

**UM NOVO PEPTÍDEO TERMOESTÁVEL DE SEMENTES DE *Adenantha pavonina*
L. COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIPROTEOLÍTICA E
AMILOLÍTICA, ANTI-INFLAMATÓRIA E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE
LEVEDURAS**

RODRIGO DA SILVA GEBARA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

SETEMBRO – 2023

**UM NOVO PEPTÍDEO TERMOESTÁVEL DE SEMENTES DE *Adenantha pavonina*
L. COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIPROTEOLÍTICA E
AMILOLÍTICA, ANTI-INFLAMATÓRIA E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE
LEVEDURAS**

RODRIGO DA SILVA GEBARA

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia”.

Orientador: Dr.^a André de Oliveira Carvalho

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ
SETEMBRO – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

G293 Gebara, Rodrigo da Silva.

UM NOVO PEPTÍDEO TERMOESTÁVEL DE SEMENTES DE *Adenanthera pavonina* L. COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIPROTEOLÍTICA E AMIOLÍTICA, ANTI-INFLAMATÓRIA E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE LEVEDURAS / Rodrigo da Silva Gebara. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

132 f.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2023.

Orientador: André de Oliveira Carvalho.

1. Resistência microbiana. 2. Moléculas bioativas. 3. Tuberculose. 4. Candidíase. 5. Inibidores de protease. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

**UM NOVO PEPTÍDEO TERMOESTÁVEL DE SEMENTES DE *Adenantha pavonina*
L. COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIPROTEOLÍTICA E
AMILOLÍTICA, ANTI-INFLAMATÓRIA E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE
LEVEDURAS**

RODRIGO DA SILVA GEBARA

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

Aprovada em 15 de Setembro de 2023

Comissão Examinadora:

Prof.^a Anna Lvovna Okorokova Façanha
(Dr.^a em Química Biológica - CBB - LFBM - UENF)

Prof.^a Kátia Valevski Sales Fernandes
(Dr.^a em Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas- CBB - LQFPP - UENF)

Prof.^a Maria Cristina Baracat-Pereira
(Dr.^a em Bioquímica - UFV)

Prof. André de Oliveira Carvalho
Orientador
(Dr. em Biociências e Biotecnologia - CBB - LFBM - UENF)



Governo do Estado do Rio de Janeiro
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Diretoria do Centro de Biociências e Biotecnologia

DECLARAÇÃO

A **versão final** da tese de Doutorado intitulada "Um novo peptídeo termoestável de sementes de *Adenantha pavonina* com atividade antimicrobiana, antiproteolítica e amilolítica, anti-inflamatória e mecanismo de ação sobre leveduras" defendida pelo aluno Rodrigo da Silva Gebara (Matrícula 201912220016) do Programa de Biociências e Biotecnologia da UENF, no dia 15 de setembro de 2023 foi **aprovada** pelos membros da banca: André de Oliveira Carvalho (Presidente e membro interno), Anna Lvovna Okorokova Façanha (membro interno), Katia Valeveski Sales Fernandes (membro interno) e Maria Cristina Baracat Pereira (membro externo).

A professora Maria Cristina Baracat Pereira estava impossibilitada de assinar presencialmente o documento.

Campos dos Goytacazes, 13 dezembro de 2023

André de Oliveira Carvalho
professor
ID. Funcional 4145143-0



Documento assinado eletronicamente por **Andre de Oliveira Carvalho, Professor**, em 13/12/2023, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento nos art. 28º e 29º do [Decreto nº 48.209, de 19 de setembro de 2022](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.rj.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=6, informando o código verificador **65152809** e o código CRC **E9BAD8C4**.

Referência: Processo nº SEI-260009/005830/2023

SEI nº 65152809

Avenida Alberto Lamego, 2000, - Bairro Pq. Califórnia, Campos dos Goytacazes/RJ, CEP 28013-602
Telefone: - www.uenf.br

“Ele se levantou e repreendeu o vento e a violência das águas; tudo se acalmou e ficou tranquilo. Onde está a sua fé? perguntou ele aos seus discípulos. Amedrontados e admirados, eles perguntaram uns aos outros: Quem é este que até aos ventos e às águas dá ordens, e eles lhe obedecem?”

(Lucas 8:22-25)

Aos meus pais Artur e Maria Auxiliadora, que sempre apoiaram minhas decisões, proporcionando-me ajuda emocional e recursos financeiros, durante toda jornada, por entenderem a minha constante ausência e sonharem junto comigo, nunca medindo esforços para concluir cada etapa da minha vida, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que permitiu com que eu conseguisse chegar até aqui, por todo consolo, abrigo, força e refúgio nos dias de tribulações;

Ao professor André de Oliveira Carvalho, orientador e amigo, minha eterna gratidão, por ter aceitado minha orientação, por toda dedicação, pelos conselhos, pela paciência e por todos os ensinamentos que me proporcionaram a sair da “minha zona de conforto”. André é uma das pessoas mais inteligentes que conheço e com o coração do tamanho da magnitude do seu caráter. Meu desejo é que Deus renove cada dia sua jornada na terra, enchendo sua vida de bênçãos e prosperidade. Estarei a sua disposição sempre;

A professora Valdirene Moreira Gomes por todo carinho e cuidado com seus alunos e ex-alunos. Agradeço imensamente todo o suporte financeiro e incentivo aos estudos e publicações. A senhora sempre será minha referência;

As professoras Anna Lvovna Okorokova Façanha, Kátia Valevski Sales Fernandes e Maria Cristina Baracat Pereira por terem aceitado o convite de participar da comissão examinadora;

A Dr^a Letícia Oliveira da Rocha por aceitar revisar o trabalho, pelos experimentos em colaboração de microscopia eletrônica e pela amizade construída ao longo dos anos;

Sabemos que nenhum avanço científico é alcançado por um único indivíduo, mas sim através de uma colaboração de muitos cientistas. Por isso, sou grato aos pesquisadores que contribuíram para esse trabalho: Dr. Antônio Jesus Dorighetto Cogo, Dr^a Letícia Oliveira da Rocha, Dr^a Marcele Souza da Silva, Dr^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão;

Ao Dr. Sanderson Dias Calixto, meu companheiro de jornada e melhor amigo, obrigado por me apoiar sempre e por estar sempre presente. Muito dos resultados obtidos aqui foram possíveis graças à sua disponibilidade;

Aos técnicos do laboratório LFBM: Luiz Carlos Dutra de Souza, Noil Gomes de Freitas, Valéria Miguelote Kokis e Zila Sousa de Macedo por todo carinho, auxílio e serviços ofertados;

A UENF e ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, pela estrutura, concessão da bolsa, apoio e oportunidade de realizar esse curso;

Aos meus pais, Artur e Maria Auxiliadora, pelo amor e compreensão naqueles dias de ausência;

Agora, ao finalizar esta etapa, não poderia deixar de agradecer aos amigos do PACG e LFBM. Obrigado por tudo que fizeram por mim. Que possamos continuar a trilhar caminhos

brilhantes juntos. Em especial, Adriana Cordeiro Gonçalves, Layrana Alves dos Santos, Maria Valéria Veronique Marcel Dantier de Andrade, Mayara Cardoso Soares, Marilúcia de Carvalho Ribeiro, Marcele Souza da Silva, Rúbia Merklein Modesto, Thaís Siqueira Gomes Barreto, Thaynã Amanda Melo Souza e a todos os amigos da FMC (Faculdade de Medicina de Campos). Eu não teria conseguido sem vocês!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELA.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xxiv
RESUMO	xxvii
ABSTRACT	xxviii
1. INTRODUÇÃO	29
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	32
2.1 Peptídeos antimicrobianos.....	32
2.2 Peptídeos antimicrobianos de plantas.....	37
2.3 Inibidores de Protease.....	42
2.4 <i>Adenantha pavonina</i> L.	43
2.5 <i>Candida sp</i> : um problema emergente	46
2.6 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47
2.7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo.....	49
3. OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo Geral	51
3.2 Objetivos Específicos	51
4. MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Material Biológico.....	53
4.1.1 Sementes	53
4.1.2 Microrganismos	53
4.1.3 Linhagens celulares de macrófagos murino.....	54
4.2 Extração, purificação e caracterização de peptídeos de <i>Adenantha pavonina</i>	54
4.2.1 Extração e fracionamento de peptídeos em sementes de <i>Adenantha pavonina</i> ..	54
4.2.2 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephrose.....	54

4.2.3	Purificação de peptídeos através da cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC	55
4.2.4	Eletroforese de proteínas.....	56
4.2.4.1	Preparo da amostra e condições de corrida.....	56
4.2.4.2	Coloração e descoloração do gel.....	56
4.2.5	Ensaio de inibição do crescimento de leveduras.....	57
4.2.6	Análise da atividade citotóxica das frações DEAE-Sepharose.....	57
4.2.7	Avaliação das frações de DEAE-Sepharose no crescimento micobacteriano	58
4.2.8	Etapa de purificação em HPLC fase reversa coluna C18	58
4.2.9	Determinação da atividade inibitória de proteases	59
4.2.10	Zimografia.....	59
4.2.11	Ensaio inibitório de α -amilase	61
4.2.12	Resistência térmica	61
4.3	Mecanismo de ação sobre leveduras oportunista do peptídeo mais ativo das frações de <i>Adenantha pavonina</i>	62
4.3.1	Determinação da concentração inibitória mínima	62
4.3.2	Análise da viabilidade celular.....	62
4.3.3	Ensaio de permeabilização de membranas de leveduras	63
4.3.4	Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio intracelular.....	63
4.3.5	Ensaio de condensação de cromatina.....	64
4.3.6	Detecção da atividade de caspases induzida pelo peptídeo em células de leveduras.....	65
4.3.7	Análise ultraestrutural através de microscopia eletrônica de varredura	65
4.3.8	Análise ultraestrutural através microscopia eletrônica de transmissão.....	66
4.4	Estudo do efeito imunomodulatório e antimicobacteriano do peptídeo mais ativo em sementes de <i>Adenantha pavonina</i>	66
4.4.1	Efeito do peptídeo de interesse na viabilidade de macrófago murino	66
4.4.2	Quantificação da produção de óxido nítrico	67

4.4.3	Quantificação da produção das citocinas TNF- α e IL-1 β	67
4.4.5	Avaliação da atividade antimicrobiana do peptídeo de interesse.....	68
4.5	Quantificação de proteínas.....	68
4.6	Análise estatísticas.....	68
5.	RESULTADOS.....	69
5.1.	Extração, purificação e caracterização dos peptídeos de <i>Adenantha pavonina</i>	69
5.1.1	Avaliação da FARP da semente de <i>A. pavonina</i> sobre leveduras de importância médica.....	69
5.1.2	Etapa de purificação por DEAE-Sepharose de peptídeos de <i>A. pavonina</i> com atividade antimicrobiana.....	71
5.1.3	Efeito tóxico das frações D1 e D2 no crescimento de micobactérias.....	73
5.1.4	Efeitos tóxicos das frações D1 e D2 sobre células de mamíferos.....	74
5.1.5	Etapa de purificação em cromatografia de fase reversa de peptídeos antimicrobianos de <i>A. pavonina</i> e atividade antimicrobiana.....	75
5.1.6	Etapa de purificação em coluna C18 de fase reversa de peptídeos de sementes de <i>A. pavonina</i>	79
5.1.7	Atividade inibitória das frações de <i>A. pavonina</i> L. sobre enzimas serínicas.....	81
5.1.8	Obtenção dos extratos de leveduras e ensaio de inibição da atividade enzimática por zimografia.....	83
5.1.9	Classificação de proteases nos lisados de células de levedura por zimografia.....	83
5.1.10	Atividade inibitória de α -amilase.....	85
5.1.11	Avaliação da estabilidade térmica do ApPI.....	86
5.2	Mecanismo de ação do ApPI sobre leveduras oportunistas.....	87
5.2.1	Determinação da concentração mínima inibitória.....	87
5.2.2	Determinação da viabilidade celular.....	88
5.2.3	Análise da ação de ApPI sobre a permeabilização de membranas plasmáticas.....	91
5.2.4	Análise da ação de ApPI sobre a produção endógena de ROS.....	93
5.2.5	Análise da funcionalidade mitocondrial.....	95
5.2.6	Análise de condensação de cromatina.....	97

5.2.7	Análise da relação da atividade de caspase na morte de <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. buinensis</i> induzida por ApPI	99
5.2.8	Análise da ação de ApPI sobre leveduras em microscopia eletrônica de varredura	101
5.2.9	Análise das alterações ultraestruturais nas células de leveduras induzidas por ApPI.....	103
5.3	Avaliação da citotoxicidade, atividade imunomodulatória e antimicobacteriana do peptídeo purificado.....	105
5.3.1	Avaliação da toxicidade de ApPI sobre macrófagos RAW 264.7	105
5.3.2	Avaliação da ApPI quanto a inibição da produção de NO.....	106
5.3.3	Avaliação da atividade inibitória de ApPI sob mediadores inflamatórios TNF- α e IL-1 β em macrófagos estimulados por LPS.....	107
5.3.4	Avaliação da atividade inibitória de ApPI sobre <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e M299.....	109
6.	DISCUSSÃO.....	111
7.	CONCLUSÕES.....	121
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Representação esquemática das principais classes estruturais de AMPs. As estruturas usadas como exemplo foram resolvidas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou difração de raio-X. Os aminoácidos foram coloridos de acordo com a escala de hidrofobicidade de Eisenberg (cinza claro – hidrofílico; vermelho – hidrofóbico). Adaptado de RONČEVIĆ et al. (2019)..... 33

Figura 2: Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos e modelos de interação em membrana citoplasmática de fungos. Diferentes peptídeos são conhecidos por interagirem com diferentes esfingofosfolípidios. (A) Proteína antifúngica PAF de *Penicillium chrysogenum*, (B) Cecropina A de X, (C) NaD1 de *Nicotiana glauca* (D) HsAFP1 de *Heuchera sanguinea*, (E) RsAFP2 de *Raphanus sativus* e (F) Histatina 5 da saliva de *homo sapiens*. Adaptado de (STRUYFS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2021). 34

Figura 3: Classificação de AMPs depositados no banco de dados Antimicrobial Peptide Database (APD, 2023) por suas atividades biológicas. HIV = vírus da imunodeficiência humana (do inglês *human immunodeficiency virus*); MRSA = *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (do inglês *methicilin resistant Staphylococcus aureus*), TB = tuberculose. Análise expressa em porcentagem em cada classe considerando o total de AMPs depositados. 35

Figura 4: Número de publicações mundiais relacionadas ao tema AMPs de 1920-2023. Para esta análise bibliométrica, adotou-se como parâmetro o período analisado (anos) por palavra-chave (AMPs) e aplicando filtros de acordo com o território (mundo), obtendo desta forma, o resultado de 238.313 documentos analisados ao longo de cem anos. Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados extraídos da Plataforma Scopus (2023)..... 36

Figura 5: Número de publicações relacionadas ao tema AMPs de 1963-2023, no Brasil. Para esta análise bibliométrica, adotou-se como parâmetro o período analisado (representado em anos) por palavra-chave (AMPs) e aplicando filtros de acordo com o território (limitado ao Brasil), obtendo desta forma, o resultado de 2980 documentos analisados nesse intervalo

de tempo. Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados extraídos da Plataforma Scopus (2023).....37

Figura 6: Representação esquemática da estrutura tridimensional de algumas famílias de AMPs de plantas. (a) tionina de *Cramble hispanica* subsp. *Abyssinica* (PDB: 3U7T). (b) defensina de *Aesculus hippocastanum* (PDB: 1BK8). (c) peptídeo semelhante a heveína de *Gypsophila vaccaria* (PDB: 5XDI). (d) peptídeo do tipo knotina de *Hibiscus sabdariffa* (PDB:5GSF). (e) peptídeo da família α -hairpina de *Nigella sativa* (PDB:2NB2). (f) proteína transportadora de lipídios de *Hordeum vulgare* (PDB:3GSH). (g) Snakina de *Solanum tuberosum*. (h) ciclotídeo de *Clitoria ternatea* (PDB:2LAM). O N-terminal e o C-terminal do ciclotídeo estão conectados e indicados em vermelho e azul, respectivamente. Verde representa o esqueleto de aminoácidos. Amarelo representa cisteínas e pontes dissulfeto entre elas. Adaptado de LI et al. (2021).....39

Figura 7: Linha do tempo dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) de plantas identificados pelo grupo entre 1996-2023. Espécies vegetais envolvidas: *Vigna unguiculata*, *Passiflora edulis f. flavicarpa*, *Phaseolus vulgaris*, *Coffea canephora*, *Capsicum annum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum* e *Adenantha pavonina*. Fonte: Elaboração própria a partir da análise de documentos 41

Figura 8: Imagens mostrando aspectos botânicos e artesanais de sementes de *Adenantha pavonina*. Planta adulta (A) e alguns dos seus órgãos vegetais (B) e pulseira confeccionada com sementes da espécie (C). Fonte A: <https://br.pinterest.com>. Foto tirada por Bartolozita Brígida. Fonte B: <https://www.theplantattraction.com/products/adenanthera-pavonina-10-seeds-red-sandalwood-saga-seed-coral-tree>. Fonte C: <https://www.elo7.com.br/pulseira-de-sementes-adenanthera-pavonina-1/dp/10B6BFD>. 45

Figura 9: Ilustração esquemática do mecanismo de ação de AMPs contra micobactéria. Após a indução da resposta imune pelas micobactérias, os peptídeos antimicrobianos são direcionados para área de infecção, onde podem ser recrutados para o granuloma. Em nível celular, a destruição dos patógenos ocorre dentro dos fagolisossomos dos macrófagos. A

composição da parede celular das micobactérias e os principais mecanismos de ação dos AMPs contra micobactérias são mostrados: (1) ruptura da parede celular e da membrana plasmática, (2) formação de poros na membrana, (3) inibição da ATPase, (4) alvos intracelulares dos AMPs: (a) ligação a ácidos nucleicos, inibição da replicação e transcrição; (b) inibição da tradução, e (5) degradação de proteínas. Os AMPs selecionados para cada atividade estão destacados. Abreviações: LL-37, extremidade C-terminal da catelicidina; HBD, β -defensina humana; GNLY, granulicina; Hcp, hepcidina; LF, lactoferrina; NE, elastase de neutrófilo; HNPs, proteínas de neutrófilos humanos; CAMP, peptídeos antimicrobianos catiônicos; SAMPs, peptídeos antimicrobianos sintéticos; MIAP, peptídeo antimicrobiano derivado da magainina-I; LLAP, peptídeo antimicrobiano derivado da LL-37; d-LAK, peptídeos antimicrobianos d-enantioméricos; CTPS, catepsinas. Adaptado de (ARRANZ-TRULLÉN et al., 2017)..... 48

Figura 10: Caracterização da FARP. (A): Visualização eletroforética da FARP em gel de tricina SDS-PAGE obtida de sementes maduras de *Adenantha pavonina*. (M) Marcadores de massa molecular (kDa). (B): Efeito inibitório da FARP no crescimento da levedura *Candida albicans*. As células foram tratadas na presença ou ausência (controle) de 400 e 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Acima das barras de teste são mostradas a porcentagem de inibição em comparação com o controle. (***) indica $p < 0,001$. (C): Perda da viabilidade celular demonstrada pela incapacidade das células tratadas de formar colônias. UFC, unidade formadora de colônia (calculada com base em 100 μL da diluição do controle e dos ensaios de amostra). (D): Fotografia das placas de Petri mostrando a viabilidade celular em *C. albicans* após 24 h de tratamento com FARP (400 e 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)..... 70

Figura 11: Fracionamento da FARP e atividade antimicrobiana de frações da DEAE-Sepharose. (A) Cromatograma de FARP de sementes de *Adenantha pavonina* em troca iônica DEAE-Sepharose. D1, fração não retida eluída em 0,1 M Tris HCl, pH 9,0 e D2 fração retida eluída usando 1 M NaCl no mesmo tampão, e 4 mL foram coletados em cada tubo. (B) Visualização eletroforética em gel de tricina SDS-PAGE contendo 40 μg de cada fração (frações FARP, D1 e D2). M – Marcadores de massa molecular (kDa); Frações D1 e D2 conforme descrito acima. (C) Efeito inibitório de D1 e D2 no crescimento da levedura *Candida albicans*. As células foram tratadas na presença ou ausência (controle) de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada fração. Acima das barras de teste são mostradas a porcentagem de inibição

em comparação com o controle. O asterisco (***) indica $p < 0,001$. (D): Perda da viabilidade celular demonstrada pela incapacidade das células tratadas de formar colônias. UFC, unidade formadora de colônia (calculada com base em 100 μL da diluição dos ensaios de controle e amostra). (E) Fotografia das placas de Petri mostrando a viabilidade celular em *C. albicans* após 24 h de tratamento com as frações D1 e D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).....72

Figura 12: Atividade antimicobacteriana das frações DEAE-Sepharose. (A) Ensaio de inibição do crescimento da cepa laboratorial *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv na presença de diferentes concentrações das frações D1 e D2, obtido após cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose. Acima das barras de teste são mostradas as porcentagens de inibição. (B) Ensaio de inibição do crescimento do isolado clínico *M. tuberculosis* M299 na presença de diferentes concentrações das frações D1 e D2, obtido após cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose. Acima das barras de teste são mostradas as porcentagens de inibição.....74

Figura 13. Perfil de citotoxicidade celular em macrófagos RAW 264.7. Avaliação da citotoxicidade das frações D1 e D2 de sementes de *Adenantha pavonina* em culturas de macrófagos RAW 264.7 pelo método MTT. As células foram tratadas após 24 h com as frações em diferentes concentrações. Células RAW 264.7 não tratadas foram usadas como controle (citotoxicidade – 0%) e 1% de detergente Triton X-100 foi adicionado como tratamento no controle positivo (citotoxicidade – 100%). Média aritmética \pm desvio padrão ($n = 3$). $P < 0,05$ (*) em comparação com células não tratadas. Acima das barras de teste é mostrada a porcentagem de inibição.....75

Figura 14. Separação da fração D1 e atividade antifúngica de amostras de HPLC. (A) Etapa intermediária de purificação dos peptídeos da fração D1 das sementes de *Adenantha pavonina*. Cromatograma da fração D1 após cromatografia de fase reversa em coluna C18. A linha oblíqua representa o gradiente de 2-propanol que se estende de 0 a 50%. O perfil de eluição das amostras foi monitorado a 220 nm. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL.min^{-1} . P1 a P10, frações retidas na coluna C18 e separadas por 2-propanol. (B e C) Visualização eletroforética das frações obtidas após D1 ser cromatografado em coluna C18 por gel tricina SDS-PAGE. M, marcador de massa molecular (kDa). (D) Efeito antifúngico das frações P1 a

P10 a $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre o crescimento de *Candida albicans*. A porcentagem de inibição do crescimento fúngico é mostrada acima das barras de teste. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os asteriscos indicam significância pela análise de variância (ANOVA) de um fator ($p < 0,001$).....77

Figura 15. Atividade da fração P4 sobre espécies de *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae*: Crescimento de leveduras na ausência (controle) e na presença da fração P4 em diferentes concentrações ($100 - 25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por 24 h. A porcentagem de inibição do crescimento fúngico é mostrada acima das barras de teste. As experiências foram realizadas em triplicata. Os asteriscos indicam significância pela análise de variância (ANOVA) de um fator ($p < 0,001$). (A) *Candida albicans* (B) *Saccharomyces cerevisiae* (C) *Candida buinensis* (D) *Candida parapsilosis*.....78

Figura 16. Purificação, identificação e caracterização de peptídeo bioativo. (A) Cromatograma da fração P4 recromatografada na coluna de fase reversa C18. A linha oblíqua representa o gradiente de 2-propanol que se estende de 0 a 25%. O perfil de eluição das amostras foi monitorado em 220 nm e foram obtidas duas frações denominadas P4r1 e P4r2. (B) Visualização eletroforética das frações P4r1 e P4r2 em gel de tricina SDS-PAGE. M, marcador de massa molecular (Da). (C): Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento de *Candida albicans* incubada com as frações P4r1 e P4r2 a $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A porcentagem de inibição do crescimento fúngico é mostrada acima das barras de teste. As experiências foram realizadas em triplicata. Os asteriscos indicam significância pela análise de variância (ANOVA) de um fator ($p < 0,001$).....80

Figura 17: Avaliação da atividade inibitória sobre proteases das frações FARP ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$), D1 ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e ApPI ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), obtidas a partir das sementes de *Adenantha pavonina*. (A) Efeito inibitório da atividade de tripsina na ausência e presença das diferentes frações. (B) Efeito inibitório da atividade de quimotripsina na ausência e presença das diferentes frações. (C) Efeito inibitório sobre a atividade da tripsina em condições experimentais de purificação de ApPI (38°C , na presença of 25 % de solução B (100% 2-propanol + 0.1% TFA) a 90 min de incubação. (D) Efeito inibitório na atividade de quimotripsina em condições experimentais de HPLC. Asteriscos indicam significância pelo teste ANOVA, e os valores de diferença foram considerados significativos

se $p < 0,05$. A porcentagem de inibição da enzima é mostrada acima das barras de teste. Os experimentos foram realizados em triplicata.....82

Figura 18: Avaliação da atividade inibitória de proteases a partir de frações obtidas de sementes *Adenantha pavonina*. (A): Visualização eletroforética em gel de tricina (12,5%) SDS-PAGE dos sobrenadantes de lisados de células de leveduras cultivadas na presença ou ausência de BSA. Vinte microgramas de cada lisado de células foram aplicados. (M) Marcador de massa molecular em kDa. (B) Detecção de atividades proteolíticas a partir de extratos celulares de *C. albicans* e *S. cerevisiae* por zimografia na ausência ou presença de BSA. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R 250. (Controle): Trip (Tripsina de pâncreas suíno). (C) Zimograma mostrando bandas de atividade proteolítica a partir do lisado de células de *S. cerevisiae* e (D) *C. albicans* na presença de diferentes frações FARP (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D1 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), ApPI (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), suplementadas com BSA a 30 °C por 1 hora. (E) Zimograma mostrando bandas de atividade proteolítica a partir do lisado de células de *S. cerevisiae* na presença de diferentes classes de inibidores comerciais. (PMSF) - fenilmetilsulfonilfluorido. (Pepstatina) – Pepstatina A. (EDTA) – ácido etilenodiaminotetracético.....84

Figura 19: ApPI é capaz de inibir a atividade da α -amilase. (A) Atividade da α -amilase de *Tenebrio molitor* na presença e ausência de diferentes frações: FARP (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D1 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), ApPI (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). (B) Atividade de α -amilase salivar humana na presença e ausência de FARP (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D1 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), ApPI (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Acima das barras de teste são mostrados os percentuais de inibição. Os valores são a média \pm DP de triplicatas. O asterisco indica significância por ANOVA ($p < 0,05$). EDTA (Controle positivo). BSA (Controle negativo).....85

Figura 20: Ensaio de termo estabilidade. Efeito do aumento da temperatura em ApPI (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) sob a inibição do crescimento de *C. albicans* por 24 h. A porcentagem de inibição do crescimento fúngico é mostrada acima das barras de teste. Os ensaios foram realizadas em triplicata. Os asteriscos indicam significância pela análise de variância (ANOVA) de um fator ($p < 0,001$).....86

Figura 21: Determinação da Concentração mínima inibitória de ApPI sobre *S. cerevisiae* (A), *C. buinensis* (B), *C. albicans* e *C. tropicalis* (C). Em cima das barras está indicada a percentagem de inibição do tratamento em relação ao seus respectivos controle. Abaixo das barras mostram a fotografia do fundo do poço e padrão de crescimento das leveduras. Os asteriscos indicam o grau de significância ($p < 0.001$) em relação ao controle.....88

Figura 22: Ensaio de viabilidade celular. Determinação da viabilidade celular das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis* tratada com ApPI, após 12 h. CFU = Médias com desvio padrão das unidades formadoras de colônias. (-) Número excessivo de colônias crescidas que impediu a contagem. Note que não há desenvolvimento de colônias nas placas tratadas de *S. cerevisiae* e *C. buinensis*, indicando que 12, 5 e 50 são os valores da DL_{100} de ApPI dessas leveduras, respectivamente. A DL_{100} é a representativa de um ensaio realizado apenas uma vez em triplicata.....90

Figura 23: Permeabilização de membrana plasmática das células de leveduras tratadas com ApPI. (A) A fluorescência verde indica a permeabilização de membrana. As células foram visualizadas em DIC e por fluorescência, todas no mesmo tempo de exposição. Aumento de 630x. Barras 20 μ m. (B) Número de células permeabilizadas determinadas após contagem de células observadas em três campos aleatórios em DIC e fluorescência. Controle positivo representa células de leveduras tratadas com aquecimento e controle negativo apenas as células de leveduras com a sonda Sytox Green. Asteriscos (*) indicam diferença estatística significativa ($p < 0.001$), pelo One-Way ANOVA. As imagens mostradas são representativas de um experimento de três.....93

Figura 24: Ensaio de indução de ROS. (A) Imagens de células de leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* após ensaio de indução de ROS por microscopia de fluorescência através da sonda H_2DCFDA . Células foram tratadas com ApPI, a partir dos valores de MIC_{100} de cada levedura e depois analisado por estresse oxidativo. Células controle tratados somente com H_2DCFDA . Controle positivo realizado com ácido acético 200 mM. Barras = 20 μ m. (B) A porcentagem de indução de ROS foi quantificada pelo número de células em três campos aleatórios em DIC e fluorescência das amostras visualizadas, sendo o

número de células em DIC de cada amostra considerada como 100%. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,001$) pelo One-way ANOVA.....95

Figura 25: Ensaio de funcionalidade mitocondrial. Imagens de células de *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* tratados com ApPI após 12 h de exposição. A fluorescência vermelha indica o potencial de membrana mitocondrial. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas no mesmo tempo de exposição. Imagem com ampliação 630 x. Barras: 10 μm 96

Figura 26: Detecção de condensação de cromatina em leveduras do gênero *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com ApPI. Marcação com DAPI das células controle e tratadas durante 12 h com os valores da MIC₁₀₀ de ApPI. Note brilho mais intenso e aumento do núcleo nas amostras tratadas. Barras: 10 μm 98

Figura 27: Detecção da atividade de metacaspases. Imagens das células de *S. cerevisiae* e *C. buinensis* após o ensaio de atividade de caspase, visualizadas por microscopia de fluorescência usando a sonda fluorescente CaspACE FITC-VAD-FMK. As células foram tratadas com os valores da MIC₁₀₀ por 12 h. As células controle foram tratadas apenas com CaspACE FITC-VAD-FMK. Barras = 10 μm 100

Figura 28: Alterações morfológicas em células de leveduras induzidas por ApPI. Imagem de MEV mostrando alterações em *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* na superfície celular após incubação com ApPI. Células de leveduras foram tratadas com MIC₁₀₀ por 12 h em relação ao controle (células não incubadas com o peptídeo). Setas brancas indicam debris celular, asteriscos brancos indicam perda de conteúdo citoplasmático e asterisco preto indica formação de pseudohifas e espessamento de parede. Barras 2 μm102

Figura 29: Imagem de MET mostrando alterações ultraestruturais nas células de leveduras induzidas por ApPI após 12 h. Células de leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* na presença ou ausência (controle) do peptídeo. Durante a exposição com ApPI, núcleos apresentam áreas de coloração escura, o que indica condensação

de cromatina (setas), alteração do espessamento de parede (triângulo) e cicatriz de brotamento (asteriscos). PC = parede celular. M = mitocôndria. N= núcleo. V= vacúolo.....104

Figura 30: Toxicidade sobre células de macrófagos murinos RAW 264.7, após 24 h de tratamento com ApPI. Acima das barras é mostrada a porcentagem de citotoxicidade pelo método de MTT. IC₅₀ – 50% para concentração citotóxica requerida para metade da redução da viabilidade celular, calculada por análise de regressão. (***) p < 0.001 comparado com o grupo não tratado e determinado por teste de Tukey.....105

Figura 31: Avaliação da capacidade inibitória de ApPI na produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS [1µg.mL⁻¹] e tratados com o peptídeo purificado nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg.mL⁻¹. Após 24 h o sobrenadante da cultura foi avaliado. A concentração de NO em µg.mL⁻¹ foi obtida por uma curva padrão de nitrito e comparada aos controles positivos de produção de NO (macrófagos somente estimulados por LPS) e negativo (macrófagos não estimulados). Valores são reportados como média ± desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com p < 0,001 (***). Acima da barra mostra a porcentagem de inibição e na parte superior do gráfico encontra-se a concentração mínima inibitória 50% obtida nas atividades avaliadas. (n=3)..... 106

Figura 32: Efeito inibitório de ApPI na produção de TNF-α e IL-1β em macrófagos estimulados por LPS. (A) Macrófagos RAW 264.7. (B) Macrófagos J774A foram tratados com LPS na presença ou na ausência de amostra, (25 – 200 µg.mL⁻¹). A quantificação dos mediadores inflamatórios nos sobrenadantes de cultura foi realizado por ELISA sanduíche. As barras para cada derivado referem-se às concentrações testadas em ordem crescente. Macrófagos estimulados por LPS foram usados como controle positivo (C+) e macrófagos não tratados como controle negativo (C-). Os valores foram apresentados como média ± desvio padrão e as diferenças estatísticas entre cada grupo e C+ foram indicadas de acordo com p < 0,001 (***), p < 0,01 (**), e p < 0,05 (*). 108

Figura 33: Atividade antimicrobiana do inibidor de protease ApPI. (A) Ensaio de inibição do crescimento da cepa laboratorial *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv na presença de diferentes concentrações do peptídeo ApPI, obtido após cromatografia de fase reversa em coluna C18. Acima das barras de teste são mostradas a porcentagem de inibição. Asteriscos indicam grau de significância, sendo $p < 0,001$. (B) Ensaio de inibição do crescimento do isolado clínico *M. tuberculosis* M299 na presença de ApPI, obtido após cromatografia de fase reversa em coluna C18. Acima das barras de teste são mostradas a porcentagem de inibição. Asteriscos indicam grau de significância, sendo $p < 0,001$ 109

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos inibidores de protease de *Adenantha pavonina*
..... 115

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPs** – Peptídeos antimicrobianos (do inglês, *antimicrobial peptides*);
- APD** - Banco de dados de peptídeos antimicrobianos (do inglês, *Antimicrobial Peptide Database*);
- ApDef₁** – Defensina-1 de *Adenantha pavonina* (do inglês, *A. pavonina defensin one*);
- ApPI** – Inibidor de protease de *Adenantha pavonina* ((do inglês, *A. pavonina protease inhibitor*))
- BAPNA** - N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida;
- BSA** –Albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin*);
- BTPNA** - N-benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida;
- CAMP**- Peptídeo antimicrobiano catelicidina (do inglês, *cathelicidin antimicrobial peptide*)
- CTPS**- Catepsinas;
- d-LAK**- Peptídeos antimicrobianos d-enantioméricos;
- DAPI** - 4',6-diamidino-2-fenil-indol (do inglês, 4',6-diamidino-2-phenylindole);
- DEAE** – Dietilaminoetil (do inglês, *diethylaminoethyl*);
- DIC** – Contraste de interferência (do inglês, *differential interference contrast*);
- DL** – Dose letal;
- DO** – Densidade óptica;
- DMEM** – Meio de águas de Eagle modificadas por Dulbeco (do inglês, *Dulbecco's modified medium*);
- DNA** – ácido desoxirribonucleico;
- DNS** - ácido 3,5-dinitrosalicílico ;
- EDTA** - ácido etilenodiaminotetracético;
- FARP** – fração aquecida rica em peptídeos;
- FBS** - do inglês, *fetal bovine serum*;
- FITC** – Isotiocianato de fluoresceína;
- GNLY**- granulicina;
- HBD** - β -defensina humana;
- Hepc** - hepcidina;
- HIV** - vírus da imunodeficiência humana (do inglês *human immunodeficiency virus*)
- HNPs**- proteínas de neutrófilos humanos;
- HPLC** - do inglês, *high performance liquid chromatography*;
- HsAFPI**- peptídeo de *Heuchera sanguinea*
- H₂DCFDA** - 2',7' diclorofluoresceína diacetato;
- IC₅₀** - do inglês *inhibitory concentration that diminishes a specified response to 50%*;

IL-1 β – Interleucina 1 beta;
IL- 6 – Interleucina 6;
kDa - quilodaltons;
LF- lactoferrina;
LLAP- peptídeo antimicrobiano derivado da LL-37;
LPS – lipopolissacarídeo;
LTPs - do inglês, *lipid transfer proteins*;
MDR - do inglês, *multiple drug resistance*;
MET- Microscopia eletrônica de transmissão;
MEV- Microscopia eletrônica de varredura;
MIAP- peptídeo antimicrobiano derivado da magainina-I;
MIC - do inglês, *minimal inhibitory concentration*;
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilcolina
Mtb - *Micobacterium tuberculosis*;
MtDef4 – defensina de planta obtida de *Medicago truncatula*
MTT - 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol;
MW – do inglês, *molecular weight*;
NaD1 – peptídeo antifúngico de *Nicotiana glauca*;
NE- elastase de neutrófilo;
NO – óxido nítrico;
OMS – Organização Mundial da Saúde;
PAF – Proteína antifúngica de *Penicillium chrysogenum*
PBS – Salina fosfatada tamponada;
PDB – do inglês, *protein data bank*
PIs – do inglês, *protease inhibitors*;
PMSF – fluoreto de fenilmeltilsulfonil;
PR – Proteínas relacionadas a patogênese;
P4r1 – fração purificada em HPLC que deu origem à fração ApPI
RIPE – Rifampicina; Isoniazida; Pirazinamida; Etambutol;
ROS – do inglês, *reactive oxygen species*;
RNA – ácido ribonucleico;
RsAFP2 – peptídeo de *Raphanus sativus*;
SAMPs- peptídeos antimicrobianos sintéticos;
SDS - dodecil sulfato de sódio;
TB - Tuberculose;

TEMED - N, N', N'', N''', N''''- tetrametiletenodiamino;

TFA - do inglês, *trifluoroacetic acid*;

TNF α – fator de necrose tumoral

Tris - Tris (hidroximetil) amino etano;

U – Atividade unitária;

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VuDef1- defensina de *Vigna unguiculata* (L.)

