

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEO DE
SEMENTES DE *Lecythis pisonis* CAMBESS (SAPUCAIA) E ESTUDO
DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA *Candida albicans*

MARIA ELIZA BRAMBILA VIEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
DEZEMBRO/2014

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEO DE
SEMENTES DE *Lecythis pisonis* CAMBESS (SAPUCAIA) E ESTUDO
DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA *Candida albicans*

MARIA ELIZA BRAMBILA VIEIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André de Oliveira Carvalho

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos – LFBM, no Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB.

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

DEZEMBRO/2014

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEO DE
SEMENTES DE *Lecythis pisonis* CAMBESS (SAPUCAIA) E ESTUDO
DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA *Candida albicans*

MARIA ELIZA BRAMBILA VIEIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Dr. Landi Veivi Guillermo Costilla, doutora em Ciências Biológicas – UNIRIO

Dr. Aline Chaves Intorne, doutora em Biociências e Biotecnologia – LFBM/UENF

Dr. Valdirene Moreira Gomes, doutora em Ciências Biológicas – LFBM/UENF

Dr. André de Oliveira Carvalho, doutor em Biociências e Biotecnologia – LFBM/UENF
(Orientador)

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

DEZEMBRO/2014

Agradecimentos

Ao meu orientador, prof. Dr. André de Oliveira Carvalho, por todos os ensinamentos, disponibilidade, serenidade, paciência e incentivo. Obrigada, sobretudo, pelo suporte nos momentos de maiores dificuldades. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grata a você por todos esses anos de orientação e convivência;

À prof^a Dr^a Valdirene Moreira Gomes por ter aceitado revisar este trabalho e por toda a contribuição para o desenvolvimento do mesmo;

Às Dr^{as} Aline Chaves Intorne, Lívia Marini Palma e Landi Veivi Guilherme Costilla, por aceitarem compor a banca examinadora;

À prof^a Ilka Maria Vasconcelos, pelo sequenciamento da região N-terminal do peptídeo;

Ao Luís e à Valéria pela manutenção do laboratório, pelo auxílio prestado e pelos momentos de descontração.

Aos alunos e funcionários do LFBM;

Aos companheiros do grupo André e do grupo Val pela ajuda, convivência e risadas compartilhadas;

Às amigas Flávia, Géssika, Júlia e Larinne que me apoiaram sempre e me fizeram companhia durante todos esses anos de LFBM. Vocês dão mais cor e alegria aos meus dias!

Às “irmãs sociais” Analiza, Denise, Marlúcia, Stela, Beatriz e Sara por tornarem meus dias mais leves e divertidos;

À Sabrina, pela amizade e companheirismo. Por estar comigo nos momentos tristes e felizes. Por ter ouvido minhas lamentações, me apoiado nos momentos mais difíceis e pelos puxões de orelha nos momentos certos. Você é o grande presente da Mãe do Céu pra mim!

Ao João, pelo amor, carinho, compreensão e companheirismo. Obrigada por confiar e acreditar em mim. Você é uma das provas sensíveis do grande amor de Deus por esta filha;

Aos primos e amigos, Fabiano e Aline, pelo apoio e, sobretudo, pelas muitas risadas que demos juntos;

Aos meus pais, João e Marcia, e à minha irmã Edwiges por todo amor, carinho, ajuda, apoio e compreensão. Eu os amo muito!

À FAPERJ e à CAPES;

À UENF;

À Deus.

Índice

Agradecimentos.....	2
Índice.....	5
Lista de figuras.....	8
Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. Introdução.....	12
1.2. Revisão de literatura.....	13
1.2.1. Peptídeos antimicrobianos.....	13
1.2.2. Peptídeos antimicrobianos de plantas.....	14
1.2.3. <i>Candida albicans</i>	20
1.2.4. <i>Lecythis pisonis</i> : Modelo de estudo.....	21
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. Material e métodos.....	26
3.1. Material biológico – obtenção e manutenção.....	26
3.1.1. Sementes.....	26
3.1.2. Leveduras.....	26

3.2. Obtenção dos peptídeos de sementes de Sapucaia.....	26
3.2.1. Extração.....	26
3.2.2. Obtenção das frações P4, F4 e F5 em coluna de fase reversa C18.....	26
3.2.3. Purificação dos peptídeos das frações F4 e F5 por recromatografia em coluna C2C18.....	27
3.2.4. Obtenção de frações peptídicas a partir da fração P4 em coluna de fase reversa C18.....	28
3.3. Quantificação das proteínas por método colorimétrico e por estimativa por comparação de bancas proteicas com um padrão.....	28
3.4. Análise do perfil proteico das frações por eletroforese.....	28
3.4.1. Preparo das amostras e condições de corrida.....	29
3.4.2. Coloração e descoloração do gel.....	29
3.5. Ensaio de inibição de crescimento.....	29
3.6. Análise da viabilidade celular.....	30
3.7. Análises por microscopia de fluorescência.....	30
3.7. 1. Teste de permeabilização da membrana plasmática.....	30
3.7.2. Análise da indução da produção de espécies reativas de oxigênio pelas células de <i>C. albicans</i>	31
3.7.3 Análise da funcionalidade das mitocôndrias das células de <i>C. albicans</i>	31
3.8. Sequenciamento da região N-terminal do peptídeo.....	31
4. Resultados.....	32
4.1. Ensaio de inibição do crescimento das células de <i>Candida albicans</i>	32
4.2. Teste de viabilidade das células de <i>C. albicans</i> tratadas com as frações F4 e	

F5.....	32
4.3. Cromatografia das frações F4 e F5 em coluna de fase reversa C2C18.....	35
4.4. Cromatografia da fração P4 em coluna de fase reversa C18.....	39
4.5. Ensaio de inibição do crescimento das células de <i>C. albicans</i>	41
4.6. Ensaio de viabilidade celular.....	42
4.7. Ensaio de inibição do crescimento das células de <i>C. albicans</i>	44
4.8. Teste de viabilidade das células de <i>C. albicans</i>	44
4.9. Teste da permeabilização de membrana	46
4.10. Análise da indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio.....	46
4.11. Análise da funcionalidade das mitocôndrias de <i>C. albicans</i>	46
4.12. Análise da sequencia do peptídeo de aproximadamente 7 kDa.....	52
5. Discussão.....	54
6. Conclusões.....	57
7. Bibliografia.....	58

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Estrutura das defensinas.....	16
Figura 2. Estrutura das LTPs.....	18
Figura 3. Estrutura das tioninas.....	19
Figura 4. Classificação botânica de <i>Lecythis pisonis</i> (sapucaia).....	22
Figura 5. Fotos de <i>Lecythis pisonis</i>	22
Figura 6. Representação esquemática de um resumo dos resultados obtidos previamente.....	24
Figura 7. Representação gráfica do ensaio de inibição do crescimento das células de <i>Candida albicans</i>	33
Figura 8. Viabilidade das células de <i>Candida albicans</i> após tratamento com as frações F4 e F5.....	34
Figura 9. Dados da cromatografia da fração F4 em coluna de fase reversa C2C18.....	36
Figura 10. Visualização eletroforética das frações B1 a B5 obtidas após cromatografia de fase reversa em coluna C2C18.....	37
Figura 11. Dados da cromatografia da fração F5 em coluna de fase reversa C2C18.....	38
Figura 12. Visualização eletroforética das frações C1 a C9 obtidas após cromatografia de fase reversa em coluna C2C18.....	39
Figura 13. Dados da cromatografia da fração P4 em coluna de fase reversa C2C18.....	40
Figura 14. Visualização eletroforética das frações obtidas após cromatografia de fase reversa da fração P4 em coluna C18.....	41
Figura 15. Representação gráfica do ensaio de inibição do crescimento das células de <i>Candida albicans</i>	42
Figura 16. Viabilidade das células de <i>Candida albicans</i> após tratamento com as frações R7 e R8.....	43
Figura 17. Representação gráfica do ensaio de inibição do crescimento das células de <i>C. albicans</i> na presença da fração R7.....	44
Figura 18. Viabilidade das células de <i>Candida albicans</i> após tratamento com a fração.....	45
Figura 19. Fotomicrografias em microscópio óptico das células de <i>Candida albicans</i> incubadas com a fração R7 e tratadas com o corante fluorescente Sytox Green para determinação da permeabilização da membrana plasmática.....	47

Figura 20. Fotomicrografias em microscópio óptico das células de <i>Candida albicans</i> incubadas com a fração R7 e tratadas com o corante fluorescente 2',7' diclorofluoresceína diacetato para determinação da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	49
Figura 21. Fotomicrografias em microscópio óptico das células de <i>Candida albicans</i> incubadas com a fração R7 e tratadas com o corante fluorescente Mitotracker green para determinação da funcionalidade mitocondrial.....	51
Figura 22. Alinhamento comparativo da sequência parcial da região N-terminal do peptídeo de 7 kDa purificado de sementes de <i>Lecithis pisonis</i> com defensinas de diferentes espécies de plantas.....	53
Tabela 1. Contagem do número de células em campos aleatórios do campo claro e fluorescência das amostras obtidas do ensaio de permeabilização de membrana.....	51
Tabela 2. Contagem do número de células em campos aleatórios do campo claro e fluorescência das amostras obtidas do ensaio de indução de espécies reativas de oxigênio.....	50
Tabela 3. Contagem do número de células em campos aleatórios do campo claro e fluorescência das amostras obtidas do ensaio de funcionalidade mitocondrial.....	51

Resumo

O uso indevido ou indiscriminado de medicamentos tem desencadeado mecanismos de resistência nos microrganismos aos vários antimicrobianos existentes no mercado. Com o aumento da resistência, surge a necessidade da pesquisa por novas substâncias para tratar infecções causadas por tais microrganismos. Nesse cenário, os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) surgem como moléculas promissoras para o desenvolvimento de novas drogas e para o uso sinérgico com drogas já existentes. Novas fontes para a obtenção desses AMPs são constantemente buscadas e diversos AMPs já foram isolados de plantas, no entanto, a prospecção de AMPs em espécies arbóreas ainda é escassa. Em *Lecythis pisonis* (sapucaia), árvore nativa brasileira, a presença de peptídeos ativos obtidos em suas sementes ainda não foi reportada. O objetivo deste trabalho foi o isolamento de AMPs que tivessem atividade inibitória sobre a levedura *Candida albicans* através de etapas cromatográficas em coluna C18 de fase reversa e estudar os mecanismos de ação dos mesmos. Uma banda homogênea na fração denominada R7 foi observada em gel de eletroforese. Ensaio de inibição de crescimento e de viabilidade mostraram que a fração R7 (10µg/mL) é capaz de inibir 38% do crescimento de *C. albicans* e inviabilizar 90% das células. Os resultados também mostram que dentro do processo de inibição do crescimento, assim como da inviabilidade das células, estão envolvidas a produção de espécies reativas de oxigênio e perda da funcionalidade das mitocôndrias das células tratadas com a referida fração. A banda proteica presente na fração R7, de aproximadamente 7 kDa, teve sua região amino-terminal sequenciada e a comparação em banco de dados mostrou que a sequência obtida é uma defensina de planta, sendo portanto, denominada de *Lp-Def1* (*Lecythis pisonis* defensin 1). Portanto este trabalho conclui-se com o primeiro AMP de sementes de *L. pisonis* pertencente à família das defensinas de plantas, o qual possui atividade inibitória sobre *C. albicans*.

Abstract

The indiscriminate or improper use of medications has triggered in the microorganisms the development of the capacity to circumvent the action of such drugs, turning them, thus, resistant to many antimicrobials available on the market. With the resistance increasing, arises the necessity to search for new substances to treat infection caused by such microorganisms. In this scenario, the antimicrobial peptides (AMPs) arise as promising raw material to the development of new drugs, as well as to the synergistic use with the already existing drugs. New sources to the obtaining of these AMPs are constantly being sought in order not only with the aim to exploit the biotechnological potential of them, but also to the comprehension of the physiological role of these molecules in the organisms. Many AMPs have been already isolated from plants, however, the AMP prospection of arboreal species is still rare. In *Lecythis pisonis* (sapucaia), native Brazilian tree, the presence of active peptides obtained from its seeds has not already been reported. The aim of this work was the isolation of AMPs, which had activity against the yeast *Candida albicans*, through two chromatographic steps in C18 reversed-phase column. One homogeneously protein band was observed in electrophoresis gel to the R7 fraction. Inhibition and viability assays showed that the fraction R7 (10µg/mL) is able to inhibit the growth and cause cell viability loss in *C. albicans*. The results showed that beneath growth inhibition and cell viability loss are the induction of reactive oxygen species and mitochondria functionality loss due to the treatment with this fraction. The protein band present in the R7 fraction, of approximately 7 kDa, had its amino-terminal region sequenced and compared to database showed that the obtained sequence is a plant defensin. Thus the peptide was called *Lp-Def1* (*Lecythis pisonis* defensin 1). In summary this work concludes with the first AMP from *L. pisonis* seeds belonging to the plant defensin family and that *Lp-Def1* has activity against *C. albicans*.

1. Introdução

Uma das grandes ameaças à saúde dos seres humanos hoje é o desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos às drogas antimicrobianas existentes no mercado. Essa resistência é ocasionada pelo uso indevido ou indiscriminado destes medicamentos e, ainda, pela má prescrição dos mesmos. Tais fatores aceleram a seleção de cepas resistentes culminando em um cenário onde bactérias e até mesmo fungos e protozoários tornam-se capazes de contornar os efeitos inibitórios dessas substâncias antimicrobianas usadas para combatê-los (Demain e Sanchez, 2009).

Entre estes patógenos estão as leveduras do gênero *Candida*, especialmente a espécie *C. albicans*. Em geral estas leveduras são organismos comensais que por algum desequilíbrio na relação com o hospedeiro humano se tornam organismos patogênicos oportunistas. Estes casos ocorrem principalmente em situações de comprometimento do sistema imune como idade avançada, imunossupressão devido a tratamento de câncer, transplantes e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*), tendo sido observada em casos de queimaduras, cirurgia invasiva e internamento prolongado em unidades de tratamento intensivo. A infecção pode variar de desordens de pele e mucosas até micoses invasivas que afetam órgãos internos. Adicionalmente a este cenário, tem sido relatados casos de linhagens clínicas de *C. albicans* resistentes aos antifúngicos como anfotericina B e fluconazol (Sanglard et al., 2003; Passos et al., 2005; Pfaller e Diekema, 2007).

Com o aumento da resistência entre estes microrganismos surge a necessidade de novos tratamentos para as infecções causadas por eles. Pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de encontrar substâncias alternativas para o desenvolvimento de novas drogas. Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) tem se destacado devido a sua capacidade de permeabilizar a membrana dos microrganismos, o que faz com que essas moléculas não apenas tenham o potencial como matéria-prima para o desenvolvimento de novas drogas, mas também o tenham para serem utilizadas de forma sinérgica com outras drogas (Aoki e Ueda, 2013).

O potencial biotecnológico dos AMPs tem levado os pesquisadores a buscarem novas fontes para a obtenção de tais moléculas, podendo estes serem isolados de microrganismos, insetos, plantas e mamíferos.

As plantas consistem uma importante fonte de novos AMPs. Muitos destes vêm sendo descritos, principalmente de espécies cultivadas e com importância econômica. Estes AMPs, além da atividade antimicrobiana, podem ainda desempenhar papéis na defesa da planta contra o ataque de insetos e herbívoros e na resistência a estresses ambientais (Cândido *et al.*, 2014). Apesar da importância destas moléculas para estes organismos e para as pesquisas dos antimicrobianos, poucos estudos vêm sendo realizados com espécies arbóreas de algum interesse econômico. Assim, a prospecção nessas novas espécies faz-se necessária.

1.2.Revisão da literatura

1.2.1. Peptídeos antimicrobianos

Os AMPs são componentes da resposta imune inata e estão presentes em todos os organismos vivos (Wu, 1999; Maróti *et al.*, 2011). Eles compartilham características comuns, tais como baixo peso molecular (menos de 10 kDa), carga líquida positiva em pH fisiológico, devido a presença de múltiplos resíduos de aminoácidos carregados positivamente (lisina e arginina) e caráter anfipático. Estas características tem influência direta no modo de ação dos mesmos sobre os microrganismos. Estes são, ainda, tolerantes a solventes orgânicos e termoestáveis. Tal estabilidade é conferida pela presença de múltiplas pontes dissulfeto, sendo esta uma das características destas moléculas. Estes AMPs são ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e, até mesmo, células tumorais (Giuliane *et al.*, 2007; Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

O modo de ação dos AMPs envolve inicialmente, atração pelas cargas negativas de estruturas (parede e/ou membrana) dos microrganismos. Estas interações eletrostáticas constituem o primeiro passo do processo de associação entre os AMPs e a camada externa da membrana dos microrganismos e permite a inserção destas moléculas na interface membranar. Esta inserção resulta na permeabilização da membrana plasmática promovendo o extravasamento do conteúdo citoplasmático ou o direcionamento do AMP para alvos intracelulares (Wu *et al.*, 1999; Giuliane *et al.*, 2007).