Z-VAD-FMK- Carbobenzoxi-Valil-Alanil-aspartil-[O-metil]-Fluorometilcetona

RESUMO

Nos últimos anos, o uso prolongado e indiscriminado de antibióticos favoreceu o surgimento de patógenos resistentes em todo o mundo. Avanços científicos não acompanham o desenvolvimento da resistência microbiana. Nesse sentido, um número crescente de peptídeos antimicrobianos de plantas tem sido purificado e caracterizado para combater essa problemática. No presente estudo, descrevemos a obtenção de frações enriquecidas de peptídeos, a partir de sementes de *Adenantha pavonina* e avaliamos suas atividades antifúngicas e antimicobacterianas, bem como o seu mecanismo de ação em leveduras do gênero *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae*. Em primeira análise, a fração aquecida rica em peptídeos foi escolhida para a purificação inicial e caracterização de seus constituintes proteicos. A fração básica obtida pela cromatografia de troca iônica foi separada por cromatografia de fase reversa em coluna C18 em dez frações (P1-P10), nas quais a atividade antifúngica foi analisada sobre *C. albicans*. A fração P4 apresentou atividade de inibição de 80% no crescimento dessa espécie de levedura na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, essa fração foi posteriormente separada por coluna de fase reversa C18 em duas novas frações, P4r1 e P4r2, sendo que o peptídeo de aproximadamente 6 kDa da fração P4r1 mostrou-se ser o peptídeo biologicamente ativo em um ensaio antifúngico. Além disso, P4r1 demonstrou inibir a atividade proteolítica de extratos de *S. cerevisiae* e *C. albicans* por zimografia, que são compostos principalmente por serino proteases, como demonstrado por inibidores específicos para essa classe de protease. Por esse motivo, denominamos de ApPI (Inibidor de Protease de *Adenantha pavonina*). Em síntese, isolamos um novo peptídeo da família Fabaceae, que apresenta capacidade de resistência a altas temperaturas, inibe o crescimento de leveduras e diferentes cepas de *M. tuberculosis*, sem efeito tóxico em células de mamíferos nas concentrações testadas, bem como apresentam atividade inibitória para diferentes α -amilases. Este último resultado sugere que o ApPI é um inibidor bifuncional e com propriedades anti-inflamatórias *in vitro*. Além disso, é capaz de induzir alterações morfológicas, ultra estruturais, permeabilização de membrana, aumento de ROS, perda de atividade mitocondrial e ativação de caspases em *C. buinensis* e *S. cerevisiae*. Os dados compilados aqui apontam para estabelecer a multiplicidade de usos potenciais do ApPI para controle de doenças infecciosas.

Palavras-chave: Resistência microbiana, Moléculas bioativas, Tuberculose, Candidíase.

ABSTRACT

In recent years, the prolonged and indiscriminate use of antibiotics has facilitated the emergence of resistant pathogens worldwide. Scientific advancements have not kept pace with microbial resistance. Additionally, co-infections caused by *Mycobacterium tuberculosis* and species of *Candida* spp. can occur in the same patient, complicating the underlying infection process. In this context, an increasing number of antimicrobial peptides from plants have been purified and characterized to combat this issue. In the present study, we describe the isolation of peptide-enriched fractions from *Adenanthera pavonina* seeds and evaluate their antifungal and antimycobacterial activities, as well as their mechanism of action against *Candida* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. In the initial analysis, the heated fraction rich in peptides was chosen for final purification and characterization of its protein constituents. Basic fraction obtained from ion exchange chromatography was separated through C18 reversed-phase chromatography into ten subfractions (P1-P10), wherein antifungal activity was analyzed against *C. albicans*. Subfraction P4 exhibited 80% inhibition activity against the growth of this yeast species at a concentration of 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Therefore, this fraction was subsequently purified by C18 reversed-phase column chromatography into two new subfractions, P4r1 and P4r2, with the approximately 6 kDa peptide proving to be biologically active in an antifungal assay. Moreover, P4r1 demonstrated the inhibition of proteolytic activity in extracts from *S. cerevisiae* and *C. albicans* on zymography, predominantly composed of serine proteases, as demonstrated by specific inhibitors for this class of protease. Hence, we named it *ApPI* (*Adenanthera pavonina* Protease Inhibitor). In conclusion, we have isolated a new peptide from the Fabaceae family, demonstrating resistance to high temperatures, inhibiting the growth of yeasts and different strains of *M. tuberculosis*, without toxic effects on mammalian cells at tested concentrations. Additionally, they exhibit catalytic activity towards various α -amylases. This latter result suggests that *ApPI* is a bifunctional inhibitor with in vitro anti-inflammatory properties. Moreover, it can induce morphological and ultrastructural alterations, membrane permeabilization, increased ROS, mitochondrial activity loss, and caspase activation in *C. buinensis* and *S. cerevisiae*. The compiled data here aim to contribute to establishing the multiplicity of potential uses for *ApPI* in controlling infectious diseases.

Key- words: Microbial resistance, bioactive molecules, tuberculosis, candidiasis

1. INTRODUÇÃO

Uma ameaça global à saúde pública é o surgimento de bactérias, fungos e leveduras patogênicas multirresistentes aos agentes antimicrobianos. A pressão seletiva contínua de resíduos de antibióticos no ambiente e o uso indiscriminado destes na medicina humana e agropecuária acarretou na geração de cepas resistentes a multidrogas, sendo reportadas cepas resistentes a todos os antibióticos comercializados, construindo um cenário alarmante sobre uma era sem opções de tratamento para as doenças infecciosas (BROWN et al., 2012; PFALZGRAFF; BRANDENBURG; WEINDL, 2018).

As estimativas indicam que em 2050 cerca de 10 milhões de pessoas em todo o mundo morrerão anualmente de infecções causadas por bactérias resistentes à antibioticoterapia. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), esse evento é classificado como uma das maiores ameaças à saúde humana constituindo um grave problema de saúde pública. Outro fator agravante deste cenário é o fato do desenvolvimento de novos fármacos estar estagnado nas últimas décadas, limitando ou deixando sem opções de tratamento algumas destas infecções (CORDES et al., 2014; MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

Esses problemas já podem ser perceptíveis nos casos de infecções fúngicas disseminadas e invasivas, o que demonstra que um número limitado de agentes antifúngicos, que é ainda mais reduzido do que os agentes antibacterianos, as tornam uma séria ameaça à saúde pública (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2014; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). Novas estimativas indicam que as doenças fúngicas são responsáveis por aproximadamente 2 milhões de mortes a cada ano em todo o mundo, superando três vezes a mortalidade causada pela malária e sendo ainda maior do que a mortalidade causada pela tuberculose, até então a principal causa de morte entre as doenças infecciosas (BANERJEE; DENNING; CHAKRABARTI, 2021). Diante do exposto, o surgimento de novas estratégias terapêuticas se faz necessário para combater esta problemática.

Paralelamente, temos relevantes fatores econômicos inseridos nesse contexto, em decorrência ao prolongamento da duração e intensidade dos tratamentos, exigindo a utilização simultânea de vários medicamentos, aumentando também o tempo de permanência de pacientes internados e conseqüentemente os custos de manutenção da internação (FAIR; TOR, 2014; RODRIGUES; NOSANCHUK, 2020).

Entre os patógenos fúngicos oportunistas mais comuns estão aqueles do gênero *Candida*, juntamente com *Aspergillus*, *Cryptococcus* e *Pneumocystis* (MCCARTY; WHITE; PAPPAS, 2021). *Candida albicans* é uma espécie comensal que em certas situações se torna um patógeno oportunista. Historicamente, tem sido considerada a espécie mais patogênica do gênero e continua sendo uma das causas mais comuns de infecções fúngicas cutâneas ou sistêmicas. As doenças causadas por esta espécie estão associadas a alta mortalidade sendo mais habitual em pacientes imunossuprimidos, ou quando associada ao uso de dispositivos invasivos, como o cateter venoso central, nutrição parenteral, cirurgias abdominais, tempo de internação prolongada em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), além do consumo indiscriminado de agentes antimicrobianos (ARENDRUP et al., 2011; DADAR et al., 2018; KATO et al., 2018).

Apesar do progresso da precisão do diagnóstico e do início precoce da terapia farmacológica antifúngica, a candidíase ainda é responsável pela quarta maior causa de morte por sepse hospitalar, apresentando uma taxa de mortalidade entre 35-75%, tanto em UTI, quanto na assistência de baixa complexidade ou comunitária, correspondendo até 11% do índice de mortalidade ocasionada pela infecção (MURRI et al., 2018).

Nos últimos anos, observou-se uma mudança epidemiológica e outras espécies de *Candida* emergiram, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (GILES et al., 2018). A espécie de levedura mais preocupante e também emergente é a *C. auris*, relatada pela primeira vez em 2009 (CHAKRABARTI; SOOD, 2021). Adicionalmente, a OMS emitiu uma lista de patógenos fúngicos que representam uma grande ameaça à saúde humana, considerando a questão da resistência antifúngica e, conseqüentemente, a possibilidade de tratamento das doenças causadas por eles, e entre os patógenos considerados de prioridade crítica estão a *C. auris* e *C. albicans* (OMS, 2022).

Outro patógeno que tem causado preocupação é a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose que atingiu uma taxa de mortalidade de 1,3 milhão de pessoas em 2020. Os relatos de cepas de *M. tuberculosis* resistentes às substâncias terapêuticas disponíveis constituem uma grande ameaça ao tratamento e controle da doença (KHAWBUNG; NATH; CHAKRABORTY, 2021). É importante destacar que coinfeções causadas por *M. tuberculosis* e espécies de *Candida* podem ocorrer nos mesmos pacientes, especialmente naqueles imunocomprometidos, o que pode complicar o tratamento e piorar o estado de saúde do paciente (AMALA; HANSON; WOKEM, 2020). Além disso, foi demonstrado que as coinfeções de COVID-19 e tuberculose aumentam o risco de uma

doença grave e de morte (SONG et al., 2021; DANESHVAR et al., 2023). Todos esses casos representam um desafio no diagnóstico, pioram o prognóstico da doença e a rapidez do diagnóstico, bem como a escolha certa do medicamento, todos fatores importantes para a recuperação dos pacientes.

Portanto, há uma necessidade urgente de se desenvolverem substâncias terapêuticas que sejam eficazes para o tratamento dessas patologias. Sob este prisma, os peptídeos antimicrobianos de plantas (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) ou seus derivados sintéticos, devido ao amplo espectro de atividade sobre microrganismos, propriedades imunomoduladoras e seus múltiplos alvos de ação sobre patógenos surgem como moléculas promissoras e seu estudo tem crescido ao longo das últimas décadas (MAHLAPUU et al., 2016).

Sendo assim, este trabalho teve como premissa avaliar a atividade antimicrobiana de peptídeos extraídos de sementes de *Adenantha pavonina* sobre o crescimento de leveduras e cepas de *M. tuberculosis* de diferentes níveis de virulência. Desta forma, a partir dos resultados que foram obtidos, pretendemos propor uma estratégia mais promissora no ramo da biotecnologia, uma vez que esta possibilitará a prospecção de novas classes de moléculas naturais e ou sintéticas, com possibilidade de contornar o problema da resistência a múltiplas drogas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peptídeos antimicrobianos

Os AMPs pertencem a um grupo heterogêneo e abundante de moléculas que são produzidas tanto em organismos procariotos quanto em eucariotos, atuando contra competidores e como constituintes importantes da imunidade inata, respectivamente (BROEKAERT et al., 1997; SILVA et al., 2011). Estes são ativos contra uma diversidade de microrganismos como: vírus, bactérias, leveduras, fungos filamentosos e protozoários, ao mesmo tempo em que geralmente apresentam baixa ou nenhuma toxicidade para células de mamíferos (ZASLOFF, 2002; HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008; ZHANG; XU; DONG, 2022; ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2022).

Além disso, compartilham de características gerais comuns, como: baixa massa molecular (inferior a 10 kDa), propriedades anfipáticas, possuindo tanto uma região hidrofóbica que interage com lipídeos, quanto uma região hidrofílica carregada positivamente (+1 a +13) capaz de interagir com estruturas aniônicas de membranas celulares, por meio de interações eletrostáticas, resultando em ruptura ou na formação de poros. Também são ricos em resíduos de cisteína os quais se conectam aos pares (2, 3 ou 4), formando pontes dissulfeto que conferem a eles alta estabilidade físico-química tornando-os bastante resistentes às proteases presentes no soro/plasma (BROEKAERT et al., 1997; GENNARO; ZANETTI, 2000; HANCOCK; SCOTT, 2000; BOMAN, 2003; MARSHALL; ARENAS, 2003; PESCHEL; SAHL, 2006; BENKO-ISEPPON et al., 2010; WANG et al., 2019; ZHANG; XU; DONG, 2022).

De acordo com a composição de aminoácidos, tamanho e estruturas conformacionais, os AMPs podem ser agrupados em quatro famílias principais. A família α é composta por peptídeos lineares que exibem uma estrutura em forma de α -hélice (Figura 1 A). A família β inclui peptídeos que possuem pelo menos um par de folhas β , estabilizadas por pontes dissulfeto (Figura 1 B). Já a família $\alpha\beta$ é composta por peptídeos que apresentam tanto α -hélices quanto folhas β , estabilizados por pontes dissulfeto (Figura 1 C). Por fim, a família não $\alpha\beta$ consiste em peptídeos que não possuem α -hélices nem folhas β , mas exibem uma estrutura estendida ou em forma de *loop* (RONČEVIĆ; PUIZINA; TOSSI, 2019).

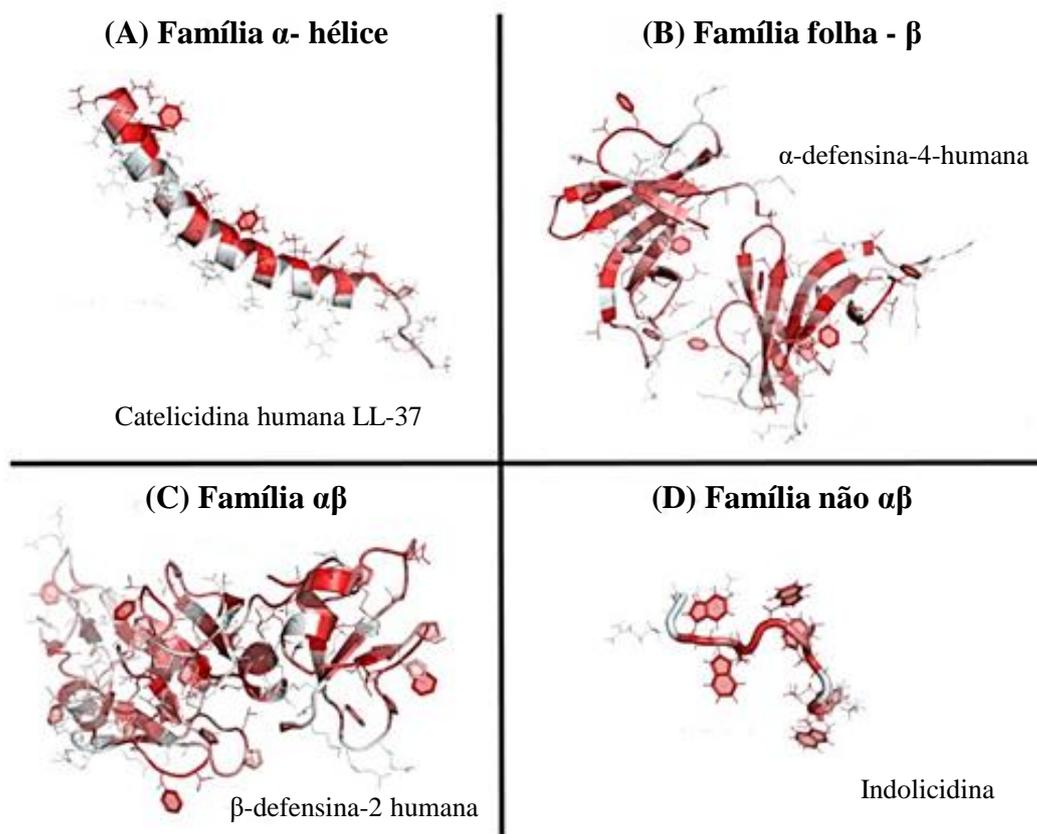


Figura 1: Representação esquemática das principais classes estruturais de AMPs. As estruturas usadas como exemplo foram resolvidas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou difração de raio-X. Os aminoácidos foram coloridos de acordo com a escala de hidrofobicidade de Eisenberg (cinza claro – hidrofílico; vermelho – hidrofóbico). Adaptado de RONČEVIĆ *et al.* (2019).

Diversos modelos de ação de permeabilização de membrana por AMPs já foram descritos, sendo os três mais aceitos e amplamente postulados: o modelo aduela de barril, modelo tapete e o modelo poro toroidal. Esses modelos foram originalmente propostos para peptídeos em α -hélice e para interação com membranas de bactérias (CORRÊA *et al.*, 2019). No passado, o modo de ação era geralmente considerado como não específico, resultando em rápida desordem física das membranas celulares microbianas, causando extravasamento e morte celular. No entanto, AMPs podem exercer um mecanismo de ação mais complexo, interagindo especificamente com a parede celular e ou membrana de microrganismos, sendo vários esfingolipídios e fosfolipídios identificados como alvos de AMPs com ação antifúngica. Após a interação com o alvo, os peptídeos podem ser internalizados ou podem permanecer do lado externo da célula (STRUYFS; CAMMUE; THEVISSSEN, 2021).

Evidências indicam que, além da permeabilidade e formação de poros de membrana de microrganismos, alguns AMPs também possuem alvos intracelulares, podendo inibir a síntese de ácidos nucleicos, proteínas e de componentes da parede celular. Além disso, alguns AMPs são capazes de inibir as atividades enzimáticas essenciais (Figura 2) (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011; LE; FANG; SEKARAN, 2017; CORRÊA et al., 2019; WANG et al., 2019). Devido à capacidade que os AMPs possuem de interagir com determinadas membranas celulares e, dessa forma, conferir a eles uma eficiente atividade antimicrobiana sobre determinados agentes patogênicos com destaque aos fungos, é que se têm observado nos últimos anos, um grande interesse biológico em estudar esse grupo de proteínas (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012).

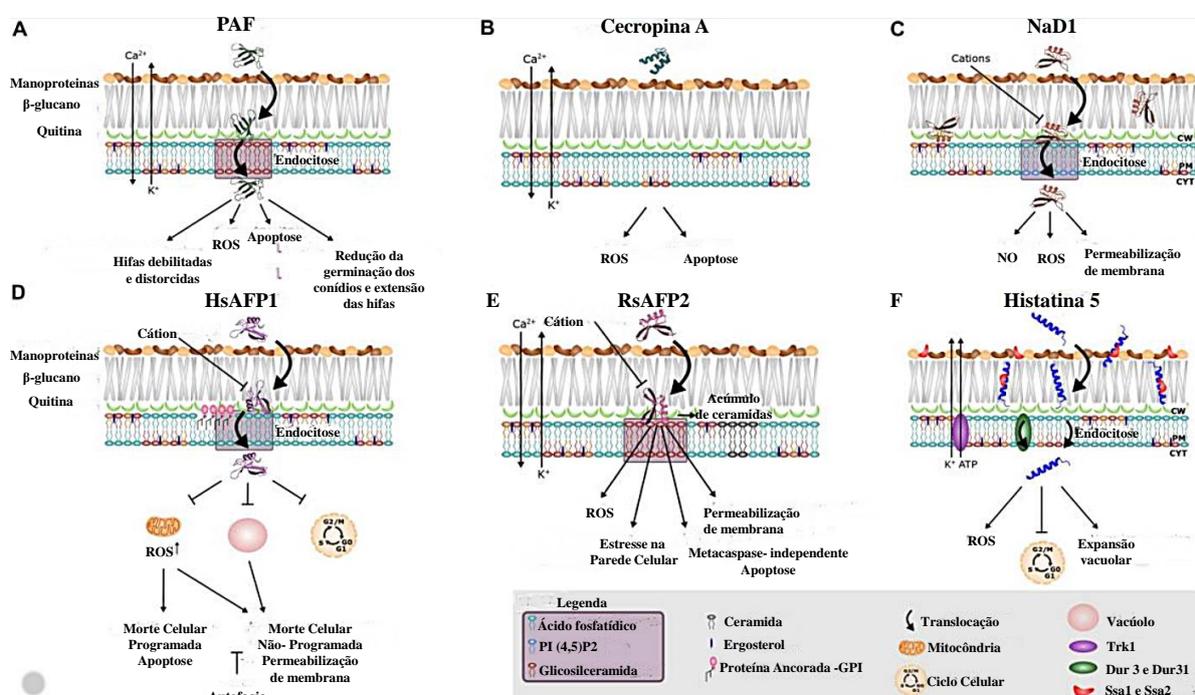


Figura 2: Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos e modelos de interação em membrana citoplasmática de fungos. Diferentes peptídeos são conhecidos por interagirem com diferentes esfingofosfolípidios. (A) Proteína antifúngica PAF de *Penicillium chrysogenum*, (B) Cecropina A de X, (C) NaD1 de *Nicotiana glauca* (D) HsAFP1 de *Heuchera sanguinea*, (E) RsAFP2 de *Raphanus sativus* e (F) Histatina 5 da saliva de *Homo sapiens*. Adaptado de STRUYFS; CAMMUE; THEVISSSEN (2021).

KANG et al. (2017) revelaram em seu estudo que alguns AMPs possuem uma excelente atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e imunomoduladora. Estudos demonstraram que alguns aminoácidos sulfurados e aromáticos presentes em proteínas também podem interagir com radicais livres, resultando numa atividade antioxidante. A Figura 3 mostra as principais atividades biológicas dessas moléculas registradas em banco de dados. Além disso, os AMPs podem ter um efeito sinérgico quando administrado com antibióticos comumente utilizados (KIM; RAJASEKARAN; SHIN, 2017). Por estas razões, tornaram-se alvos para desenvolvimento de fármacos para tratar pacientes acometidos por patógenos resistentes a múltiplas drogas (MARQUETTE; BECHINGER, 2018).

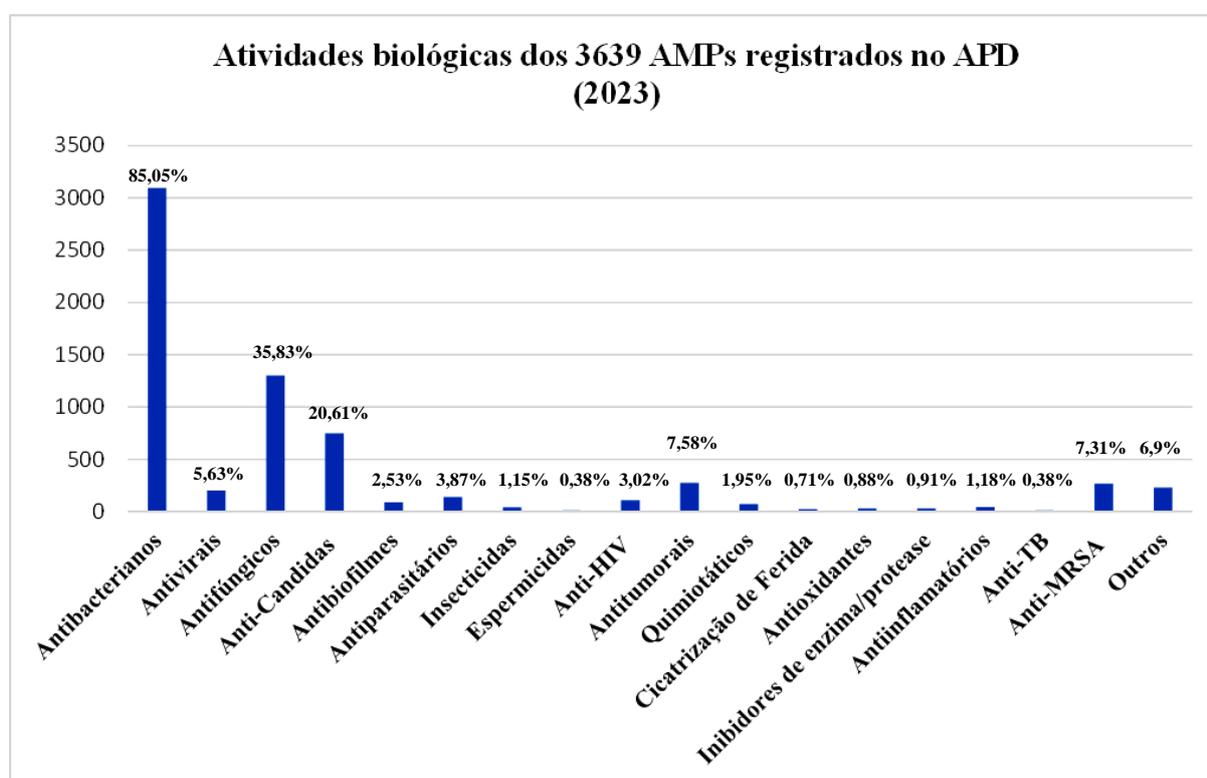


Figura 3: Classificação de AMPs depositados no banco de dados *Antimicrobial Peptide Database* (APD, 2023) por suas atividades biológicas. HIV = vírus da imunodeficiência humana (do inglês *human immunodeficiency virus*); MRSA = *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (do inglês *methicilin resistant Staphylococcus aureus*), TB = tuberculose. Análise expressa em porcentagem em cada classe considerando o total de AMPs depositados.

Paralelamente, a síntese química de peptídeos baseados em AMPs naturais tem ganhado destaque nos últimos anos. A partir de modificações químicas direcionadas por trocas de resíduos de aminoácidos, incorporação de moléculas não proteicas, D-aminoácidos,

ciclização, acetilação ou amidação da molécula, é possível aumentar a especificidade e a estabilidade do peptídeo, diminuindo a toxicidade para células de mamíferos, bem como protege-lo de degradação no organismo alvo por meio de processos proteolíticos (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018; GHOSH et al., 2019).

A fim de avaliar a importância temática, utilizamos a bibliometria para observar e analisar o número de produções científicas, impacto de periódicos, autores e principais tendências na área de AMPs. A estratégia de busca utilizada, onde para o filtro (“AMPs” (mundo)), foram encontradas 238.313 publicações na base de dados Scopus (Figura 4). É evidente o crescimento de publicações a partir do ano de 1965 até o ano de 2023, desde o primeiro trabalho disponível nessa base de dados. Entretanto, no Brasil observamos um crescente número de publicações a partir 1996, totalizando 27 artigos publicados, num total de 2980 documentos entre 1963-2023 (Figura 5).

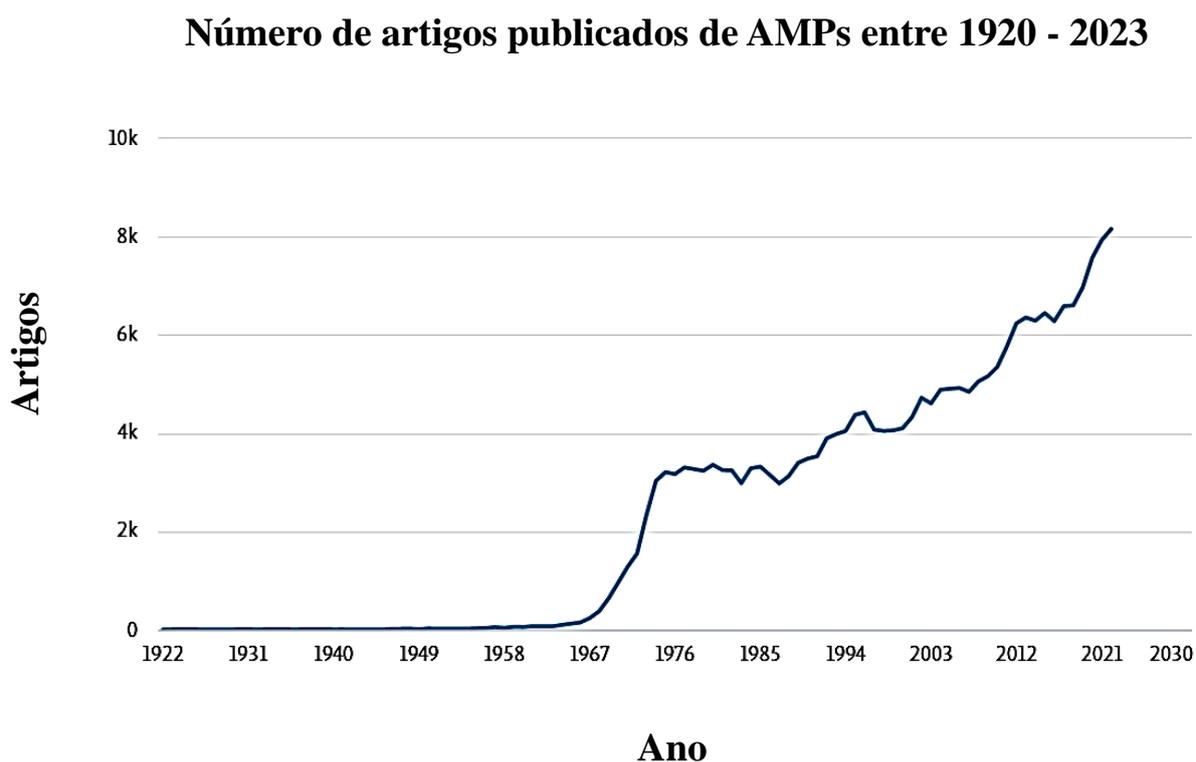


Figura 4: Número de publicações mundiais relacionadas ao tema AMPs de 1920-2023. Para esta análise bibliométrica, adotou-se como parâmetro o período analisado (anos) por palavra-chave (AMPs) e aplicando filtros de acordo com o território (mundo), obtendo desta forma, o resultado de 238.313 documentos analisados ao longo de cem anos. Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados extraídos da Plataforma Scopus (2023).

Número de artigos publicados no Brasil de AMPs 1920 - 2023

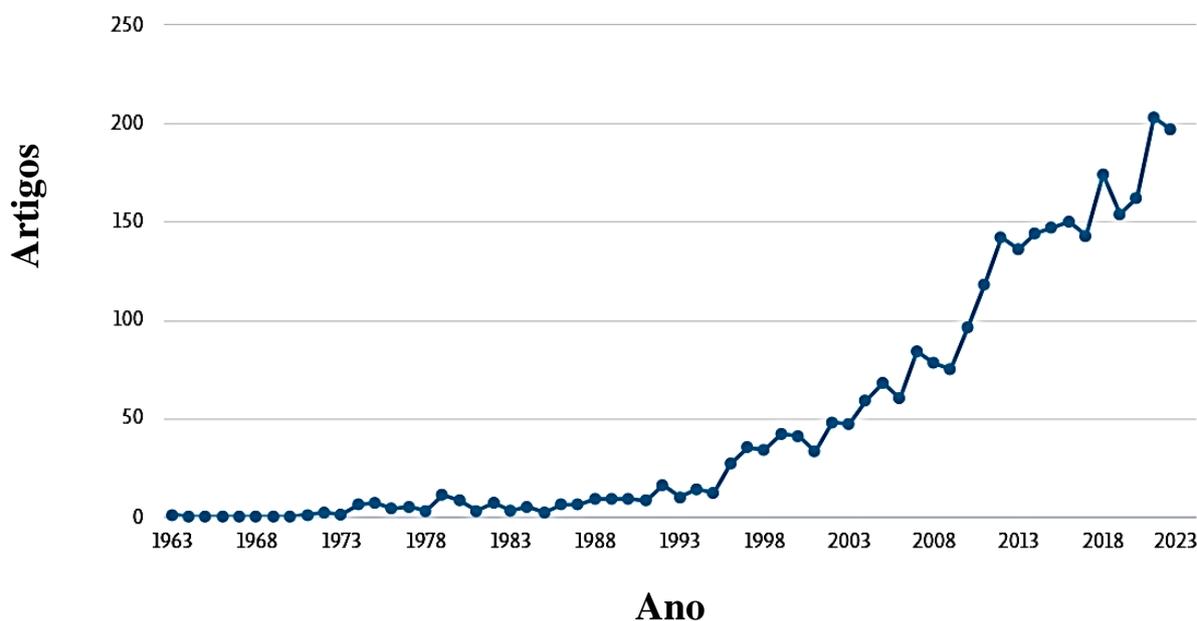


Figura 5: Número de publicações relacionadas ao tema AMPs de 1963-2023, no Brasil. Para esta análise bibliométrica, adotou-se como parâmetro o período analisado (representado em anos) por palavra-chave (AMPs) e aplicando filtros de acordo com o território (limitado ao Brasil), obtendo desta forma, o resultado de 2980 documentos analisados nesse intervalo de tempo. Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados extraídos da Plataforma Scopus (2023).

A partir da bibliometria, podemos observar que os cientistas estão interessados nos AMPs por várias razões elucidadas acima. Avaliando-se a atividade desses peptídeos presentes em eucariotos, os de origem vegetal desempenham um papel importante na imunidade inata e na defesa contra pragas e patógenos (LI et al., 2021). As propriedades e características bioquímicas de AMPs de plantas serão abordados no tópico seguinte.

2.2 Peptídeos antimicrobianos de plantas

As plantas são organismos sésseis, expostos a condições climáticas adversas, ataques de patógenos e pragas e apresentam nenhuma capacidade de escapar de ataques de insetos e patógenos (FRANCISCO GARCIA-OLMEDO et al., 1998). Sob este prisma, elas

desenvolveram diversos mecanismos evolutivos de defesa, os quais incluem espessamento da parede celular, mudança na composição lipídica das membranas celulares, aumento na concentração de fitohormônios, acumulação de metabólitos secundários e compostos bioativos, bem como a produção de proteínas e peptídeos em resposta ao estresse (NURNBERGER et al., 2004; HAKIM et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2021).

Visando defesa contra fitopatógenos, as plantas selecionaram AMPs como uma defesa química que concede resistência direta e durável a uma ampla variedade de microrganismos, os quais também têm demonstrado atividade contra patógenos humanos (NAWROT et al., 2014). Tais AMPs podem ser extraídos e isolados de diversos órgãos vegetais, tais como: raiz, caule, folha, flor e especialmente de sementes, local onde podemos encontrá-los em nível elevado em comparação com outras partes das plantas (BROEKAERT et al., 1997).

Além disso, AMPs de plantas possuem uma estrutura tridimensional bastante diversificada e exibem um amplo espectro de atividades biológicas, como propriedades antimicrobiana, antiviral, antitumoral, inseticida, anti-inflamatória e analgésica (SKALICKOVA et al., 2015; KANG et al., 2017). Alguns deles participam do transporte de lipídios, enquanto outros exibem propriedades bloqueadoras de canais iônicos ou inibidores de proteases e α -amilases, além de, em geral, não apresentarem efeito tóxico sobre células de mamíferos (BENKO-ISEPPON et al., 2010).

Os AMPs de plantas são divididos em famílias de acordo com a similaridade na sequência de aminoácidos, espaçamento entre cisteínas e diferentes arranjos de pontes dissulfeto, os quais estabilizam sua conformação tridimensional. Com base nesses critérios os AMPs de plantas são classificados em: tioninas, peptídeos similares à heveína, peptídeos similares à knotina (linear e cíclico), proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs, do inglês *lipid transfer proteins*), as snakinas, as α -hairpininas, as defensinas e inibidores (Figura 6) (TAM et al., 2015).

Curiosamente, existe uma topologia conservada entre famílias de AMPs de planta, sugerindo que tais propriedades defensivas desses peptídeos não são apenas determinadas por suas sequências primárias, mas também por sua estrutura tridimensional (BARBOSA PELEGRINI et al., 2011; TAM et al., 2015). Algumas propriedades como comprimento, carga, hidrofobicidade, ângulo de ligação e conformação estrutural são essenciais para alguns AMPs desempenharem suas atividades e agirem como um escudo químico contra o ataque de patógenos (CAMPOS et al., 2018).

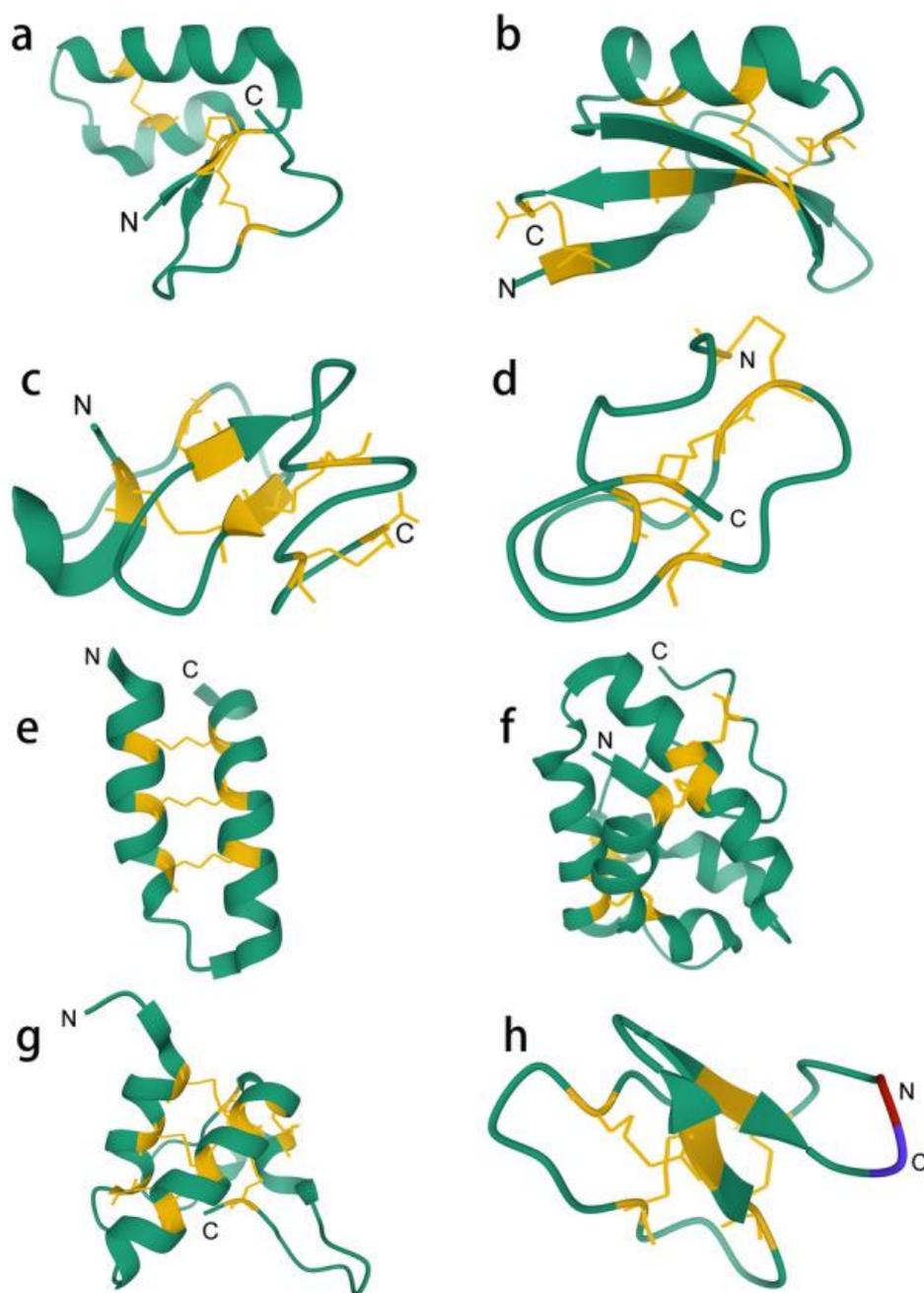


Figura 6: Representação esquemática da estrutura tridimensional de algumas famílias de AMPs de plantas. (a) tionina de *Cramble hispanica subsp. Abyssinica* (PDB: 3U7T). (b) defensina de *Aesculus hippocastanum* (PDB: 1BK8). (c) peptídeo semelhante a heveína de *Gypsophila vaccaria* (PDB: 5XDI). (d) peptídeo semelhante a knotina de *Hibiscus sabdariffa* (PDB:5GSF). (e) peptídeo da família α -hairpina de *Nigella sativa* (PDB:2NB2). (f) proteína transportadora de lipídios de *Hordeum vulgare* (PDB:3GSH). (g) Snakina de *Solanum tuberosum*. (h) ciclótídeo de *Clitoria ternatea* (PDB:2LAM). O N-terminal e o C-terminal do ciclótídeo estão conectados e indicados em vermelho e azul, respectivamente. Verde

representa o esqueleto de aminoácidos. Amarelo representa cisteínas e pontes dissulfeto entre elas. Adaptado de LI et al. (2021).

O conhecimento da estrutura tridimensional de AMPs está facilitando o isolamento, a classificação e até mesmo o desenho estrutural de novos peptídeos com múltiplas funções. Estes aspectos os tornam alvos atraentes de estudo, permitindo que os cientistas desenvolvam substâncias com diversas aplicações biotecnológicas, como a capacidade de inibir a atividade de proteases de mamíferos e insetos (CAMPOS et al., 2018). Isso tem despertado a atenção de muitos pesquisadores e diversos trabalhos vêm relatando as propriedades dos AMPs para a classe dos inibidores de protease (PIs, do inglês *Protease Inhibitors*) que será mais detalhada no tópico seguinte. (R. CECI, 2011).

Nessa perspectiva, o grupo vem há alguns anos isolando, caracterizando, desenhando estruturas para a síntese química, bem como vem elucidando o mecanismo de ação de diferentes AMPs (Figura 7), pertencentes a diversas espécies como *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) (CARVALHO et al., 2001), *Passiflora edulis f. flavicarpa* (maracujá amarelo) (AGIZZIO et al., 2003; AGIZZIO et al., 2006), *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) (MELLO et al., 2011), *Coffea canephora* (café) (ZOTTICH et al., 2013; BARD et al., 2016), *Capsicum annuum* (pimentão) (TAVEIRA et al., 2014), *Capsicum chinense* (pimenta malagueta) (DIAS et al., 2013), *Capsicum baccatum* (pimenta dedo de moça) (VIEIRA BARD et al., 2014) e *Adenantha pavonina* (carolina) (RIBEIRO SOARES et al., 2012).

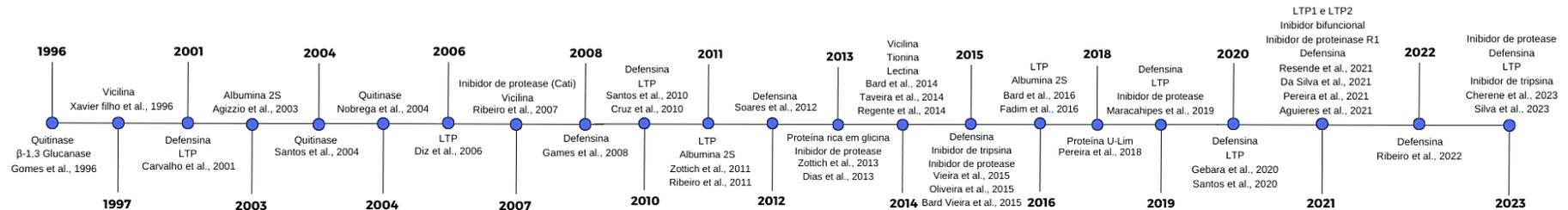


Figura 7: Linha do tempo dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) de plantas identificados pelo grupo entre 1996-2023. Espécies vegetais envolvidas: *Vigna unguiculata*, *Passiflora edulis f. flavicarpa*, *Phaseolus vulgaris*, *Coffea canephora*, *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum* e *Adenanthera pavonina*. Fonte: Elaboração própria a partir da análise de documentos.

2.3 Inibidores de Proteases

PIs são moléculas capazes de inibir a atividade enzimática de proteases. Esses inibidores formam um complexo estável com a proteína-alvo, bloqueando ou alterando o sítio conformacional. Tais moléculas estão presentes na maior parte dos organismos vivos, desempenhando diversas funções, como: regulação de proteólise de enzimas digestivas, armazenamento de proteínas, mecanismos apoptóticos e respostas ao estresse (SILVA-LOPEZ, 2018). Nas plantas, eles estão presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos, podendo ser encontrados em maior nível em sementes e órgãos de reserva (COTABARREN et al., 2020; ESCANDÓN et al., 2022).

Atualmente, a busca por PIs vem ganhando destaque na tentativa de elucidar questões relacionadas à estrutura, ação fisiológica, mecanismos de ação e evolutivos, principalmente a defesa de plantas e mobilização de proteínas de reserva (CARBONARO; NUCARA, 2022). Além disso, o interesse por essas moléculas se intensificou desde o surgimento da pandemia do HIV e, mais recentemente, da COVID-19, devido ao seu potencial inibitório contra proteases virais (ADHIKARI et al., 2021).

O alto teor dos PIs nas sementes de muitas espécies de plantas, especialmente os da família Fabaceae, tem despertado interesse quanto ao potencial fisiológico, pois são os mais bem elucidados. Diversos estudos citam trabalhos de inibidores de proteases extraídos e purificados de leguminosas, devido ao interesse nas possíveis aplicações dessas moléculas que apresentam atividades anti-inflamatórias e antitumorais, como as cistatinas (RODRÍGUEZ-SIFUENTES et al., 2020; SULTANA et al., 2022).

Baseado em evidências de similaridade da estrutura primária, localização de pontes dissulfeto e posição dos sítios catalíticos, os PIs de plantas têm sido agrupados em famílias distintas, diferindo-se em massa molecular, padrão de pontes dissulfeto, estrutura tridimensional e agentes desnaturantes. Cabe ressaltar que a maioria desses inibidores apresentam estabilidade à variação de temperatura e de pH; além de suas propriedades biológicas poderem ser utilizadas no tratamento de diversas patologias (YOSHIZAKI et al., 2007).

Além disso, essas moléculas formam complexo estável com proteases do patógeno alvo, bloqueando ou impedindo o acesso ao sítio ativo da enzima. De acordo com o mecanismo de ação das enzimas proteolíticas e dependendo do aminoácido ativo em seu sítio catalítico, os inibidores de proteases podem ser classificados em serinoproteases, cisteínoproteases, proteases aspárticas e metaloproteases (FARADY; CRAIK, 2010).

Entre os inibidores, ainda existem aqueles bifuncionais que inibem diferentes enzimas, podendo, por exemplo, inibir tanto a enzima tripsina quanto a enzima α -amilase. No reino Plantae são relatados seis subtipos de inibidores de α -amilase (AAI, do inglês *α -amylase inhibitors*); inibidores tipo defensina, tipo cereal, tipo knotina, tipo Kunitz, tipo taumatina e tipo lectina (SVENSSON et al., 2004). Os inibidores de α -amilase bifuncionais têm baixa massa molecular, geralmente entre 10 e 15 kDa e foram descobertos em plantas ricas em amido, como cevada, amaranto, trigo e milho. Geralmente, têm especificidade para amilases de insetos, portanto, são importantes na defesa contra herbívoros (TAM et al., 2015).

É importante chamar atenção sobre o fato das serino-proteases serem as mais abundantes e mais bem estudadas enzimas proteolíticas da natureza, conseqüentemente seus inibidores também os são. De uma maneira geral, as plantas expressam quantidades muito maiores de PIs desse tipo, comparado aos demais inibidores (KIM et al., 2009).

Nas plantas, os PIs que inibem serino proteases podem ser expressos em resposta ao ataque de insetos e patógenos inibindo a ação de proteases digestivas presentes, principalmente, nos mamíferos e insetos, assim como enzimas presentes nas bactérias e fungos (CLEMENTE et al., 2019). Essas moléculas são expressas em resposta a diferentes agressões e fazem parte do grupo de proteínas relacionadas à patogênese chamadas de PR. Estas podem estar presentes em menores concentrações nos tecidos saudáveis durante o desenvolvimento normal da planta, mas podem ter seu nível de expressão aumentado sob várias condições de estresse (SALVAUDON; HÉRAUDET; SHYKOFF, 2005; (BÁRTOVÁ; BÁRTA; JAROŠOVÁ, 2019).

2.4 *Adenanthera pavonina L.*

Adenanthera pavonina L., conhecida popularmente como olho de dragão, olho de pavão, carolina e tento vermelho é uma árvore típica do continente asiático, pertencente à família Fabaceae, podendo alcançar entre 12 a 15 metros de altura (ROCAS, 2003). É caracterizada por ter sementes vermelho-brilhantes, utilizada para fins artesanais na confecção de colares e pulseiras, bem como fins comerciais (Figura 8) (JAROMIN; KORYCIŃSKA; KOZUBEK, 2011). Suas sementes apresentam dormência e contém propriedades farmacológicas relevantes, sendo a atividade antifúngica, anti-inflamatória e sua capacidade de interromper ou diminuir a atividade enzimática as de maior interesse biológico (ARA et al., 2010); (WICKRAMARATNE; PUNCHIHEWA; WICKRAMARATNE, 2016); (RAMALHO et al., 2018).

Nosso grupo previamente identificou nas sementes de *A. pavonina* uma defensina que foi denominada de *ApDef*₁ (do inglês *A. pavonina defensin one*) (RIBEIRO SOARES et al., 2012). Naquele estudo foi visto que *ApDef*₁ apresentava atividade fungicida para *S. cerevisiae* e fungistática para *C. albicans*. Além disso, sua identificação e caracterização nos permitiu explorar novos conhecimentos a respeito do mecanismo de ação, atividade antifúngica e os mecanismos envolvidos que acarretam morte celular da levedura modelo *S. cerevisiae* (SOARES et al., 2017).

O presente estudo visou a identificação e purificação de peptídeos presentes nessas sementes, dando ênfase na busca de substâncias ainda não exploradas, através de adaptações na metodologia de extração, a fim de encontrar AMPs que desempenham outras atividades biológicas, além das propriedades antifúngicas.



Figura 8: Imagens mostrando aspectos botânicos e artesanais de sementes de *Adenanthera pavonina*. Planta adulta (A) e alguns dos seus órgãos vegetais (B) e pulseira confeccionada com sementes da espécie (C). Fonte A: <https://br.pinterest.com>. Foto tirada por Bartolozita Brígida. Fonte B: <https://www.theplantattraction.com/products/adenanthera-pavonina-10-seeds-red-sandalwood-saga-seed-coral-tree>. Fonte C: <https://www.elo7.com.br/pulseira-de-sementes-adenanthera-pavonina-1/dp/10B6BFD>.

2.5 *Candida spp*

O gênero *Candida* é constituído por aproximadamente 200 diferentes espécies de leveduras, algumas delas normalmente encontradas como parte da flora normal do corpo humano podendo ser isoladas de superfícies de mucosas sadias da cavidade oral, vaginal, trato gastrointestinal e região retal (KAUFFMAN, 2006; PAPPAS, 2006).

As espécies do gênero *Candida* se apresentam na forma de levedura, momento no qual não são, em sua maioria invasivas. Mas ao serem expostas a condições adversas ou se estiverem em um ambiente propício ao seu desenvolvimento, produzem pseudo-hifas ou hifas septadas, tornando-se patogênicas (BERMAN; SUDBERY, 2002; SPIERING et al., 2010). Essa capacidade de transição, bem como a formação de biofilmes em *Candida spp.* são principalmente associadas ao fenótipo altamente resistente às condições adversas (ZARNOWSKI et al., 2018).

Nos últimos anos, vários autores ao redor do mundo mostraram que as doenças fúngicas têm atingido frequências maiores do que o esperado. Estima-se que mais de 11 milhões de pessoas no mundo sejam acometidas por infecções fúngicas com cerca de 1,6 milhões de mortes por ano, mais que o total de óbitos decorrentes da malária e tuberculose (COLE et al., 2017). Dentro desses números, as espécies do gênero *Candida* tem sido as causadoras da maioria dos casos (STANISZEWSKA, 2020).

Diversas espécies do gênero *Candida* estão envolvidas nas infecções humanas. No passado, a espécie *C. albicans* representava a maior causa de infecções dentro do gênero, sendo que outras espécies eram descritas apenas como causadoras de infecções hospitalares ou em pacientes imunocomprometidos. Porém, essa realidade mudou nas duas últimas décadas e atualmente tem-se relatado uma proporção considerável de pacientes fora dos fatores de risco infectados com espécies “não-albicans”, dentre estas a *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (COLOMBO et al., 2017).

A *Candida auris* emergiu globalmente como um patógeno fúngico multirresistente associado aos procedimentos invasivos e cuidados de saúde no paciente gravemente enfermo. Relatos recentes destacam desafios contínuos devido à identificação equivocada do microrganismo, altas taxas de resistências a medicamentos antifúngicos e mortalidade significativa dos pacientes acometidos (SPIVAK; HANSON, 2018). Adicionalmente, o gênero *Candida* pode estar associada a coinfeções em pacientes com acometimento grave por COVID-19 (SENOK et al., 2021) ou como infecção secundária à tuberculose ativa, resultando em lesões pulmonares severas (BHATT et al., 2022).

Expandir o arsenal de medicamentos antifúngicos para o tratamento de candidíase é crucial nesta era de aumento da expectativa de vida de pacientes com imunossupressão e comorbidades. As infecções causadas por espécies resistentes a multidrogas, e a lista de antifúngicos aprovados para o tratamento da doença é limitado, o que contribui para o insucesso terapêutico. Sob esse viés, os AMPs têm se tornado alvos farmacológicos, uma vez que atuam interagindo com componentes da parede celular, como mananos, β -1,3 – glucanos e quitina (RODRÍGUEZ-CASTAÑO et al., 2023).

2.6 *Mycobacterium tuberculosis*

Apesar do progresso científico, o agente etiológico da tuberculose (TB) humana, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), mantém muitas estratégias bem-sucedidas para contornar as defesas do sistema imune do hospedeiro, permitindo o desenvolvimento de resistência, resultando em um regime de tratamento extremamente longo e ineficiente (CHEVALIER et al., 2014). Além disso, há evidências de que funções adicionais foram adquiridas durante a evolução inicial da micobactéria sugerindo que o organismo adaptou (e aumentou) as vias metabólicas para a persistência e propagação em seu hospedeiro humano obrigatório (MASHABELA; DE WET; WARNER, 2019).

A TB tem uma história evolutiva longa e vários estudos indicam que a primeira infecção humana ocorreu há aproximadamente 70.000 anos (COMAS et al., 2013). Estima-se que um quarto da população mundial está infectada por *Mtb*, destes apenas 10% dos infectados desenvolverão a doença ativa, enquanto o restante não apresentará os sintomas ao longo da vida (FURIN; COX; PAI, 2019).

Alguns fatores são responsáveis por influenciar no aumento do número de casos de TB, destacando-se o aparecimento de cepas resistentes aos fármacos de primeira linha RIPE (Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol), infecção ocasionada pelo HIV, fatores ambientais, condições socioeconômicas e situações que desencadeiam imunossupressão (LYON; ROSSMAN, 2017).

Nos casos de MDR-TB (do inglês, *multi drug resistant-TB*), apresentando resistência a qualquer fármaco descritos anteriormente e de resistência adicional a qualquer medicamento de segunda linha (fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, lincomicinas) a taxa de cura é muito baixa, exigindo a internação para administração de antimicrobianos injetáveis, de elevado custo e de uso restrito hospitalar (MOODLEY; GODEC, 2016; GUPTA; JORWAL, 2018).

Os AMPs são considerados candidatos a moléculas para o desenvolvimento de novos agentes anti-TB, tanto na prevenção quanto no tratamento devido à sua atividade antimicrobiana de amplo espectro e rápida eficiência (ABEDINZADEH; GAEINI; SARDARI, 2015). Estudos apontam que AMPs exibem atividade bactericida através da inibição da síntese da parede celular de micobactérias, rica em ácido teicóico, que é responsável pela patogenicidade e resistência a entrada de medicamentos (MÉNDEZ-SAMPERIO, 2008). Entretanto, estudos recentes demonstram que o mecanismo de ação dos AMPs nas micobactérias envolve diversos processos que afetam a membrana celular e o funcionamento interno das bactérias, conforme visualizados na figura 9 (ARRANZ-TRULLÉN et al., 2017).

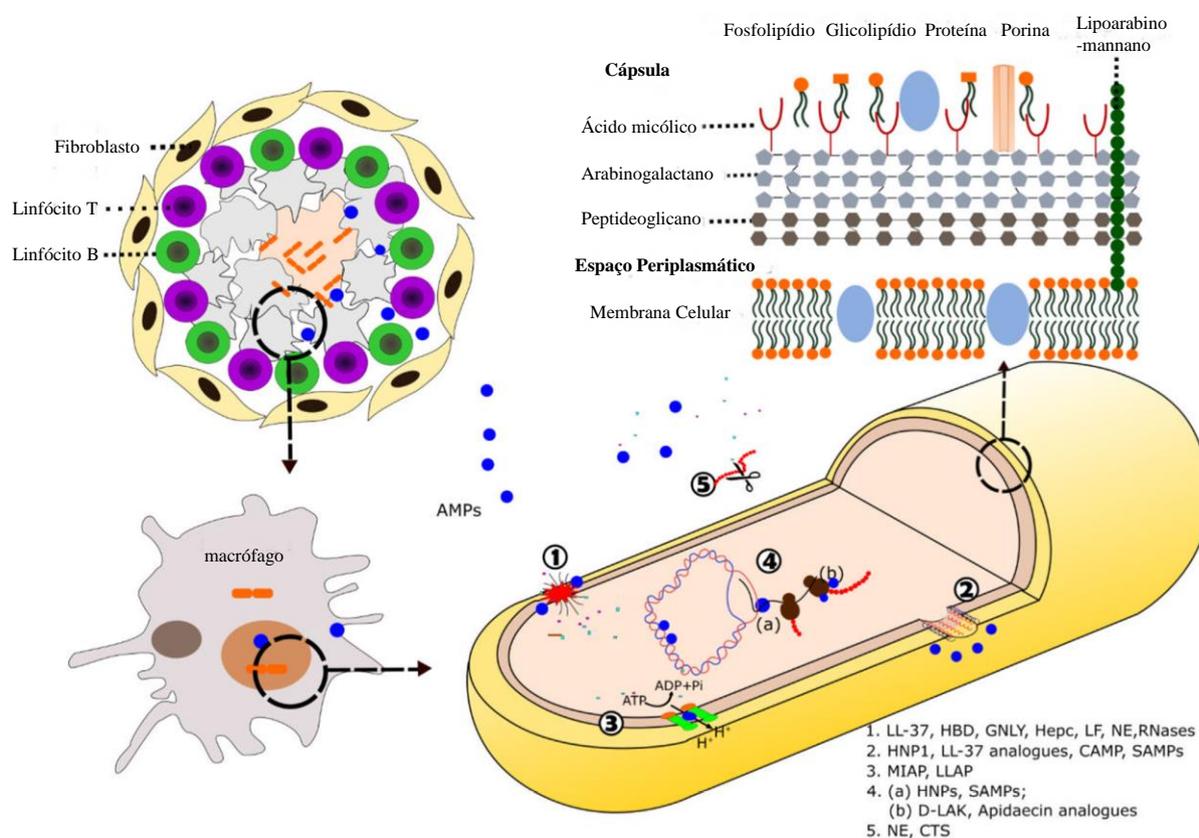


Figura 9: Ilustração esquemática do mecanismo de ação de AMPs contra micobactéria.

Após a indução da resposta imune pelas micobactérias, os peptídeos antimicrobianos são direcionados para área de infecção, onde podem ser recrutados para o granuloma. Em nível celular, a destruição dos patógenos ocorre dentro dos fagolisossomos dos macrófagos. A composição da parede celular das micobactérias e os principais mecanismos de ação dos AMPs contra micobactérias são mostrados: (1) ruptura da parede celular e da membrana plasmática, (2) formação de poros na membrana, (3) inibição da ATPase, (4) alvos intracelulares dos AMPs: (a) ligação a ácidos nucleicos, inibição da replicação e transcrição;

(b) inibição da tradução, e (5) degradação de proteínas. Os AMPs selecionados para cada atividade estão destacados. Abreviações: LL-37, extremidade C-terminal da catelicidina; HBD, β -defensina humana; GNLY, granulicina; Hepc, hepcidina; LF, lactoferrina; NE, elastase de neutrófilo; HNPs, proteínas de neutrófilos humanos; CAMP, peptídeos antimicrobianos catiônicos; SAMPs, peptídeos antimicrobianos sintéticos; MIAP, peptídeo antimicrobiano derivado da magainina-I; LLAP, peptídeo antimicrobiano derivado da LL-37; d-LAK, peptídeos antimicrobianos d- enantioméricos; CTPS, catepsinas. Adaptado de ARRANZ-TRULLÉN et al. (2017).

2.7 *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

Há muitos anos, o homem tem conhecimento e utilizado a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em diversas áreas biotecnológicas, especialmente na indústria alimentícia, onde o microrganismo é amplamente reconhecido por suas características fermentativas (NIELSEN, 2019). Além disso, é um dos organismos modelo mais amplamente utilizados para pesquisar outros organismos, interações de proteínas e para descobrir a estrutura e função de proteínas, entre outras abordagens (RESNICK; COX, 2000; HIETER, 2008). Isso ocorre porque este microrganismo é facilmente manipulável em laboratório, cresce rapidamente, não é patogênico, permite a integração de sequências exógenas de DNA em seu genoma através de recombinação homóloga e compartilha semelhanças em diversos processos celulares com outros eucariotos, devido à conservação de muitos processos intracelulares ao longo da evolução (BARR, 2003; VANDERWAEREN et al., 2022).

O sequenciamento completo do seu genoma e a sua bioquímica bem estabelecida e facilidade de manipulação genética tornaram *S. cerevisiae* um excelente modelo para estudar diversas vias biológicas (GOFFEAU et al., 1996; SUTER; AUERBACH; STAGLJAR, 2006; BOLOTIN-FUKUHARA; DUMAS; GAILLARDIN, 2010). Essa levedura apresenta estágios haploide e diploide bastante estáveis, o que facilita o isolamento de mutações recessivas em linhagens haploides, e estudos de complementação podem ser efetuados em linhagens diplóides (SHERMAN, 2002).

As possibilidades oferecidas por este organismo são numerosas, sendo uma ferramenta prática para explorar e estudar outros organismos. Por exemplo, a sua similaridade com processos bem estudados tem permitido avanços significativos no entendimento de muitos processos biológicos básicos em *C. albicans*. Além disso, muitos genes de *C. albicans* têm sido identificados e ou analisados usando *S. cerevisiae* como um “substituto”, incluindo genes

envolvidos na adesão às células humanas (GAUR; KLOTZ, 1997; FU et al., 1998); (BERMAN; SUDBERY, 2002). Dois desses genes codificam diretamente proteínas de parede celular que são importantes para a adesão em *C. albicans*, enquanto um terceiro afeta a adesão das células de *S. cerevisiae* através de um mecanismo indireto.

Mecanismos moleculares envolvidos em uma variedade de distúrbios neurodegenerativos, como Alzheimer, Huntington e Taupatia causados por mau enovelamento e deposição de proteínas, incluindo doenças causadas por príons, têm sido decifrados, a partir de *S. cerevisiae* como modelo (NIELSEN, 2019; VANDERWAEREN et al., 2022). Além disso, essa levedura já vem sendo utilizada há décadas para a produção de medicamentos, como insulina, hirudina e vacina contra hepatite B (ARDIANI; HIGGINS; HODGE, 2010). Mais recentemente, graças à biologia sintética e molecular, novas cepas foram desenvolvidas para a produção de moléculas terapêuticas e candidatos a fármacos e vacinas anticâncer por meio de células recombinantes. Portanto, estudos têm demonstrado que essa levedura é uma ferramenta valiosa para identificar novos fármacos e seus alvos, destacando-se por sua utilidade, potência e versatilidade (BIDOU; ROUSSET; NAMY, 2010).

Nesse trabalho, usaremos este microrganismo modelo para avaliar a atividade antiproteolítica de peptídeos presentes em sementes de *A. pavonina*, além de elucidar o mecanismo de toxicidade que culmina na morte desta e de outras leveduras do gênero *Candida*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Extrair, purificar e caracterizar peptídeos de sementes de *Adenanthera pavonina* L., avaliando a atividade antifúngica e antimicobacteriana e eventual citotoxicidade a célula de mamíferos, elucidando diversos mecanismos de ação sobre leveduras do gênero *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Objetivos Específicos

- Extrair, e purificar peptídeos de sementes de *A. pavonina*;
- Avaliar o perfil antifúngico de peptídeos obtidos de sementes de *A. pavonina*, sobre *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. buinensis*, *C. parapsilosis* e *S. cerevisiae* e selecionar o peptídeo biologicamente mais ativo;
- Caracterizar bioquimicamente, os peptídeos obtidos de frações com atividade antimicrobiana de sementes de *A. pavonina*;
- Analisar o efeito das frações e do peptídeo mais ativo sobre a atividade das enzimas tripsina, quimiotripsina e α -amilases;
- Avaliar o perfil proteolítico em extratos das leveduras na presença e ausência de frações e do peptídeo mais ativo;
- Avaliar a viabilidade celular das leveduras citadas na presença do peptídeo mais ativo;
- Verificar o potencial do peptídeo mais ativo em permeabilizar membranas das leveduras citadas;
- Identificar a ocorrência da indução de estresse oxidativo nas leveduras tratadas com o peptídeo mais ativo;
- Avaliar a atividade de caspases e a funcionalidade mitocondrial das leveduras supracitadas tratadas com o peptídeo mais ativo;
- Analisar o efeito ultraestrutural das células de leveduras por microscopia eletrônica de transmissão tratadas com o peptídeo mais ativo;
- Avaliar a toxicidade celular das frações e do peptídeo mais ativo por análise da atividade mitocondrial das culturas de macrófagos RAW 264.7;

- Examinar o efeito do peptídeo mais ativo quanto à inibição da produção de NO (do inglês *nitric oxide*), TNF- α (do inglês, *tumoral necrosis factor alpha*) e IL-1 β (do inglês, *interleukin-1-beta*) em cultura de macrófagos RAW 264.7 e J774A estimulados por lipopolissacarídeo;
- Avaliar o perfil antimicobacteriano de frações e do peptídeo mais ativo sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e M229;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

4.1.1 Sementes

As sementes de *Adenantha pavonina* L. foram coletadas no município de São Francisco do Itabapoana, localizada no interior do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (21°28'12'' latitude sul, 41°07'08'' longitude oeste), durante o mês de Março de 2019. Em seguida, estas foram lavadas em água corrente, posteriormente enxaguadas em água destilada com auxílio de peneiras limpas e secas sobre papel toalha, armazenadas em recipiente fechado e protegidas da luz, de variação de temperatura e umidade no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

4.1.2 Microrganismos

As espécies de leveduras *Candida albicans* (CE022), *Candida tropicalis* (CE017), *Candida parapsilosis* (CE002) e *Saccharomyces cerevisiae* (1038) foram cultivadas e conservadas no LFBM. A espécie *Candida buinensis* (3982) foi obtida da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. As leveduras foram crescidas em ágar Sabouraud (1% peptona, 2% glicose, 1,7% ágar) (Kasvi, SP, Brasil) a 30 °C por 24-36 h. Após o crescimento estas foram armazenadas a 4 °C, com repiques periódicos a cada 3 meses.