Em mecanismos que não envolvem o rompimento da membrana, os AMPs são capazes de passar através desta e em seguida dissociarem-se da mesma. A inibição,

nestes casos, pode ocorrer devido à ligação de tais peptídeos à moléculas de DNA e RNA, ao estímulo da produção de enzimas autolíticas por parte dos mesmos ou à inibição de outros processos celulares como a síntese de DNA e de proteínas (Wu *et al.*, 1999; Giuliane *et al.*, 2007).

Os AMPs são encontrados em todos os organismos (Wu, 1999; Maróti *et al.*, 2011) sendo que suas funções não se limitam apenas à defesa contra microrganismos. Em mamíferos, por exemplo, eles atuam na inflamação, no reparo de feridas e na regulação do sistema imune adaptativo (Wu, 1999).

1.2.2. Peptídeos antimicrobianos de plantas

Assim como os animais, as plantas possuem um eficiente sistema de defesa capaz de responder ao ataque de patógenos. Os mecanismos por elas utilizados envolvem barreiras físicas tais como tricomas, cutículas e parede celular, barreiras químicas não proteicas, como terpenóides e alcalóides (Dixon, 2001) e barreiras químicas proteicas, como proteínas e peptídeos. Estas barreiras ainda podem ser subdivididas em pré formadas, quando estas ocorrem na planta antes do ataque de patógenos e pós formadas quando estas ocorrem nas plantas apenas após o ataque de patógenos (van Loon *et al.*, 2006). Em relação à expressão, os AMPs são constitutivamente expressos em sementes e em células periféricas de órgãos reprodutivos, flores e frutos. Em relação a órgãos vegetativos sua expressão é, geralmente, induzida mediante infecção ou ferimento, sendo que sua indução pode ser ainda local ou sistêmica (Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

As famílias, especialmente representativas dos AMPs, são capazes de inibir o desenvolvimento de patógenos através da interação com a membrana destes, causando um distúrbio em sua integridade (Odintsova e Egorov, 2012). Dentre uma das mais estudadas famílias de AMPs estão as defensinas de plantas. Elas são ubíquas no reino vegetal sendo estreitamente relacionadas, estruturalmente e funcionalmente, com AMPs encontrados em fungos, insetos, invertebrados e mamíferos, que coletivamente formam a superfamília das defensinas. As defensinas de plantas possuem entre 45 a 54 resíduos de aminoácidos, apresentando peso molecular de, aproximadamente, 6 kDa (Giuliani *et al.*, 2007; Benko-Iseppon *et al.*, 2010) (Figura 1A). A estrutura tridimensional destas moléculas consiste em três folhas- β antiparalelas e α -hélice paralela às folhas- β (Figura 3B). Essa estrutura é estabilizada por quatro pontes dissulfeto formadas por oito

cisteínas estritamente conservadas, sendo que já foram caracterizadas duas defensinas que constituem exceção a esta estrutura comum, a *Ph-D1* que contem uma ponte dissulfeto adicional, e *Vr-D1* que contem uma hélice do tipo 3_{10} entre a primeira folha- β e α -hélice. Dentro desta estrutura existem duas regiões estruturais conservadas chamadas de região $\alpha\beta$ estabilizada por cisteínas e γ -core. Apesar destas regiões conservadas estruturalmente, no nível da estrutura primária as defensinas de plantas são bastante variáveis (Figura 1A). As pontes dissulfeto conferem a estes peptídeos estabilidade em diversas condições fisiológicas tais como pH entre 4 e 10, temperatura de 0 a 90 °C e resistência a digestão proteolítica por tripsina (Carvalho e Gomes, 2011; Cândido, *et al.*, 2014). A grande variação na estrutura primária (Figura 1A) confere pequenas variações na estrutura terciária e estas variações na estrutura podem explicar a diversidade de atividade biológicas descritas para as defensinas de plantas (van der Weeden e Anderson, 2013)). Já foram descritas as atividade de resposta da planta a estresses abióticos cooperando no processo de tolerância ao frio e à metais pesados e principalmente a estresses bióticos, desempenhando um papel fundamental na defesa contra bactérias e fungos, sendo estas também uma das atividades melhor estudadas (Terras *et al.*, 1992; Thevissen *et al.*, 1999; Carvalho e Gomes, 2011).

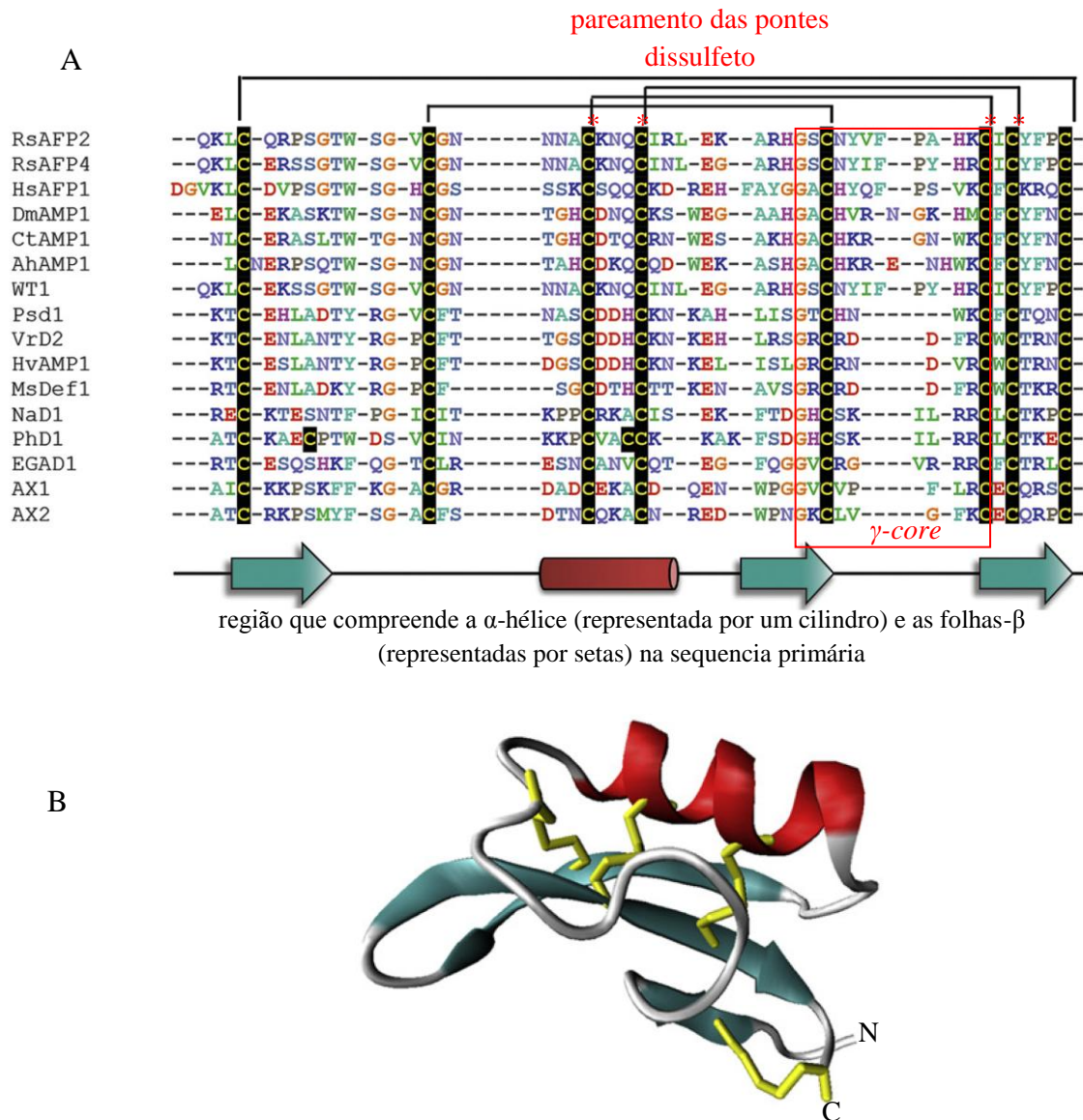


Figura 1. Estrutura da defensinas. (A) Alinhamento de resíduos de aminoácidos da sequência madura de diversas defensinas de plantas como indicado: *R*s-AFP2 e *R*s-AFP3, de *Raphanus sativus*; *H*s-AFP1, de *Heuchera sanguinea*; *D*m-AMP1, de *Dahlia merckii*; *C*tAMP1, de *Clitoria ternatea*; *A*hAMP1, de *Aesculus hippocastanum*; *W*T1, de *Wasabi japonica*; *P*s-d1, de *Pisum sativum*; *V*r-D2, de *Vigna radiata*; *H*v-AMP1, de *Hardenbergia violacea*; *M*s-Def1, de *Medicago sativa*; *N*a-D1, de *Nicotiana glauca*; *P*h-D1, de *Petunia hybrida*; *E*GAD1, de *Elaeis guineensis*; *A*X1 e *A*X2, de *Beta vulgaris*. (*) pontes dissulfeto que formam a região $\alpha\beta$ estabilizada por cisteínas. (-) espaços foram introduzidos para maximizar o alinhamento. Os resíduos de aminoácidos são indicados no seguinte padrão de cores, de acordo com suas propriedades, verde = hidrofóbicos, azul claro = polares, azuis = básicos, vermelhos = ácidos, laranjas = glicinas, cinzas = prolina, roxo = histidinas. (B) Representação esquemática da estrutura tridimensional da defensina de *Raphanus sativus* (rabanete) *R*s-AFP1 mostrando em vermelho a α -hélice e em cinza esverdeado as folhas- β . As quatro pontes dissulfeto formada entre os oito resíduos de cisteínas

conservados são mostrados em amarelo. N e C indicam a região N e C-terminal, respectivamente (Adaptado de van der Weeden e Anderson, 2013).

Uma outra família bastante representativa dos AMPs estudadas são as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs, do inglês *lipid transfer proteins*). Estas foram originalmente descobertas e nomeadas pela ideia de que o transporte de lipídeos entre as membranas celulares, por exemplo, do local de síntese para a membrana receptora final, envolvesse um fator que facilitaria o transporte de moléculas lipídicas no ambiente hidrofílico do citoplasma. Devido a esta habilidade de se ligar e transportar lipídeos estes peptídeos receberam o nome de LTP (Kader, 1996). Anos mais tarde descobriu-se que este peptídeo também tinha atividade inibitória sobre microrganismos e por esta atividade este peptídeo foi relacionado com a resposta de defesa de plantas (Kader, 1996). Atualmente as LTPs são subdivididas em duas famílias. As proteínas da família LTP1 tem aproximadamente 10 kDa, oito resíduos de cisteína em posições conservadas e ponto isoelétrico entre 9 e 10. As da família LTP2 são menores tendo, aproximadamente, 7 kDa, quatro pontes dissulfeto conservadas e pI também entre 9 e 10. Ambas possuem padrões conservados de oito resíduos de cisteína que estabilizam a estrutura. Este padrão de pareamento dos resíduos de cisteínas é diferente entre as duas famílias como mostrado na figura 2 A. A estrutura das LTPs de ambas as famílias é dominado por α -hélices, sendo quatro α -hélices nas LTPs1 e três α -hélices e duas voltas simples nas LTPs2. Para ambos os peptídeos destaca-se na estrutura tridimensional uma cavidade interna hidrofóbica que corresponde ao sítio de ligação de lipídios, sendo que nas LTPs1 esta apresenta forma de um túnel com duas aberturas, uma maior e outra menor. Já as LTPs2 esta cavidade é em forma de uma caixa triangular, no entanto, ela é mais flexível permitindo a ligação de moléculas lipídicas maiores do que é possível para as LTPs1 (Figura 2 B-E) (Benko-Iseppon *et al.*, 2010; Cândido *et al.*, 2014). Tais proteínas, especialmente as da família LTP1, estão presentes na parede celular de diversas espécies vegetais. Devido a atividade de transporte de lipídeos associado à estudos de expressão e localização as LTPs1 estão associadas à diversas atividade biológicas em plantas como: formação da cutícula, embriogênese, estabelecimento de relações simbióticas e, juntamente com as defensinas, da adaptação das plantas a várias condições ambientais (Kader, 1996; Castro e Fontes, 2005; Kido *et al.*, 2010; Pii *et al.*, 2012). Adicionalmente a atividade antimicrobiana é a segunda atividade melhor

entendida, sendo a de ligação e transporte de lipídeos a que mais se entende a relação estrutura-função nesta família de AMPs de plantas.

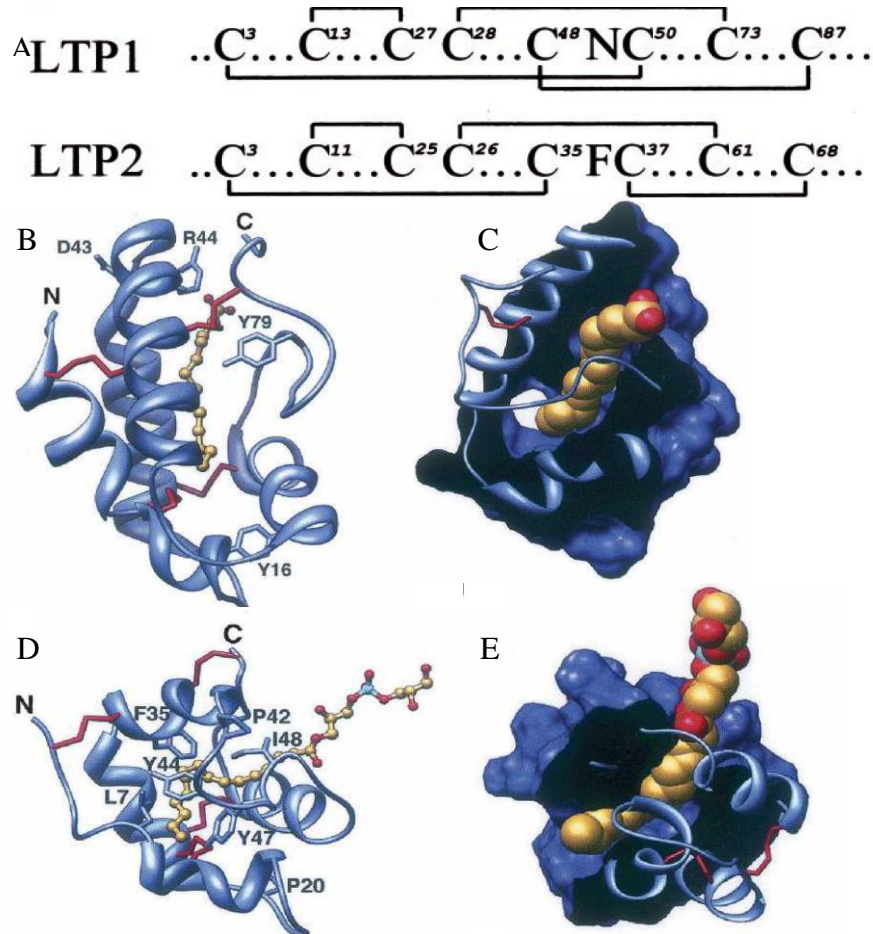


Figura 2. Estrutura das LTPs. (A) Estrutura primária das famílias das LTP1 e das LTP2 em representação simplificada, sendo os aminoácidos são representados por (•), as cisteínas são indicadas pela letra C e as pontes dissulfeto pelas linhas, onde se destaca os resíduos de cisteínas e os arranjos das pontes dissulfeto entre as duas famílias de LTPs. N representa resíduos de aminoácidos hidrofílicos e F os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Adaptado de Samuel *et al.*, 2002). (B) Modelagem representativa das LTPs1, mostrando a LTP1 de *Oryza sativa* ligada ao ácido mirístico, onde se destacam as quatro α -hélices e as pontes dissulfeto em vermelho. (C) Mesma modelagem que em (B) sendo o modelo preenchido e com um corte mostrando a cavidade hidrofóbica ocupada com o ácido mirístico. (D) Modelagem representativa das LTPs2, mostrando a LTP2 de *Triticum aestivum* ligada à L- α -palmitoil-fosfatidilglicerol, onde se destacam as três α -hélices e as pontes dissulfeto em vermelho. (E) Mesma modelagem que em (D) sendo o modelo preenchido e com um corte mostrando a cavidade hidrofóbica ocupada com o L- α -palmitoil-fosfatidilglicerol (Adaptado de Yeats e Rose, 2008).

As tioninas, outra família a qual apresenta função antimicrobiana representativa são peptídeos básicos, com ponto isoelétrico maior que 8, de 5 kDa, ricos em arginina, lisina e cisteína, sendo este último encontrado em números de 6 ou 8 resíduos e em posições conservadas (Figura 3 A). Possuem uma estrutura característica em forma da letra “L” composta por duas α -hélices e 2 folhas- β (Figura 5 B). Apresentam efeitos tóxicos contra bactérias, fungos e células animais e vegetais, possuem atividade como tiorredoxinas o que confere a estes peptídeos funções como proteínas reguladoras. Alguns representantes deste grupo podem ligar-se ao DNA e protegê-lo contra desnaturação térmica. Nas sementes, as tioninas ainda funcionam como proteínas de armazenamento sendo importantes fontes de enxofre (Castro e Fontes, 2005; Benko-Iseppon *et al.*, 2010;).