A cepa laboratorial de referência *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) H37Rv foi obtida comercialmente da *American Type Culture Collection* (ATCC 27294), enquanto a cepa da família Beijing, *Mtb* M299, proveniente de um isolado clínico de pacientes com TB em Moçambique foi cedida pelo Dr. Philip Suffys (Instituto Oswaldo Cruz/RJ). Ambas as cepas foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9 (DIFCO, Detroit, MI), suplementado com 0,05% Tween 80 e 10% de ADC (albumina, dextrose, catalase, Difco Laboratories) durante 7 dias até metade da fase logarítmica, em estufa bacteriológica a 37 °C e 5% de CO₂. O monitoramento do crescimento micobacteriano foi efetuado através da medida de densidade óptica (DO 600 nm), por espectrofotometria (Biochrom, modelo Libra S6). As alíquotas de 1

mL (10^7 a 10^8 bactérias) foram retiradas para estoque e mantidas em acondicionamento a -70 °C, no Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR), do CBB da UENF. Toda a manipulação e cultivo das cepas de *M. tuberculosis* obedeceram às normas de laboratório de biossegurança de nível 3 do LBR.

4.1.3 Linhagens celulares de macrófagos murino

As linhagens celulares de macrófago RAW 264.7 (ATCC TIB-71, *Manassas*, VA, EUA) e J774A.1 (ATCC TIB-67, *Manassas*, VA, EUA) foram cultivadas em DMEM-F12 (do inglês, *Dulbecco's modified Eagle's medium*), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS, do inglês *fetal bovine serum*), numa atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, no LBR.

4.2 Extração, purificação e caracterização de peptídeos de *Adenanthera pavonina*

4.2.1 Extração e fracionamento de peptídeos em sementes de *Adenanthera pavonina*

A extração proteica das sementes de *A. pavonina* foi realizada como descrito em SOARES et al. (2012), na qual foi incluída uma nova etapa de aquecimento à metodologia. As sementes foram descascadas e, após a retirada dos tegumentos, os cotilédones foram triturados em um multiprocessador de alimentos (TruFlowSpeed 400 W, Eletrolux) até uma obtenção de farinha com granulacão fina, da qual 20 g foram combinadas a 200 mL de tampão fosfato (Na₂HPO₄ 10 mM; NaH₂PO₄ 15 mM; KCl 0,1M; EDTA 1,5% e pH 5,4) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) até a completa homogeneização. Em seguida, esse homogenato foi submetido à agitação constante por 2 h a 4 °C. O homogeneizado obtido foi submetido a uma centrifugação (16.000 x g por 30 min a 4 °C) (Sorvall ST40 R, Thermo Scientific), o precipitado insolúvel foi descartado e o sobrenadante foi filtrado (papel de filtro qualitativo) e então aquecido a 90 °C por 10 min em banho maria (Quimis LTDA, SP, Brasil). Após esta última etapa, submeteu-se novamente a uma centrifugação a 16.000 x g por 10 min a 4 °C, na qual o precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido, denominado de fração aquecida rica em peptídeos (FARP), da qual os peptídeos foram submetidos à purificação por métodos cromatográficos.

4.2.2 Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose

Uma coluna de troca iônica foi preparada utilizando-se a resina DEAE-Sepharose (GE HealthCare) e empacotada sob a ação da gravidade. Posteriormente, a coluna foi recarregada com água destilada, NaOH 0,1M, água destilada, HCl 0,1M, novamente com água destilada e todas as soluções com três vezes o volume da resina e, por fim, equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,0), a uma taxa de fluxo de 1 mL.min⁻¹.

Após a sua ativação, cerca de 10 mL da FARP foi adicionado a 5 mL de volume de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,0). Posteriormente, esta solução foi centrifugada a 16.000 x g por 3 min à temperatura ambiente, e o sobrenadante aplicado na coluna. Foram coletadas frações de 4 mL a um fluxo constante de 60 mL.h⁻¹, sendo estas denominadas de D1 (fração não retida). A fração D2 (fração retida) foi eluída com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 9,0, acrescido de NaCl 1 M. As absorvâncias das frações foram lidas em espectrofotômetro (LGS53, BEL Photonics) a 280 nm e posteriormente armazenadas a - 20 °C até o uso. A fração D1 proveniente desta cromatografia foi submetida a metodologia de HPLC.

4.2.3 Purificação de peptídeos através da cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC

Os peptídeos da fração D1 de sementes de *A. pavonina* foram purificados por cromatografia de fase reversa em HPLC (Promenence, Shimadzu), utilizando uma coluna C18 (Shim-pak VP-ODS, 250 x 4,6 mm, Sigma-Aldrich) acoplada a uma pré-coluna C8 (Pelliguard, 20 x 4,6 mm, Sigma-Aldrich), equilibrada com TFA 0,1% (Sigma-Aldrich). Antes da injeção, a fração D1 da DEAE-Sepharose foi filtrada através de um filtro em membrana de polivinilideno difluoreto (Millex- GV 0.22 µm, Millipore) e em seguida, um volume de 5 mL da amostra foi injetada na coluna a temperatura de 38 °C. A eluição foi realizada com o solvente A durante os primeiros 15 min, seguida por um gradiente de 0 a 30% (v/v) do solvente B (100% de 2-propanol (Sigma-Aldrich) em 0.1% de TFA) dos 15 aos 130 min, depois a concentração do solvente B foi aumentada para 50% dos 130 aos 136 min, e em seguida, a concentração do solvente B foi aumentada para 50% e mantida nessa concentração por 1 min. Em seguida, a concentração do solvente B foi reduzida para 0% e mantida nessa concentração até o final da corrida aos 140 min. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL.min⁻¹ e a eluição foi acompanhada pela absorvância a 220 ± 4 nm.

4.2.4 Eletroforese de proteínas

O processo de extração e purificação foi monitorado por eletroforese em gel de tricina-SDS-PAGE, usando placas de vidro 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 mm, conforme metodologia descrita por SCHÄGGER; VON JAGOW (1987). O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4% de acrilamida/bisacrilamida e o gel de concentração numa concentração de 3,9%, montados no Mini Protean Tetra System (Biorad).

4.2.4.1 Preparo da amostra e condições de corrida

Antes da eletroforese, as amostras extraídas e obtidas por diferentes métodos cromatográficos foram tratadas com uma solução fria (1:10, V/V) composta por ácido tricloroacético 10% e 0,07% de β -mercaptoetanol, diluído em acetona, mantido a -20 °C por 2 h e depois centrifugado a 13.000 x g por 15 min a 4 °C. Os precipitados foram lavados três vezes em uma solução de acetona contendo 0,07% β -mercaptoetanol. Os precipitados foram secos em um incubador de banho seco (Boekel Scientific) a 40 °C e depois ressuspensos em 8 M de ureia e acrescentadas ao tampão de amostra (Tris 0,125 M, SDS 2,5%, azul de bromofenol 0,25% e sacarose 15%). As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min e posteriormente centrifugadas a 16.000 x g por 3 min. Após esse procedimento, as amostras foram aplicadas no gel de concentração e submetidas à eletroforese sob condições desnaturantes. A corrida foi realizada a uma voltagem constante de 20 V, por aproximadamente 16 h. Para estimar a massa molecular dos peptídeos foi usado o marcador de baixa massa molecular (M.W. 1.060-26.600, Sigma-Aldrich) composto de proteínas de diferentes massas 26.600 Da (Isomerase triosefosfato de músculo de coelho); 17.000 Da (Mioglobina de coração de cavalo); 14.200 Da (α -Lactoalbumina bovina); 6.500 Da (Aprotinina de pulmão bovino); 3.496 Da (Insulina bovina β -oxidada); 1.060 Da (Bradicinina).

4.2.4.2 Coloração e descoloração do gel

Após a finalização da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado numa solução fixadora (ácido acético 10% e metanol 40%) por 30 min. Em seguida, o gel foi corado com Coomassie Coloidal G-250 (sulfato de amônio 8%, ácido fosfórico 0,8%, Coomassie Blue G-250 0,08% e metanol 20%) em agitação constante por

aproximadamente 24 h. Depois de corado, o gel foi enxaguado repetidamente com água quente para remover a coloração residual e posteriormente fotodocumentado (câmera principal do Samsung Galaxy S22).

4.2.5 Ensaio de inibição do crescimento de leveduras

Para a preparação das culturas de células de levedura, um inóculo do estoque de cada espécie de levedura foi transferido para placas de Petri contendo ágar Sabouraud e permitido crescer nas placas a 30 °C por 24 h. Em seguida, as células foram transferidas para caldo Sabouraud estéril (10 mL). As suspensões de células de levedura foram quantificadas em uma câmara de Neubauer (LaborOptik) para cálculos posteriores de diluições apropriadas. Um ensaio de inibição de crescimento foi realizado de acordo com BROEKAERT et al., (1990) com algumas modificações. O ensaio consistiu em 10.000 células.mL⁻¹, caldo Sabouraud com amostras (FARP e as frações peptídicas das diferentes etapas cromatográficas) em diferentes concentrações, e um volume final de 100 µL. O ensaio foi incubado a 30 °C por 24 h, e então as densidades ópticas (DO) foram medidas em 620 nm (EZ Read 400, BIOCHROM). Amostras de controle foram feitas sem a adição da FARP ou das demais frações peptídicas e foram consideradas como 100% de crescimento.

4.2.6 Análise da atividade citotóxica das frações DEAE-Sephrose

As células RAW 264.7 foram semeadas em placas de 96 poços (100.000 células.mL⁻¹) e incubadas por 24 h a 37 °C. Em seguida, as células foram incubadas na presença ou ausência das frações de DEAE-Sephrose (6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg.mL⁻¹) por 24 h a 37 °C. A citotoxicidade das frações de DEAE-Sephrose na viabilidade das macrófagas RAW 264.7 foi determinada usando o ensaio MTT. A capacidade das células de reduzir o sal MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio brometo]) para cristais de formazan pela atividade das desidrogenases mitocondriais é usada como indicador de toxicidade. Após 24 h de incubação com as frações, uma solução de MTT (5 mg.mL⁻¹) em solução salina tamponada com fosfato (PBS)) foi adicionada (10% V/V) e as células foram incubadas por 2 h a 37 °C. Em seguida, o sobrenadante das células RAW 264.7 foi removido, e os cristais de formazan gerados foram dissolvidos com 100 µL de isopropanol acidificado. As placas foram lidas a 570 nm usando um leitor de microplacas (MOSMANN, 1983). A citotoxicidade foi calculada subtraindo a razão do valor médio de absorbância das células tratadas do valor médio de

absorbância das células não tratadas (controle). Células tratadas com detergente Triton X-100 (1%) foram usadas como controle positivo (100% de citotoxicidade). Os valores da concentração inibitória média (IC₅₀) foram calculados por regressão não linear."

4.2.7 Avaliação das frações de DEAE-Sepharose no crescimento micobacteriano

Após 7 dias de cultivo, as suspensões micobacterianas foram sonicadas (MaxiClean 800) com três pulsos de um min, agitadas no vortex e mantidas em repouso por 10 min para sedimentação de eventuais aglomerados. As densidades ópticas (DO) das suspensões foram medidas espectrofotometricamente a 600 nm (Elisa Epoch Biotek) e ajustadas para DO 0,1. As suspensões micobacterianas (1×10^6 UFC/poço em placa de 96 poços) foram incubadas com ou sem as frações de DEAE-Sepharose (200, 100, 50 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) tanto para as cepas *Mtb* H37Rv quanto para a cepa clínica *Mtb* M299. Após incubação por 5 dias a 37 °C, 10 μL de solução MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço e incubados por 3 h a 37 °C. O ensaio MTT foi usado para quantificação indireta do crescimento bacteriano em meio líquido, servindo como um método alternativo de avaliação da concentração inibitória mínima (MOODLEY et al., 2014). As suspensões micobacterianas e o procedimento do MTT foram descritos anteriormente. Posteriormente, 100 μL de tampão de lise (20% p/v de SDS, 50% de dimetilformamida em água destilada, pH 4,7) foram adicionados aos poços e incubados por 18 h a 37 °C. As amostras resultantes foram medidas por DO a 570 nm. Suspensões micobacterianas não tratadas foram usadas como controle negativo (crescimento micobacteriano espontâneo).

4.2.8 Etapa de purificação em HPLC com coluna C18 de fase reversa

A fração que promoveu maior inibição contra *C. albicans* da coluna de fase reversa C18 foi escolhida para purificação final. Essa amostra foi aplicada à mesma coluna C18 com um gradiente recém-desenvolvido e estendido baseado na porcentagem do gradiente de 2-propanol da primeira etapa cromatográfica na qual a fração foi inicialmente eluída. O gradiente foi o seguinte: de 0 a 15 min, 0% de solução B (100% de 2-propanol e 0,1% de TFA); de 15 a 50 min, de 0 a 22% de solução B; de 50 a 115 min, de 22 a 25% de solução B e a partir de 115 min, a concentração de solução B foi diminuída para 0% e mantida até o final da corrida (120 min). O fluxo utilizado foi de $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a eluição foi acompanhada pela absorbância a $220 \pm 4 \text{ nm}$.

4.2.9 Determinação da atividade inibitória de proteases

Inicialmente, as atividades das enzimas tripsina e quimotripsina foram determinadas utilizando a tripsina de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich) e a α -quimotripsina de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich) em relação aos substratos N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) e N-benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida (BTPNA), respectivamente, em um tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, a 37 °C, em um volume final de 200 μ L. A reação foi interrompida após 30 min pela adição de 100 μ L de ácido acético 30% (v/v) e os volumes medidos a 405 nm usando um espectrofotômetro (EZ Read 400, BIOCHROM) (MACEDO et al., 2007). Uma unidade (U) de atividade de protease foi definida como um aumento de 0,01 unidades de absorbância a 405 nm por 200 μ L, de acordo com KAKADE; RACKIS; MCGHEE (1974). Para a determinação da atividade das frações peptídicas, 86 U de tripsina e 100 U de quimotripsina foram incubadas previamente com as frações obtidas (400 μ g.mL⁻¹ de FARP, 100 μ g.mL⁻¹ das frações obtidas de DEAE-Sepharose e 25 μ g.mL⁻¹ de peptídeo purificado da coluna C18, conforme descrito acima com as modificações de que as enzimas foram pré-incubadas com as frações peptídicas e o peptídeo purificado. Também determinamos a atividade proteolítica e a atividade inibitória das frações peptídicas conforme descrito anteriormente, mas nas condições de HPLC utilizadas para obter o peptídeo purificado, ou seja, incubação a 38 °C, com concentrações de 25% de 2-propanol e 0,01% de TFA por 90 min.

4.2.10 Zimografia

C. albicans e *S. cerevisiae* foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 5 mL de caldo Sabouraud, suplementado com 10% de soro de albumina bovina (BSA) esterilizado por filtração (Millex-GV 0.22 μ m, Millipore). As leveduras (1×10^6 células.mL⁻¹) foram incubadas em um agitador orbital (712, Novatecnica) por 24 h a 30 °C e 150 rpm. Após esse período, a suspensão de células obtida foi submetida a uma centrifugação a 7.000 x g por 5 min a 4 °C (5415R, Eppendorf). O sedimento de células foi ressuspensão em 500 μ L de PBS 100 mM (pH 5,6) e misturado (Vortex Mixer K45-2820, KASVI) antes do tratamento ultrassônico em um sonicador de sonda (Sonifier 150, Branson). O tempo total de ciclo do tratamento ultrassônico foi de 30 min, o que corresponde a cinco pulsos de 1 min e cinco intervalos de 5 min entre os pulsos (LIU et al., 2013). A temperatura do lisado celular

durante a sonicação foi verificada e mantida aproximadamente a 4 °C por meio de banho de gelo. Em seguida, foi submetido a uma centrifugação adicional a 10.000 x g por 15 min a 4 °C. O extrato bruto resultante, obtido por este método mecânico, foi submetido a eletroforese e zimografia.

Para a eletroforese, os extratos brutos de levedura foram diluídos na proporção de 5:1 (m/v) em um tampão de amostra (0,125 M Tris, 2,5% SDS, 0,25% azul de bromofenol e 15% sacarose), analisados e caracterizados em SDS-PAGE a 12% de acordo com LAEMMLI (1970). Para a zimografia, a eletroforese em gel foi realizada conforme descrito acima, com a seguinte modificação: o gel foi copolimerizado com 0,5% de gelatina. As amostras foram separadas em condições não desnaturantes a 4 °C com voltagem constante (120 V). Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes com um tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) contendo 2,5% de Triton X-100 a 30 °C por 40 min cada. Em seguida, o gel de gelatina foi incubado com Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) contendo 0,01 M de CaCl₂ a 30 °C por 120 min. Finalmente, o gel foi fixado por 30 min com uma solução de fixação (50% de metanol e 10% de ácido acético) e então corado com Azul de Coomassie R-250. As faixas brancas no zimograma indicam a presença de atividade proteolítica. A tripsina (86 U) foi usada como uma protease de controle. Marcadores de proteína (66.000 - albumina, soro bovino; 45.000 - ovoalbumina, ovo de galinha; 36.000 - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, músculo de coelho; 29.000 - anidrase carbônica, eritrócitos de bovino; 24.000 - tripsinogênio, pâncreas bovino; 20.000 - inibidor de tripsina, soja; 14.200 - α -lactoalbumina, 6.500 - aprotinina, pulmão bovino) do marcador de peso molecular de baixo alcance (M.W. 6.500 - 66.000 Da) (Sigma-Aldrich) foram usados como padrões de acordo com o manual de instruções. Para determinação da atividade inibitória das amostras (400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de FARP, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações DEAE-Sephrose e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de peptídeo purificado da coluna C18), estas foram pré-incubadas por 1 h a 30 °C com os extratos brutos de levedura antes da zimografia, realizada conforme descrito acima. Para a determinação do tipo de protease fúngica por zimografia, os extratos brutos de levedura foram pré-incubados por 1 h a 30 °C com os seguintes inibidores: para proteases serina, 1 mM de fluoreto de fenilmeltisulfonil (PMSF); para proteases aspárticas, 1 mM de pepstatina A; e para metaloproteases, 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e a zimografia foi repetida como antes (FELICOLI et al., 1997).

4.2.11 Ensaio inibitório de α -amilase

A hidrólise do amido pelas α -amilases intestinais de *Tenebrio molitor* e pela amilase salivar humana foi determinada conforme descrito por DA SILVA et al. (2018), utilizando a liberação de açúcares redutores pelo ensaio colorimétrico com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A unidade de atividade (U) foi determinada incubando três volumes diferentes de enzimas com amido solúvel a 1% (Sigma-Aldrich) a 37 °C para a amilase salivar humana e a 30 °C para as α -amilases intestinais de *T. molitor*, por 15 min em 50 μ L de água (volume final). Após o tempo de reação, 400 μ L de solução DNS foram adicionados às amostras, que foram aquecidas a 100 °C por 5 min, resfriadas à temperatura ambiente e lidas a 540 nm (Leitor de Placas CHAMALEONTM V, Hidex). Uma U foi considerada a quantidade de enzima que aumentou a absorbância a 540 nm em 0,1 unidade de absorbância a 37 °C por 15 min para a amilase salivar humana, e a 30 °C para as α -amilases intestinais de *T. molitor*. Para a atividade inibitória das α -amilases, 10 U de cada enzima foram incubados previamente com as frações obtidas (400 μ g.mL⁻¹ de FARP, 100 μ g.mL⁻¹ das frações DEAE-Sepharose e 25 μ g.mL⁻¹ de peptídeo purificado da coluna C18) por 30 min a 37 °C para a amilase salivar humana, e a 30 °C para as α -amilases intestinais de *T. molitor*, e então o ensaio inibitório foi determinado conforme descrito para a determinação de U. BSA (1 mg.mL⁻¹) foi usado como controle negativo e EDTA 5 mM foi usado como controle positivo.

4.2.12 Resistência térmica

Para testar a resistência térmica do peptídeo bioativo isolado de aproximadamente 6 kDa, três soluções de 30 μ L contendo 25 μ g.mL⁻¹ do peptídeo foram aquecidas separadamente a 90, 100 e 130 °C em um banho seco (Boekel Scientific) por 30 min. Após o aquecimento, as amostras tratadas pelo calor foram submetidas a um ensaio antimicrobiano conforme descrito no **item 4.2.5** para determinar a atividade antimicrobiana residual.

4.3 Mecanismo de ação sobre leveduras oportunista do peptídeo mais ativo das frações de *Adenantha pavonina*

4.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima

C. albicans, *C. tropicalis*, *C. guineensis* e *S. cerevisiae* foram incubadas em caldo Sabouraud contendo diferentes concentrações (200 – 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) do peptídeo purificado (P4r1) para determinação da concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *minimal inhibitory concentration*), a fim de se ter 100% de inibição do crescimento sobre as leveduras, sendo o volume final do ensaio ajustado para 100 μL . O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços) (Nunc) a 30 °C, totalizando um período de 24 h.

O crescimento celular foi determinado pela densidade óptica com amostras ressuspensas até a formação de uma solução homogênea e foi representado graficamente após 24 h de ensaio em função do tempo em um leitor de microplacas, num comprimento de onda de 620 nm. Todo ensaio foi realizado em triplicata e sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada descrita por BROEKAERT et al. (1990).

MIC₁₀₀ de P4r1 para o tempo de 24 h de incubação foi determinada partir dos dados das curvas de dose-resposta (usando parâmetros da porcentagem de inibição de crescimento em função da concentração de proteína). Todos os demais ensaios de mecanismo de ação foram realizados com estes parâmetros.

4.3.2 Análise da viabilidade celular

Após a determinação da MIC₁₀₀ do peptídeo purificado bioativo, todo conteúdo dos poços foi lavado em meio líquido Sabouraud e, com uma alça de Drigalski, foi uniformemente espalhado em placa de Petri contendo ágar Sabouraud e incubado a 30 °C, durante 48 h, permitindo que células viáveis se dividissem e formassem colônias. O desenvolvimento de colônias indicaria a ação fungistática e o não desenvolvimento de colônias indicaria a ação fungicida do peptídeo. A menor concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com ação fungicida foi considerada como DL₁₀₀, cuja interpretação foi feita a partir do não crescimento de colônias após o plaqueamento. Este experimento foi realizado, segundo SOARES et al. (2017). A DL₁₀₀ do peptídeo purificado foi utilizada como parâmetro para os ensaios de mecanismo de ação.

4.3.3 Ensaio de permeabilização de membranas de leveduras

As células das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guineensis* e *S. cerevisiae* (1×10^4 cel.mL⁻¹) foram incubadas em caldo Sabouraud contendo as respectivas concentrações de MIC₁₀₀ do peptídeo ativo, sendo o volume final foi ajustado para 100 µL. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços) a 30 °C por um período de 12 h.

A permeabilização da membrana das células de leveduras tratadas com a fração purificada, obtida do HPLC, foi avaliada através da utilização do corante fluorescente Sytox green, de acordo com a metodologia proposta por THEVISSSEN; TERRAS; BROEKAERT (1999). Logo após as 12h de incubação com peptídeo purificado, alíquotas de 96 µL das culturas foram incubadas, ao abrigo da luz e sob agitação constante de 200 rpm por 15 min, com o corante fluorescente Sytox green a uma concentração final de 0,2 µM. Este corante se torna fluorescente após interagir com ácidos nucleicos e penetra apenas em células com membranas comprometidas. As células do controle negativo somente foram incubadas com o corante Sytox green, nas mesmas condições. Para o controle positivo, as leveduras foram aquecidas por 2 min a 100 °C. Posteriormente, as células foram analisadas em microscópio óptico (Axio Imager.A2, Zeiss), acoplado a uma câmera AxioCAM MRc5 (Zeiss) e as imagens foram analisadas pelo software Axiovision, versão 4.0 (Zeiss). O microscópio está equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450-490 nm e emissão de 500 nm).

A análise estatística foi feita sobre a média do número de células fluorescentes. A percentagem de células fluorescentes, usada como indicação de estresse oxidativo, foi calculada sobre a média do número de células presentes em DIC dos ensaios do controle e testes, em que foram assumidos como 100%. Para o cálculo da percentagem de células fluorescentes, foi usada a seguinte fórmula: [(número de células fluorescentes x 100)/número de células observadas em DIC].

4.3.4 Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio intracelular

Para avaliar se o mecanismo de ação dos peptídeos isolados envolve a indução de estresse oxidativo, foi realizado um experimento como descrito no **item 4.3.3**, com algumas modificações: a sonda fluorescente 2'7'- diclorofluoresceína diacetato (H₂DFCDA) foi utilizada para medir espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, segundo metodologia descrita por MELLO et al. (2011). Este corante entra passivamente nas células e, quando

desacetilado por esterases intracelulares, é oxidado por ROS, tornando-se fluorescente. Após 12 h de incubação das células de leveduras com peptídeos nas concentrações dos respectivos MIC₁₀₀ serão novamente incubadas, agora com 20 µM da sonda H₂DCFDA, ao abrigo da luz, por 2 h à temperatura ambiente e com agitação constante de 200 rpm. Um controle positivo também foi feito, incubando com 200 mM de ácido acético por 30 min. Em seguida, as células foram analisadas no microscópio óptico equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450-490 nm e emissão de 500 nm).

4.3.5 Ensaio de determinação da funcionalidade mitocondrial

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada através do corante fluorescente Mitotracker red (Sigma-Aldrich). O Mitotracker red é uma sonda fluorescente catiônica que tem alta afinidade ao potencial elétrico de membranas, assim, ele marca mitocôndrias ativas em células vivas. Após o ensaio de inibição, os peptídeos, através dos valores da MIC₁₀₀ e com 12 h de tempo de incubação, junto às leveduras do gênero *Candida* e *S. cerevisiae* que foram ressuspensas e incubadas com 100 nM de Mitotracker red, sob agitação constante a 200 rpm e ao abrigo da luz por 30 min. As células do controle positivo foram tratadas com Triton X-100 2% (v/v) por 17 min.

Em seguida foram analisadas por contraste de interferência diferencial (DIC) no microscópio óptico equipado com um filtro de fluorescência (comprimento de onda de excitação de 506 nm, comprimento de onda de emissão de 530 nm).

4.3.6 Ensaio de condensação de cromatina

Para a marcação do núcleo, após o ensaio para a determinação da MIC, descrita no **item 4.3.1** e para o tempo de 12 h de incubação com o peptídeo, as células de *S. cerevisiae* e do gênero *Candida* foram lavadas com PBS incubadas com 1 µg.mL⁻¹ de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich) em PBS durante 10 min, seguida de três lavagens com o mesmo tampão e então visualizadas com um microscópio DIC (Axio Imager, A2, Zeiss) equipado com filtros de fluorescência (excitação 365 nm; emissão de 397 nm) de acordo com a metodologia descrita por MADEO; FRÖHLICH; FRÖHLICH (1997). O DAPI

é um composto químico que possui afinidade pelo DNA, ligando-se especificamente a regiões ricas em adenina e timina na molécula de DNA, emitindo uma fluorescência azul sob excitação por luz ultravioleta. Para que a sonda se ligasse ao DNA e marcasse o grupo controle, foi realizado o aquecimento a 100 °C por 5 min, a fim de detectar alterações na estrutura nuclear.

4.3.7 Detecção da atividade de caspases induzidas pelo peptídeo em células de leveduras

A detecção de atividade de caspases foi realizada utilizando o marcador *in situ* CaspACE FITC-VAD-FMK (Promega), como descrito pelo fabricante. O marcador FITC-VAD-FMK é um análogo do inibidor de caspases Z-VAD-FMK (carbобензоxi-valil-alanil-aspartil-[O-metil]-fluorometilcetona). O N-terminal carbобензоxi (Z) é substituído pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC) criando uma marcação fluorescente para apoptose. Esse complexo entra na célula onde atua como um pseudo-substrato que inibe de modo irreversível as caspases através da ligação ao resíduo de cisteína no seu sítio ativo e torna-se fluorescente.

Após a incubação com os peptídeos por 12 h nas concentrações da MIC, as células de leveduras *C. buinensis* e *S. cerevisiae* foram centrifugadas a 6000 x g e as células ressuspensas foram lavadas uma vez em 500 µL de PBS (10 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl) pH 7,4 e novamente ressuspensas em 50 µL da solução de coloração (fornecida pelo kit) contendo 50 µM do marcador FITC-VAD-FMK. Após incubação de 20 min a 30 °C, sob agitação constante a 200 rpm, as células foram mais uma vez lavadas em 500 µL de PBS e ressuspensas em 20 µL de PBS. As células do controle negativo (na ausência dos peptídeos) e positivo (incubadas com 200 mM de ácido acético) tiveram o mesmo tratamento das células tratadas como peptídeo purificado. As células foram analisadas por DIC no microscópio óptico equipado com um filtro de fluorescência para detecção da fluoresceína (comprimento de onda de excitação, 450-490 nm, comprimento de onda de emissão de 500 nm) (TAVEIRA et al., 2018).

4.3.8 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura

Células de leveduras tratadas com o peptídeo de interesse após a determinação da MIC para o tempo de 12 h de incubação, foram submetidas a três lavagens com solução salina NaCl 0,9% e fixadas em uma solução aquosa contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de formaldeído e 0,1 M de tampão fosfato por 24 h e pós fixadas em tetróxido de ósmio 1% e

tampão fosfato 0,1 M por 1 h. Após lavagem novamente no mesmo tampão, as células foram desidratadas em uma série crescente de acetona (20%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes 100% superseca), com duração de 1 h em cada etapa. Após a desidratação, as células foram submetidas a um ponto crítico para substituir toda acetona por CO₂ líquido sob condições de alta pressão (Secador de Ponto Crítico Bal-Tec – CPD 030). As imagens foram obtidas com um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss – EVO 40) com uma aceleração de tensão de 15 kV.

4.3.9 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão

Células das leveduras tratadas com o peptídeo ativo, após o ensaio descrito no **item 4.3.1** após 12 h de incubação foram fixadas em uma solução de glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4,0% e solução NaCl 0.9% por 2 h, em seguidas foram feitas três lavagens de 30 min no mesmo tampão. As amostras foram fixadas em uma solução de tetróxido de ósmio 1% e tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2), à temperatura ambiente por 1 h. Após três lavagens de 30 min no mesmo tampão, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de acetona (30, 50, 70, 90% e três vezes 100%). Posteriormente, os fragmentos foram infiltrados com resina epóxi (Epon[®]), utilizando-se série crescente de resina em acetona (3:1). A polimerização da resina foi realizada em estufa a 60 °C.

Foram realizados cortes ultrafinos (aproximadamente 70 nm de espessura) com o auxílio do ultramicrotomo (Reichert Ultracuts Leica Instruments[®]) e faca de diamante (Diatome[®]). Estes foram coletados em grades de cobre de 300 mesh. Em seguida, os cortes foram contrastados com acetato de uranila 5%, por 1 min, e citrato de chumbo, por 40 s a temperatura ambiente e, posteriormente, observados no microscópio eletrônico de transmissão (TEM 900 Zeiss), a uma aceleração de voltagem de 90 KV.

4.4 Estudo do efeito imunomodulatório e antimicobacteriano do peptídeo mais ativo de sementes de *Adenantha pavonina*

4.4.1 Efeito do peptídeo de interesse na viabilidade de macrófago murino

Quando em experimentação, os macrófagos RAW 264.7 (5×10^5 células.mL⁻¹) foram plaqueados, conforme metodologia descrita no **item 4.1.3** na presença e na ausência do

peptídeo de interesse (nas concentrações determinadas que inibem os microrganismos) e/ ou LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, *Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich).

O teste de citotoxicidade celular das amostras foi efetuado através da avaliação do potencial mitocondrial em metabolizar o 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol (MTT) a um cristal de formazan, conforme metodologia descrita no **item 4.2.8**.

4.4.2 Quantificação da produção de óxido nítrico

A produção de NO pelos macrófagos RAW 264.7 foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito. Cinquenta microlitros de cada sobrenadante, obtido conforme item 4.4.1) foram acrescentados a 50 μL de reagente de Griess (p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, Sigma- Aldrich). Após 10 min, a absorbância foi mensurada a 570 nm em espectrofotômetro de placa (Dinatech MR5000). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada em μM utilizando como referência uma curva de nitrito de sódio decrescida do valor obtido.

4.4.3 Quantificação da produção das citocinas TNF- α e IL-1 β

As linhagens murinas de macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) e J774A.1 (ATCC TIB-67) foram cultivadas em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10 % soro fetal bovino (SFB) (Gibco/Invitrogen, NY, USA) e acrescido de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina (GibcoBRL) e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de anfotericina B (Sigma-Aldrich), sendo mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Para cultivo de J774A.1, 5×10^5 células. mL^{-1} foram plaqueadas em placa de 96 poços com $100 \mu\text{L.poço}^{-1}$ de meio DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB (sem acréscimo de antibiótico), ou presença da amostra (25, 50, 100 ou $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e/ou LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, *Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, USA). A placa foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO_2 e após 24 h, o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação dos parâmetros inflamatórios.

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulada e tratada foram quantificadas separadamente utilizando kits comerciais de ELISA (ensaio de imunoabsorção ligado à enzima) tipo sanduíche (R&D Systems, MN, USA) e a execução experimental ocorreu segundo o protocolo do fabricante. Como controle positivo da produção de ambos os mediadores, foi utilizado o sobrenadante da cultura de macrófagos

estimulada e não tratada; como controle negativo, o sobrenadante da cultura celular não estimulada e não tratada.

4.4.4 Avaliação da atividade antimicobacteriana do peptídeo de interesse

Durante a fase logarítmica de crescimento das cepas de *Mtb* H37Rv e M299, 50 μL da suspensão de cada cepa foram separadamente plaqueados em placa de 96 poços (1×10^7 UFC.mL⁻¹) e acrescidos dos peptídeos de interesse nas concentrações de pré-determinadas para ambas as cepas de *Mtb*. A placa foi então incubada a 37 °C por 5 dias. Após este período, foram adicionados 10 μL .poço⁻¹ de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazolio (MTT, do inglês methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) e 3 h depois, 100 μL de tampão de lise (20% (p/v) de SDS, 50% (v/v) de dimetilformamida (DMF, do inglês *dimethylformamide*, Sigma-Aldrich) (MOODLEY et al., 2014). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm (CAVIEDES; DELGADO; GILMAN, 2002). Como controle positivo de crescimento será utilizado meio de cultura 7H9 suplementado e acrescido de bactérias e não tratado e como controle-negativo, somente meio de cultura suplementado. A capacidade das células para reduzir o sal MTT em cristal de formazan pela atividade da desidrogenase será utilizada como um indicador da viabilidade celular.

4.5 Quantificação de proteínas

As determinações quantitativas de proteínas foram realizadas pelo método do ácido bicinonínico, metodologia descrita por Smith et al. (1985) e pelo fabricante, Sigma-Aldrich) sendo a albumina da clara de ovo (Sigma-Aldrich) utilizada como padrão.

4.6 Análise estatísticas

Os dados foram avaliados pela One-way ANOVA test Tukey's e as diferenças das médias de $p < 0,05$ foram consideradas significativas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* (versão 8.0 para Windows).

5. RESULTADOS

5.1. Extração, purificação e caracterização dos peptídeos de *Adenantha pavonina*

5.1.1 Avaliação da FARP da semente de *A. pavonina* sobre leveduras de importância médica

A FARP, obtida após a extração de proteínas das sementes de *A. pavonina* pelo novo método utilizado, após aquecimento crítico e sequências de centrifugações foi submetida ao gel de tricina SDS-PAGE para verificação da presença de peptídeos (Figura 10 A). A visualização das bandas proteicas nessa fração mostrou a presença de várias bandas acima de 26 kDa, três bandas de proteínas principais entre 26 e 17 kDa, uma proteína majoritária de aproximadamente 14 kDa e uma banda proteica de interesse de aproximadamente 6 kDa, o que indica a presença de peptídeos (Figura 10 A). A FARP foi submetida a um ensaio antifúngico inicial. Verificou-se que a FARP apresentou capacidade inibitória de crescimento em *C. albicans* de 97,69 e 99,10% para 400 e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente (Figura 10 B). Analisamos ainda a viabilidade da levedura. A FARP em 400 e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ induziu perda de viabilidade celular de 93,57 e 100% de *C. albicans*, respectivamente (Figura 10 C e 10 D). Este resultado indicou que o efeito inibitório da FARP sobre *C. albicans* foi fungicida.

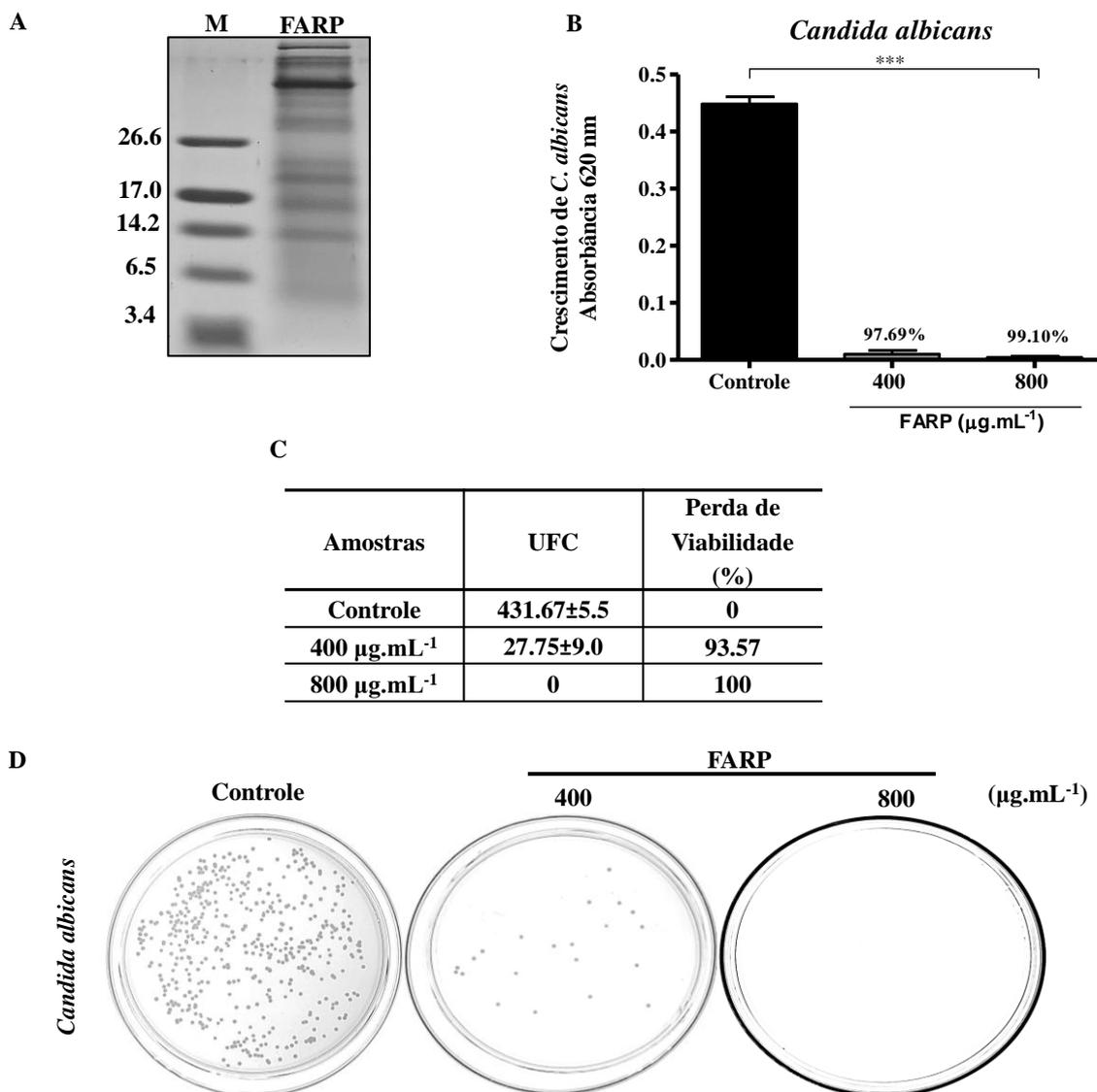


Figura 10: Caracterização da fração aquecida rica em peptídeos (FARP). (A): Visualização eletroforética da FARP em gel de tricina SDS-PAGE obtida de sementes maduras de *Adenantha pavonina*. (M) Marcadores de massa molecular (kDa). (B): Efeito inibitório da FARP no crescimento da levedura *Candida albicans*. As células foram tratadas na presença ou ausência (controle) de 400 e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Acima das barras de teste são mostradas a porcentagem de inibição em comparação com o controle. (***) indica $p < 0,001$. (C): Perda da viabilidade celular demonstrada pela incapacidade das células tratadas de formar colônias. UFC, unidade formadora de colônia (calculada com base em 100 μL da diluição do controle e dos ensaios de amostra). (D): Fotografia das placas de Petri mostrando a viabilidade celular em *C. albicans* após 24 h de tratamento com FARP (400 e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

5.1.2 Etapa de purificação por DEAE-Sepharose de peptídeos de *A. pavonina* com atividade antimicrobiana

A FARP foi separada em duas frações diferentes após cromatografia em DEAE-Sepharose, D1 (fração não retida, eluída no tampão de equilíbrio) e D2 (fração retida, eluída no tampão de equilíbrio contendo NaCl 1 M) (Figura 11 A). A análise por gel de tricina SDS-PAGE mostrou para a fração D1 a presença de bandas de proteínas com massa molecular de aproximadamente 6 kDa, uma banda de proteína principal de aproximadamente 17 kDa e muitas bandas de proteínas acima do marcador de 26,6 kDa. A fração D2 após dessalinização também apresentou bandas proteicas de aproximadamente 6 kDa, duas bandas proteicas principais com 17 e acima de 26 kDa e muitas bandas proteicas acima do marcador de 26,6 kDa (Figura 11 B). O ensaio antifúngico demonstrou que as frações D1 e D2 na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram capazes de inibir significativamente o crescimento de *C. albicans* em 97,98 e 98,19%, respectivamente (Figura 11 C). O ensaio de viabilidade apontou efeito fungicida na fração D1 com 100% de perda da viabilidade celular, enquanto a fração D2 demonstrou efeito fungicida com dose letal (DL) = 98,57% a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e nas condições testadas (Figura 11 D e 11 E).

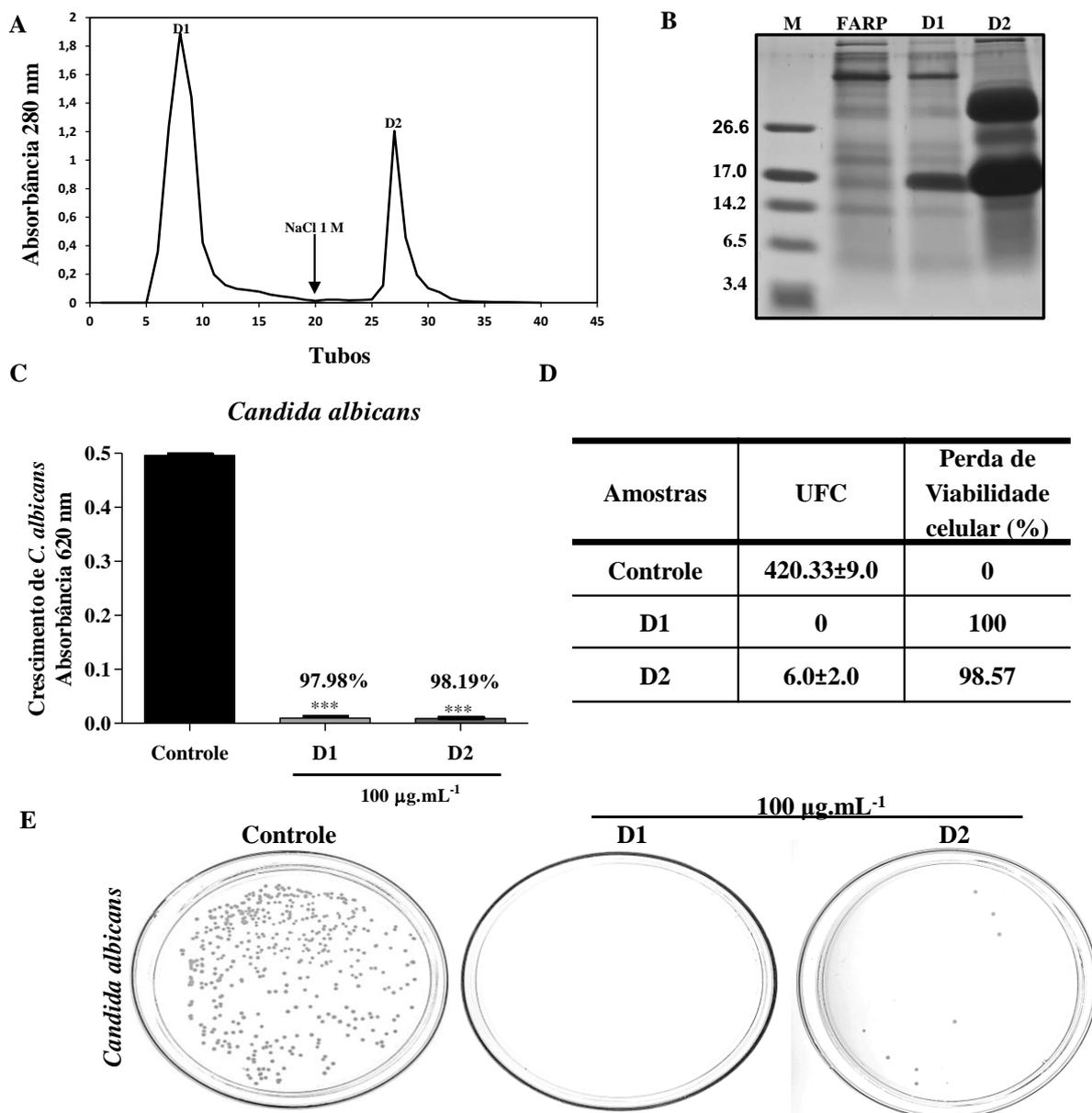


Figura 11: Fracionamento da FARP e atividade antimicrobiana de frações da DEAE-Sepharose. (A) Cromatograma de FARP de sementes de *Adenantha pavonina* em troca iônica DEAE-Sepharose. D1, fração não retida eluída em 0,1 M Tris HCl, pH 9,0 e D2 fração retida eluída usando 1 M NaCl no mesmo tampão, e 4 mL foram coletados em cada tubo. (B) Visualização eletroforética em gel de tricina SDS-PAGE contendo 40 μg de cada fração (frações FARP, D1 e D2). M – Marcadores de massa molecular (kDa); Frações D1 e D2 conforme descrito acima. (C) Efeito inibitório de D1 e D2 no crescimento da levedura *Candida albicans*. As células foram tratadas na presença ou ausência (controle) de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada fração. Acima das barras de teste são mostradas a porcentagem de inibição em comparação com o controle. O asterisco (***) indica $p < 0,001$. (D): Perda da viabilidade celular demonstrada pela incapacidade das células tratadas de formar colônias. UFC, unidade

formadora de colônia (calculada com base em 100 μL da diluição dos ensaios de controle e amostra). (E) Fotografia das placas de Petri mostrando a viabilidade celular em *C. albicans* após 24 h de tratamento com as frações D1 e D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

5.1.3 Efeito tóxico das frações D1 e D2 no crescimento de micobactérias

Devido à atividade antifúngica demonstrada pelas frações D1 e D2, a inibição do crescimento micobacteriano também foi avaliada nas cepas de *M. tuberculosis* H37Rv e M299 (Figura 12 A e 12 B, respectivamente). A fração D1 inibiu o crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv em 76,19, 75,60, 72,20 e 14,28% a 200, 100, 50 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Da mesma forma, a fração D2 também inibiu o crescimento da mesma cepa de *M. tuberculosis* em 34,76, 32,30, 27,72 e 19,73%, nas mesmas concentrações testadas. Além disso, a fração D1 foi capaz de inibir o crescimento de *M. tuberculosis* M299, a cepa de alta virulência, mas apenas nas duas maiores concentrações de 200 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 43,29% e 24,95%, respectivamente. Para a fração D2, observou-se uma inibição do crescimento de 22,60% e 19,60% também nas duas maiores concentrações de 200 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

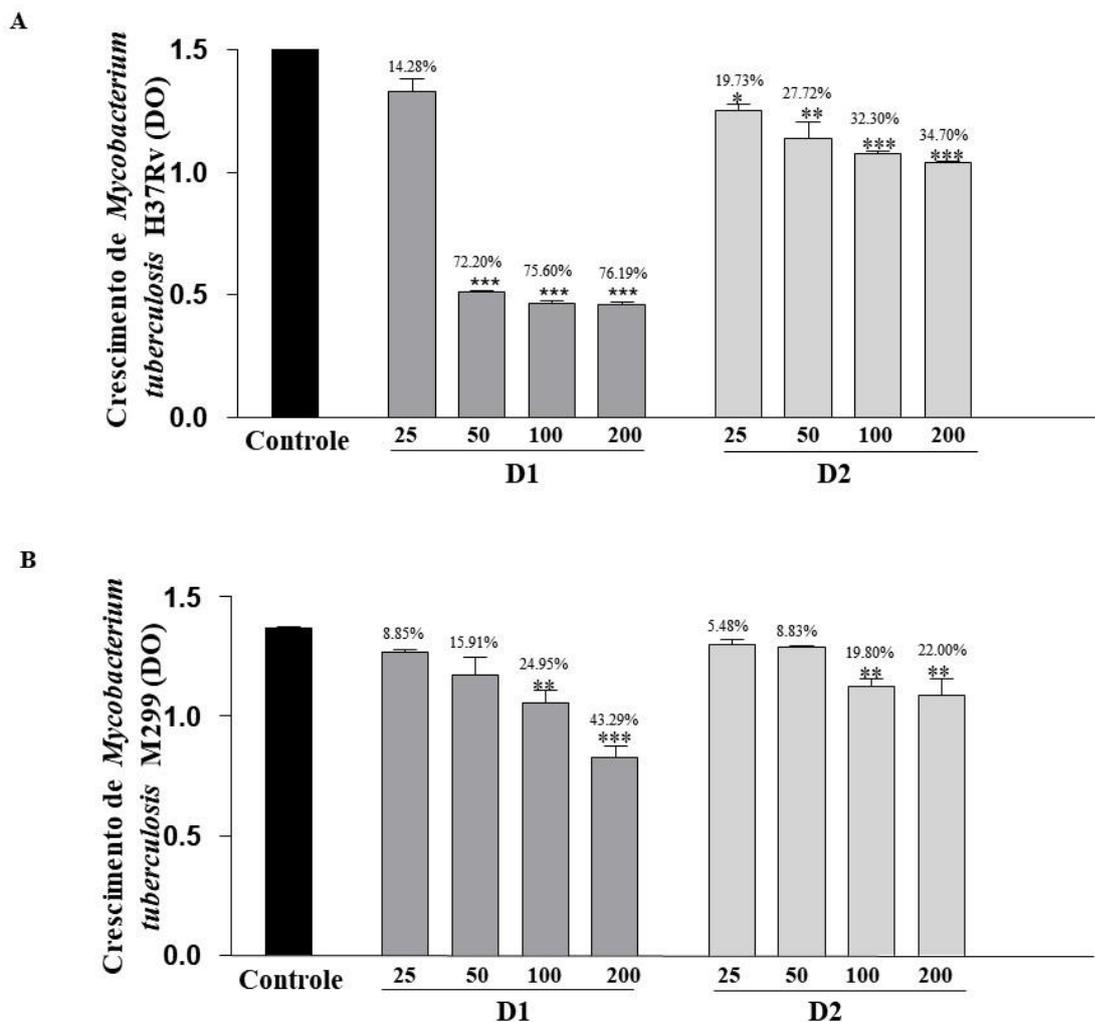


Figura 12: Atividade antimicobacteriana das frações DEAE-Sepharose. (A) Ensaio de inibição do crescimento da cepa laboratorial *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv na presença de diferentes concentrações (200 – 25 µg.mL⁻¹) das frações D1 e D2, obtido após cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose. Acima das barras de teste são mostradas as porcentagens de inibição. (B) Ensaio de inibição do crescimento do isolado clínico *M. tuberculosis* M299 na presença de diferentes concentrações das frações D1 e D2, obtido após cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose. Acima das barras de teste são mostradas as porcentagens de inibição.

5.1.4 Efeitos tóxicos das frações D1 e D2 contra células de mamíferos

Monitoramos a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 murinos por meio da capacidade desse tipo de célula de metabolizar MTT em formazan (Figura 13). A fração D1

apresentou citotoxicidade moderada para macrófagos RAW 264.7 murinos dependentes da concentração testada, e apresentou $IC_{50} > 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p > 0,05$, comparado ao controle não tratado). A fração D2 foi tóxica ao macrófago RAW 264.7 em todas as concentrações testadas (6,25 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e apresentou maior citotoxicidade em relação à fração D1, apresentando $IC_{50} < 6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

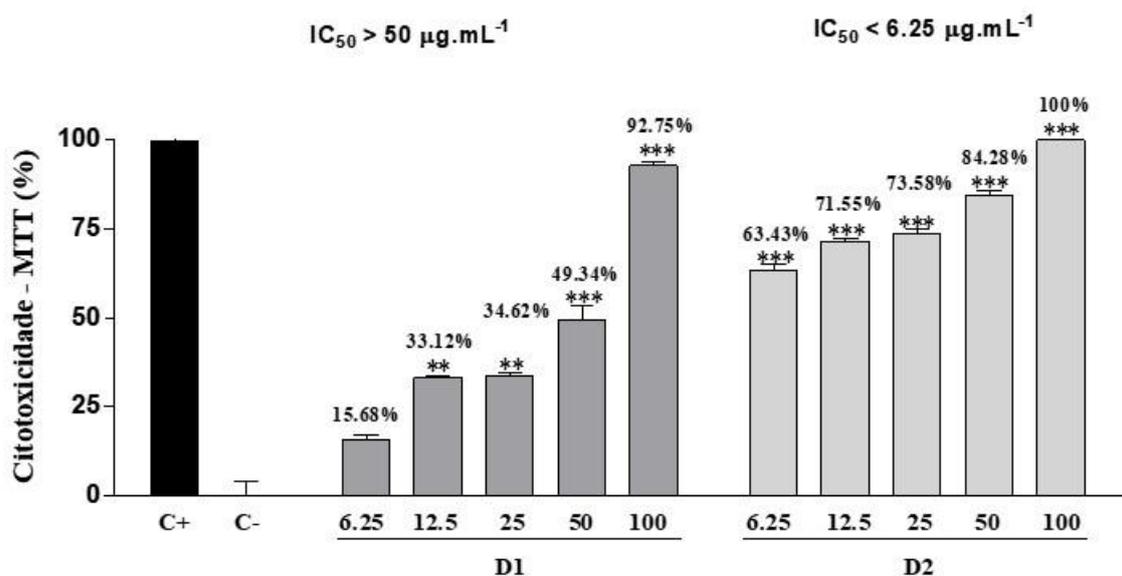


Figura 13. Perfil de citotoxicidade celular em macrófagos RAW 264.7. Avaliação da citotoxicidade das frações D1 e D2 de sementes de *Adenantha pavonina* em culturas de macrófagos RAW 264.7 pelo método MTT. As células foram tratadas após 24 h com as frações em diferentes concentrações. Células RAW 264.7 não tratadas foram usadas como controle negativo (citotoxicidade – 0%) e 1% de detergente Triton X-100 foi adicionado como tratamento no controle positivo (citotoxicidade – 100%). Média aritmética \pm desvio padrão ($n = 3$). $P < 0,05$ (*) em comparação com células não tratadas. Acima das barras de teste é mostrada a porcentagem de inibição.

5.1.5 Purificação em cromatografia de fase reversa de peptídeos antimicrobianos de *A. pavonina* e atividade antimicrobiana

Definimos alguns critérios para nos ajudar a escolher qual fração será analisada posteriormente, foram eles: homogeneidade da fração (Figura 11 A), presença de peptídeos (Figura 11B), efeito fungicida (Figura 11 D e 11 E), efeito antimicobacteriano (Figura 12 A e 12 B), e menor toxicidade para células de mamíferos (Figura 13). Usando esses critérios, a

fração D1 foi selecionada. Primeiramente, a fração D1 foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C18 e separada em dez frações com o gradiente de 2-propanol. Eles foram nomeados P1 a P10 (Figura 14 A). Todas essas frações foram visualizadas por gel de tricina SDS-PAGE e a maioria delas continha peptídeos de aproximadamente 6 kDa (Figura 14 B e 14 C). A fração P1 apresentou duas bandas proteicas de aproximadamente 6 e 17 kDa; P2 apresentou uma forte banda de proteína de aproximadamente 14 kDa; P3 apresentou uma banda abaixo do marcador de 6,5 kDa, uma de aproximadamente 6,5 kDa, uma acima do marcador de 6,5 kDa, duas bandas fracas de aproximadamente 14,2 e 17 kDa e três bandas fracas de proteína acima do marcador de 26 kDa; P4 apresentou duas bandas proteicas principais de aproximadamente 14 e 6 kDa; P5 apresentou duas bandas fracas de proteínas de aproximadamente 14 e 6 kDa. P6 apresentou três bandas principais de proteínas de aproximadamente 6, 14 e 17 kDa, P7 apresentou várias bandas principais de proteínas entre 6 e 26 kDa e acima da banda de 26 kDa. P8 e P9 apresentaram três bandas proteicas entre 6 e 14 kDa; P10 mostrou várias bandas de proteínas principais entre 6 e 26 kDa e acima do marcador de 26 kDa. O ensaio antifúngico indicou que das dez frações de HPLC (P1 a P10) apenas as frações P1, P4, P5, P6, P7 e P10 inibiram o crescimento de *C. albicans* (Figura 13 D), exibindo 68,42, 80,32, 50,11, 29,75, 47,14 e 73,23% de inibição, respectivamente. As frações P2, P3, P8 e P9 não inibiram significativamente *C. albicans*. Os resultados indicaram que a fração P4 possui a maior atividade antifúngica, 80,32% a 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida, expandimos as espécies de levedura e testamos em diferentes concentrações de P4 para avaliar o efeito da fração P4 em seu crescimento. As concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiram 90,45, 89,29, 83,25 e 79,41% de *C. albicans*, respectivamente. Nas mesmas concentrações, inibiu 96,29, 96,21, 96,21 e 72,58% de *S. cerevisiae*, respectivamente, e 93,47, 93,32, 89,63 e 77,13% de *C. buinensis*, respectivamente. Apenas a maior concentração testada (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi capaz de inibir 28,24% do crescimento de *C. parapsilosis*.

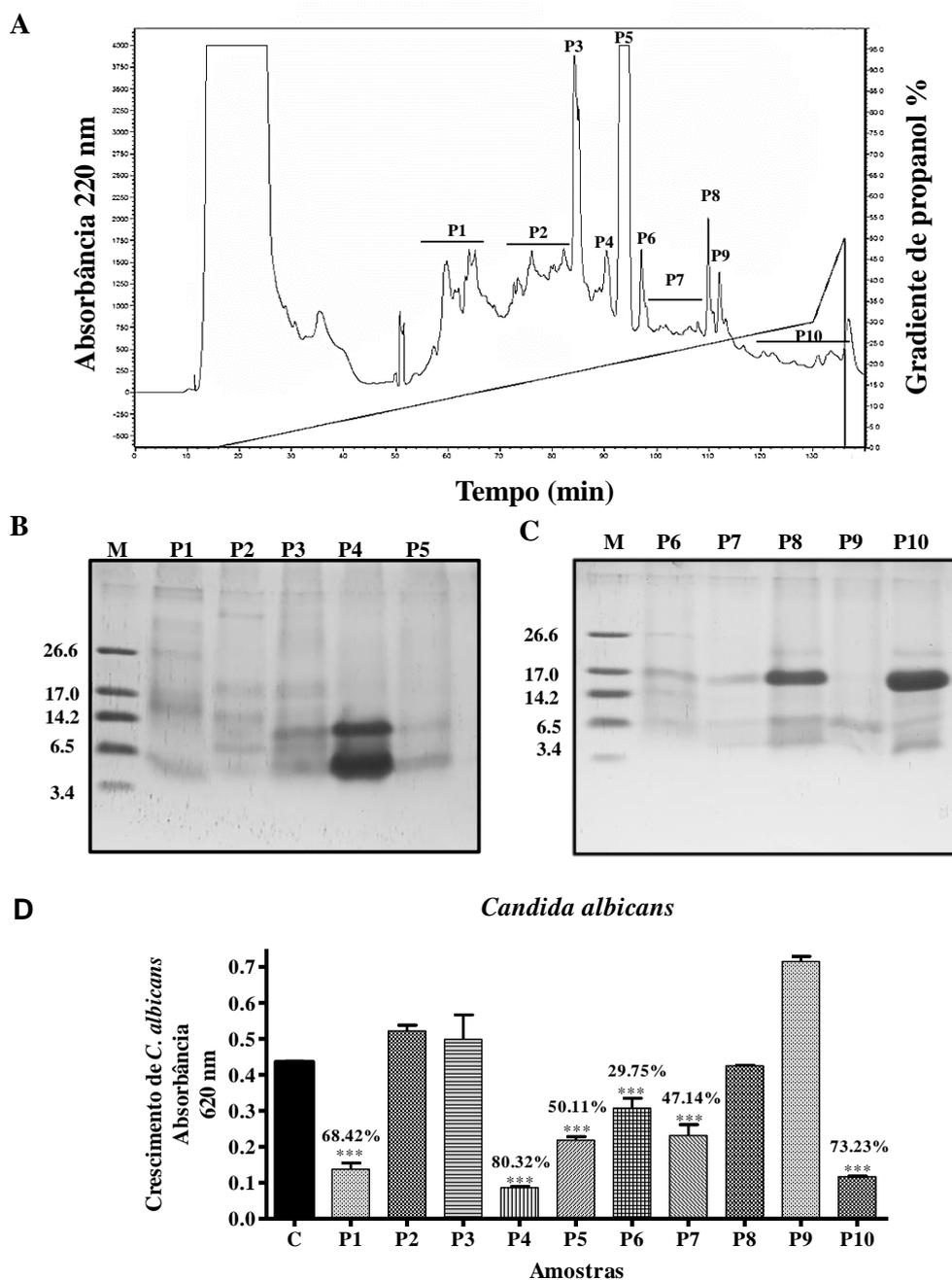


Figura 14. Separação da fração D1 e atividade antifúngica de amostras obtidas por cromatografia de fase reversa em HPLC. (A) Etapa intermediária de purificação dos peptídeos da fração D1 das sementes de *Adenantha pavonina*. Cromatograma da fração D1 após cromatografia de fase reversa em coluna C18. A linha representa o gradiente de 2-propanol que se estende de 0 a 50% (v/v). O perfil de eluição das amostras foi monitorado a 220 nm. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL.min⁻¹. P1 a P10, frações retidas na coluna C18 e separadas por 2-propanol. (B e C) Visualização eletroforética das frações obtidas após D1 ser cromatografado em coluna C18 por gel de tricina SDS-PAGE. M, marcador de massa molecular (kDa). (D) Efeito antifúngico das frações P1 a P10 a 25 µg.mL⁻¹ sobre o

crescimento de *Candida albicans*. A porcentagem de inibição do crescimento fúngico é mostrada acima das barras de teste. Os ensaios foram realizadas em triplicata. Os asteriscos indicam significância pela análise de variância (ANOVA) de um fator ($p < 0,001$).

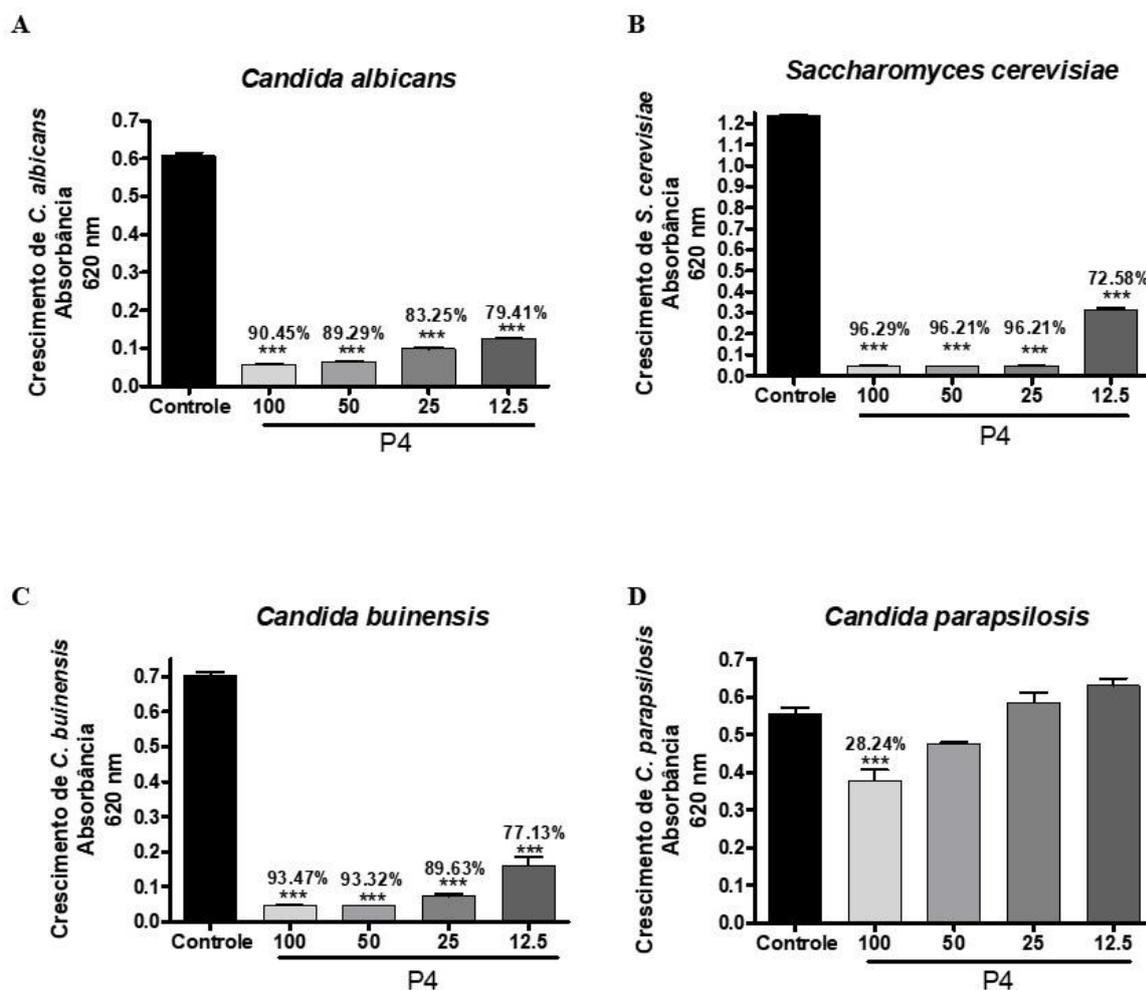


Figura 15. Atividade da fração P4 sobre espécies de *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae*: Crescimento de leveduras na ausência (controle) e na presença da fração P4 em diferentes concentrações (100 - 25 µg.mL⁻¹) por 24 h. A porcentagem de inibição do crescimento fúngico é mostrada acima das barras de teste. Os experimentos foram realizados em triplicado. Os asteriscos indicam significância pela análise de variância (ANOVA) de um fator ($p < 0,001$). (A) *Candida albicans* (B) *Saccharomyces cerevisiae* (C) *Candida buinensis* (D) *Candida parapsilosis*.

5.1.6 Etapa de purificação em coluna C18 de fase reversa de peptídeos de sementes de *A. pavonina*

A fração P4 foi escolhida para prosseguir com o processo de purificação porque esta fração apresentou a maior atividade inibitória entre as dez frações testadas e também porque o padrão proteico observado na eletroforese mostrou-se de menor complexidade, em relação às outras frações mais complexas e, portanto, mais fáceis de purificar. Nosso novo método de eluição resultou em duas frações, denominadas P4r1 e P4r2 (Figura 16 A). Sob o gel de tricina SDS-PAGE, a fração P4r1 continha uma banda de proteína de aproximadamente 6 kDa e P4r2 mostrou uma banda de proteína de maior massa molecular de aproximadamente 14 kDa (Figura 16 B). A fração P4r1 apresentou atividade inibitória significativa contra *C. albicans* (84,56%) a 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Enquanto a fração P4r2 apresentou menor atividade inibitória (13,63%) contra esta levedura na mesma concentração (Figura 16 C). Este resultado confirma que a banda de aproximadamente 6 kDa foi responsável pela atividade biológica da fração P4.