A β -hordothionin KSCCRSTLGRNCYNLCRVRGAQK-LCANACRCKLTSGLSCPKGFPK
 α -hordothionin KSCCRSTLGRNCYNLCRVRGAQK-LCAGVCRCKLTSTGSCPFGFPK
 crambin TTCCPSIVARSNFNVCRLPGTPEALCATYTGCIIPGATCPGDYAN



B



Figura 3. Estrutura das tioninas (A) Alinhamento da estrutura primária de α -tioninas e β -tioninas e abaixo da sequência é mostrado o padrão de três e quatro pontes dissulfeto (Adaptado de Romagnoli *et*

al., 2003). (B) Representação da estrutura terciária da β -purotionina mostrando a característica forma “L” e as duas α -hélices e duas folhas- β . Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos são mostrados se projetando das α -hélices (Adaptado de Clifton *et al.*, 2011).

Além dos AMPs citados acima, diversos outros AMPs já foram isolados de plantas, principalmente de sementes, como peptídeos ricos em glicina, snakinas, seferdinas, ciclotídeos, peptídeo básico de milho-1, peptídeos de *Impatiens balsamina* e *Mirabilis jalapa* (Cammue *et al.*, 1992; Duvick *et al.*, 1992; Patel *et al.*, 1998; Segura *et al.*, 1999; Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; Daly *et al.*, 2009).

Muitos destes AMPs de plantas apresentam atividade contra patógenos de humanos como diferentes espécies de *Candida* (Ribeiro *et al.*, 2007; Thevissen *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2011; Zottich *et al.*, 2011). Neste contexto estes AMPs têm sido cotados como possíveis novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças fúngicas.

1.2.3. *Candida albicans*

As leveduras do gênero *Candida* são organismos cosmopolitas que se reproduzem, principalmente, de forma assexuada por brotamento sendo, em sua maioria, saprofitas. Algumas espécies estão associadas à infecções em humanos onde *C. albicans* representa o principal patógeno e está amiúde associado a outras doenças (Castro *et al.*, 2006). A capacidade de alternar entre as formas de levedura e hifa está relacionada à sua patogenicidade (Molero *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2006). Esta transição de forma pode ser induzida *in vitro* por mudanças ambientais, como alteração de pH e temperatura ou diferença em componentes como N-acetilglicosamina e prolina (Molero *et al.*, 1998).

C. albicans é uma espécie de fungo diploide, dimórfica, que habita, de forma comensal, as mucosas do trato gastrointestinal e das cavidades oral e vaginal de animais, incluindo humanos. De um modo geral os fungos do gênero *Candida* são os mais importantes causadores de micoses oportunistas ao redor do mundo (Pfaller e Diekma, 2007). À candidemia são conferidas taxas de mortalidade de 10 a 49%. Esta infecção ocorre, principalmente, em pacientes que passam por longos períodos de hospitalização submetidos a tratamentos com antibióticos, à tratamentos com imunossupressores ou à tratamentos invasivos. A alta taxa de mortalidade observada é

devido ao complicado diagnóstico da doença bem como o alto custo do tratamento. Embora um aumento em candidemias não-albicans venha sendo observado, *C. albicans* é, ainda, o principal causador dos episódios de candidemia relatados, sendo responsável por cerca de 60 – 70% dos casos de infecção (Barbedo e Sgarbi, 2010; Playford *et al.*, 2010). Candidemia é especialmente prevalente em pacientes imunocomprometidos, tais como os transplantados, neutropênicos e vítimas da AIDS. Esta pode variar de micoses superficiais ou invasivas com ocorrência em diversos sítios anatômicos, podendo ser divididas em cutâneo-mucosas, sistêmicas e alérgicas (Barbedo e Sgarbi, 2010; Giolo e Svidzinski, 2010).

1.2.4. *Lecythis pisonis*: Modelo de Estudo

Lecythis pisonis Cambess (sapucaia) é uma espécie de origem amazônica e pertencente à família das Lecitidáceas (Figura 4). Esta espécie ocorre naturalmente desde o estado do Ceará até o estado do Rio de Janeiro, na Floresta Pluvial Atlântica e é bastante utilizada na restauração de áreas degradadas. Sua ocorrência é mais frequente no sul da Bahia e no norte do Espírito Santo. Esta é uma árvore de grande porte, podendo alcançar 30 m de altura e sua madeira é utilizada na construção civil e naval. O florescimento desta espécie ocorre de setembro a outubro, podendo se estender dependendo da região, e suas flores são arroxeadas e distribuem-se de maneira racemosa, podendo conter de 2 a 25 flores por inflorescência. Junto com o florescimento ocorre o aparecimento das novas folhas, cujas cores podem ser rosa ou lilás (Lorenzi, 2002) (Figura 5A e B).

O fruto tem formato arredondado, possuem casca rígida e espessa. Quando maduros, ocorre o fendilhamento em formato arredondado na parte inferior, semelhante a uma tampa, por onde as sementes são liberadas. Devido a estas características, *L. pisonis* é também conhecida como cumbuca-de-macaco (Lorenzi, 2002; Souza *et al.*, 2008) (Figura 5C e D).

As sementes da *L. pisonis* (Figura 5 D) são utilizadas como alimento sendo muito ricas em lipídios, o que lhes confere caráter oleaginoso, e em proteínas. Dentre os ácidos graxos presentes no óleo da semente predomina-se o ácido linoléico, ácido graxo essencial para a alimentação humana. Suas sementes também apresentam um alto teor de vitamina C quando comparadas a sementes de espécies da mesma família e são, ainda, fontes razoáveis de vitamina B1 e B2 (Valillo *et al.*, 1999). *L. pisonis* é, ainda,

empregada na medicina popular. A casca das árvores é utilizada no tratamento de diarreia e a folha é utilizada como diurético e em banhos para coceira (Braga *et al.*, 2007; Franco e Barros, 2006

Domínio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Viridiplantae</i>
Filo	<i>Streptophyta</i>
Classe	<i>Asterids</i>
Ordem	<i>Euricales</i>
Família	<i>Lecythidaceae</i>
Gênero	<i>Lecythis</i>
Espécie	<i>Lecythis pisonis</i>

Figura 4. Classificação botânica de *Lecythis pisonis* (sapucaia) (Dados obtidos do *Taxonomy Browser* do *National Center for Biotechnology Information*, *Taxonomy ID 372758*).

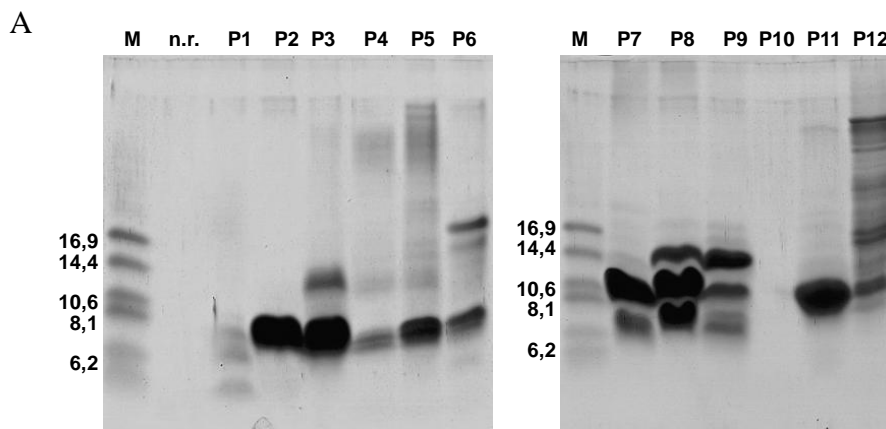


Figura 5. Fotos de *Lecythis pisonis* mostrando a árvore (A), detalhe da inflorescência (B), detalhe do fruto imaturo e das folhas novas que apresentam coloração rosada (C) e do fruto maduro já fendilhado e com a exposição das sementes (D) (Fotos: Google images).

O estudo de AMPs em espécies arbóreas é raramente realizado. Poucos exemplos são restritos às espécies que detêm algum interesse econômico como *Pinus silvestries* (Kovaleva *et al.*, 2009), *Elaeis guineesins* (palma africana) (Tregear *et al.*, 2002), *Prunus persica* (pêssego) (Botton *et al.*, 2002; Wisniewski *et al.*, 2003) e *Ginkgo biloba* (Shen *et al.*, 2005). Neste sentido a prospecção de AMPs a partir de *L. pisonis* é importante não só pelos motivos já expostos, como também pelos aspectos da ciência básica dada pela descoberta de AMPs nesta espécie arbórea, além da caracterização de sua atividade biológica, que adicionalmente agregaria valor a uma planta da flora brasileira, incentivando a conscientização de seu manejo sustentável e conservação.

Em um trabalho prévio foi obtido um extrato peptídico a partir da extração ácida da farinha de cotilédones de *L. pisonis*. Este extrato foi separado, em coluna de fase reversa C18, em 13 frações denominadas de NR, para a fração não retida, e P1 a P12 (Figura 6A) para as frações retidas e eluídas de acordo com sua ordem de eluição em gradiente de 2-propanol. Todas as frações obtidas foram submetidas ao ensaio de inibição do crescimento usando *Candida albicans*. A fração P4 foi a fração que apresentou o maior efeito de inibição do crescimento de *C. albicans* (Figura 6B) e adicionalmente o teste de viabilidade mostrou que o efeito inibitório era devido à atividade fungicida. Esta fração foi então selecionada para uma nova etapa de purificação em coluna C18 com um novo gradiente, expandindo a concentração de propanol em que o P4 foi eluído. Um total de cinco frações foi coletado e três apresentaram bandas proteicas (Figura 6C)) (Vieira, 2012).

Portanto a partir das informações mencionadas acima, de não haver descrição de AMPs em *L. pisonis* e do possível papel de AMPs no controle de infecções fúngicas causadas por patógenos oportunistas, como do gênero *Cândida*, o objetivo geral do trabalho foi investigar a presença de AMP nesta espécie arbórea da flora brasileira e examinar sua atividade sobre *C. albicans*.



B

C

Figura 6. Representação esquemática de um resumo dos resultados obtidos previamente (Vieira, 2012), mostrando o perfil proteico das frações obtidas da extração proteica da semente de *Lecythis pisonis* em gel de tricina (A), o ensaio antimicrobiano mostrando as frações que foram capazes de inibir o crescimento da levedura *Candida albicans* (B) e as frações obtidas da segunda etapa cromatográfica a partir da fração P4 em gel de tricina (C).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Purificar e caracterizar os peptídeos da fração 4 previamente obtida da extração ácida da farinha de cotilédones de *L. pisonis* (Vieira, 2012) e estudar a inibição causada por tais peptídeos sobre *Candida albicans*.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Purificar AMPs contidos na fração P4, previamente obtida de sementes de *L. pisonis*;
- 2) Selecionar o AMP desta fração com maior atividade inibitória sobre o crescimento da levedura *C. albicans*;
- 3) Analisar a viabilidade das células de *C. albicans* após tratamento com o AMP selecionado;
- 4) Determinar o modo de ação do peptídeo selecionado analisando a permeabilização de membrana, indução de espécies reativas de oxigênio e perda da funcionalidade mitocondrial na levedura *Candida albicans*;
- 5) Caracterizar a estrutura primária do AMP selecionado.

3. Material e Métodos

3.1. Material biológico - obtenção e manutenção

3.1.1. Sementes

Sementes de *Lecythis pisonis* Cambess (sapucaia) foram coletadas em campo no município de São José de Ubá – RJ, nos períodos de agosto e setembro de 2010 a 2012 e armazenadas em frascos fechados a temperatura ambiente.

3.1.2. Leveduras

A Cepa de *Candida albicans* (CE022) foi obtida do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. As cepas são mantidas em placas de petri contendo ágar Sabouraud (Peptona de caseína 5,0 g/L; peptona de carne 5g/L, dextrose 40,0 g/L; agar 15,0 g/L - Merck) e repicadas trimensalmente.

3.2. Obtenção dos peptídeos de sementes de Sapucaia

3.2.1. Extração

A extração foi realizada segundo o método descrito por Egorov *et al.* (2005), com modificações no volume de éter de petróleo utilizado. As sementes foram abertas, descascadas e somente o cotilédone foi utilizado. Um total de 0,5 g foi macerado em nitrogênio líquido até a transformação deste em um pó bem fino. Em seguida deu-se a deslipidação da farinha de cotilédone em éter de petróleo na proporção de 1:30 (p/vol) sob agitação constante por 1 h a 4 °C. O éter foi descartado e substituído pela solução de extração (1% de TFA (do inglês *trifluoroacetic acid*), 1 M de HCl, 5% de ácido fórmico, 1% de NaCl) na proporção de 1:4 (p/vol), sendo submetido a mais 1 h de agitação a 4 °C. Após este período a solução foi centrifugada a 18.000 x g por 10 min (Mikro 200R, Hettich) e a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e filtrado (Millex-GV, PVDF, 0,22 µm) e submetidas à cromatografia de fase reversa para a obtenção da fração P4 previamente identificada (Vieira, 2012).

3.2.2. Obtenção das frações P4, F4 e F5 em coluna de fase reversa C18

Para a purificação do extrato bruto obtido no processo de extração foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (Shim-pack VP-ODA 250Lx4.6, Shimadzu) acoplada a

uma coluna guarda C8 (Pelliguard, Sigma). A cromatografia de fase reversa caracteriza-se pela capacidade de reter moléculas apolares. Essas moléculas são posteriormente eluídas em um solvente orgânico. Assim, a coluna foi equilibrada com 0,1% de TFA. O extrato bruto filtrado foi diretamente aplicado na coluna de fase reversa. A corrida foi feita a um fluxo de 0,6 mL/min e temperatura 38 °C em sistema de HPLC (Prominence, shimadzu). A eluição das proteínas retidas na coluna foi dada em um gradiente de 2-propanol (Lichrosolv, Merck) segundo a metodologia de Segura *et al.* (1993) montado da seguinte maneira: 0-8 min, 100% do solvente A (TFA 0,1% em água ultra pura); 8-18 min, 15% do solvente B (TFA 0,1% em 2-propanol 100%); 18-60 min, 34% de B; 60-66 min, 65% de B; 66,01 min, 0% de B e a corrida encerrada em 75 min. As frações obtidas foram liofilizadas (Liofilizador K105, LIOTOP) e analisadas por eletroforese em gel de tricina. Das frações obtidas, a fração previamente identificada como P4 foi selecionada para a obtenção das frações F4 e F5 também identificadas em um trabalho anterior (Vieira, 2012).

Para a obtenção das frações F4 e F5, a fração P4 foi submetida à nova cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Shim-pack VP-ODA 250Lx4.6, Shimadzu), acoplada a uma coluna guarda C8 (Pelliguard, Sigma). Foi utilizado o gradiente: 0-8 min; 100% do solvente A (TFA 0,1% em água ultra pura); 8-20 min, 10% do solvente B (TFA 0,1% em 2-propanol 100%); 20-80 min, 20% de B; 80-83 min, 50% de B; 83-84 min, 50% de B; 84,01 min, 0% de B, a um fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 38°C. A corrida foi encerrada em 90 min. As frações F4 e F5 foram coletadas e submetidas à nova cromatografia.

3.2.3. Purificação dos peptídeos das frações F4 e F5 por recromatografia em coluna C2C18

As frações F4 e F5 foram submetidas à cromatografia em coluna C2C18 (μ RPC C2/C18 ST 4.6/100, GE HealthCare). Um novo gradiente foi montado tendo como base a concentração de propanol em que as frações F4 e F5 foram inicialmente eluídas na coluna C18. Por serem eluídas em concentrações próximas de 2-propanol, ambas foram submetidas ao mesmo gradiente que foi: 0-8 min; 100% do solvente A (TFA 0,1% em água ultra pura); 8-20 min, 7% do solvente B (TFA 0,1% em 2-propanol 100%); 20-140 min, 16% de B; 143 min, 50% de B; 144 min, 50% de B; 144,01 min, 0% de B,

sendo a corrida encerrada em 150 min. Este método foi utilizado para a purificação de ambas as frações.

As frações obtidas em ambas as cromatografias foram concentradas e analisadas por eletroforese em gel de tricina (Shägger e von Jagow, 1987).

Devido à baixa concentração de peptídeos obtida nas frações, modificações na metodologia de purificação da fração P4 foram realizadas.

3.2.4. Obtenção de frações peptídicas a partir da fração P4 em coluna de fase reversa C18

Com o objetivo de minimizar a perda de amostra decorrente de várias etapas cromatográficas, foram realizadas modificações na metodologia de purificação da fração P4 descrita por Vieira (2012). A fração P4 foi submetida à uma nova cromatografia na coluna de fase reversa C18 (Shim-pack VP-ODA 250Lx4.6, Shimadzu) acoplada a uma coluna guarda C8 (Pelliguard, Sigma). A corrida foi realizada a um fluxo mais baixo, de 0,3 mL/min e temperatura 39 °C em sistema de HPLC (Prominence, shimadzu). A eluição das frações proteicas retidas na coluna foi feita em um gradiente de 2-propanol mais extenso. O gradiente desta nova corrida foi o seguinte: 0-8 min; 100% do solvente A (TFA 0,1% em água ultra pura); 8-27 min, 13% do solvente B (TFA 0,1% em 2-propanol 100%); 27-140 min, 20% de B; 143 min, 50% de B; 144 min, 50% de B; 144,01 min, 0% de B, sendo a corrida encerrada em 150 min.

As frações obtidas nesta cromatografia foram concentradas e analisadas por eletroforese em gel de tricina (Shägger e von Jagow, 1987).

3.3. Quantificação das proteínas por método colorimétrico e por estimativa por comparação de bancas proteicas com um padrão

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando-se o ácido bicinconínico (Sigma) segundo a metodologia descrita pelo fabricante. Ovalbumina (Sigma) foi utilizada como proteína padrão. A quantificação foi feita, também, por comparação visual das bandas proteicas de interesse com um padrão feito com uma curva com concentrações conhecidas de lisozima (Sigma) em gel de eletroforese em tricina (Shägger e von Jagow, 1987).

3.4. Análise do perfil proteico das frações por eletroforese

Os picos coletados na cromatografia de fase reversa foram visualizados por eletroforese em gel de tricina (SDS-Tricina-PAGE) segundo método descrito por Shägger e von Jagow (1987). Para a montagem dos géis foram utilizadas placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores e pentes de 0,75 mm e o aparato Mini protean II tetra system (BioRad). Como padrão de massa molecular foi usado o marcador MW-SDS-17S (Sigma) composto das seguintes proteínas: mioglobina (16.950 Da), mioglobina I + II (14.400 Da), mioglobina I + III (10.600 Da), mioglobina I (8.160 Da), mioglobina II (6.200 Da), glucagon (3.400 Da) e mioglobina III (2.500 Da)

3.4.1. Preparo das amostras e condições de corrida

As amostras referentes aos picos obtidos foram ressuspendidas em água e a tiveram seu conteúdo proteico quantificado como descrito no item 3.3. Dez microgramas de cada amostra foram misturados ao tampão de amostra (2% de SDS, 10% de sacarose, 0,25% de azul de bromofenol, 0,1 M de Tris HCl, pH 8,0) e à β -mercaptoetanol (5%). A mistura foi aquecida a 100 °C por 5 min e centrifugada a 18.000 x g por 3 min. Em seguida as amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese sob condições desnaturantes. A corrida foi feita com tampão do catodo contendo 0,1 M de Tris, 0,1 M de Tricina, 0,1% de SDS e tampão anodo contendo 0,2 M de Tris (pH 8,9).

3.4.2. Coloração e descoloração do gel

Terminada a corrida, o gel foi retirado das placas de vidro e colocado em solução corante de Coomassie Blue R (0,5%) por, aproximadamente, 30 min. A descoloração foi realizada por uma solução descorante (10% de ácido acético e 30% de metanol em água destilada). O gel foi mantido em solução até a visualização das bandas protéicas e, posteriormente, armazenado em água.

3.5. Ensaio de inibição de crescimento

Células de *C. albicans* foram crescidas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud a 30 °C por 24 h. Uma colônia foi ressuspendida em meio Sabouraud líquido (peptona de carne 5 g/L; peptona de caseína 5g/L, Dextrose 20 g/L) e em seguida foi realizada a contagem das células em Câmara de Neubauer (0,0025 mm², Optik Labor). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços onde foi depositado um total 2.000 células por mL em meio Sabouraud sendo o volume final do ensaio de 100 μ L. As amostras

obtidas do processo de purificação foram esterilizadas por filtração (Millex-GV 0,22 µm, Millipore) e adicionadas ao meio com células em concentrações de 10 e 30 µg/mL. O acompanhamento foi realizado medindo-se a absorbância através de um leitor de microplacas a 620 nm. As leituras foram realizadas a cada 6 horas, com exceção dos períodos noturnos, por 36 h. As porcentagens de inibição foram calculadas considerando o controle como 100% de crescimento (Broekaert *et al.*, 1990).

3.6. Análise da viabilidade celular

A viabilidade das células foi avaliada através da formação de colônias em placas de Petri após ensaio de inibição do crescimento. As células foram quantificadas com auxílio de uma câmara de Neubauer e um total 150 células foi semeado em ágar Sabouraud. A contagem foi feita para as células do controle e a mesma diluição realizada nestas foi utilizada para as células tratadas com o peptídeo. O número de colônias obtidas no controle foi considerado como 100% de viabilidade (Vermelho *et al.*, 2006).

3.7. Análises por microscopia de fluorescência

Todas as análises de fluorescência foram feitas no microscópio Axio Imager. A2, Zeiss, equipado com um conjunto de filtros para a detecção de fluoresceína (excitação 450-490 nm; emissão 500 nm). Imagens de campo-claro e fluorescência foram obtidas a partir de uma câmera digital acoplada ao microscópio (AxioCam MRc 5, Zeiss) através do *software* AxioVision (versão 4.8.2, Zeiss). Todas as imagens foram capturadas com o mesmo tempo de exposição.

Fotos de vários campos foram tiradas aleatoriamente e o número de células do controle assim como das amostras tratadas foram contadas nas fotos de campo claro e fluorescência (n=5). A partir destes dados a porcentagem de células fluorescentes foi determinado considerando o total de células das respectivas imagens de campo claro das amostras como 100%.

3.7.1. Teste de permeabilização da membrana plasmática

A avaliação da permeabilização da membrana foi realizada com a utilização do corante Sytox green (Molecular Probes) segundo o método descrito por Thevissen *et al.* (1999) com modificações. Após o ensaio de inibição do crescimento, as células foram

ressuspendidas e uma alíquota foi incubada, ao abrigo da luz, com o corante por 15 min a uma concentração de 0,5 μ M. Após o período de incubação, as células foram transferidas para lâminas tratadas com poli-L-lisina 0,1% e observadas ao microscópio óptico.

3.7.2. Análise da indução da produção de espécies reativas de oxigênio pelas células de *C. albicans*

A indução da produção de ROS pelas células de *C. albicans* foi analisada de acordo com a metodologia descrita por Aerts *et al.* (2007) com modificações. Após o ensaio de inibição do crescimento, as células foram ressuspendidas e uma alíquota foi incubada, ao abrigo da luz, por 15 min com o corante fluorescente 2',7' diclorofluoresceína diacetato (Sigma) a uma concentração de 20 μ M, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante e em seguida transferidas para lâminas tratadas com poli-L-lisina 0,1% e observadas ao microscópio óptico.

3.7.3. Análise da funcionalidade das mitocôndrias das células de *C. albicans*

A funcionalidade mitocondrial foi analisada com o uso do corante fluorescente Mitotracker green (Molecular Probes). Após 36 h de crescimento, as células provenientes do ensaio de inibição, foram ressuspendidas e uma alíquota foi incubada com o corante por 15 min a uma concentração de 1 nM, e em seguida transferidas para lâminas tratadas com poli-L-lisina 0,1% e observadas ao microscópio óptico.

3.8 Sequenciamento N-terminal

A fração R7 contendo o peptídeo de aproximadamente 7 kDa, obtido diretamente da coluna C18, foi diretamente submetida a sequenciamento pelo método de degradação Edman (1950) feito em um sequenciador automático de proteínas (PPSQ-33A, Shimadzu) com posterior identificação dos resíduos por cromatografia (Allen, 1989). Após a obtenção da sequência, esta foi comparada em banco de dados de proteínas com o algoritmo do BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/Blast>) (Altschul, 1990) para identificação e o alinhamento posterior foi feito com o Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Thompson *et al.*, 1994).

4. Resultados

4.1. Ensaio de inibição do crescimento das células de *Candida albicans*

As etapas de extração e purificação de peptídeos de cotilédones de *L. pisonis* até a obtenção das frações F4 e F5 foram repetidas com objetivo de acumular estas frações (Vieira, 2012).

A partir destas frações foram inicialmente feito o ensaio de inibição do crescimento para se determinar qual fração tinha atividade mais forte sobre *C. albicans*. Tanto F4 e F5 tiveram o mesmo nível de inibição do crescimento de *C. albicans*, sendo este de 79,4 e 77,6%, respectivamente (Figura 7).

4.2. Teste de viabilidade das células de *C. albicans* tratadas com as frações F4 e F5

As células oriundas do ensaio de inibição do crescimento das frações F4 e F5 tiveram sua viabilidade testada. F4 foi capaz de inviabilizar, aproximadamente, 93% das células, enquanto a fração F5 inviabilizou, aproximadamente, 80% destas (Figura 8A e B). Este resultado indica que a inibição observada anteriormente (Figura 7) é causada pela inviabilidade das células, portanto este resultado mostra que o efeito destas frações é fungicida.

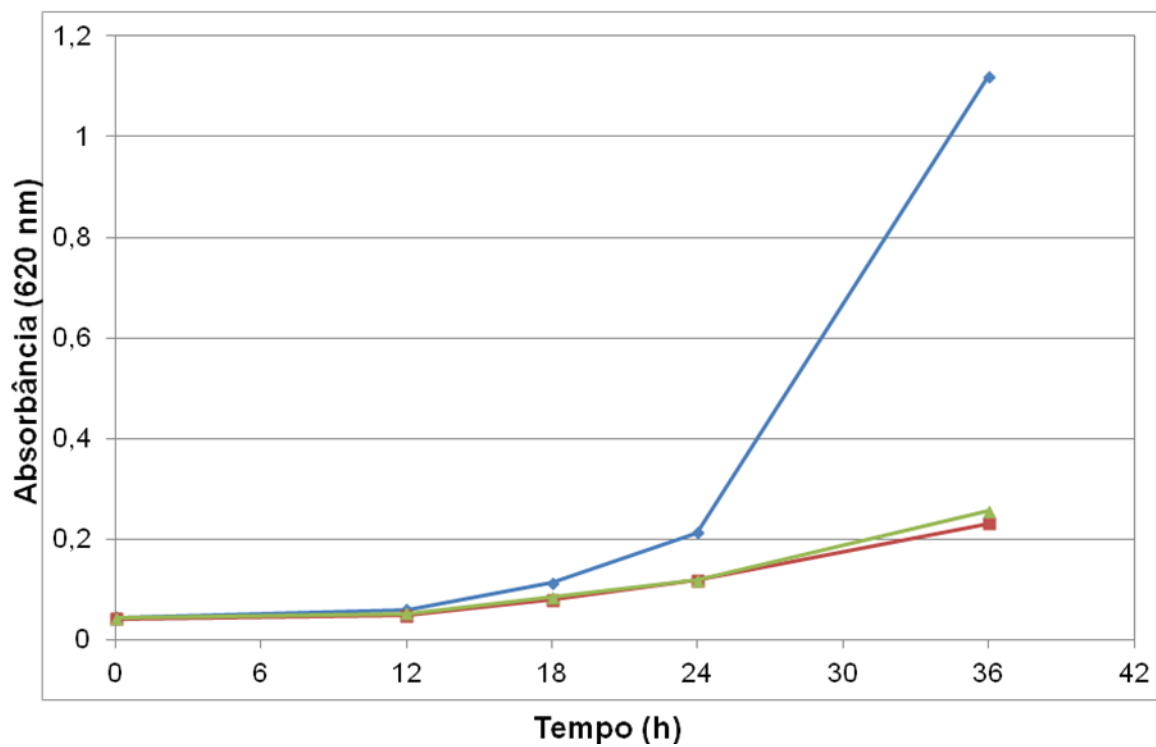
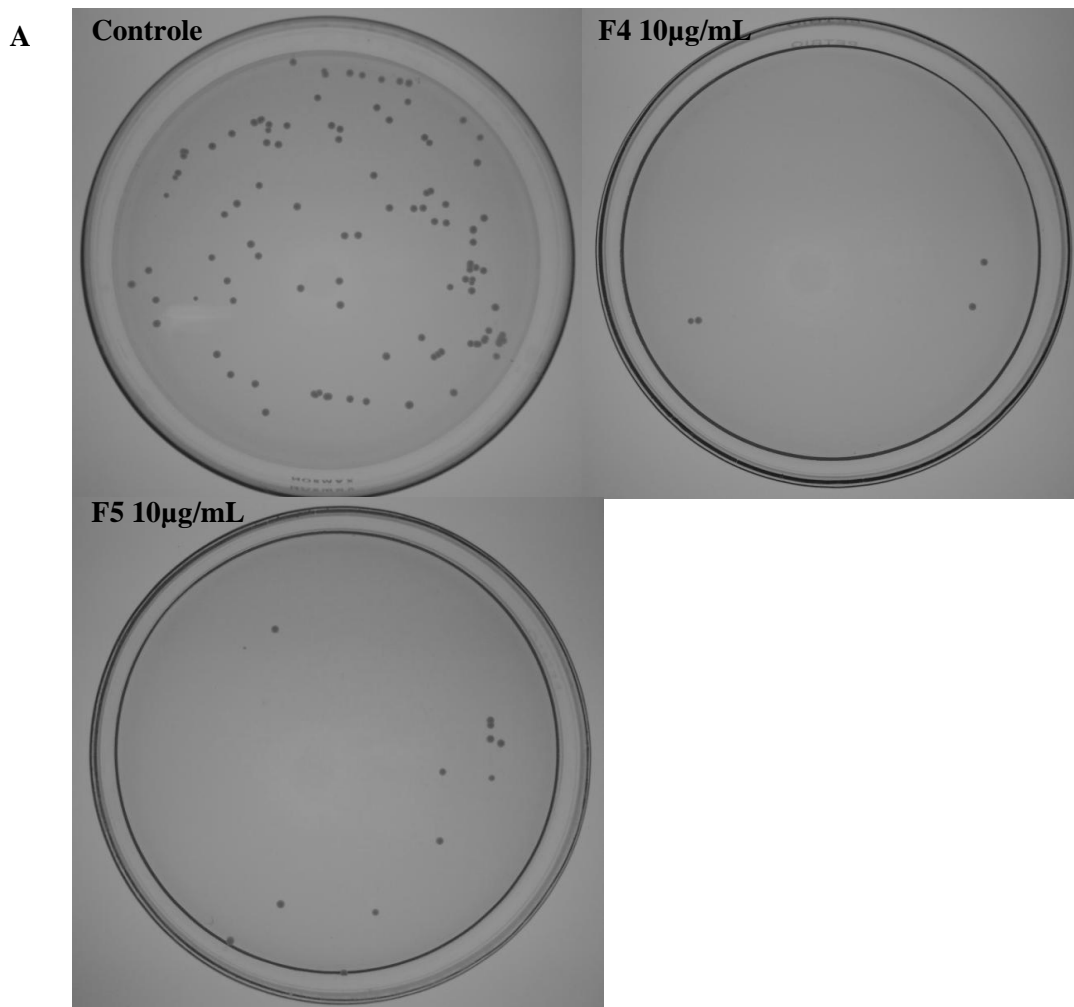


Figura 7. Representação gráfica do ensaio de inibição do crescimento das células de *Candida albicans*. Controle não tratado (-♦-); fração F4 (-■-), 10 µg/mL; fração F5 (-▲-), 10 µg/mL.



B Número de colônias e viabilidade das células de *Candida albicans* após 36 h de incubação com a fração 4 e fração 5.