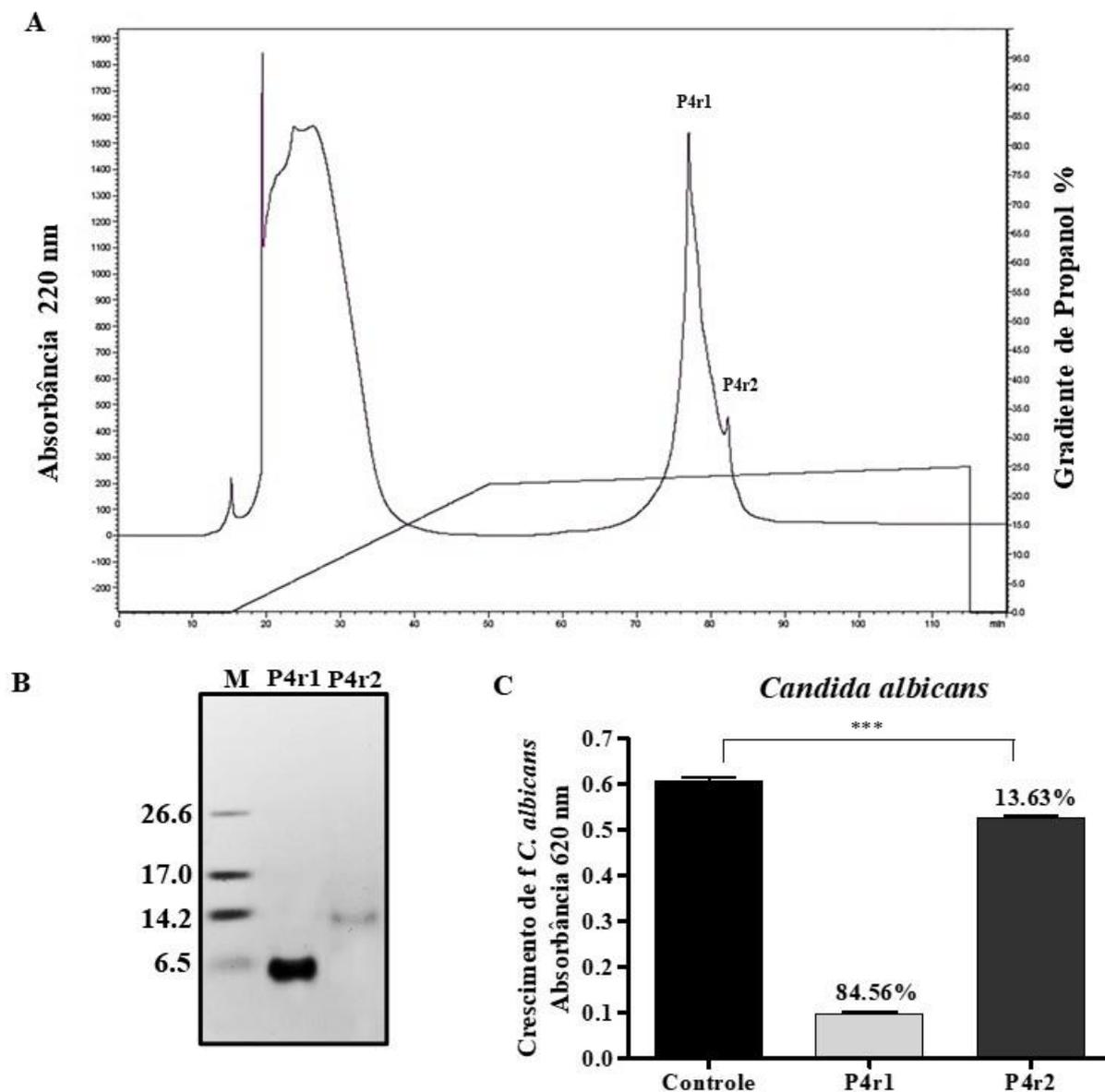


Figura 16. Purificação, identificação e caracterização de peptídeo bioativo. (A) Cromatograma da fração P4 recromatografada na coluna de fase reversa C18. A linha oblíqua representa o gradiente de 2-propanol que se estende de 0 a 25%. O perfil de eluição das amostras foi monitorado em 220 nm e foram obtidas duas frações denominadas P4r1 e P4r2. Figura (B) Visualização eletroforética das frações P4r1 e P4r2 em gel de tricina SDS-PAGE. M, marcador de massa molecular (Da). (C): Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento de *Candida albicans* incubada com as frações P4r1 e P4r2 a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A porcentagem de inibição do crescimento fúngico é mostrada acima das barras de teste. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os asteriscos indicam significância pela análise de variância (ANOVA) de um fator ($p < 0,001$).

5.1.7 Atividade inibitória das frações de *A. pavonina* L. sobre enzimas serínicas

Nós testamos se a fração P4r1 e as demais frações anteriores apresentavam atividades inibitórias sobre proteases. Para a tripsina, observou-se que a FARP a $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiu 99,03% da atividade catalítica da enzima, e as frações D1 e D2 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiram 84,41% e 99,49% de sua atividade catalítica, respectivamente. O P4r1 a $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou atividade inibitória fraca sobre a tripsina, com 17,34% (Figura 17 A). Para a quimotripsina, as frações FARP, D1 e D2 foram menos eficientes na inibição de sua atividade catalítica em comparação com a tripsina, mostrando inibições de 79,85%, 22,64% e 73,51%, respectivamente, nas mesmas concentrações mencionadas anteriormente. Da mesma forma, o P4r1 não demonstrou atividade inibitória significativa em relação à quimotripsina (Figura 17 B). Para descartar a possibilidade de que as condições de cromatografia de fase reversa interferissem negativamente na atividade inibitória enzimática do P4r1, os ensaios inibitórios enzimáticos foram repetidos com as frações que foram tratadas com as condições de fase reversa, ou seja, a $38 \text{ }^\circ\text{C}$, na presença de 25% da solução B (100% de 2-propanol e 0,1% de TFA), e tempo de incubação de 90 min. Esses resultados mostram que a FARP, D1 e D2 mantiveram suas atividades inibitórias sobre a tripsina (Figura 17 C) e quimotripsina (Figura 17 D), o que comprova que as condições da cromatografia de fase reversa utilizadas para a obtenção do P4r1 não afetaram sua atividade inibitória sobre as proteases de serina utilizadas.

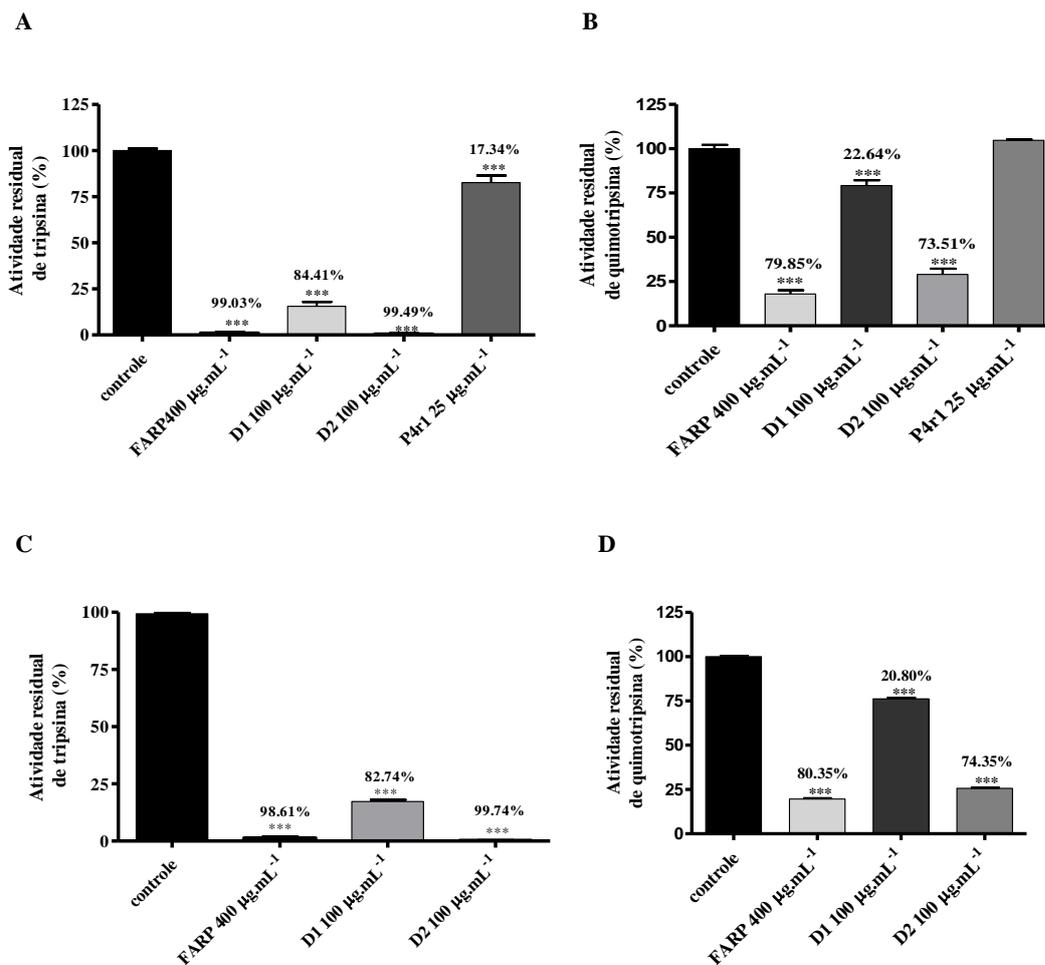


Figura 17: Avaliação da atividade inibitória sobre tripsina e quimotripsina das frações FARP ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$), D1 ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e P4r1 ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), obtidas a partir das sementes de *Adenantha pavonina*. (A) Efeito inibitório da atividade de tripsina na ausência e presença das diferentes frações. (B) Efeito inibitório da atividade de quimotripsina na ausência e presença das diferentes frações. (C) Efeito inibitório sobre a atividade da tripsina em condições experimentais de purificação de P4r1 (38°C , na presença of 25 % de solução B (100% 2-propanol + 0.1% TFA) à 90 min de incubação. (D) Efeito inibitório na atividade de quimotripsina em condições experimentais de HPLC. Asteriscos indicam significância pelo teste ANOVA, e os valores de diferença foram considerados significativos se $p < 0,05$. A porcentagem de inibição da enzima é mostrada acima das barras de teste. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.1.8 Obtenção dos extratos de leveduras e ensaio de inibição da atividade enzimática por zimografia

Para comprovar a atividade inibitória sobre proteases da fração P4r1, realizamos ensaios de zimografia através de extratos de leveduras. A Figura 18 B demonstra as atividades proteolíticas dos extratos brutos de *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Para *C. albicans*, apenas a cultura suplementada com BSA apresentou uma banda fraca, compatível com uma baixa atividade proteolítica de bandas de 36 e 45 kDa, de acordo com os marcadores. Para *S. cerevisiae*, em ambos os extratos, com e sem adição de BSA, foram evidentes três bandas proteolíticas principais de aproximadamente 36, 45 e acima de 45 kDa. A tripsina foi utilizada como controle para a zimografia e apresentou uma única banda de aproximadamente 20 kDa, o que confirmou o sucesso do experimento (Figura 18 B). No gel corado com Coomassie, as culturas de ambas as espécies de leveduras suplementadas com BSA mostraram maior expressão da proteína, evidenciada pelo aumento da densidade e do número de bandas proteicas. Bandas intensas com massa molecular variando de 14 a 66 kDa foram detectadas nos extratos celulares de *C. albicans*. Para *S. cerevisiae*, observou-se o aumento da intensidade das bandas de proteínas entre 45 e 66 kDa (Figura 18 A). Uma vez confirmada a presença de proteases nos extratos de leveduras, incubamos o lisado celular de *S. cerevisiae* suplementado com BSA na presença de diferentes frações de *A. pavanina* a 30 °C por 1 h antes da zimografia. Para *S. cerevisiae*, observamos que FARP (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D1 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) eliminaram a atividade proteolítica de 36 e 45 kDa, e para a banda proteolítica acima de 45 kDa, na qual uma atividade residual permaneceu. Da mesma forma. Para P4r1 (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), todas as bandas proteolíticas foram completamente inibidas (Figura 18 C). Da mesma forma, para *C. albicans*, FARP (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D1 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) não inibiram a atividade proteolítica, enquanto P4r1 (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiu completamente a atividade proteolítica (Figura 18 D). Esses resultados mostram que P4r1 possui capacidade inibitória proteolítica e demonstraram que o peptídeo de aproximadamente 6 kDa é um inibidor de protease.

5.1.9 Classificação de proteases nos lisados de células de levedura por zimografia

Para determinar a classe de proteases detectadas na zimografia, utilizamos o extrato de *S. cerevisiae* e repetimos a zimografia na presença de inibidores comerciais de protease. A Figura 18 E mostra a eliminação completa da atividade proteolítica após a exposição do

extrato a 1 mM de PMSF por 1 h antes da zimografia, ao passo que a atividade proteolítica foi preservada após exposição de 1 mM de Pepstatina A e 1 mM de EDTA. Esses resultados demonstram que as enzimas detectadas nos lisados de células de leveduras, nas condições testadas, pertencem principalmente à classe de serino proteases. Por essa razão, renomeamos-lo para ApPI, sigla para Inibidor de Protease de *A. pavonina*.

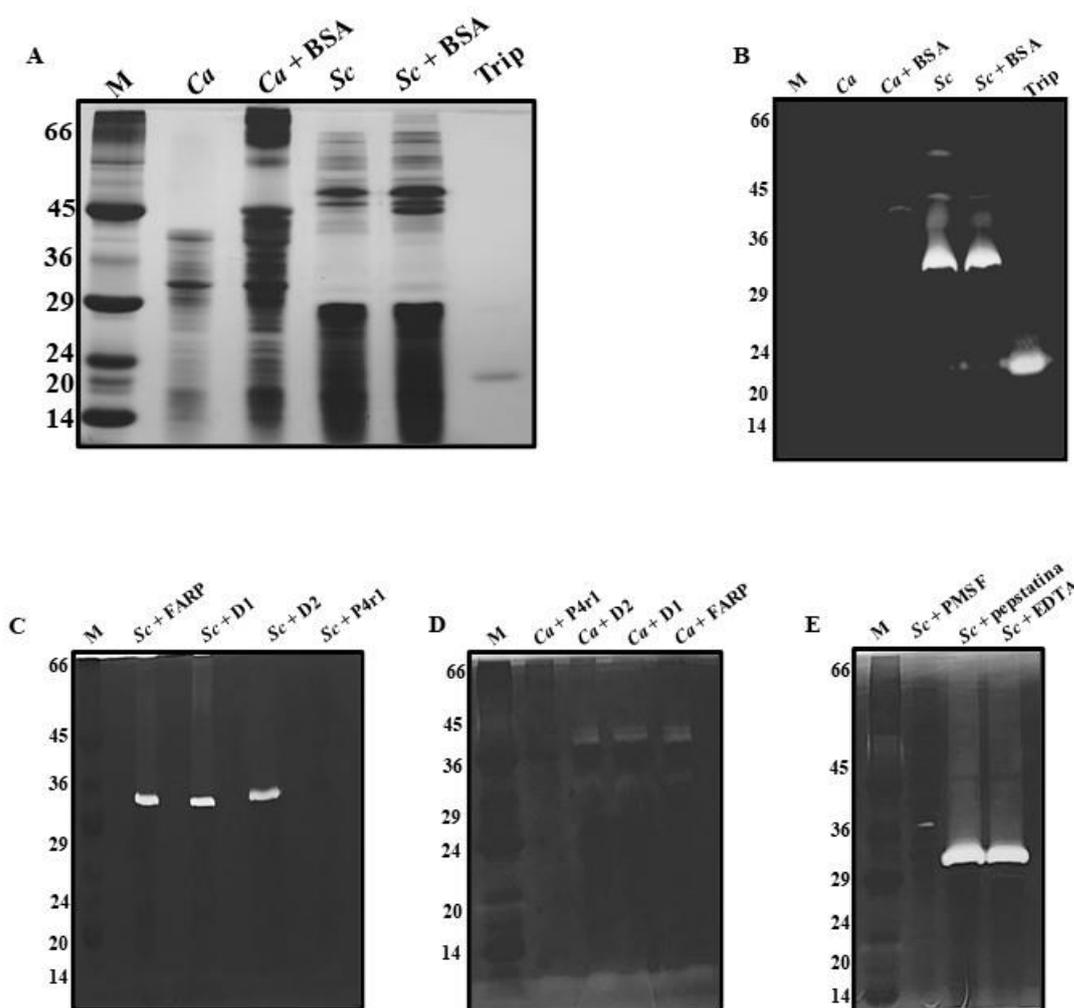


Figura 18: Avaliação da atividade inibitória de proteases a partir de frações obtidas de sementes *Adenantha pavonina*. (A): Visualização eletroforética em gel de tricina SDS PAGE (12,5%) dos sobrenadantes de lisados de células de leveduras cultivadas na presença ou ausência de BSA. Vinte microgramas de cada lisado de células foram aplicados. (M) Marcador de massa molecular em kDa. (B) Detecção de atividades proteolíticas a partir de extratos celulares de *C. albicans* e *S. cerevisiae* por zimografia na ausência ou presença de BSA. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R 250. (Controle): Trip (Tripsina de pâncreas suíno). (C) Zimograma mostrando bandas de atividade proteolítica a partir do

lisado de células de *S. cerevisiae* e (D) *C. albicans* na presença de diferentes frações FARP (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). D1 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), P4r1 (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), suplementadas com BSA a 30 °C por 1 hora. (E) Zimograma mostrando bandas de atividade proteolítica a partir do lisado de células de *S. cerevisiae* na presença de diferentes classes de inibidores comerciais. (PMSF) - fenilmetilsulfonilfluorido. (Pepstatina) – Pepstatina A. (EDTA) – ácido etilenodiaminotetracético.

5.1.10 Atividade Inibitória de α -amilase

Também testamos a capacidade do ApPI de inibir, além das proteases, α -amilases, assim como as outras frações obtidas durante o processo de purificação. A fração D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e o ApPI (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram capazes de inibir, respectivamente, 42,98% e 94,76% a atividade de α -amilase intestinal das larvas de inseto *T. molitor* (Figura 19 A), enquanto as frações FARP e D1 não inibiram a enzima nas condições testadas. Em relação à α -amilase salivar humana, apenas o ApPI, na mesma concentração, inibiu 100% da atividade catalítica da enzima, assim como o controle positivo EDTA (Figura 19 B). Esses dados sugerem fortemente que o ApPI é um inibidor de protease bifuncional.

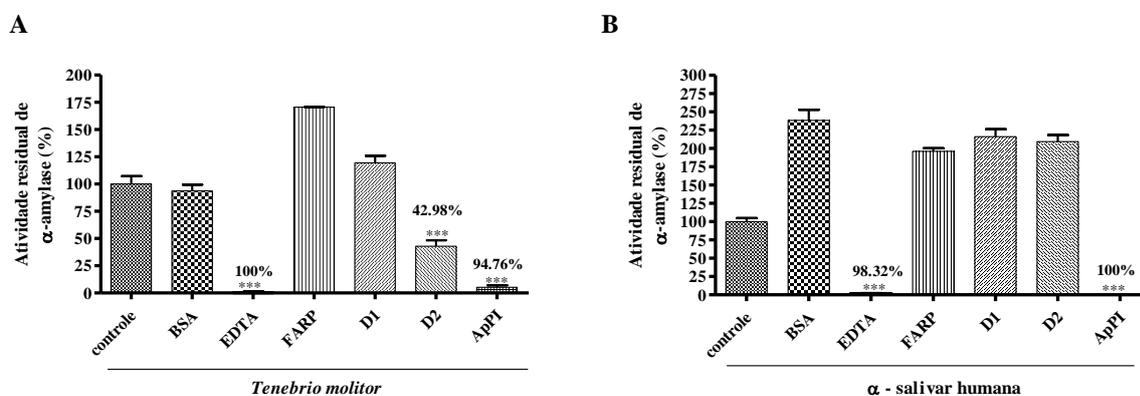


Figura 19: ApPI é capaz de inibir a atividade da α -amilase. (A) Atividade da α -amilase de *Tenebrio molitor* na presença e ausência de diferentes frações: FARP (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D1 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), ApPI (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). (B) Atividade de α -amilase salivar humana na presença e ausência de FARP (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D1 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), D2 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), ApPI (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Acima das barras de teste são mostrados os percentuais de inibição. Os valores são a média \pm DP de triplicatas. O asterisco

indica significância por ANOVA ($p < 0,05$). EDTA (Controle positivo). BSA (Controle negativo).

5.1.11 Avaliação da estabilidade térmica do ApPI

Durante a extração de peptídeos a partir de sementes de *A. pavonina*, uma etapa de aquecimento foi utilizada para eliminar proteínas indesejadas e enriquecer a amostra com peptídeos termoestáveis. Nesse sentido, o peptídeo purificado foi capaz de suportar 90 °C por 10 min, as condições utilizadas na extração. Agora, para ter uma melhor ideia da termorresistência do ApPI, aquecemos o mesmo a 90, 100 e 130 °C por 30 min e testamos sua atividade antimicrobiana residual. Na primeira condição térmica testada, o ApPI mostrou uma inibição de crescimento de 81,16% em *C. albicans*, o que indica que o ApPI não perdeu atividade biológica com o aumento do tempo de incubação a 90 °C. Para as temperaturas de 100 °C e 130 °C, observou-se uma inibição de crescimento de 69,57% e 59,78%, respectivamente. Considerando a porcentagem de inibição a 90 °C por 30 min como parâmetro de comparação, a 100 °C houve uma perda de 11,59% da atividade antimicrobiana, e a 130 °C, essa perda foi de 21,38%. Esses resultados indicam que o ApPI é um peptídeo termorresistente (Figura 20).

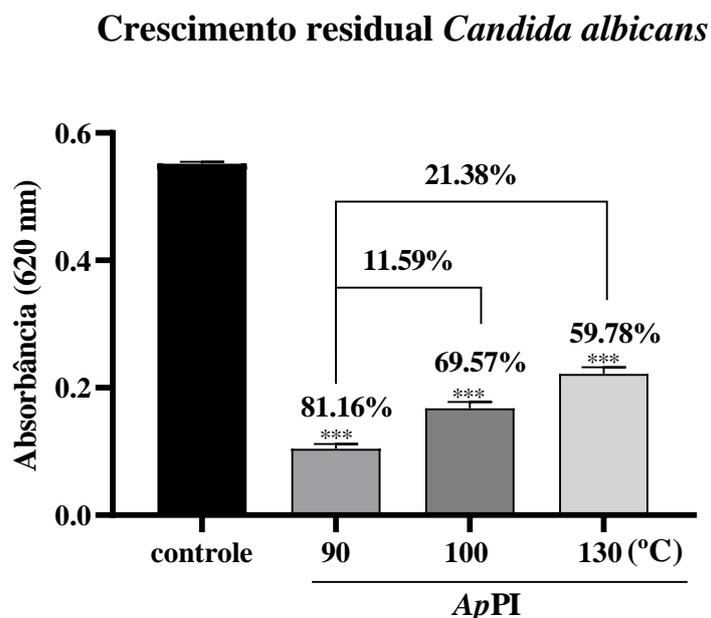


Figura 20: Ensaio de termo estabilidade. Efeito do aumento da temperatura sobre a ação inibitória de ApPI ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) na inibição do crescimento de *C. albicans* por 24 h. A

porcentagem de inibição do crescimento fúngico é mostrada acima das barras de teste. Os ensaios foram realizadas em triplicata. Os asteriscos indicam significância pela análise de variância (ANOVA) de um fator ($p < 0,001$).

5.2 Mecanismo de ação do ApPI sobre leveduras oportunistas

5.2.1 Determinação da concentração mínima inibitória

Para determinarmos a menor concentração do ApPI capaz de inibir completamente o crescimento de leveduras foi feito o ensaio de MIC₁₀₀, a partir das espécies mais sensíveis para a fração P4 (*S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans*) (Figura 15) e *C. tropicalis* (ainda não avaliada experimentalmente). Nesse ensaio, foi possível observar que ApPI inibiu completamente o crescimento dessas leveduras a partir da concentração de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. cerevisiae*, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. buinensis*, 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. albicans* e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. tropicalis* (Figura 21).

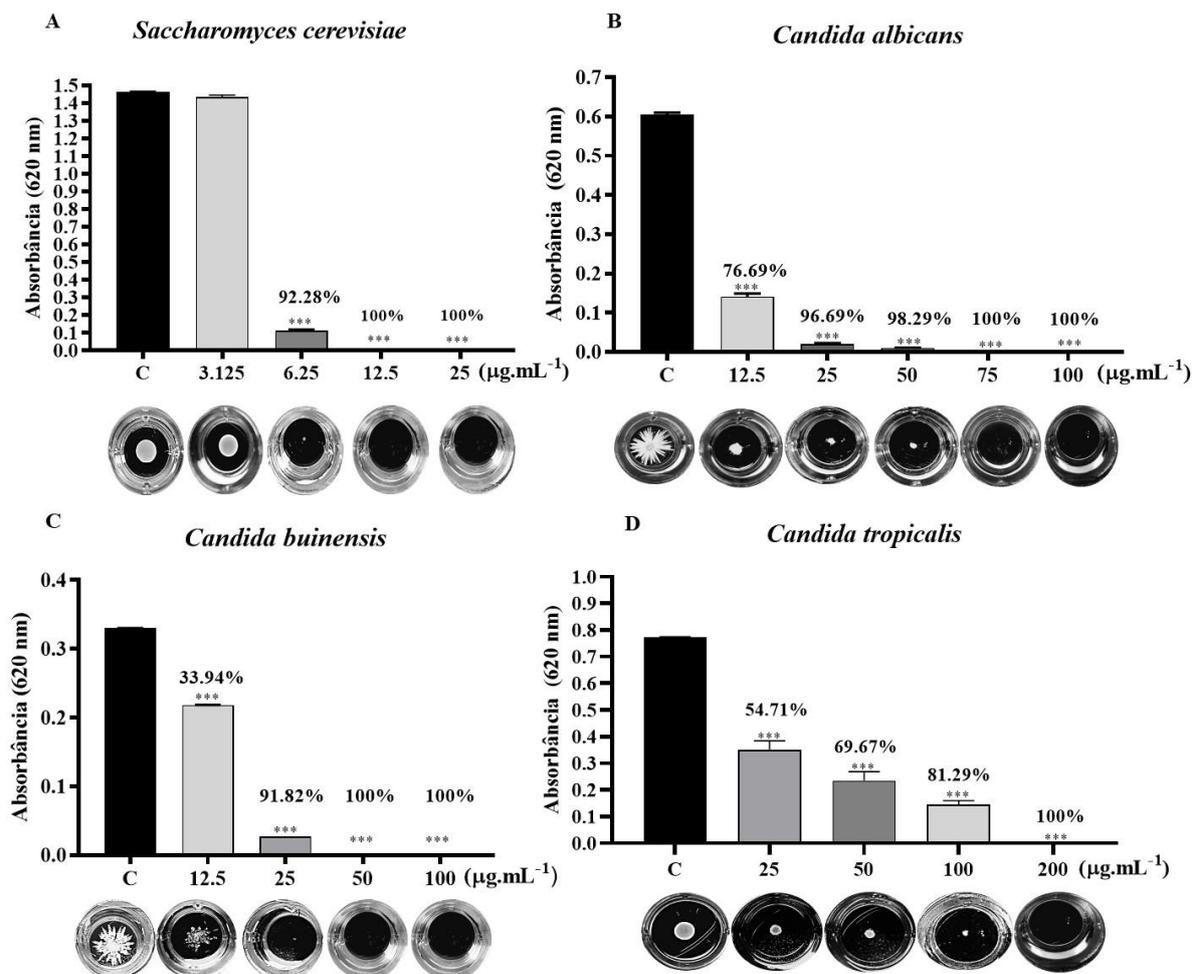


Figura 21: Determinação da concentração mínima inibitória de ApPI sobre *S. cerevisiae* (A), *C. buinensis* (B), *C. albicans* e *C. tropicalis* (C). Em cima das barras está indicado a percentagem de inibição do crescimento fúngico em relação aos controles. Abaixo das barras mostram-se as fotografias do fundo dos poços e padrão de crescimento das leveduras. Os asteriscos indicam o grau de significância ($p < 0.001$) em relação ao controle.

5.2.2 Determinação da viabilidade celular

Para determinarmos se a ação do peptídeo purificado é fungicida ou fungistática, plaqueamos todo o conteúdo dos poços (100 µL) após o ensaio da MIC₁₀₀ com 12 h de incubação.

Quando tratamos *S. cerevisiae* e *C. buinensis* com o peptídeo ApPI, na concentração da MIC₁₀₀, não houve crescimento de colônias, indicando que 12,5 µg.mL⁻¹ e 50 µg.mL⁻¹ correspondem as concentrações da DL₁₀₀ respectivamente (Figura 22). No entanto, quando *C.*

albicans foi tratada com ApPI, na concentração da MIC₁₀₀, houve um crescimento de colônias (resultado não mostrado), logo decidimos plaquear a concentração seguinte (100 µg.mL⁻¹), com a qual foi possível observar o crescimento de colônias após o plaqueamento. Esse último processo também foi observado em *C. tropicalis* na concentração da MIC₁₀₀, evidenciando a ação fungistática do peptídeo para as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Após a determinação da MIC₁₀₀ e DL₁₀₀, decidimos estudar os mecanismos de ação que resultam na perda de viabilidade celular. Sendo assim, os ensaios seguintes foram feitos com os parâmetros de MIC₁₀₀ e com 12 h de incubação para as seguintes combinações de peptídeo purificado- levedura: *S. cerevisiae* + ApPI 12,5 µg.mL⁻¹, *C. albicans* + ApPI 100 µg.mL⁻¹, *C. buinensis* + ApPI 50 µg.mL⁻¹ e *C. tropicalis* + ApPI 200 µg.mL⁻¹.

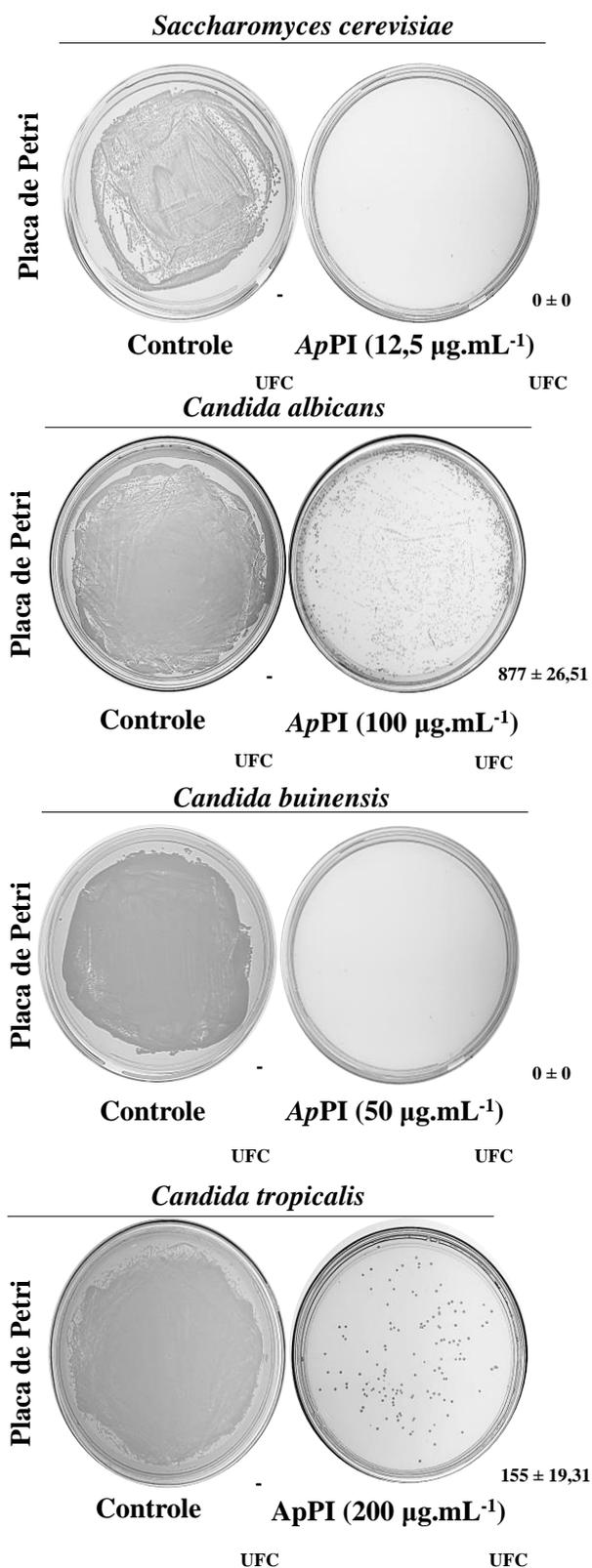


Figura 22: Ensaio de viabilidade celular. Determinação da viabilidade celular das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis* tratada com *ApPI*, após 12 h. UFC = Médias com desvio padrão das unidades formadoras de colônias. (-) Número excessivo de

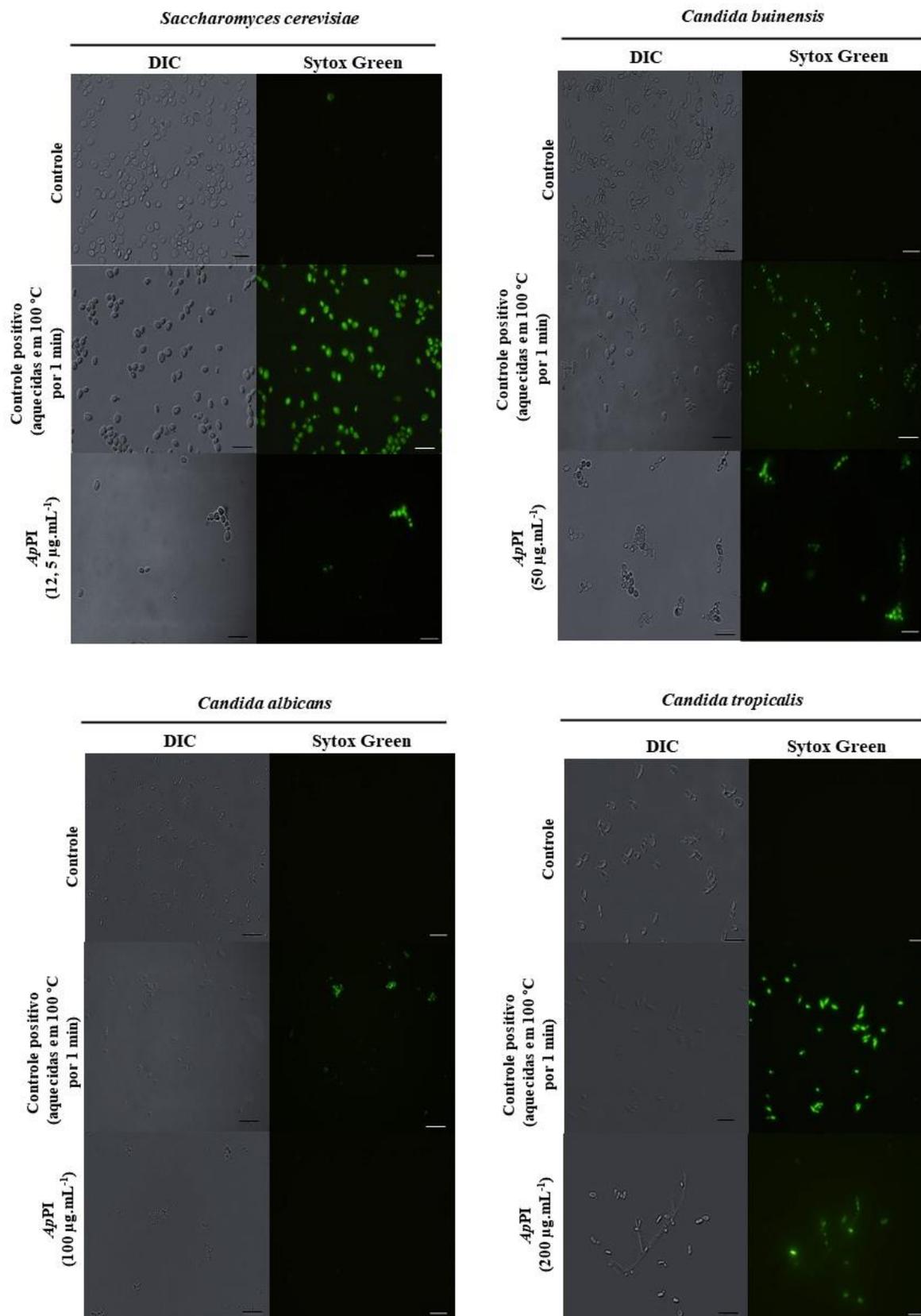
colônias crescidas que impediu a contagem. Note que não há desenvolvimento de colônias nas placas tratadas de *S. cerevisiae* e *C. buinensis*, indicando que 12,5 e 50 é a DL_{100} de ApPI dessas leveduras, respectivamente. A DL_{100} é a representativa de um ensaio realizado apenas uma vez em triplicata.