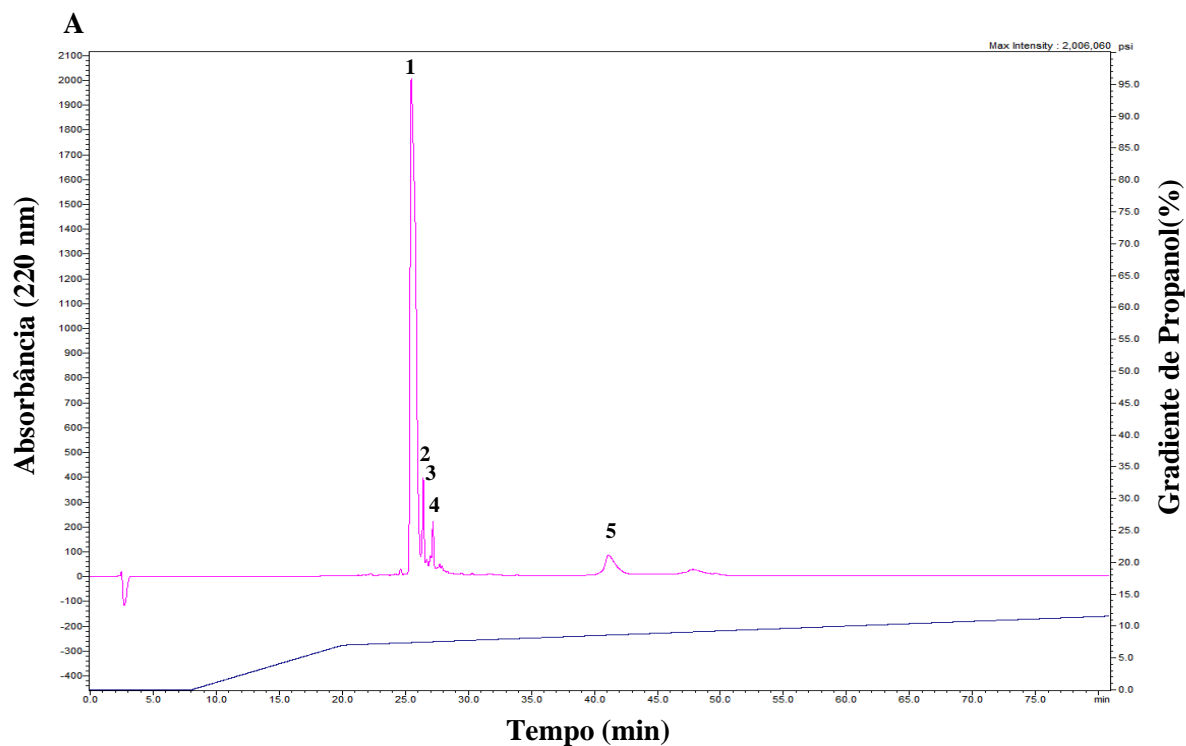
Amostras	Número de colônias	Viabilidade (%)
Controle	88 ±18,3	100
F4	6±2,8	6,8
F5	17,5±9,2	19,9

Figura 8. Viabilidade das células de *Candida albicans* após tratamento com as frações F4 e F5. (A) Foto da placa do ensaio de viabilidade das células de e (B) Dados do número de colônias e viabilidade das células obtidas das amostras do ensaio de inibição do crescimento.

4.3. Cromatografia das frações F4 e F5 em coluna de fase reversa C2C18

As frações F4 e F5 foram submetidas à cromatografia de fase reversa na coluna C2C18. Na cromatografia de F4 foram obtidas 5 novas frações denominadas B1 a B5 (Figura 9A), cujos tempos de retenção são mostrados na figura 8B. A visualização eletroforética destas amostras revelou a presença de uma banda homogênea apenas na fração B5 de aproximadamente 5 kDa. Bandas proteicas não foram visualizadas nas demais frações (Figura 10).

Na cromatografia de F5 foram coletadas 9 novas frações enumeradas de 1 a 9 (C1 a C10) de acordo com a ordem de eluição (Figura 11A), cujos tempos de retenção são mostrados na figura 10B. A visualização eletroforética das frações revelou a presença de bandas proteicas nas frações C7, C8 e C9, entre 5 e 7 kDa, e a ausência das mesmas nas demais frações (Figura 12).



B

Frações	Tempos de retenção
B1	25'40" – 26'20"
B2	26'30" – 26'60"
B3	26'60" – 27'09"
B4	27'12" – 27'35"
B5	40'70" – 42'00"

Figura 9. Dados da cromatografia da fração F4 em coluna de fase reversa C2C18. (A) Cromatograma da fração F4 obtido na cromatografia de fase reversa em coluna C2C18. Os números de 1 a 5 correspondem às frações B1 a B5. A linha oblíqua representa o gradiente de 2-propanol. (B) Tempos de retenção dos picos obtidos nesta cromatografia.

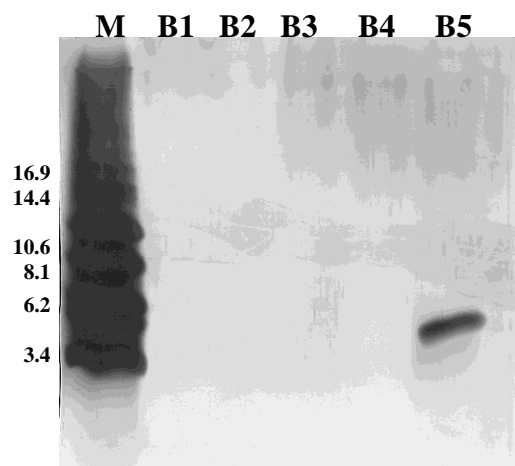
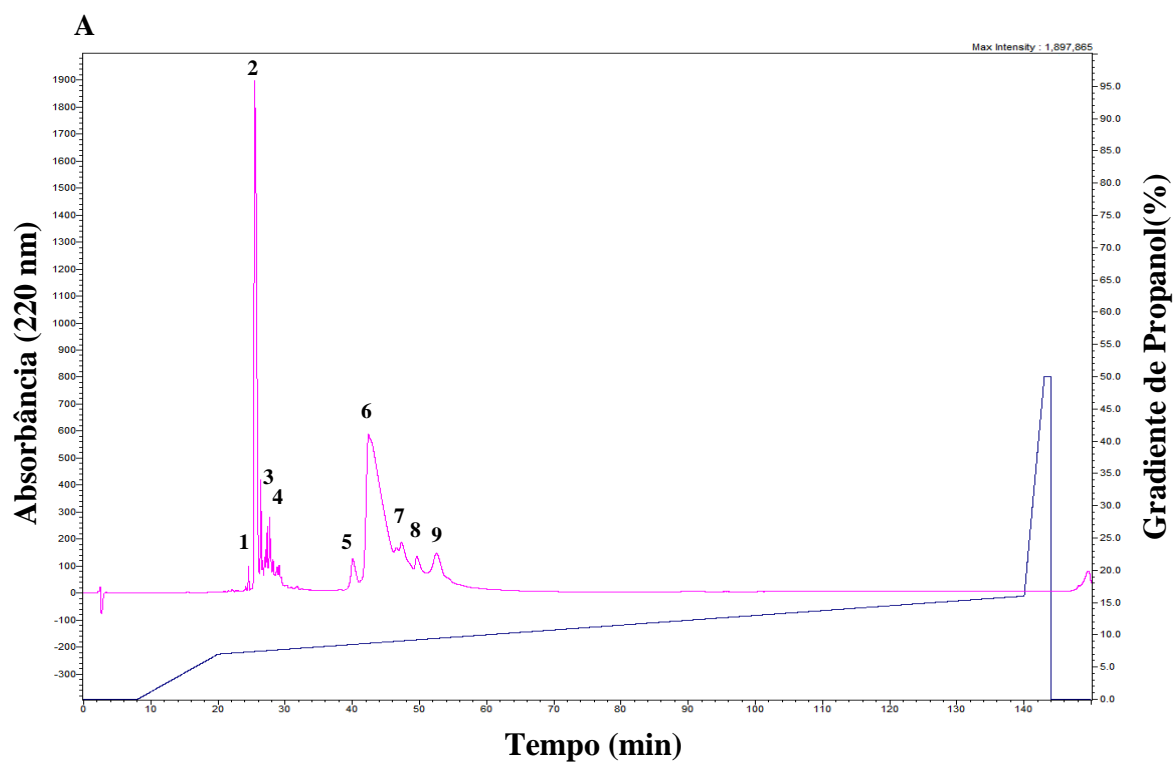


Figura 10. Visualização eletroforética das frações B1 a B5 obtidas após cromatografia de fase reversa em coluna C2C18 da fração F4. Uma banda homogênea é observada para a amostra B5. M, marcador de massa molecular em kDa.



B

Frações	Tempos de retenção
C1	26'23" – 26'53"
C2	26'61" – 27'40"
C3	27'60" – 27'99"
C4	28'09" – 28'43"
C5	28'90" – 29'33"
C6	39'37" – 40'98"
C7	41'60" – 45'95"
C8	46'25" – 50'26"
C9	51'94" – 53'55"

Figura 11. Dados da cromatografia da fração F5 em coluna de fase reversa C2C18. (A) Cromatograma da F5 obtido na cromatografia de fase reversa em coluna C2C18. Os números 1 a 9 correspondem às frações C1 a C9, respectivamente. A linha oblíqua representa o gradiente de 2-propanol. (B) Tempos de retenção dos picos obtidos nesta cromatografia.

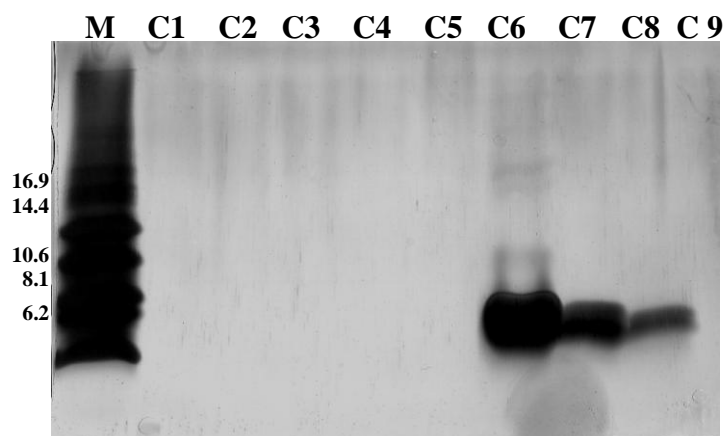


Figura 12. Visualização eletroforética das frações C1 a C9 obtidas após cromatografia de fase reversa em coluna C2C18 da fração F5. Uma banda homogênea é observada na raia 5. M, marcador de massa molecular em kDa.

Apesar da obtenção destas frações, não foi possível fazer a quantificação proteica delas pelas metodologias descritas no item 3.3. A comparação visual com um padrão de lisozima, por eletroforese, indicou que a quantidade de amostra era insuficiente para dar seguimento às etapas seguintes.

A baixa concentração das frações obtidas ressaltou a necessidade de um novo método de purificação onde se buscou a redução no número de etapas cromatográficas como forma de se evitar perdas decorrentes do processo de purificação. Neste sentido, voltamos para a fração P4 e, depois de uma análise dos métodos cromatográficos, criamos um método cromatográfico para a cromatografia de fase reversa em coluna C18 com o objetivo de isolar bandas proteicas com apenas esta etapa cromatográfica.

4.4. Cromatografia da fração P4 em coluna de fase reversa C18

P4 após cromatografia de fase reversa na coluna C18, acoplada a um cartucho C8, e com um novo gradiente, foi, inicialmente, fracionado em 9 novas frações, denominadas de R1 a R9 (Fig 13A), cujos tempos de retenção são indicados na figura 12B.

A visualização eletroforética das amostras revelou a presença de bandas protéicas nas frações R3, R4, R5, R6, R7 e R8 (Figura14).

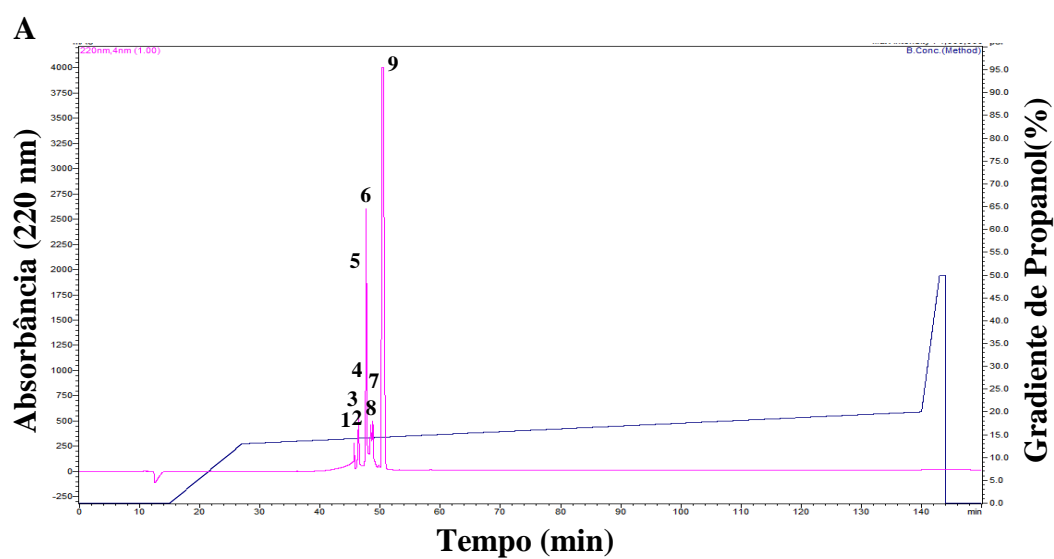


Figura 13. Dados da cromatografia de fase-reversa da fração P4 em coluna C18 (método 2). (A) Cromatograma obtido na cromatografia da fração P4 na coluna de fase reversa C18. Os números 1 a 9 correspondem às frações R1 a R9, respectivamente. A linha oblíqua representa o gradiente de 2-propanol. (B) Tempos de retenção dos picos obtidos nesta cromatografia.

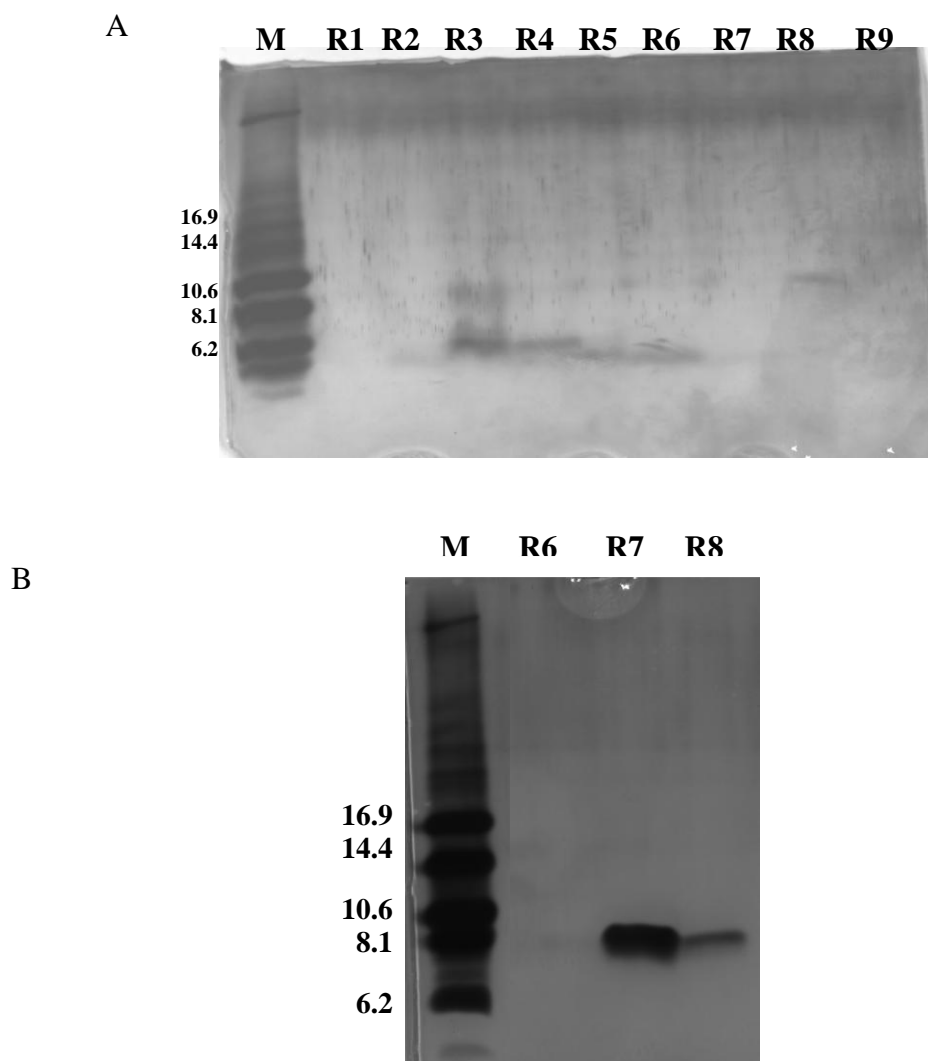


Figura 14. Visualização eletroforética das frações obtidas após cromatografia de fase reversa da fração P4 em coluna C18. (A) Frações R1 – R9. (B) Frações R6, R7 e R8. M, marcador de massa molecular em kDa.

4.5. Ensaio de inibição do crescimento das células de *C. albicans*

Um ensaio de inibição de crescimento foi realizado com as frações que apresentaram bandas proteicas no gel de eletroforese. Para cada amostra foram usados 10 µg/mL, concentração esta estimada por comparação visual com o padrão lisozima por eletroforese. Uma fraca inibição foi observada no crescimento das células tratadas com as frações R7 e R8 (Figura 15). As demais frações não foram capazes de inibir o

crescimento das células de *C. albicans* em nenhum dos tempos analisados (dados não mostrados).