5.2.3 Análise da ação de ApPI sobre a permeabilização de membranas plasmáticas

Para verificarmos se ApPI causa a permeabilização de membrana plasmática de *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*, respectivamente, usamos a sonda fluorescente Sytox Green (Figura 23 A). O sinal fluorescente emitido pelas células de *S. cerevisiae*, *C. buinensis* e *C. tropicalis* tratadas com ApPI, indicou que houve permeabilização de 78,74, 58,96 e 80,78% das células respectivamente (Figura 23 B). Também foi possível observar em DIC, a redução de células de *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis* por campos quando comparamos o controle com o tratado e alterações morfológicas, após 12 h de incubação com ApPI.

Também foi visto o encolhimento das células de *S. cerevisiae* e *C. buinensis* em relação ao controle, bem como formação de aglomerado celular e alteração no processo de brotamento, também presente em *C. albicans*. Além disso, é interessante notar que quando as células de *C. tropicalis* são tratadas com ApPI ocorre a formação de pseudo-hifas.

A



B

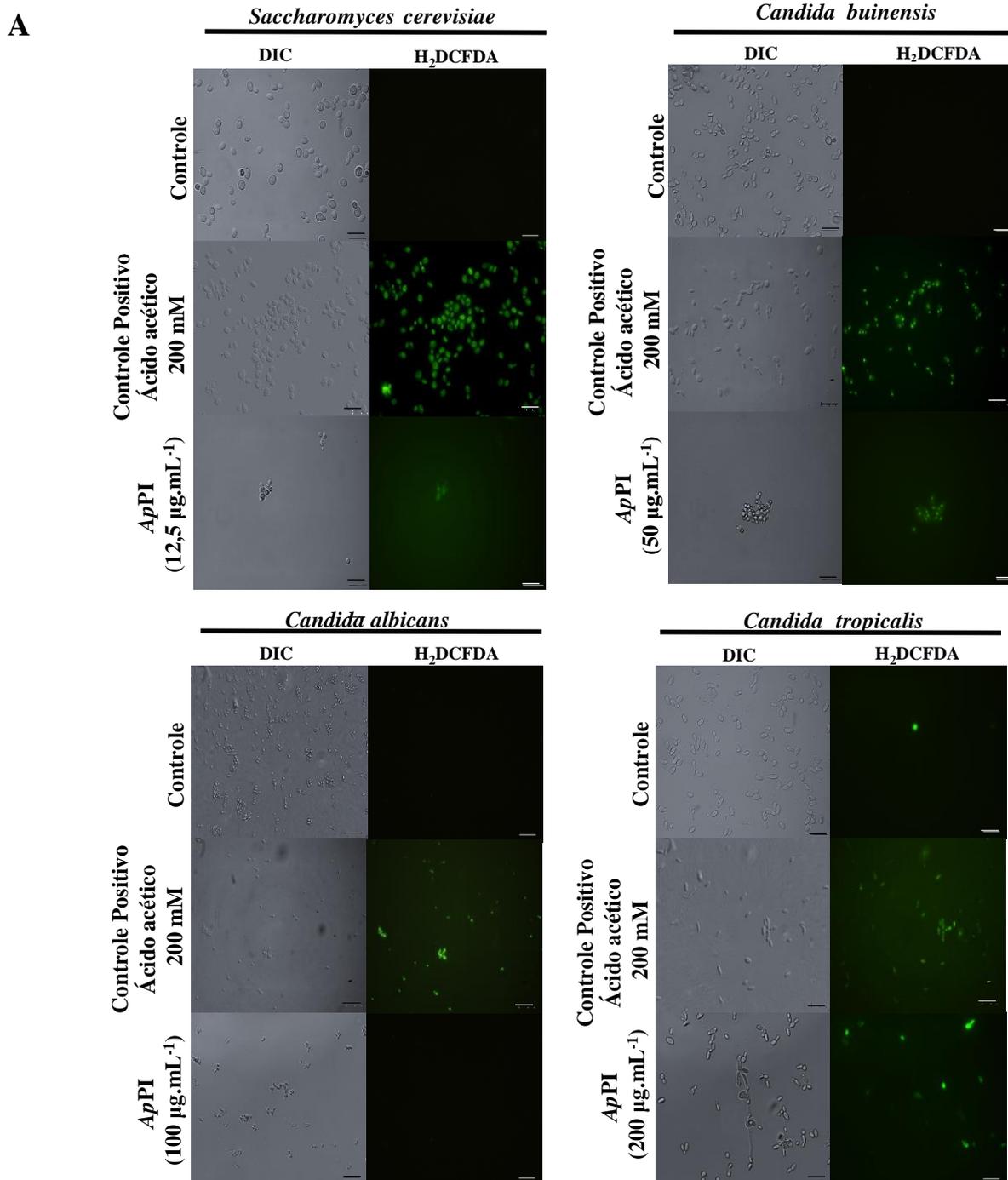
Espécies de Levedura	Amostras	Número de células em DIC	Número de células em Fluorescência	(%) Células permeabilizadas (Sytox Green +)
<i>S. cerevisiae</i>	controle	216,66 ± 32,15	3,66 ± 2,08	1,69
	controle +	151,66 ± 15,94	150,33 ± 15,18	99,12
	ApPI	15,66 ± 1,52	12,33 ± 2,51	78,74*
<i>C. albicans</i>	controle	137,00 ± 21,00	0,33 ± 0,58	0,24
	controle +	219,00 ± 29,20	214,33 ± 28,74	97,85
	ApPI	51,66 ± 25,48	2,00 ± 1,00	3,87
<i>C. buinensis</i>	controle	123,66 ± 1,53	2,00 ± 0,00	1,62
	controle +	176,00 ± 30,63	174,33 ± 35,57	99,05
	ApPI	26,00 ± 9,53	15,33 ± 3,21	58,96*
<i>C. tropicalis</i>	controle	109,66 ± 15,63	1,00 ± 1,00	0,91
	controle +	52,00 ± 8,18	49,00 ± 5,57	94,23
	ApPI	17,33 ± 2,30	14,00 ± 2,00	80,78*

Figura 23: Permeabilização de membrana plasmática das células de leveduras tratadas com ApPI. (A) A fluorescência verde indica a permeabilização de membrana. As células foram visualizadas em DIC e por fluorescência, todas no mesmo tempo de exposição. Aumento de 630x. Barras 20 µm. (B) Número de células permeabilizadas determinadas após contagem de células observadas em três campos aleatórios em DIC e fluorescência. Controle positivo representa células de leveduras tratadas com aquecimento e controle negativo apenas as células de leveduras com a sonda Sytox Green. Asteriscos (*) indicam diferença estatística significativa ($p < 0.001$), pelo One-Way ANOVA. As imagens mostradas são representativas de um experimento de três.

5.2.4 Análise da ação de ApPI sobre a produção endógena de ROS

A presença de ROS pode ser uma consequência da ação do inibidor de protease e quando geradas nas células de leveduras, podem acarretar em lesões irreversíveis. Sendo assim, para identificarmos a presença dessas moléculas de forma intracelular, foi feita a análise por microscopia de fluorescência usando a sonda H₂DCFDA (Figura 24 A). Nossa intenção foi identificar se há produção de ROS após 12 h de contato com as células de leveduras com o peptídeo. Quando as células de *S. cerevisiae*, *C. buinensis* e *C. tropicalis* foram incubadas com ApPI, 96,25%, 85,49% e 37,16% da população estava fluorescente,

indicando que essas células apresentavam estresse oxidativo (Figura 24 B). Além disso, pode-se observar em DIC, que houve uma redução de células por campo para todas as leveduras testadas, corroborando com os resultados do ensaio de inibição (Figura 21) e permeabilização de membrana (Figura 23 A).



B

Espécies de Levedura	Amostras	Número de células em DIC	Número de células em Fluorescência	(%) Células fluorescentes (H ₂ DCFDA +)
<i>S. cerevisiae</i>	controle	165,33 ± 11,93	1,33 ± 1,52	0,80
	controle +	106,33 ± 21,20	105,00 ± 19,67	98,75
	ApPI	26,67 ± 7,64	25,67 ± 6,66	96,25*
<i>C. albicans</i>	controle	235,33 ± 8,50	1,00 ± 1,00	0,42
	controle +	124,66 ± 8,74	121,67 ± 8,08	97,60
	ApPI	42,67 ± 7,50	3,33 ± 1,53	7,80
<i>C. buinensis</i>	controle	127,00 ± 7,55	1,00 ± 1,00	0,79
	controle +	86,00 ± 7,94	83,33 ± 7,64	96,86
	ApPI	18,33 ± 14,43	15,67 ± 12,50	85,49*
<i>C. tropicalis</i>	controle	125 ± 9,17	0,33 ± 0,58	0,26
	controle +	71 ± 8,19	54,33 ± 2,52	76,52
	ApPI	37,67 ± 6,03	14,00 ± 2,65	37,16*

Figura 24: Ensaio de indução de ROS. (A) Imagens de células de leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* após ensaio de indução de ROS por microscopia de fluorescência através da sonda H₂DCFDA. Células foram tratadas com ApPI, a partir dos valores de MIC₁₀₀ de cada levedura e depois analisado por estresse oxidativo. Células controle tratados somente com H₂DCFDA. Controle positivo realizado com ácido acético 200 mM. Barras = 20 µm. (B) A porcentagem de indução de ROS foi quantificada pelo número de células em três campos aleatórios em DIC e fluorescência das amostras visualizadas, sendo o número de células em DIC de cada amostra considerada como 100%. Asterisco (*) indica diferença significativa (p < 0.001) pelo One-way ANOVA.

5.2.5 Análise da funcionalidade mitocondrial

A produção de ROS identificada nas leveduras após o tratamento com o peptídeo extraído e purificado a partir de sementes de *A. pavanina*, nos levou a investigar sobre possíveis danos que possam comprometer a funcionalidade mitocondrial. Como a matriz mitocondrial é a principal fonte de ROS intracelular, decidimos analisar esta organela e para isso usamos a sonda de potencial de membrana *Mitotracker red*. Este ensaio foi feito levando em consideração o tempo de morte de 12 h.

No primeiro momento, pode ser observado uma marcação fluorescente mais forte e mais difusa nas células controle. Entretanto, quando tratamos as leveduras por 12 h com ApPI,

observamos uma menor intensidade de fluorescência entre as células do controle e do tratado, exceto em *C. tropicalis* (Figura 25), indicando uma diminuição da atividade mitocondrial em *S. cerevisiae*, *C. buinensis* e *C. albicans*.

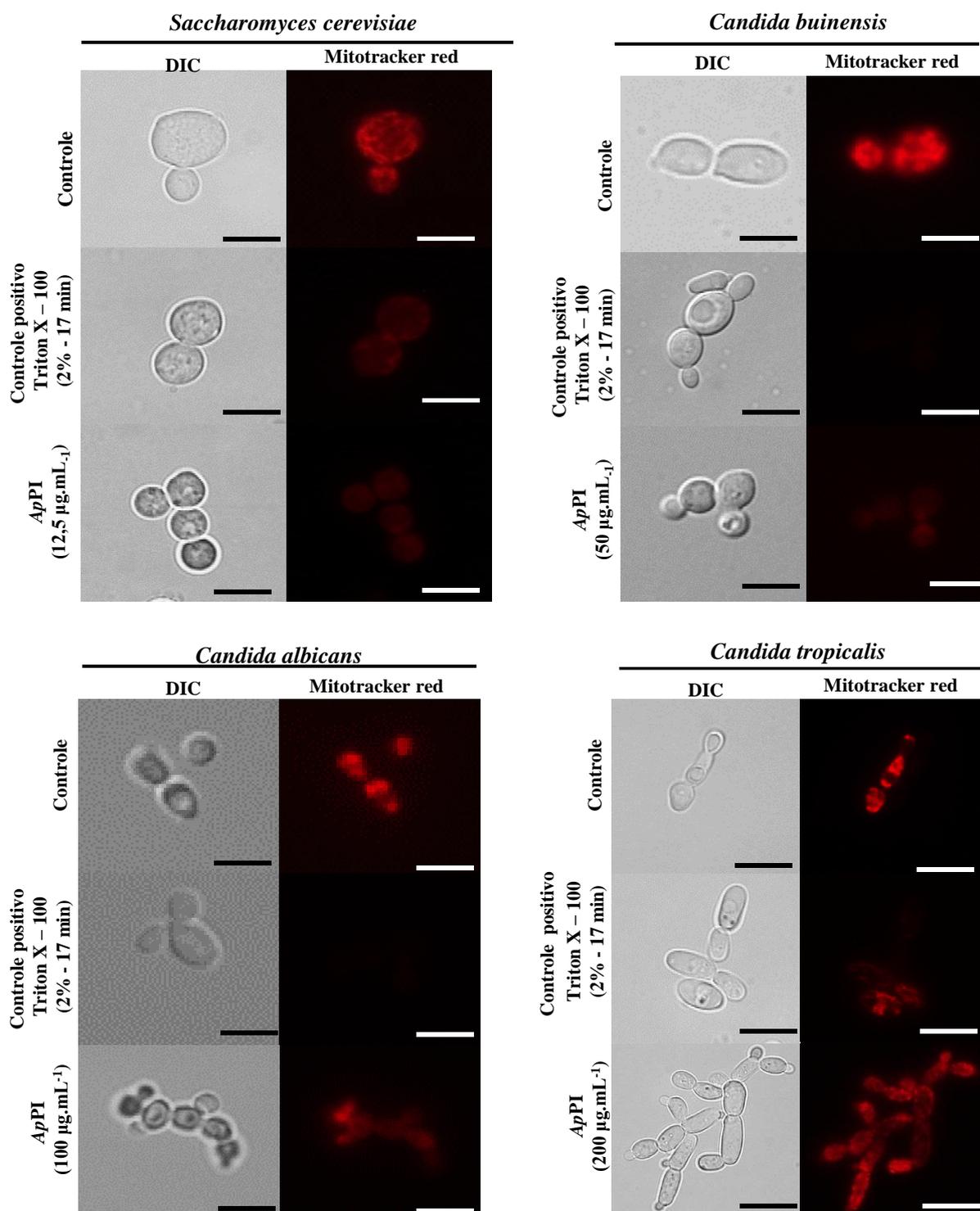


Figura 25: Ensaio de funcionalidade mitocondrial. Imagens de células de *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* tratados com ApPI após 12 h de exposição. A fluorescência vermelha indica o potencial de membrana mitocondrial. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, todas no mesmo tempo de exposição. Imagem com ampliação 630 x. Barras: 10 μ m.

5.2.6 Análise de condensação de cromatina

ROS são formadas em qualquer organismo exposto ao oxigênio molecular e apresentam papel crucial no evento de apoptose. Sob esse viés, analisamos o efeito de ApPI na indução de marcadores apoptóticos. O núcleo das células de *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* foi analisado através da marcação com DAPI, um composto que atravessa membranas quando permeabilizadas e se liga especificamente ao DNA, tornando-se fluorescente. Células de leveduras tratadas com ApPI nas concentrações da MIC₁₀₀ apresentaram (exceto em *C. tropicalis*) uma fluorescência nuclear concentrada e intensa, típica de células apoptóticas, o que indica condensação de cromatina (Figura 26).

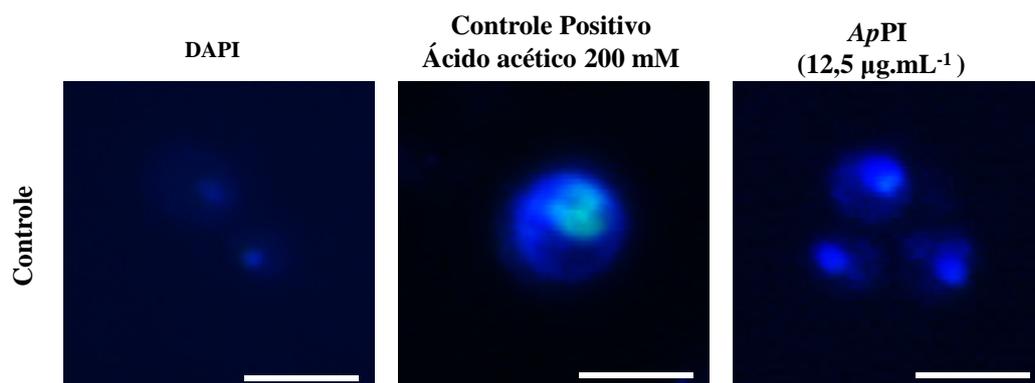
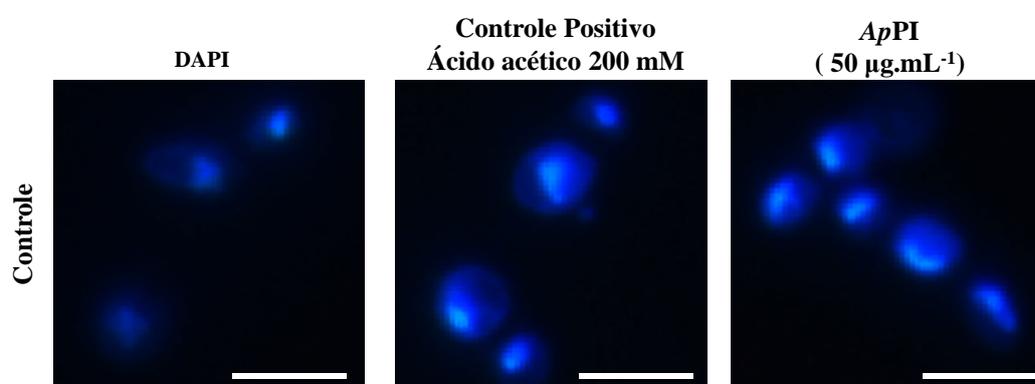
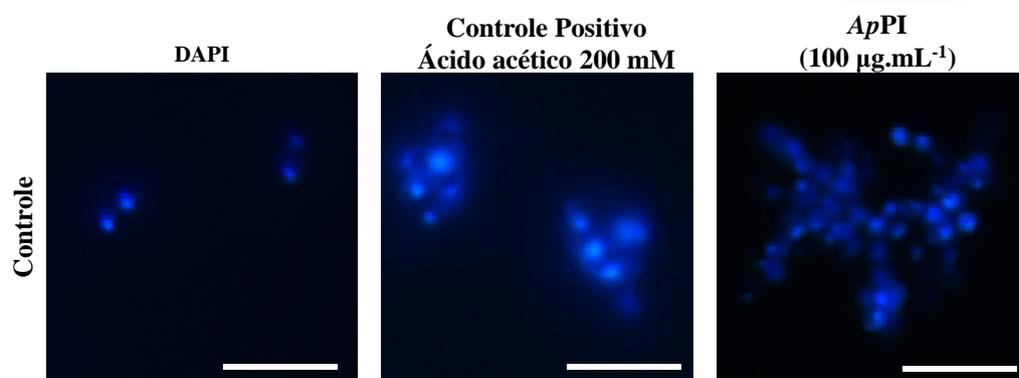
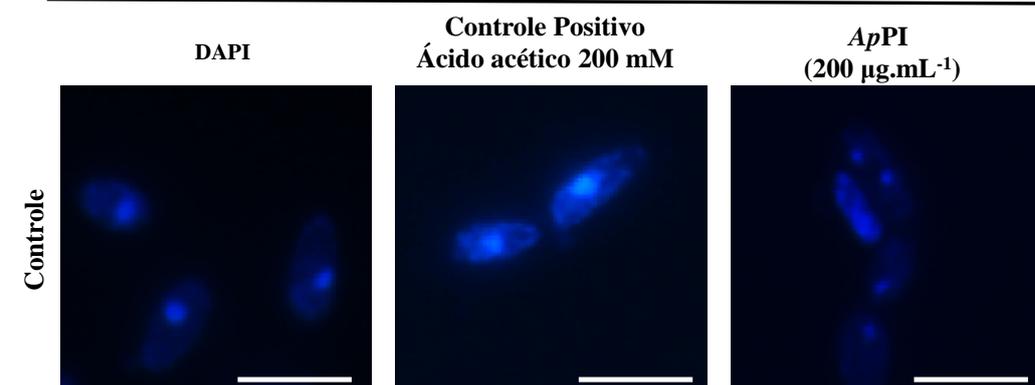
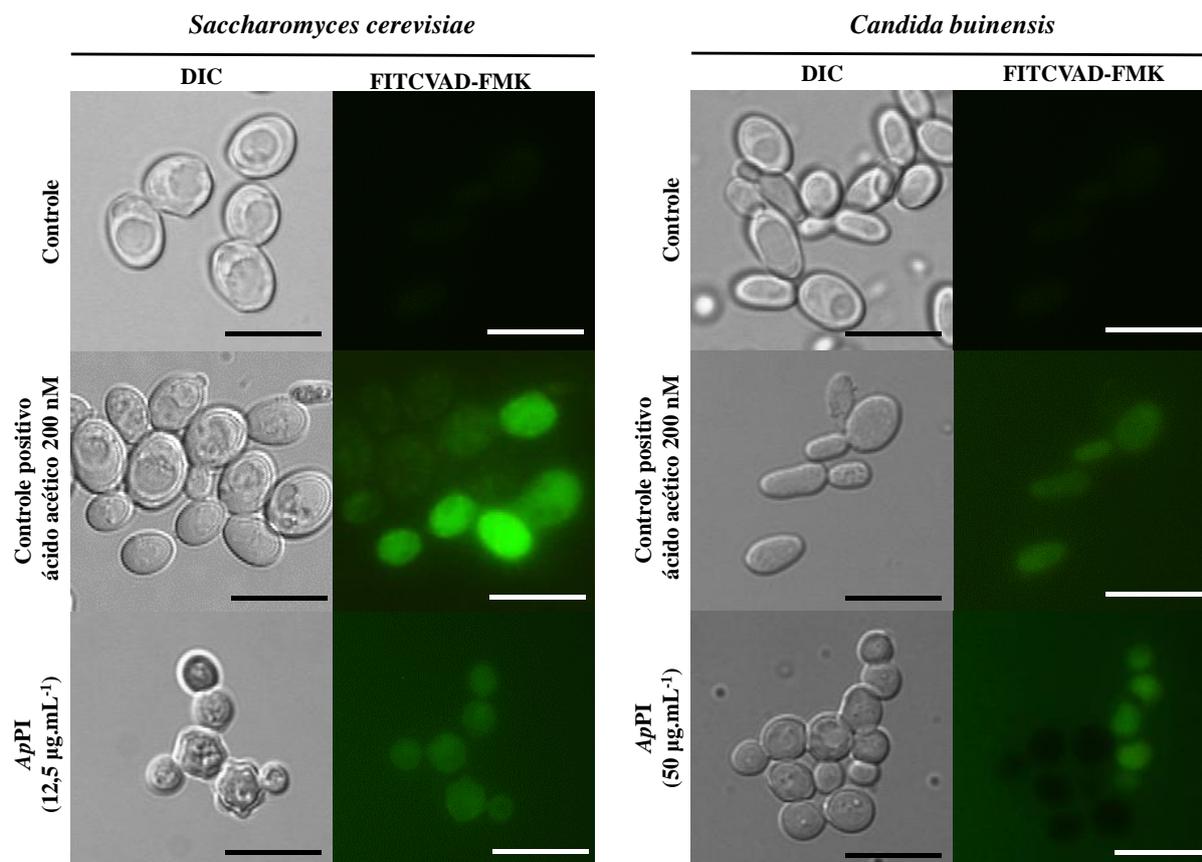
Saccharomyces cerevisiae*Candida buinensis**Candida albicans**Candida tropicalis*

Figura 26: Detecção de condensação de cromatina em leveduras do gênero *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com ApPI. Marcação com DAPI das células controle e tratadas durante 12 h com os valores da MIC₁₀₀ de ApPI. Note brilho mais intenso e aumento do núcleo nas amostras tratadas. Barras: 10 µM.

5.2.7 Análise da relação da atividade de caspase na morte de *S. cerevisiae* e *C. buinensis* induzida por ApPI

Para confirmar se as características encontradas, como estresse oxidativo e condensação de cromatina nas leveduras de *S. cerevisiae* e *C. buinensis* semelhante à alterações também observadas em processos apoptóticos, estariam relacionados a eventos de morte celular, avaliamos o envolvimento de caspases induzidas pela presença de ApPI (Figura 27 A). Nossos resultados mostraram que a exposição das células de *S. cerevisiae* e *C. buinensis* a ApPI resultou em 83,30 e 44,42%, respectivamente, de células com sinal positivo para a ativação de caspases (Figura 27 B). Isso corrobora fortemente com os resultados anteriores e indica que, pelo menos para essas células, o processo de morte celular pode depender de caspases com características compatíveis com a morte celular programada.

A



B

Espécies de Levedura	Amostras	Número de células em DIC	Número de células em Fluorescência	(%) Células fluorescentes (FITCVAD-FMK +)
<i>S. cerevisiae</i>	controle	134,33 ± 9,29	0 ± 0	0,00
	controle +	118,33 ± 4,16	113,00 ± 2,64	95,50
	<i>ApPI</i>	10,00 ± 3,60	8,33 ± 2,08	83,30*
<i>C. buinensis</i>	controle	186,33 ± 7,02	0 ± 0	0,00
	controle +	166,33 ± 10,26	163,33 ± 9,61	98,20
	<i>ApPI</i>	12,00 ± 3,00	5,33 ± 1,53	44,42*

Figura 27: Detecção da atividade de caspases. Imagens das células de *S. cerevisiae* e *C. buinensis* após o ensaio de atividade de caspase, visualizadas por microscopia de fluorescência usando a sonda fluorescente CaspACE FITC-VAD-FMK. As células foram tratadas com os valores da MIC₁₀₀ por 12 h. As células controle foram tratadas apenas com CaspACE FITC-VAD-FMK. Barras = 10 µm. (B) Porcentagem da atividade de caspase foi quantificada por número de células fluorescentes em três campos aleatórios e visualizados por DIC e fluorescência das amostras visualizadas, sendo o número de células em DIC de cada

amostra considerada como 100%. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0.001$) pelo One-way ANOVA.

5.2.8 Análise da ação de ApPI sobre leveduras em microscopia eletrônica de varredura

Devido a alterações morfológicas apresentadas em microscopia óptica (Figura 23 A), analisamos o efeito de ApPI sobre a estrutura e morfologia das leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Ao comparar as células controle com as quatro leveduras, estas últimas apresentaram uma superfície lisa e uniforme, sem rupturas aparentes. Entretanto, quando estas são tratadas com ApPI (Figura 28) apresentam uma série de alterações como: perda de conteúdo citoplasmático e encolhimento celular, evidenciando, danos severos nas células (asteriscos branco), resultando em debris celulares (seta branca), permeabilização de membrana e formação de pseudohifas com enrugamento de parede, especialmente em *C. tropicalis* (asterisco preto).

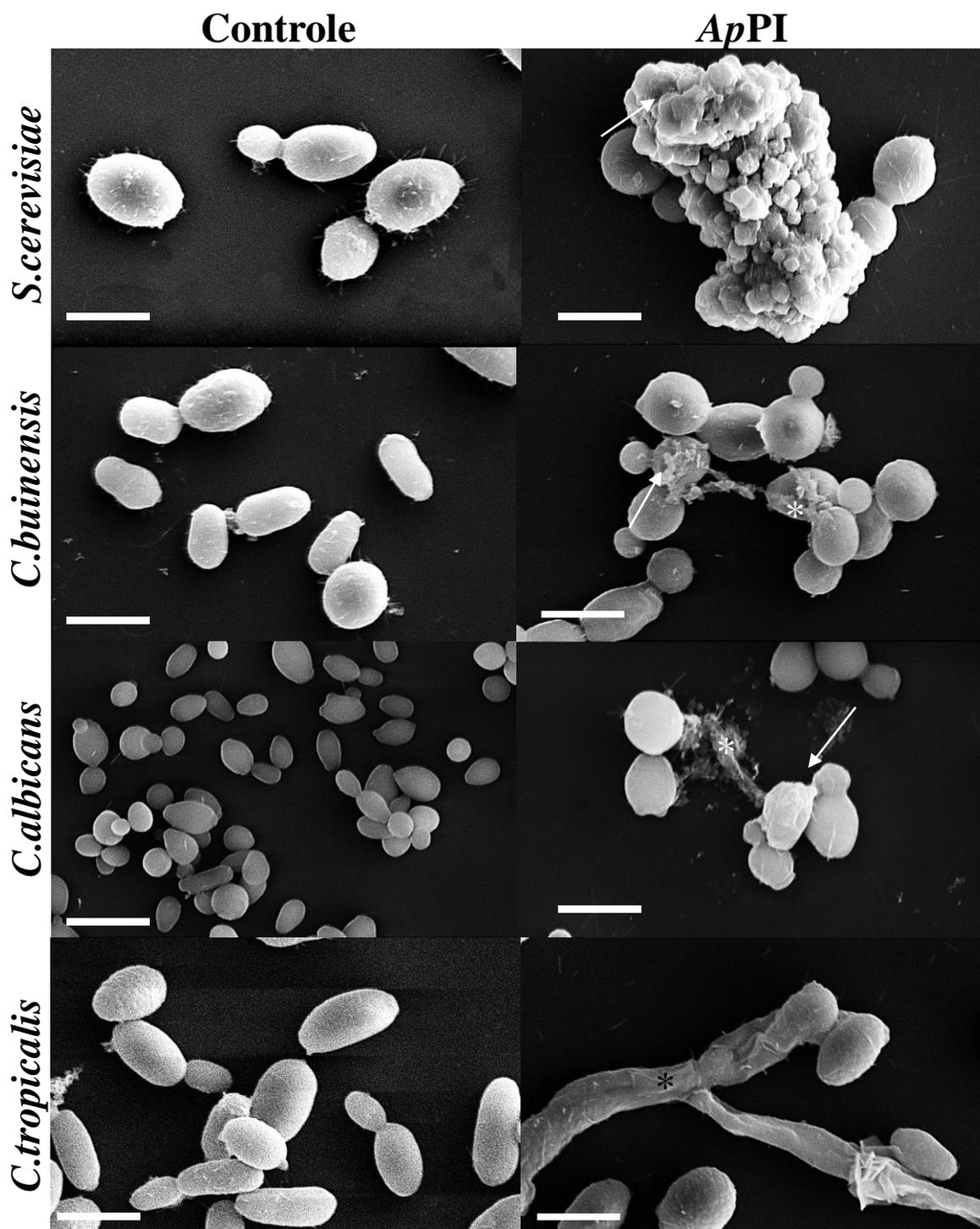


Figura 28: Alterações morfológicas em células de leveduras induzidas por ApPI. Imagem de MEV mostrando alterações em *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* na superfície celular após incubação com ApPI. Células de leveduras foram tratadas com MIC₁₀₀ por 12 h em relação ao controle (células não incubadas com o peptídeo). Setas brancas indicam debris celular, asteriscos brancos indicam perda de conteúdo citoplasmático e asterisco preto indica formação de pseudohifas e espessamento de parede. Barras: 2 μ m.

5.2.9 Análise das alterações ultraestruturais nas células de leveduras induzidas por ApPI

Devido ao efeito do ApPI em alterar a atividade mitocondrial (Figura 25) e indicar condensação de cromatina (Figura 26) nas leveduras testadas, decidimos verificar o comportamento de algumas organelas que pudessem corroborar com os resultados obtidos anteriormente. Logo, analisamos aspectos ultraestruturais de *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* por MET, após 12 h de incubação com o peptídeo na concentração da MIC₁₀₀ (Figura 29). O resultado mostrou que o núcleo das células tratadas, quando comparadas com as do controle, apresentou pontos de coloração mais escuros, os quais sugerem fortemente a condensação de cromatina. As mitocôndrias mostraram uma diminuição no tamanho e suas cristas não puderam ser visualizadas internamente. Além disso, observamos uma menor quantidade de mitocôndrias ativas em relação ao controle, o que corrobora com os ensaios obtidos de aumento de ROS e diminuição da funcionalidade mitocondrial. Também foi possível observar cicatriz de brotamento e alteração no espessamento da parede celular, bem como possível ruptura, o que estaria provocando a liberação do material citoplasmático, como foi observado nas imagens de MEV (Figura 28).