4.6. Ensaio de viabilidade celular

As células provenientes do ensaio de inibição tiveram sua viabilidade testada. A fração R7 foi capaz de inviabilizar, aproximadamente, 33% das células de *C. albicans*. A fração R8, no entanto, não foi capaz de inviabilizar tais leveduras uma vez que houve uma retomada do crescimento das células quando estas foram retiradas da presença da fração (Figura 16). Assim, a fração R7 foi selecionada para a realização das etapas subsequentes

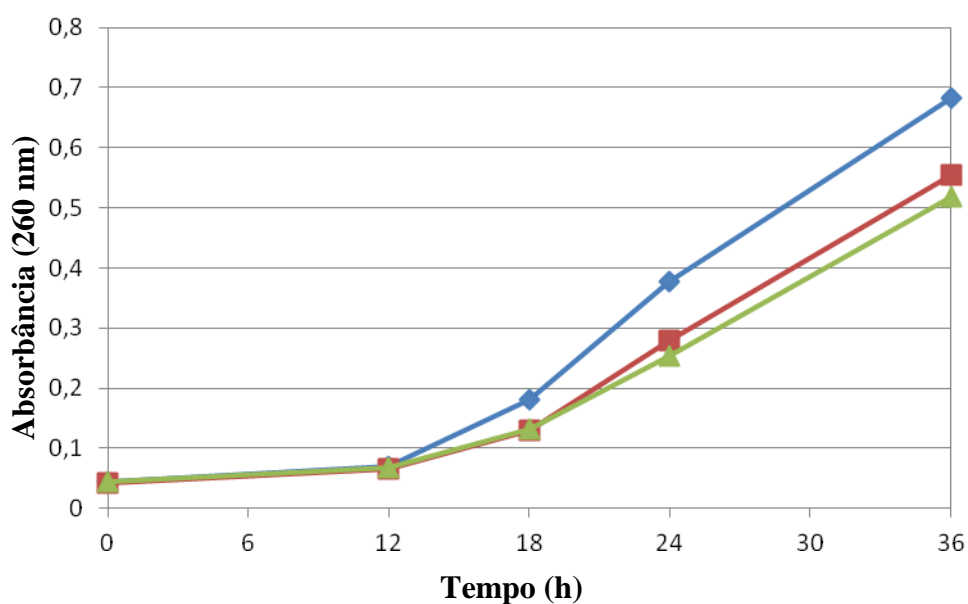
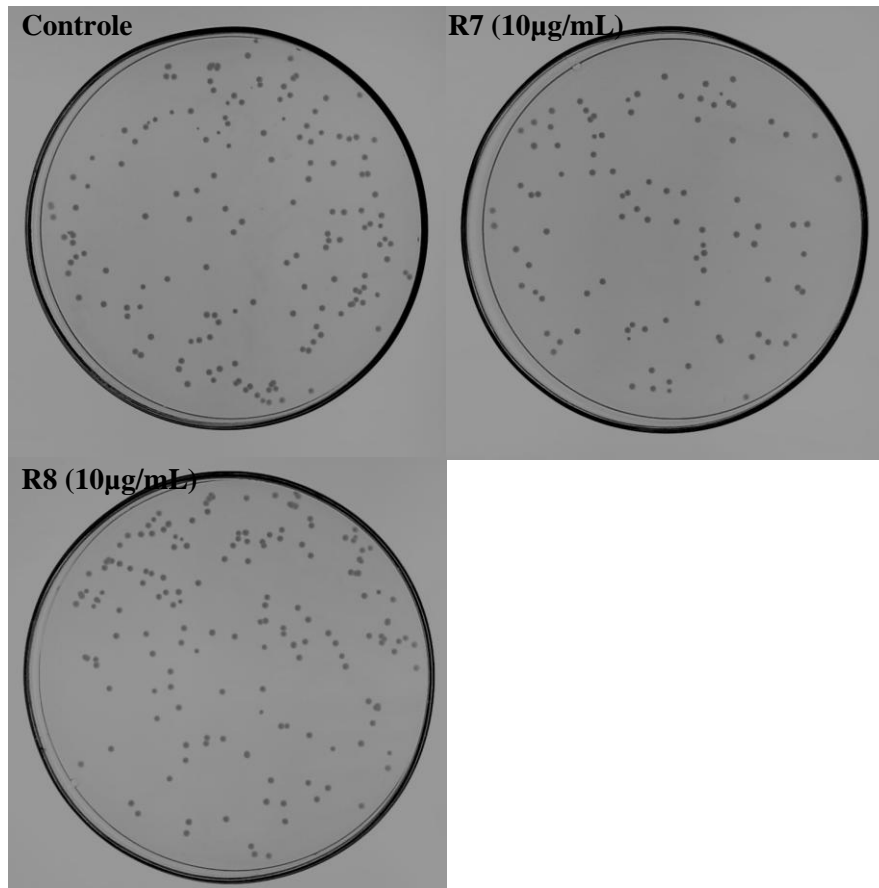


Figura 15. Representação gráfica do ensaio de inibição do crescimento das células de *Candida albicans*. Controle não-tratado (-♦-); fração R7 (-■-), 10 µg/mL; fração R8 (-▲-), 10 µg/mL.

A



B

Amostras	Número de colônias	Viabilidade (%)
controle	157,5 ± 7,7	100
R7	105 ± 15,5	66,6
R8	168 ± 2,8	106,6

Figura 16. Viabilidade das células de *Candida albicans* após tratamento com as frações R7 e R8. (A) Foto das placas do ensaio de viabilidade das células de *Candida albicans*. (B) Dados do número de colônias e viabilidade das células obtidas das amostras do ensaio de inibição do crescimento.

4.7. Ensaio de inibição do crescimento das células de *C. albicans*

Um novo ensaio de inibição do crescimento foi realizado utilizando-se uma concentração maior da fração R7 (Figura 17). A concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de inibir, aproximadamente, 38% do crescimento enquanto a concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ inibiu, aproximadamente, 52% do crescimento de *C. albicans*.

4.8. Teste de viabilidade das células de *C. albicans*

As células oriundas do ensaio de inibição do crescimento as células de *C. albicans* tiveram sua viabilidade testada (Figura 18A) a fim de analisar o tipo de inibição exercida pela fração R7. Na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, a fração R7 inviabilizou 87% das células. Na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, 96% das células foram inviabilizadas (Figura 18B). Este resultado indica que o efeito da fração R7, nestas condições, é fungicida.

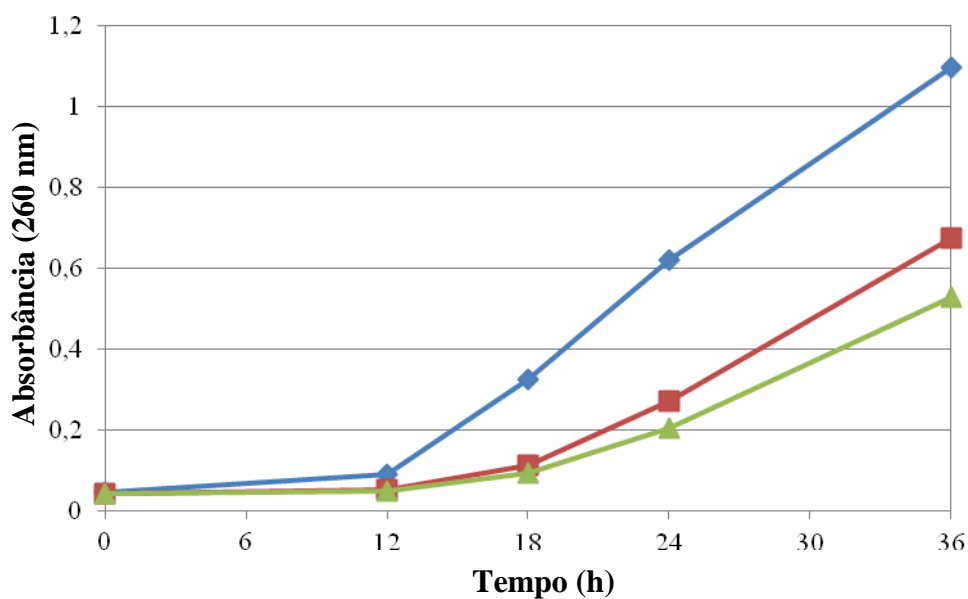
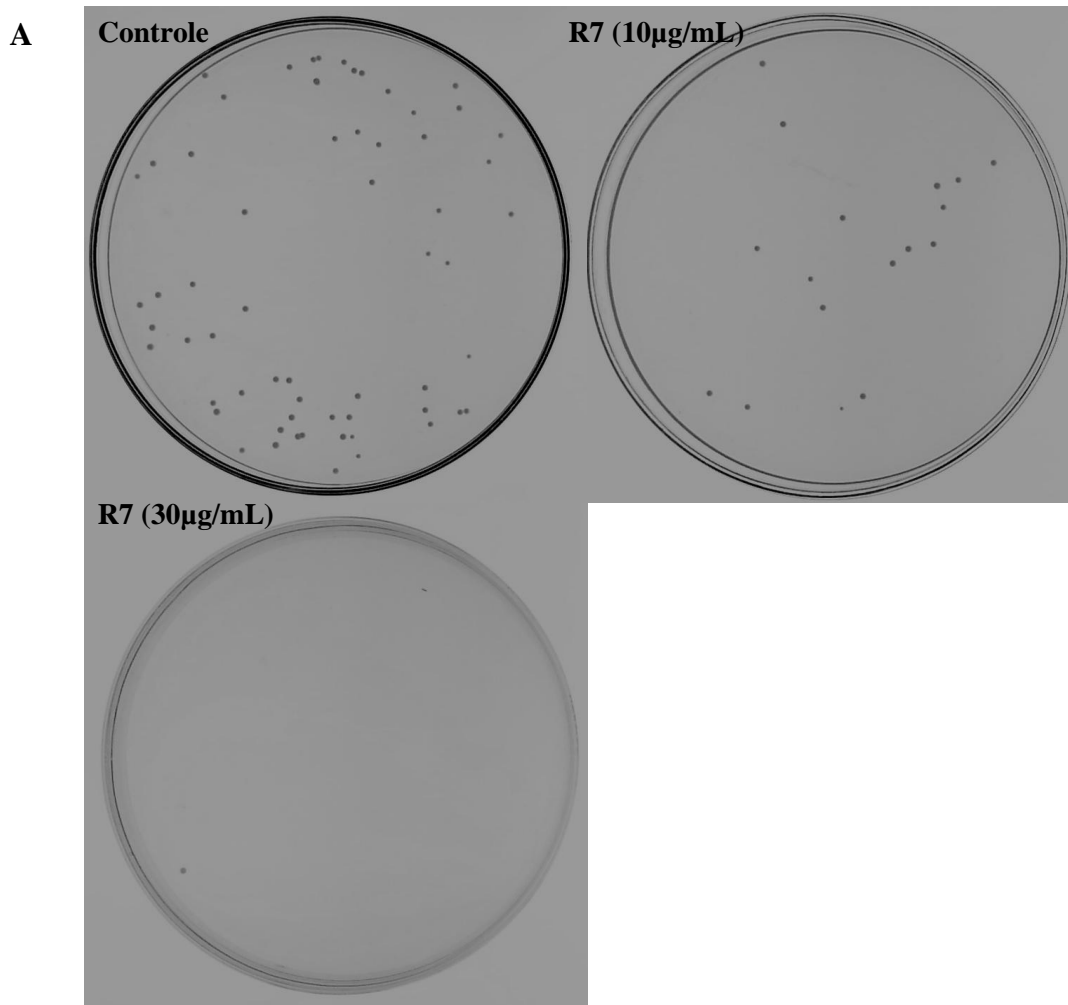


Figura 17. Representação gráfica do ensaio de inibição do crescimento das células de *C. albicans* na presença da fração R7. Controle não-tratado (-♦-); 10 $\mu\text{g/mL}$ (-■-); 30 $\mu\text{g/mL}$ (-▲-).



B

Amostras	Número de colônias	Viabilidade (%)
controle	57±5,6	100
R7 (10 µg/mL)	17,5±0,7	10
R7 (30 µg/mL)	1±1,4	0,6

Figura 18. Viabilidade das células de *Candida albicans* após tratamento com a fração R7 nas concentrações de 10 e 30 µg/mL. (A) Foto das placas do ensaio de viabilidade das células de *Candida albicans* tratadas com a fração R7. (B) Dados do número de colônias e viabilidade das células obtidas das amostras do ensaio de viabilidade.

4.9. Teste da permeabilização de membrana

Uma alíquota das células de *C. albicans* provenientes do ensaio de inibição foi incubada com o corante Sytox green com a finalidade de analisar a capacidade da fração R7 de permeabilizar a membrana de *C. albicans*. Foram observadas células fluorescentes tanto nos controles quanto nas células tratadas com a amostra (Figura 19). Com objetivo de confirmar a permeabilização, o número de células do campo claro e da fluorescência foi contabilizado e a porcentagem de células fluorescentes foi calculado (Tabela 1). Os resultados mostram que o número de células fluorescentes nas amostras tratadas não foi superior ao controle, indicando a não permeabilização das células pelo peptídeo testado nestas concentrações.

4.10. Análise da indução da produção endógena de ROS

As células oriundas do ensaio de inibição foram tratadas com o corante 2',7' diclorofluoresceína diacetato que penetra na célula e, ao sofrer oxidação, emite fluorescência, indicando a presença de ROS. Células fluorescentes foram observadas em ambas as concentrações da fração R7 utilizadas (Figura 20). As células foram contabilizadas e este resultado indica que o tratamento com a fração R7 foi capaz de induzir a produção de ROS nas células de *C. albicans* em 9,5 e 16,8% para as concentrações de 10 e 30 µg/mL, respectivamente (Tabela 2).

4.11. Análise da funcionalidade das mitocôndrias de *C. albicans*

A funcionalidade mitocondrial das células de *C. albicans* foi analisada utilizando-se o corante Mitotracker Green que marca mitocôndrias funcionais (Figura 21). As células tratadas com a fração R7 apresentaram significativa perda visual de fluorescência quando comparadas ao controle não tratado. Esta perda foi confirmada pela contagem das células e cálculo da porcentagem, sendo este de 27,4% de células fluorescentes para a fração R7 (Tabela 3), sugerindo que a referida fração causou a perda da funcionalidade destas organelas.

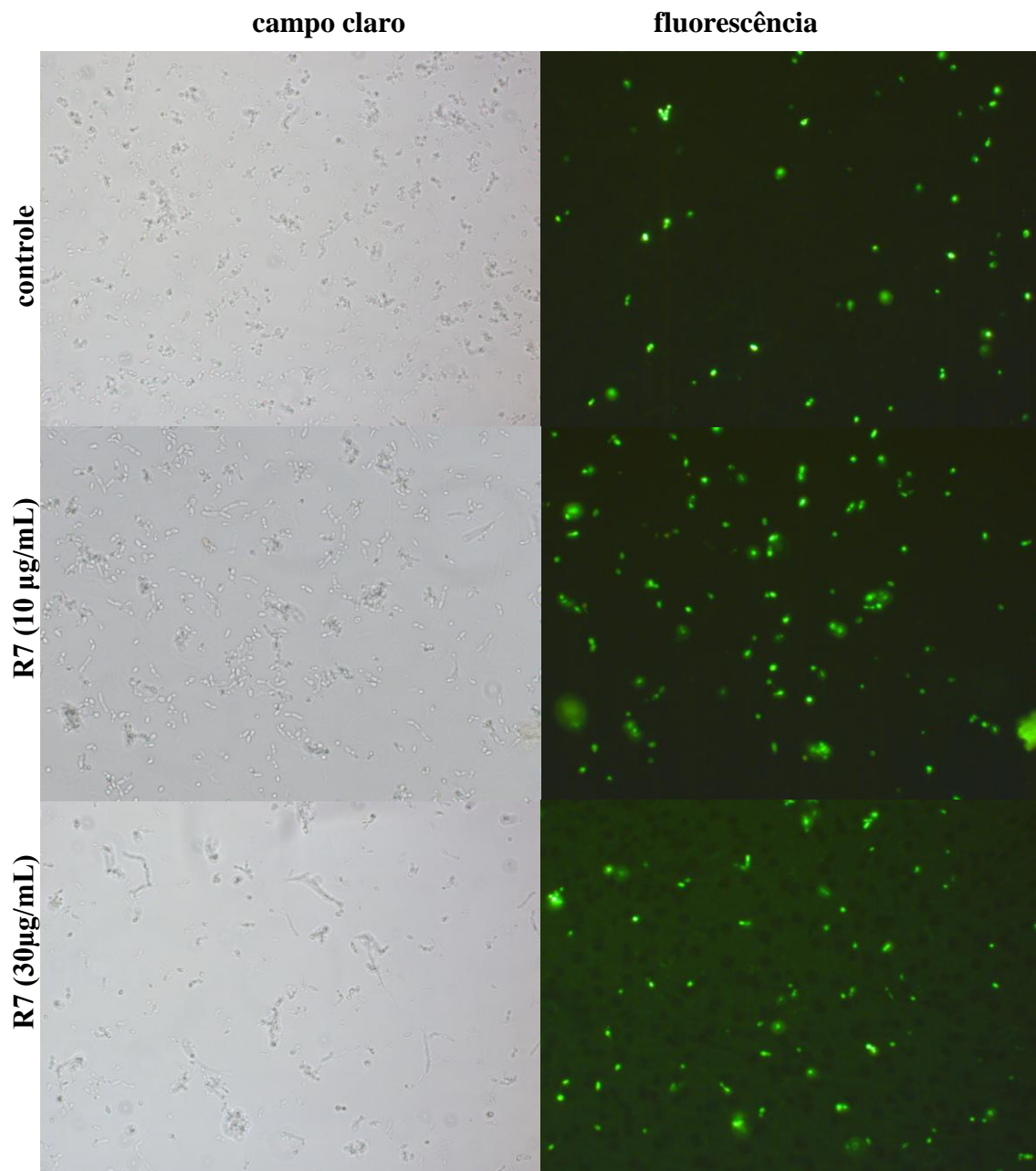


Figura 19. Fotomicrografias em microscópio óptico das células de *Candida albicans* incubadas com a fração R7 e tratadas com o corante fluorescente Sytox green para determinação da permeabilidade de membrana. A fluorescência verde indica as células permeabilizadas. Todas as fotos foram obtidas com o mesmo tempo de exposição.

Tabela 1. Contagem do número de células em campos aleatórios do campo claro e fluorescência das amostras obtidas do ensaio de permeabilização de membrana (n=5).

Amostras	Campo claro	Fluorescência	% de células fluorescentes
controle	899,5±23,3	208,5±65,7	23,17
R7 (10 µg/mL)	841±7	132±2,8	15,6
R7 (30 µg/mL)	482,5±40,3	142,5±50,2	29,5

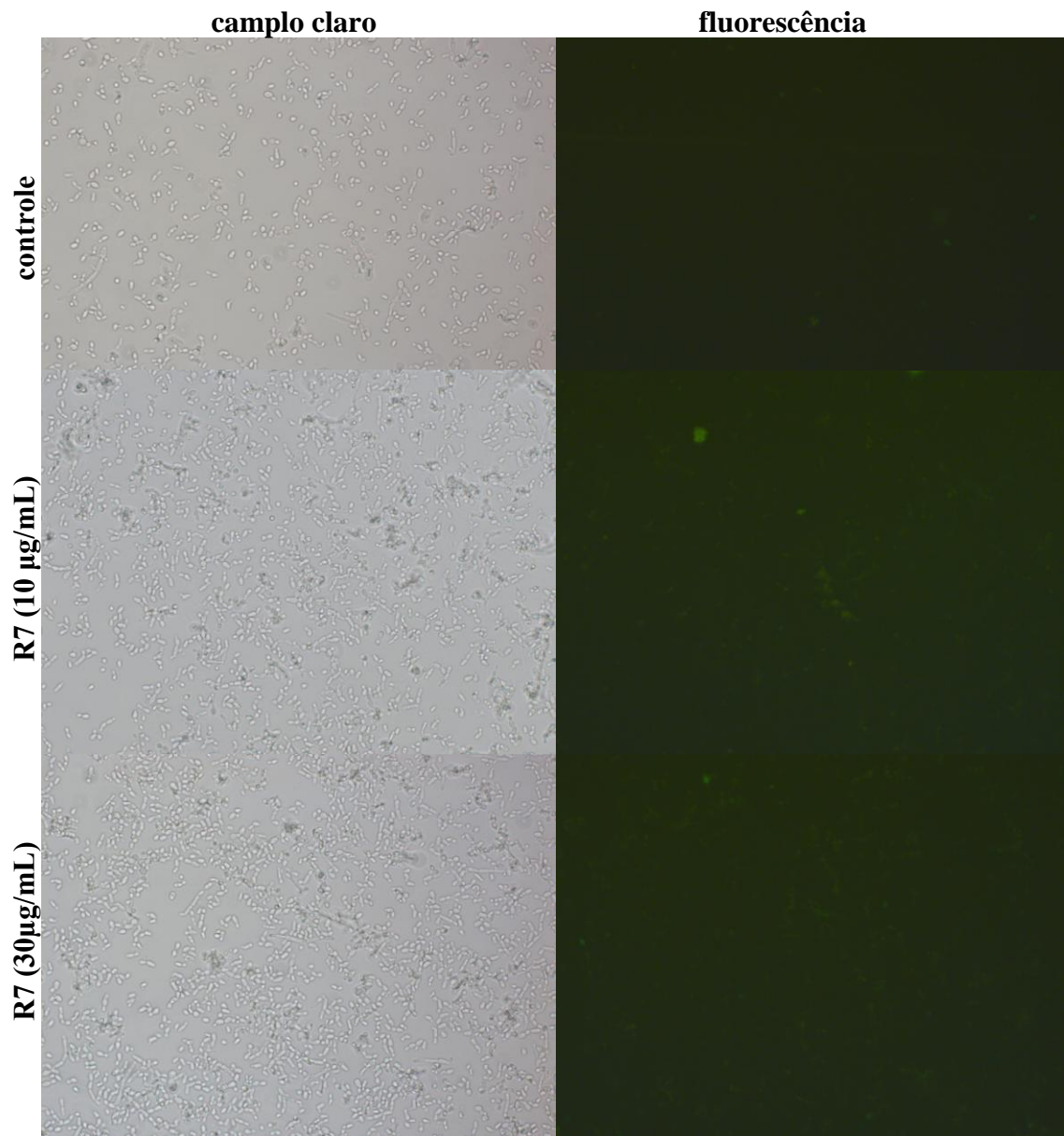


Figura 20. Fotomicrografias em microscópio óptico das células de *Candida albicans* incubadas com a fração R7 e tratadas com o corante fluorescente 2',7' diclorofluoresceína diacetato para determinação da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS). A fluorescência verde indica a presença de ROS nas células.

Tabela 2. Contagem do número de células em campos aleatórios do campo claro e fluorescência das amostras obtidas do ensaio de indução de espécies reativas de oxigênio (n=5).

Amostras	Campo claro	Fluorescência	% de células fluorescentes
controle	878,5±0,7	20,6±5,5	2,3
R7 (10 µg/mL)	749±52,3	71,5±17,3	9,5
R7 (30 µg/mL)	597±72,12	100,6±56,3	16,8

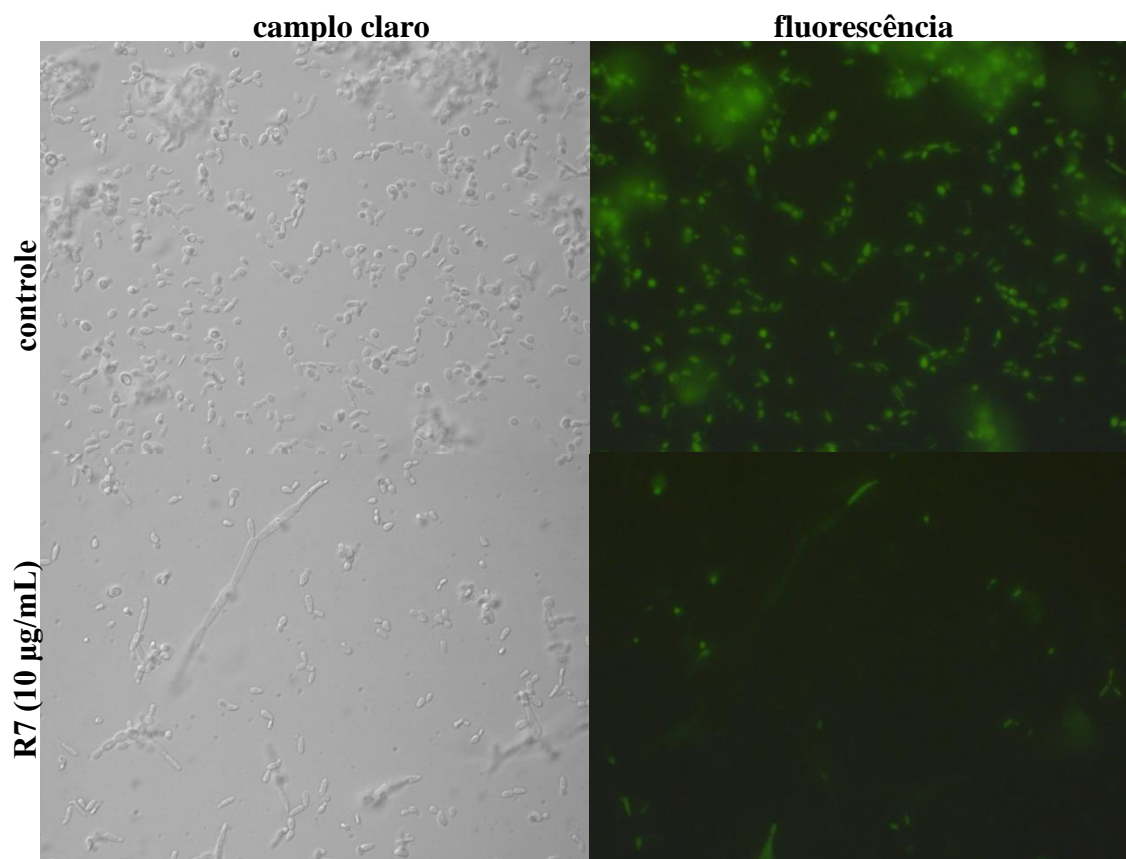


Figura 21. Fotomicrografias em microscópio óptico das células de *Candida albicans* incubadas com a fração R7 e tratadas com o corante fluorescente Mitotracker green para determinação da funcionalidade mitocondrial. A fluorescência verde indica as células com mitocôndrias funcionais.

Tabela 3. Contagem do número de células em campos aleatórios do campo claro e fluorescência das amostras obtidas do ensaio de funcionalidade mitocondrial (n=5).

Amostras	Campo claro	Fluorescência	% de células fluorescentes
controle	316±59,4	251±151,3	79,4
R7 (10 µg/mL)	191,3±97,1	52,6±18,4	27,4

4.12. Análise da sequência do peptídeo de aproximadamente 6 kDa

O peptídeo de aproximadamente 6 kDa, purificado a partir da fração R7 que apresentou maior atividade inibitória sobre *C. albicans*, foi submetida à sequenciamento N-terminal e a sequência parcial cobrindo 36 resíduos de aminoácidos foi comparada com sequências depositadas em banco de dados de proteína. A análise mostra alta similaridade com defensinas de plantas (Figura 22). O peptídeo apresentou similaridade com defensinas das espécies arbóreas de *Panax sinseng* (77,7% de identidade), *Eucalyptus grandis* (75,0% de identidade) e *Malus domestica* (72,2% de identidade). Este peptídeo também apresentou 80,5% de identidade com defensina de *Vigna unguiculata* e apresentou o padrão conservado de resíduos de cisteínas observado para as defensinas de plantas. Assim, o resultado indica que este peptídeo pertence à família das defensinas de plantas e este passou a ser definido como *Lp-Def1* (*Lecythis pisonis* defensin 1).

A família das defensinas de plantas tem em média 45 resíduos de aminoácidos (Carvalho e Gomes, 2011), estes 36 resíduos obtidos cobrem 80% da sequência completa das defensinas de plantas.

5. Discussão

Vieira (2012), utilizando métodos de extração ácida descrita por Egorov *et al.* (2005), com algumas modificações, obteve 13 frações peptídicas a partir de cotilédones de sementes de *L. pisonis*. Estas frações peptídicas tiveram suas atividades testadas sobre a levedura *C. albicans* e a fração P4 apresentou a atividade inibitória mais forte contra esta levedura e por isso foi selecionada para outra etapa de purificação. Nesta nova etapa a fração P4 foi separada em duas novas frações chamadas de F4 e F5. No presente trabalho demos continuidade aos processos de purificação e caracterização dos peptídeos presentes nestas frações. Para isso, fizemos uso da cromatografia de fase-reversa na coluna C18. Diversas metodologias para o isolamento de AMPs são descritas na literatura (Terras *et al.*, 1992; Egorov *et al.*, 2005; Finkina, *et al.*, 2008). A cromatografia de fase-reversa é comumente utilizada na purificação de AMPs e tem se mostrado bastante eficiente. Zottich *et al.* (2011), isolaram uma LTP de sementes de *Coffea canephora* utilizando-se de uma coluna C18 e 2-propanol para a eluição da mesma. Segura *et al.* (1993) também se utilizaram de uma coluna de fase reversa, C3, bem como de 2-propanol para o isolamento de LTPs de monocotiledôneas e de dicotiledôneas.

Apesar da obtenção de frações contendo bandas homogêneas, o rendimento final do processo de purificação foi muito baixo, e alterações nos métodos cromatográficos foram necessárias, visando uma redução das etapas de purificação com a finalidade de evitar perdas adicionais inerentes ao processo. O baixo rendimento é em alguns casos um dificultador do processo de purificação de AMPs e está ligado à baixa concentração destas moléculas em tecidos vegetais. Este problema já foi reportado para alguns peptídeos (Terras *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 2000; Odintsova *et al.*, 2008).

Com o método otimizado, foi obtida uma fração proteica constituída de um peptídeo de aproximadamente 7 kDa (Figura 14). A fração que continha este peptídeo foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* (Figuras 15 e 17) sendo que, nas condições testadas, a inibição do crescimento era devido a um efeito fungicida. Este resultado foi evidenciado devido à incapacidade das células de *C. albicans* tratadas com o peptídeo de retomarem seu crescimento após serem retiradas da presença do mesmo (Figuras 16 e 18). O peptídeo presente na fração R7 foi submetido a sequenciamento de sua região N-terminal e apresentou alta similaridade com AMPs pertencentes à família

das defensinas de plantas, sendo identificado com *Lp-Def1* (*Lecythis pisonis* defensin 1) (Figura 22).

As defensinas constituem a mais antiga família de AMPs sendo encontradas em vertebrados, invertebrados e plantas. Estas moléculas apresentam um elevado padrão de conservação de sua estrutura tridimensional e função através dos reinos da vida. Dentre os AMPs as defensinas são amplamente distribuídas no reino vegetal e também uma das famílias de AMPs melhor caracterizada. Estas são encontradas na parede celular e no espaço extracelular de sementes, bem como em camadas periféricas tanto de sementes, quanto de outros órgãos e tecidos vegetais. Esta localização está intimamente relacionada com o papel defensivo destas moléculas uma vez que em tais regiões ocorre o primeiro contato com patógenos. As defensinas de planta apresentam diversas atividades biológicas *in vitro*, dentre elas a inibição do crescimento de fungos e bactérias, inibição da síntese de proteínas, inibição de proteases e α -amilases, entre outros (Carvalho e Gomes 2009, 2011; Odintsova e Egorov, 2012; Lacerda *et al.*, 2014).

A atividade antifúngica das defensinas de planta é bastante descrita. Diversos fungos filamentosos, bem como fungos considerados modelos de estudo e, até mesmo, patógenos humanos, já tiveram seu crescimento comprometido devido ao tratamento com alguma defensina de origem vegetal (Thevissen *et al.*, 1999; Aerts, *et al.*, 2009; Carvalho e Gomes, 2011; Mello *et al.*, 2011). O tipo de atividade exercida por tais moléculas e a concentração necessária para a realização da mesma varia de acordo com o fungo e com a defensina de planta testados (Carvalho e Gomes, 2011; Vriens *et al.*, 2014).

Para compreendermos o modo de ação de *Lp-Def1*, realizamos um teste de permeabilização de membrana (Figura 19). Em geral, é observado que no mecanismo de ação de vários AMPs está envolvido a permeabilização da membrana plasmática (Thevissen *et al.*, 1999; van der Weerden *et al.*, 2010; Mello *et al.*, 2011), uma vez que a natureza catiônica dos AMPs associada à capacidade destas em assumirem conformações anfipáticas permitem sua interação com as com elementos estruturais negativos nas paredes celulares/glicocalix e fosfolipídeos das membranas dos microrganismos, respectivamente (Giuliane *et al.*, 2007; Rahnamaeian, 2011; Bahar e Ren, 2013). No que confere às defensinas de planta, sabe-se que estas são capazes de atravessar a parede celular e interagir com componentes da membrana carregados negativamente, como os esfingolipídios e os fosfolipídios fúngicos (van der Weerden *et*

al., 2010; Odintsova e Egorov, 2012; Vriens *et al.*, 2014). Nossos resultados, no entanto, não nos permitiram afirmar que *Lp-Def1* causa a permeabilização da membrana de *C. albicans* uma vez que células fluorescentes foram observadas no controle em quantidade superior ao que foi observado nos testes realizados com a referida defensina.

Nós analisamos a indução do aumento dos níveis de ROS nas células de *C. albicans* (figura 20) ocasionada pela defensina *Lp-Def1*. A maioria das moléculas de ROS são produzidas pelas mitocôndrias, uma vez que estas são produtos da fosforilação oxidativa. Sabe-se que ROS, juntamente com agentes antioxidantes desempenham um importante papel na regulação da apoptose (Gottlieb *et al.*, 2000). O aumento da produção dessas moléculas pode causar não só a destruição mitocondrial, mas também a destruição celular através de vias apoptóticas (Maiese *et al.*, 2010). Nossos resultados mostraram que *Lp-def1* é capaz de elevar a produção endógena de ROS além dos níveis controlados pelas células, levando à perda de viabilidade destas. Nós analisamos, ainda, a funcionalidade das mitocôndrias das células testadas e nossos resultados indicam que o tratamento com *Lp-Def1* causa a perda da funcionalidade de tais organelas (Figura 21). Sabe-se que alguns AMPs são capazes de interagir com as mitocôndrias (Hugosson *et al.*, 1994), no entanto, estudos relacionando a atuação da defensina na funcionalidade destas ainda não haviam sido relatados.

Muitos AMPs atuam em baixas concentrações sobre um amplo espectro de microrganismos. Tal característica associada ao amplo espectro de ação destas moléculas e à baixa toxicidade às células de mamíferos tornam os AMPs moléculas promissoras para o uso terapêutico, tanto para o uso sinérgico com antibióticos já existentes quanto para o desenvolvimento de novas drogas (Peters *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012). Assim, novas fontes destas moléculas são constantemente buscadas e diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de melhor compreender a forma de atuação destas moléculas. Além disso, este estudo destaca como fontes de moléculas bioativas espécies da biodiversidade da flora brasileira que agreguem valor à espécie e, portanto, refletindo sua melhor conservação, manejo e uso sustentável.

6. Conclusões

- A cromatografia de fase reversa na coluna C18 mostrou-se eficiente na purificação dos peptídeos de sementes de sapucaia, uma vez que bandas proteicas homogêneas foram observadas ao final de dois passos cromatográficos;
- A fração R7 foi capaz de inibir o crescimento e de causar a inviabilidade das células de *C. albicans* na concentração de 10 µg/mL e na concentração de 30 µg/mL, a fração R7 foi capaz de inviabilizar quase 100% das células de *C. albicans*;
- A inibição do crescimento e morte das células de *C. albicans* tratadas com a fração R7 envolvem a indução da produção de ROS e perda da funcionalidade mitocondrial;
- O sequenciamento da região N-terminal da banda proteica presente na fração R7 e posterior comparação da mesma revelou tratar-se de uma defensina, sendo assim denominada *Lp-Def1*.

7. Bibliografia

- Aerts, A. M.; Carmona-Gutierrez, D.; Lefevre, S.; Govaert, G.; François, I. E.; Madeo, F.; Santos, R.; Cammue, B. P.; Thevissen, K. (2009). The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in *Candida albicans*. *FEBS Lett.* 583: 2513-2516.
- Aerts, A. M.; François, I. E. J. A.; Meert, E. M. K.; Li, Q-T; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K. (2007). The antifungal activity of Rs-AFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 13: 243-247.
- Allen, G., (1989). Sequencing of proteins and peptides. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. 2^a ed. Nova York: Elsevier, 1989. Vol 9.
- Almeida, M. S.; Cabral, M. S.; Zingali, R. B.; Kurtenbach, E. (2000). Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Arch Biochem Biophys.* 378: 278-286.
- Aoki, W.; Ueda, M. (2013). Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. *Pharmaceuticals.* 6: 1055-1081.
- Bahar, A. A. e Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals.* 6: 1543-1575.
- Barbedo, L. S. e Sgarbi, D. B. G. (2010). Candidíase. *J Bras Doenças Sex Trans.* 22: 22-38.
- Benko-Iseppon, A. M.; Galdino, S. L.; Calsa Jr, T., Kido, E. A., Tossi, A., Belarmino, L. C., Crovella, S. (2010). Overview on plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci.* 11: 181-8.
- Berrocal-Lobo, M.; Segura, A.; Morenom M.; López, G.; García-Olmedo, F.; Molina, A. (2002). Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. *Plant Physiol.* 128: 951-961.
- Botton, A.; Begheldo, M.; Rasori, A.; Bonghi, C.; Tonutti, P. (2002). Differential expression of two lipid transfer protein genes in reproductive organs of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Plant Sci.* 163: 993-1000.
- Braga, L. F.; Sousa, M. P.; Gilberti, S.; De Carvalho, M. A. C. (2007). Caracterização morfológica de sementes de castanha de Sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess - Lecythidaceae). *RCAA.* 5: 111-116.

- Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C.; Terras, F. R. G.; Proost, P.; van Dame, J.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Broekaert, W. F. (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J Biol Chem.* 267: 2228-2233.
- Cândido, E. S.; Cardoso, M. H. S.; Sousa, D. A.; Viana, J. C.; Oliveira-Júnior, N. G.; Miranda, V.; Franco, L. O. (2014). The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. *Peptides.* 55: 65-78.
- Carvalho, A. O. e Gomes, V. M. (2007). Role of plant lipid transfer protein in plant cell physiology - A concise review. *Peptides.* 28: 1144-1153.
- Carvalho, A. O. e Gomes, V. M. (2011). Plant Defensins and Defensin-Like Peptides - Biological Activities and Biotechnological Applications. *Curr Pharm Des.* 17: 4270-4293.
- Castro, M. S. e Fontes, W. (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett.* 12: 11-16.
- Castro, T. L.; Coutinho, H. D. M.; Gedeon, C. C.; Santos, J. M.; Santana, W. J.; Souza, L. B. S. (2006). Mecanismos de resistência da *Candida sp WW* a antifúngicos. *Informa.* 18: 30-35.
- Clifton, L. A.; Sanders, M. R.; Hughes, A. V.; Neylon, C.; Frazier, R. A.; Green, R. J. (2011). Lipid binding interactions of antimicrobial plant seed defence proteins: puroindoline-a and β -purothionin. *Phys Chem Chem Phys.* 13:17153-17162.
- Daly, N. L.; Rosengren, K. J.; Craik, D. J. (2009). Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Adv Drug Deliver Rev.* 61: 918-930.
- Demain, A. L. e Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *JPN J Antibiot.* 62: 5-16.
- Dixon, R. A. (2001). Progress natural products and plant disease resistance. *Nature.* 411: 843-847.
- Duvick, J. P.; Rood, T.; Rao, A. G.; Marshak, D. R. (1992). Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) Kernels. *J Biol Chem.* 267: 18814-18820.
- Edman, P., (1950). Method for determination of amino acid sequences in peptides. *Acta Chem. Scandinavia,* 28: 283-293.

- Egorov, T.A.; Odintsova, T.I.; Pukhalsky, V.A.; Grishin, E.V. (2005). Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*; 26: 2064-2073.
- Finkina, E. I.; Shramova, E. I.; Tagaev, A. A.; Ovchinnikova, T. V. (2008). A novel defensin from the lentil *Lens culinaris* seeds. *Biochem Bioph Res Co.* 371: 860-865.
- Franco, E. A. P. e Barros, R. F. M. (2006). Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. *Rev Bras Pl Med.* 8: 78-88.
- Giolo, M. P. e Svidzinski T. I. E. (2010). Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab.* 46: 225-234.
- Giuliani, A.; Pirri, G.; Nicoletto, S. F. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *CEJB.* 2: 1-33.
- Gottlieb, E. Heiden, M. G. V.; Thompson, C. B. (2000). Bcl-x_L prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 20: 5680-5689.
- Hugosson M, Andreu D, Boman HG, Glaser E. (1994). Antibacterial peptides and mitochondrial presequences affect mitochondrial coupling, respiration and protein import. *Eur J Biochem.* 223: 1027-1033.
- Kang, S.-J.; Kim, D.-H.; Mishig-Ochir, T.; Lee B.-J. (2012). Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application. *Arch Pharm Res.* 35: 409-413.
- Kido, E. A.; Pandolfi V.; Houllou-Kido L. M.; Andrade, P. P.; Marcelino, F. C.; Nepomuceno, A. L.; Abdelnoor, R. V.; Burnquist, W. L.; Benko-Iseppon, A. M. (2010). Plant Antimicrobial Peptides: An overview of superSAGE transcriptional profile and a functional review. *Curr Protein Pept Sci.* 11: 220-30.
- Kovaleva, V.; Kiyamova, R.; Cramer, R.; Krynytskyy, H.; Gout, I.; Filonenko, V.; Gout, R. (2009). Purification and molecular cloning of antimicrobial peptides from Scots pine seedlings. *Peptides* 30: 2136–2143.
- Lacerda, A. F.; Vasconcelos, E. A. R.; Pelegrini, P. B.; Sa, M. F. G. (2014). Antifungal defensins and their role in plant defense. *Front Microbiol.* 5: 1-10.

- Lobo, D. S.; Pereira, I. B.; Fragel-Madeira, L.; Medeiros, L. N.; Cabral, L. M., Faria, J.; Bellio, M.; Campos, R. C.; Linden, R.; Kurtenbach, E. (2007). Antifungal *Pisum sativum* Defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry*. 46: 987-996.
- Lorenzi, H. *Lecythis pisonis* Cambess. In: Harri Lorenzi. *Árvores Brasileiras: manual de educação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. Vol. 1. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2002. p. 152.
- Maiese, K.; Chong, Z. Z.; Hou, J.; Shang, Y. C. (2010). Oxidative stress: biomarkers and novel therapeutic pathways. *Exp Gerontol*. 45: 217-234.
- Maróti, G.; Kereszt, A.; Kondorosi, E.; Mergaert, P. (2011). Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol*. 162: 363-374.
- Mello, E. O.; Ribeiro, S. F. F.; Carvalho, A. O.; Santos, I. S.; Da Cunha, M.; Santa-Catarina, C.; Gomes, V. M. (2011). Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in Fungi Cells. *Curr. Microbiol*. 62: 1209-1217.
- Molero, G.; Díez-Orejas, R.; Navarro-García, R.; Monteoliva, L.; Pla, J.; Gil, C.; Sánchez-Pérez, M.; Nombela, C. (1998). *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Internatl Microbiol*. 1: 95-106.
- Odintsova, T. e Egorov, T. Plant antimicrobial peptides. In: Helen R. Irving, Christoph Gehring. *Plant signaling peptides*. Vol. 16. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2012. p. 107-133.
- Odintsova, T. I.; Korostyleva, T. V.; Utkina, L. L.; Andreev, Y. A.; Slavokhotova, A. A.; Istomina, E. A.; Pukhal'skii, V. A.; Egorov, T. A. (2013). Wheat Antimicrobial peptides. *Russ J Genet*. 3: 40-46.
- Odintsova, T. I.; Rogozhin, E. A.; Baranov, Y.; Musolyamov, A. K.; Yalpani, T. A.; Grishin, E. V. (2008). Seed defensins of banyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.). *Beauv. Biochimie*. 90: 1667-1673.
- Padovan, L.; Scocci, M.; Tossi, A. (2010). Structural aspects of plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sc*. 11: 210-219.

- Passos, X. S.; Sales, W. S.; Maciel, P. J.; Costa, C. R.; Miranda, K. C.; Lemos, J. A.; Batista, M. A.; Silva, M. R. R. (2005). *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100: 925-928.
- Patel, S. U.; Osborn, R.; Rees, S.; Thornton, J. M. (1998). Structural studies of *Impatiens balsamina* antimicrobial protein (Ib-AMP1). *Biochemistry*. 37: 983-990.
- Peters, B. M.; Shirliff, M.E.; Jabra-Rizk M. A. (2010). Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs. *Plos Patogh*. 6: 1-4.
- Pfaller, M. A.; Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 20: 133-163.
- Pii, Y.; Molesini, B.; Masiero, S.; Pandolfini, T. (2012). The non-specific lipid transfer protein N5 of *Medicago truncatula* is implicated in epidermal stages of rhizobium-host interaction. *BMC Plant Biol*. 12: 233-246.
- Playford, E. G.; Nimmo, G. R.; Tilse, M.; Sorrel, T. C. (2010). Increasing incidence of candidaemia: long-term epidemiological trends, Queensland, Australia, 1999-2008. *J Hosp Infect*. 76: 46-51.
- Rahnamaeiam, M. (2011). Antimicrobial peptides modes of mechanism, modulation of defense responses. *Plant Signal Behav*. 6: 1325-1332.
- Ribeiro, S. F. F.; Carvalho, A. O.; Da Cunha, M.; Rodrigues, R.; Cruz, L. P.; Melo, V. M. M.; Vasconcelos, I. M.; Melo, E. J. T.; Gomes, V. M. (2007). Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon*. 50: 600-611.
- Romagnoli, S.; Fogolari, F.; Catalano, M.; Zetta, L.; Schaller, G.; Urech, K; Giannattasio, M.; Ragona, L.; Molinari, H. (2003). NMR Solution Structure of viscotoxin C1 from *viscum album* species *coloratum ohwi*: toward a structure – function analysis of viscotoxins. *Biochemistry*. 42: 12503-12510.
- Samuel, D.; Liu, Y-J.; Cheng, C-S; Lyu, P-C. (2002). Solution Structure of plant nonspecific Lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J Biol Chem*. 277: 35267-35273.
- Sanglard, D.; Ischer, F.; Parkinson, T.; Falconer, D.; Bille, J. (2003). *Candida albicans* mutations in the Ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Ch*. 47: 2404-2412.

- Schägger, H. e Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal Biochem.* 166: 368-379.
- Segura, A.; Moreno, M.; García-Olmedo, F. (1993). Purification and antipathogenic activity of lipid transfer preoteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS.* 332: 243-246.
- Segura, A.; Moreno, M.; Madueño, F.; Molina, A. García-Olmedo, F. (1999). Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *APS.* 12: 16-23.
- Shen, G.; Pang, Y.; Wu, W.; Miao, Z.; Qian, H.; Zhao, L.; Sun, X.; Tang, K. (2005). Molecular cloning, characterization and expression of a novel jasmonate-dependent defensin gene from *Ginkgo biloba*. *J Plant Physiol.* 162:1160-1168.
- Souza, V. A. B.; Carvalho, M. G.; Santos, K. S.; Ferreira, C. S. (2008). Características físicas de frutos e amêndoas e características químico-nutricionais de amêndoas de acessos de sapucaia. *Rev Bras Frutic Jaboticabal - SP* 30: 946-952.
- Terras, F. R. G.; Eggermont, K.; Kovaleva, V.; Raikhel, N. V.; Osborn, R. W.; Kester, A.; Rees, S. B.; Torrekens, S.; van Leuven, F.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P. A.; Broekaert, W. F. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell.* 7: 573-88.
- Terras, F. R. G.; Schoofs, H. M. E.; De Bolle, M. F. C.; Van Leuven, F.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P. A.; Broekaert, W. F. (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem.* 267: 15301-15309.
- Thevissen, K.; Kristensen, H-H.; Thomma, B. P. H. J.; Cammue, B. P. A.; François, I. E. J. A. (2007). Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discov Today.* 12: 966-971.
- Thevissen, K.; Terras, F. R. G.; Broekaert, W. (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microb.* 65: 5451-5458.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

- weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tregear, J. W.; Morcillo, F.; Richaud, F.; Berger, A.; Singh, R.; Cheah, S. C.; Hartmann, C.; Rival, A.; Duval, Y. (2002). Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. *J Exp Bot.* 53: 1387-1396.
- Vallilo, M. I.; Tavares, M.; Aued-Pimentel, S.; Campos, N. C.; Moita Neto, J. M. (1999). *Lecythis pisonis* Camb. Nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. *Food Chem.* 66: 197-200.
- van der Weerden, N. L.; Hancock, R. E.; Anderson, M. A. (2010). Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *J Biol Chem.* 285: 37513-37520.
- van der Weerden, N. L. e Anderson, M. A. (2013). Plant defensins: common fold, multiple functions. *Br Mycol Soc.* 26: 121-131.
- van Loon, L. C.; Rep, M., Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Ann. Rev Phytopathol* 44: 135-62.
- Vieira, M. E. B. Peptídeos de sementes de sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.): isolamento e atividade antimicrobiana contra leveduras. 2012. viii, 43f., il. Trabalho Monográfico - Bacharelado em Ciências Biológicas, Campos dos Goytacazes/Brasil, 2012. Orientação de: André de Oliveira Carvalho.
- Vriens, K.; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K. (2014). Antifungal plant defensins: Mechanisms of action and production. *Molecules.* 19: 12280-12303.
- Wisniewski, M. E.; Bassett, C. L.; Artlip, T. S.; Webb, R. P.; Janisiewicz, W. J.; Norelli, J. L.; Goldway, M.; Droby, S. (2003). Characterization of a defensin in bark and fruit tissues of peach and antimicrobial activity of a recombinant defensin in the yeast, *Pichia pastoris*. *Physiol Plant.* 119: 563-572.
- Wu, M.; Maier, E.; Benz, R.; Hancock, R. E. W. (1999). Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochem.* 38:7235-7242.
- Yeats, T. H. e Rose, J. k. C. (2008). The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Sci.* 17: 191-198.

Zottich, U.; Da Cunha, M.; Carvalho, A. O.; Dias, G.B.; Silva, N. C.; Santos, I. S.; Nascimento, V. V.; Miguel, E. C.; Machado, O. L. T; Gomes, V. M. (2011). Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1810