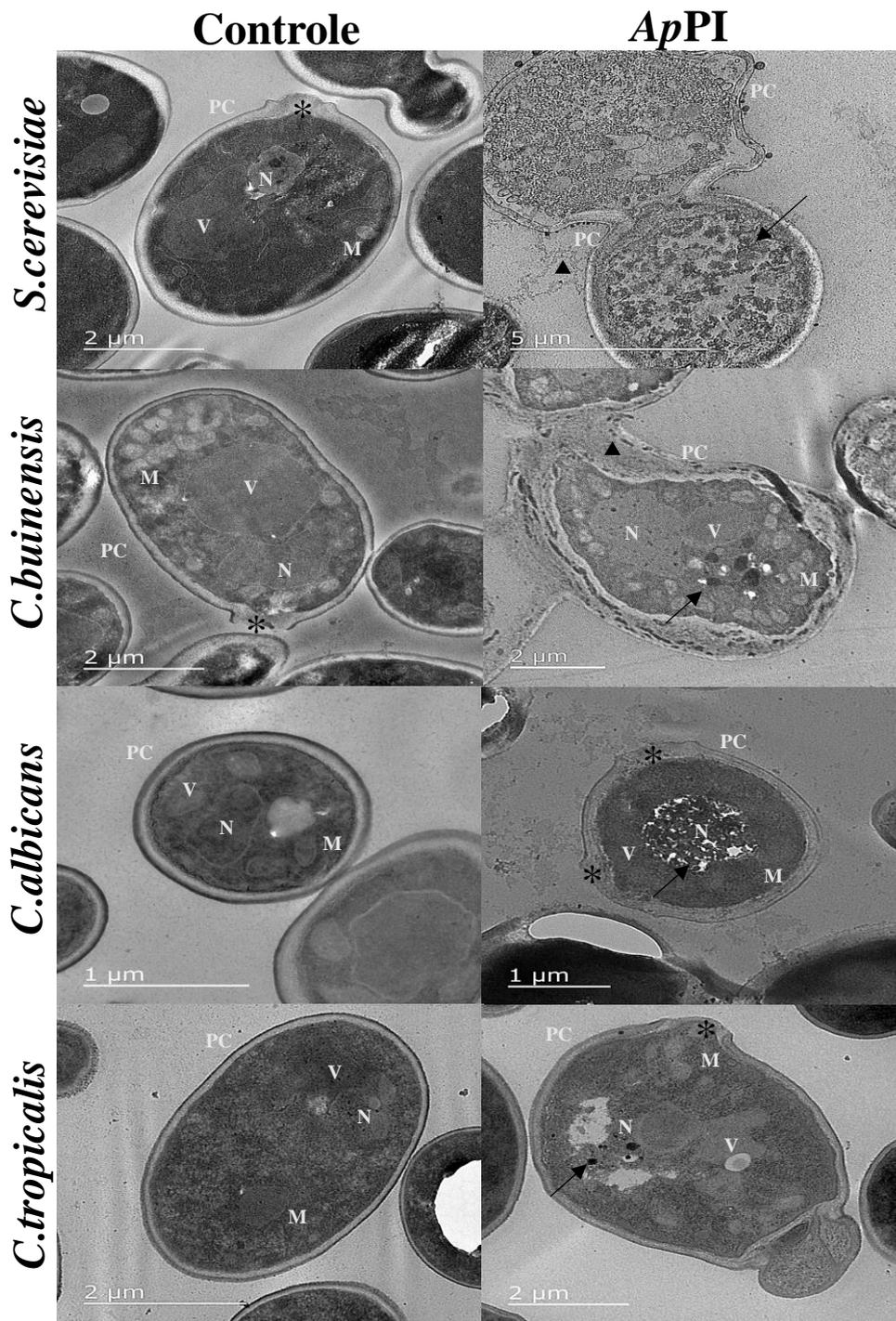


Figura 29: Imagem de MET mostrando alterações ultraestruturais nas células de leveduras induzidas por ApPI após 12 h. Células de leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* na presença ou ausência (controle) do peptídeo. Durante a exposição com ApPI, núcleos apresentam áreas de coloração escura, o que indica condensação de cromatina (setas), alteração do espessamento de parede (triângulo) e cicatriz de brotamento (asteriscos). PC = parede celular. M = mitocôndria. N = núcleo. V = vacúolo.

5.3 Avaliação da citotoxicidade, atividade imunomodulatória e antimicrobacteriana do peptídeo purificado

5.3.1 Avaliação da toxicidade de *ApPI* sobre macrófagos RAW 264.7

Com base nos resultados obtidos na Figura 30, podemos observar que o peptídeo *ApPI*, obtido por sementes de *A. pavonina* através da cromatografia de fase reversa e testado em uma linhagem celular de macrófago murino (RAW 264.7), demonstrou baixa toxicidade em todas as concentrações avaliadas no ensaio de citotoxicidade por MTT. Vale a pena destacar que, mesmo na maior concentração utilizada ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) nos ensaios antifúngicos e antimicrobacterianos, a toxicidade foi de apenas 33,81% para RAW 264.7, sendo $\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, na menor concentração utilizada nos experimentos ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o peptídeo é ainda menos tóxico, apresentando 12,65% de toxicidade para essa linhagem de macrófagos murino.

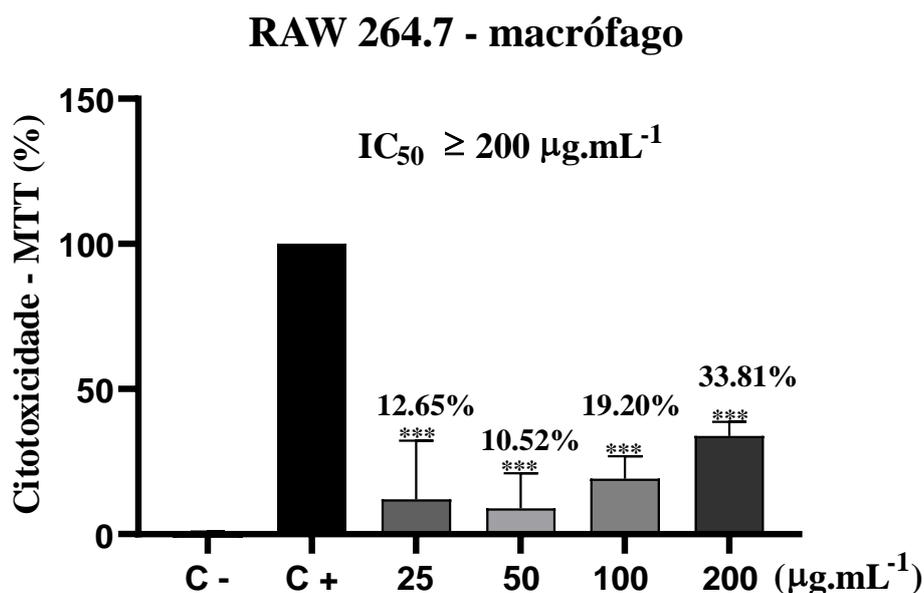


Figura 30: Toxicidade sobre células de macrófagos murinos RAW 264.7, após 24 h de tratamento com *ApPI*. Acima das barras é mostrada a porcentagem de citotoxicidade pelo método de MTT. IC_{50} – 50% para concentração citotóxica requerida para metade da redução da viabilidade celular, calculada por análise de regressão. (***) $p < 0.001$ comparado com o grupo não tratado e determinado por teste de Tukey.

5.3.2 Avaliação da *ApPI* quanto à inibição da produção de NO

Nesse estudo verificamos a atividade anti-inflamatória do inibidor bifuncional *ApPI*, quanto a capacidade de inibir a produção de NO em cultura de macrófagos estimulados com LPS, a partir da produção de nitrito, através de experimentos *in vitro* (Figura 31). Diante do contexto, foi possível observar que *ApPI* conseguiu inibir os níveis de NO em 37,89 e 84,77%, respectivamente, em suas maiores concentrações (100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e $\text{IC}_{50} = 111,6 \pm 0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, desmonstrando uma possível atividade anti-inflamatória.

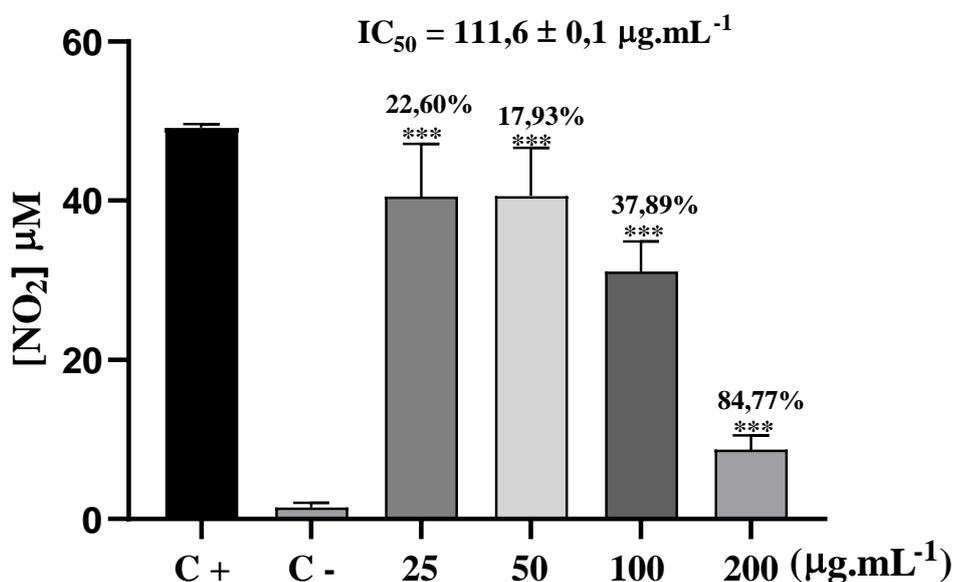
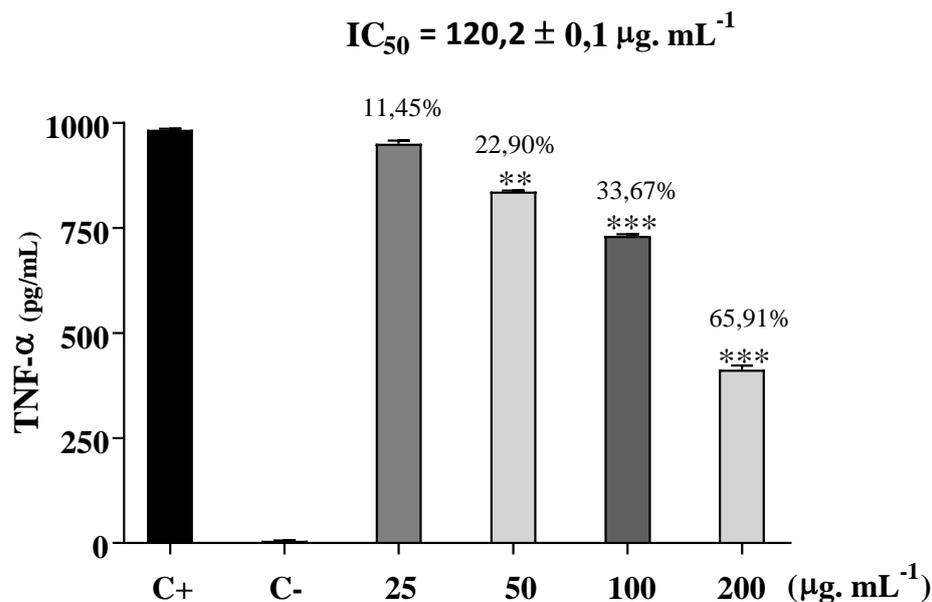


Figura 31: Avaliação da capacidade inibitória de *ApPI* à produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS [$1\mu\text{g.mL}^{-1}$] e tratados com *ApPI* nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 24 h o sobrenadante da cultura foi avaliado. A concentração de NO em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi obtida por uma curva padrão de nitrito e comparada aos controles positivos de produção de NO (macrófagos somente estimulados por LPS) e negativo (macrófagos não estimulados). Valores são reportados como média \pm desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com $p < 0,001$ (***) . Acima da barra mostra a porcentagem de inibição e na parte superior do gráfico encontra-se a concentração mínima inibitória 50% obtida nas atividades avaliadas. (n=3).

5.3.3 Avaliação da atividade inibitória de *ApPI* sob mediadores inflamatórios TNF- α e IL-1 β em macrófagos estimulados por LPS

Devido ao potencial do peptídeo purificado de inibir a produção de NO (Figura 31), decidimos investigar a capacidade de *ApPI* de inibir outros mediadores inflamatórios, como o TNF- α e IL-1 β (Figura 32 A e 32 B). Ao avaliar o potencial do inibidor de protease observou-se que ele apresentou capacidade inibitória significativa para TNF- α , sendo $MIC_{50} = 120,2 \pm 0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ademais, a capacidade de inibição de IL-1 β foi elevada para todas as concentrações testadas, apresentando $MIC_{50} = 30 \pm 0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 32B). O potencial de inibição verificado na maior concentração ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) não mostrou interferência do efeito citotóxico, pelo método do MTT, corroborando com a hipótese de que esse peptídeo teria uma atividade anti-inflamatória intrínseca e aplicações biotecnológicas relevantes.

A



B

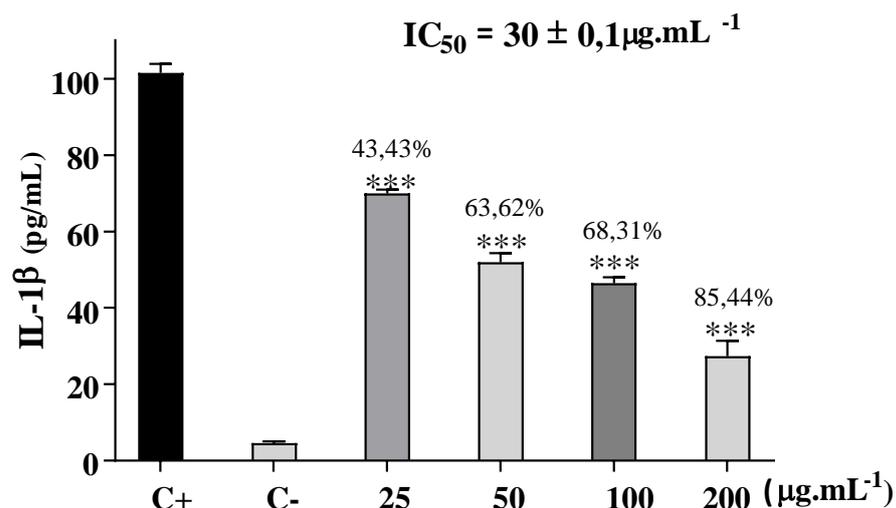
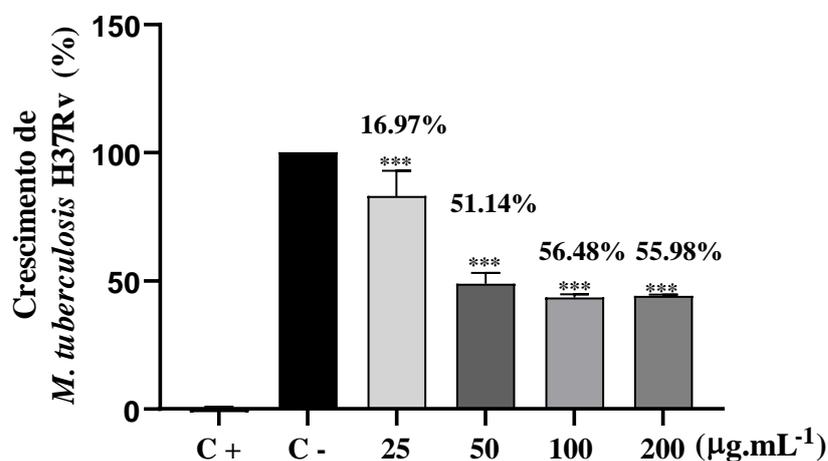


Figura 32: Efeito inibitório de ApPI na produção de TNF- α e IL-1 β em macrófagos estimulados por LPS. (A) Macrófagos RAW 264.7 e (B) Macrófagos J774A foram tratados com LPS na presença ou na ausência de amostra, (25 – 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$). A quantificação dos mediadores inflamatórios nos sobrenadantes de cultura foi realizado por ELISA sanduíche. As barras para cada derivado referem-se às concentrações testadas em ordem crescente. Macrófagos estimulados por LPS foram usados como controle positivo (C+) e macrófagos não tratados como controle negativo (C-). Os valores foram apresentados como média \pm desvio padrão e as diferenças estatísticas entre cada grupo e C+ foram indicadas de acordo com $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*).

5.3.4 Avaliação da atividade inibitória de ApPI sobre *M. tuberculosis* H37Rv e M299

Devido ao potencial inibitório presente na fração D1 contra as cepas de diferentes virulências de *M. tuberculosis*, decidimos verificar se o peptídeo biologicamente ativo e com massa molecular de 6 kDa purificado, seria capaz de inibir as linhagens H37Rv e M299 (Figura 33). Observou-se que para a cepa de menor virulência (H37Rv), ApPI inibiu respectivamente em 16,97, 51,14, 56,48 e 55,98% nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já para a cepa de maior virulência (M299), ApPI foi capaz de inibir em 25,83, 28,69, 28,82 e 38,84%, respectivamente nas mesmas concentrações.

A



B

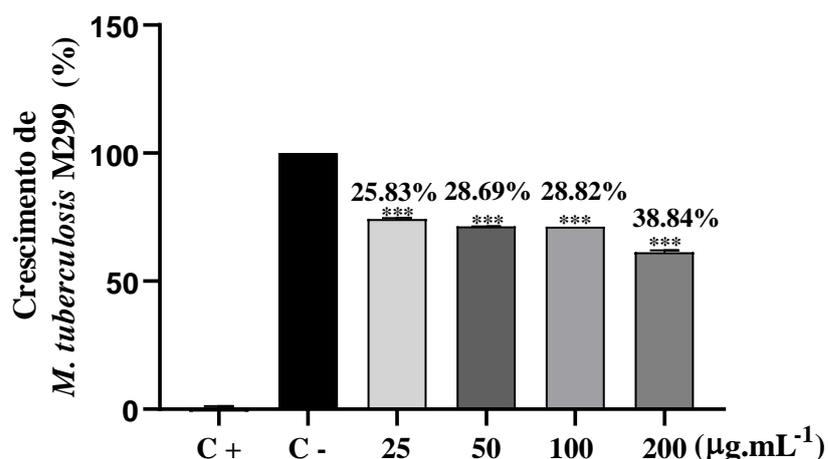


Figura 33: Atividade antimicobacteriana do inibidor de protease ApPI. (A) Ensaio de inibição do crescimento da cepa laboratorial *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv na presença de diferentes concentrações do peptídeo ApPI, obtido após cromatografia de fase reversa em

coluna C18. Acima das barras de teste são mostradas a porcentagem de inibição. Asteriscos indicam grau de significância, sendo $p < 0,001$. (B) Ensaio de inibição do crescimento do isolado clínico *M. tuberculosis* M299 na presença de ApPI, obtido após RP-HPLC-C18. Acima das barras de teste são mostradas a porcentagem de inibição. Asteriscos indicam grau de significância, sendo $p < 0,001$.

6. DISCUSSÃO

AMPs têm sido considerados uma fonte promissora de novos fármacos devidos às vantagens de apresentarem amplo espectro de atividade antimicrobiana, capacidade rápida de eliminação de micróbios, efeito microbicida em baixas concentrações e baixa probabilidade de induzir resistência. Além disso, eles são seguros para uso clínico devido à ausência ou baixa toxicidade em relação às células de mamíferos, e também possuem uma vantagem adicional de promoverem efeitos sinérgicos com fármacos convencionais, criando novas possibilidades terapêuticas (COSTA et al., 2019).

Nesse estudo decidimos desenvolver uma estratégia para extrair e isolar AMPs a partir de sementes de *A. pavonina*, tendo como base o trabalho realizado por RIBEIRO SOARES et al. (2012), com algumas modificações no processo de extração de proteínas. Além disso, essa tese se trata de um estudo biomonitorado no qual as frações obtidas foram correlacionadas com a atividade antimicrobiana. Entre as etapas comumente usadas na purificação de peptídeos e proteínas, a precipitação usando sais é regularmente explorada, pois tem as vantagens de ser econômica e de concentrar a amostra de interesse (BURGESS, 2009). O sulfato de amônio é frequentemente usado para precipitação por *salting out*, pois apresenta uma força iônica muito alta, na qual a solubilidade de proteínas diminui, ocorrendo a formação do precipitado (DUONG-LY; GABELLI, 2014). Assim, o sulfato de amônio pode ser usado para separar pequenas proteínas com base em sua solubilidade na presença de alta concentração de sal (WINGFIELD, 2016). Uma vez utilizado esse método, é necessário remover o sal da amostra e o método de diálise é uma opção em relação aos métodos cromatográficos (HARCUM, 2008). A precipitação por *salting out* é inserida como uma etapa inicial entre a centrifugação e a purificação inicial usando cromatografia (GRANT; LOUIS, 2016). Em nosso processo de extração, eliminamos a etapa de precipitação com sulfato de amônio e, conseqüentemente, eliminamos a etapa de diálise. Além disso, adicionamos uma etapa crítica de aquecimento para selecionar proteínas termorresistentes. Nesta etapa, também fizemos uma modificação, aumentando a temperatura de 80 °C por 15 min do método anterior (RIBEIRO SOARES et al., 2012) para 90 °C por 10 min. Com base nessas duas modificações, ganhamos tempo e recursos financeiros ao tornar o processo mais rápido e eficiente, pois enriquecemos o extrato com peptídeos e, ao mesmo tempo, eliminamos proteínas indesejáveis.

Essas modificações, principalmente a etapa de aquecimento, foram previstas porque os AMPs geralmente são termoestáveis devido ao seu tamanho pequeno e a presença de

resíduos de cisteína que se agregam formando pontes dissulfeto em pares (SRIVASTAVA et al., 2020). Comparado com outros métodos de extração e etapas iniciais de fracionamento do conteúdo proteico do extrato, nossos resultados, apoiados pela conhecida resistência térmica dos AMPs, representam uma estratégia rápida e eficiente que pode ser explorada para enriquecer a amostra com peptídeos, e com vantagem adicional de economizar o tempo necessário nas técnicas de precipitação e diálise.

Após confirmar a presença de peptídeos na FARP, avaliamos sua atividade antimicrobiana contra o patógeno oportunista *C. albicans*. Nossos resultados indicaram que, de modo geral, o efeito das proteínas e peptídeos que compõem a FARP contra *C. albicans* é fungicida, sendo que a dose de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, causou uma perda de viabilidade de 93,57% e a dose de 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ causou a perda de viabilidade de 100% (Figura 10 C e 10 D). Esse resultado foi interessante, porque o efeito fungicida é uma característica desejável para uma substância terapêutica, devido a estudos que demonstram que essa característica não favorece o desenvolvimento de cepas resistentes (LEWIS; GRAYBILL, 2008). Nessa perspectiva, avançamos ainda mais no processo de purificação dos peptídeos presentes na FARP, combinando técnicas cromatográficas. Mais uma vez, com base nas características gerais dos AMPs, desta vez a anfipaticidade e cationicidade, escolhemos como primeira etapa uma cromatografia de troca iônica e depois uma cromatografia de fase reversa (WALLS; WALKER, 2017; BOYSEN; HEARN, 2001). Os aminoácidos em proteínas são afetados pelo pH do meio (MALIK et al., 2016), portanto, ao alterar o pH da fase móvel, a proteína de interesse assume diferentes cargas líquidas na superfície (PABST et al., 2008) e pode se tornar não carregada ou opostamente carregada em relação ao grupo funcional da resina. No presente estudo, escolhemos usar o tampão Tris-HCl em sua capacidade de tamponamento no extremo mais distante, pH 9,0, a fim de modificar o ponto isoelétrico de proteínas e peptídeos que irão compor a fração não retida e diferenciar o pH 8,0 do método anterior (RIBEIRO SOARES et al., 2012) (Figura 11 A). O gel de tricina SDS-PAGE revelou que a fração não retida da cromatografia de troca iônica apresentava uma menor complexidade proteica em comparação com a fração retida (Figura 11 B). GAMES et al. (2008) revelaram que uma fração não retida do extrato de *Phaseolus vulgaris* (família Fabaceae), em uma cromatografia em DEAE-Sepharose era composta por uma única banda de proteína com massa molecular de aproximadamente 6 kDa, caracterizada como uma defensina de planta, denominada de PvD1, a qual revelou propriedades antifúngicas contra *Candida parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *Kluyveromyces marxianus* e fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium laterithium* e *Rizoctonia solani*.

Investigamos ainda o efeito antimicrobiano das frações D1 e D2 quanto a sua capacidade de inibição do crescimento de duas cepas com virulências diferentes de *M. tuberculosis* e, também, inibição do crescimento de *C. albicans*. Diversos estudos têm demonstrado o potencial de AMPs de plantas contra uma variedade de patógenos (TANG et al., 2018). Mais recentemente, DA SILVA GEBARA et al. (2020) identificaram duas defensinas, denominadas de *CaDef_{2.1}* e *CaDef_{2.2}*, presentes na Fração F2, obtida em HPLC, a partir de frutos de *Capsicum annuum* (família Solanaceae), os quais demonstraram atividade inibitória contra *C. albicans*, *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* M299. Curiosamente, a fração D1 desse estudo apresentou resultados promissores nas maiores concentrações testadas (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra o isolado clínico *M. tuberculosis* M299, sendo capaz de inibir 43,29% e 24,95% (Figura 12 A e 12 B), respectivamente, ao passo que no trabalho de DA SILVA GEBARA et al. (2020) demonstraram que a fração F2 inibiu aproximadamente 30% da cepa de maior virulência (M299) na maior concentração testada (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Essa diferença é especialmente relevante, uma vez que a fração F2 contém apenas duas defensinas que têm capacidade de atuar em sinergia entre si. Além disso, é importante ressaltar que as frações foram obtidas por diferentes métodos cromatográficos e pertencem a diferentes famílias de plantas, resultando na diferença da atividade inibitória observada.

Os ensaios de toxicidade são importantes na avaliação da segurança do desenvolvimento de um fármaco terapêutico, pois medem a capacidade de uma molécula causar danos ou morte às células hospedeiras (MCGREGOR, 2008). Portanto, as características estruturais necessárias para atividades antimicobacterianas ou candidicidas devem ser eficazes e não conferir atividade citotóxica às células hospedeiras (ABEDINZADEH; GAEINI; SARDARI, 2015). Com base nessa premissa, escolhemos a fração que apresentava menor toxicidade em células de mamífero para análises adicionais (Figura 13). A fração D1 foi selecionada e separada em dez frações após cromatografia de fase reversa em coluna C18, e dentre elas, a fração P4 apresentou maior atividade antifúngica contra *C. albicans* (Figura 14 A-D) e, portanto, foi selecionada para análises posteriores.

Determinar a sequência primária de uma proteína é um passo crucial para compreender sua estrutura e função (JISNA; JAYARAJ, 2021). O peptídeo de aproximadamente 6 kDa (Figura 16 A-C), que correspondia ao peptídeo biologicamente ativo da fração P4, foi submetido à identificação de aminoácidos por espectrometria de massas (resultado não demonstrado). A sequência resultante identificou aminoácidos com similaridade para PIs da família Solanaceae, não compatíveis com proteínas da espécie ou

família estudada. Além disso, os fragmentos dos peptídeos gerados diferem da massa do peptídeo bioativo e por esta razão, sua sequência não pôde ser deduzida.

Curiosamente, vários inibidores de proteases já foram identificados nas sementes de *A. pavonina*, cujas principais características estão listadas na Tabela 1. RICHARDSON et al. (1986) identificaram oito isoformas de inibidores de tripsina de *A. pavonina* e os caracterizaram como proteínas de aproximadamente 21 kDa. A isoforma DE5 foi caracterizada pelos autores como sendo composta por duas subunidades, uma maior com aproximadamente 16 kDa e uma menor com 5 kDa, ligadas por pontes dissulfeto. A comparação de sequência revelou clara similaridade com inibidores de proteases do tipo Kunitz (*ApKTI*) de aproximadamente 22 kDa em *A. pavonina*, que mostrou atividade inibitória contra proteases tripsina e papaína. DA SILVA et al. (2014) demonstraram o efeito inibitório de *ApTI* (inibidor de tripsina de *Adenantha pavonina*) para proteases do intestino médio e seu impacto no crescimento larval de *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar). Nosso inibidor tem aproximadamente 6 kDa, não inibe tripsina ou quimotripsina, mas inibe proteases serínicas de *S. cerevisiae* e *C. albicans*, inibe microrganismos (leveduras oportunistas, *S. cerevisiae* e *Mycobacterium tuberculosis*), inibe α -amilases e mantém atividade antifúngica após o aquecimento a 130 °C por 30 min (Figura 20). Portanto, com base nessas características distintivas, acreditamos que nosso peptídeo purificado, denominado *ApPI*, é um inibidor bifuncional proveniente das sementes de *A. pavonina*.

É importante destacar que de acordo com nossos resultados mostrados na Figura 17 A e Figura 17 B, as frações FARP, D1 e D2 obtidas de sementes de *A. pavonina* exibiram atividade inibitória específica contra tripsina e quimotripsina, corroborando com a existência de inibidores distintos nessa espécie (RICHARDSON et al., 1986; MACEDO et al., 2010); (KRISHNAN et al., 2022). Inesperadamente, o *ApPI* não foi capaz de inibir a atividade dessas enzimas, especialmente quimotripsina. Essa diferença na capacidade inibitória da quimotripsina é provavelmente devida ao teste ter sido realizado com 100 U e para a tripsina com 86 U. A incapacidade do *ApPI* de inibir tripsina e quimotripsina pode estar relacionada às condições às quais foi exposto durante a purificação na cromatografia de fase reversa, por exemplo, 1 h em 25% de propanol a 38 °C. Para testar essa hipótese, expusemos as frações das quais o *ApPI* foi purificado nas condições descritas. Assim, tratamos FARP, D1 e D2 sob as mesmas condições em que o *ApPI* é eluído na cromatografia de fase reversa e testamos novamente sua capacidade de inibir tripsina e quimotripsina. Os dados obtidos revelaram que todas as frações mantiveram atividade inibitória contra essas proteases serínicas nessas condições (Figura 17 C Figura 17 D). Esses resultados indicam uma baixa afinidade do *ApPI*

em relação à tripsina e quimotripsina (Figura 17 A e 17 B). Isso pode ser explicado pelo fato de que a especificidade e afinidade por uma enzima específica dependem de vários fatores, como a posição de seus grupos funcionais e sua interação com a enzima alvo (SRUTHI; PRAKASH, 2018; JOSHI et al., 2013). Corroborando com essa ideia, foi demonstrado que o ApTI apresenta diferentes afinidades por diferentes proteases (MACEDO et al., 2004) e, embora o ApPI não iniba as proteases tripsina e quimotripsina, ele foi capaz de inibir proteases séricas de *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Figura 18).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos inibidores de protease de *Adenantha pavonina*

Nome	Família de inibidores	Massa molecular (kDa)	Estrutura polipeptídica (cadeia)	Habilidade em inibir tripsina/papaina	Habilidade em inibir α -amilase	Tolerância térmica (Temperatura máxima°C)	Referência
ApPI	nd	6	simples	não/nd	sim	sim (130)	tese
nd	nd	24	nd	sim/nd	nd	não	Prabhu and. Pattabiraman, 1980
DE5	Kunitz	21	dupla	sim/nd	nd	nd	Richardson et al., 1986
ApTI	Kunitz	19	simples	sim/sim	nd	nd	Macedo et al., 2004 Macedo et al., 2010
nd	nd	14.1	simples	sim/nd	nd	sim (100)	Souza et al. 2016
ApKTI	Knitz	22	dupla	sim/sim	nd	nd	Migliolo et al., 2010
APPI-1	nd	7-8	nd	sim/nd	nd	sim (65)	Chandrashekharaiah et al. 2017
APPI-2	nd	11-12	nd	sim/nd	nd	sim (65)	Chandrashekharaiah et al. 2017
APPI-3	nd	13-14	nd	sim/nd	nd	sim (65)	Chandrashekharaiah et al. 2017
DE-52 A e B	Kunitz	15 e 17	nd	sim/nd	nd	não	Krishnan et al., 2022
DE-52 C e D	nd	17 e 19	nd	sim/nd	nd	não	Krishnan et al., 2022

nd – não detectado

Os ensaios antifúngicos realizados nesse trabalho mostraram que a fração P4 não possuiu atividade antifúngica significativa para a espécie *C. parapsilosis*, nas concentrações testadas (Figura 15 D). Sendo assim, decidimos testar a sensibilidade da levedura *C. tropicalis* para determinação da MIC₁₀₀ (Figura 26). Com base nos resultados obtidos, as leveduras *S. cerevisiae* e *C. buinensis* apresentaram maior sensibilidade a ApPI, o que resultou em uma

menor concentração inibitória mínima ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), ao passo que as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* exigiram maior concentração do peptídeo ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), para a inibição completa do crescimento das leveduras, sendo ApPI fungo-específica. Diante desse contexto, podemos observar que as diferentes espécies de leveduras podem ter papel relevante para o processo de inibição gerados por AMPs. EL-MOUNADI et al. (2016) revelaram que a concentração diferencial de esfingolípídeos nesses fungos, poderia explicar as diferentes formas de ação da defensina MtDef4 sobre *Neurospora crassa* e *Fusarium graminearum*. Além disso, o trabalho realizado por RAMAMOORTHY et al. (2007) demonstrou que a inibição dependia do esfingolípídeo glicosilceramida (GlcCer), e não a inibição causada pela MtDef4.

Com base nos ensaios antifúngicos, a exposição das leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* com a MIC₁₀₀ através de um plaqueamento nestas concentrações (ensaio de viabilidade), vimos que com $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram capazes de inibir a formação de colônias de *S. cerevisiae* e *C. buinensis*, respectivamente (considerada DL₁₀₀), ao passo que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não inibiram a formação de colônias (Figura 22). Esse resultado demonstra que o efeito fungicida observado na fração D1 (Figura 10 D e Figura 10 E) é proveniente da ação de outros peptídeos presentes nessas frações e que quando separados em P4 (Figura 14) e purificados em P4r1 (Figura 16) perdem essa propriedade. Adicionalmente, há outras frações obtidas em HPLC, como a P10, que merecem destaque devido à sua atividade anti-*Candida* (Figura 14 D), abrindo perspectivas futuras para novos estudos.

Após a determinação da viabilidade celular, passamos a estudar a caracterização dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na interação entre o peptídeo purificado e as leveduras, sendo a permeabilização de membrana o primeiro ensaio realizado. Este resultado mostrou que ApPI é capaz de permeabilizar membranas de *S. cerevisiae*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*, mostrando 78,74% , 58,96% e 80,78% de células permeabilizadas após 12 h, corroborando com diversos trabalhos que demonstram na ação de AMPs de interagir com as membranas plasmáticas (THEVISSSEN; TERRAS; BROEKAERT, 1999; MELLO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012). Recentemente, DA SILVA et al. (2021) identificaram dois inibidores bifuncionais PEF2 e PEF3, isolados de *Capsicum chinense*, capazes de permeabilizar membranas de *Fusarium solani*. Outro exemplo é o inibidor de protease IETI, isolado de semente de *Inga edulis*, o qual demonstrou atividade anti-*Candida*, alterando a permeabilidade da membrana e a viabilidade celular (DIB et al., 2019). É importante notar que a permeabilização de membrana e a inibição do crescimento de microrganismos não estão

necessariamente relacionados. Peptídeos capazes de induzir a permeabilização de membrana, podem não ser eficazes na inibição do crescimento fúngico e vice-versa (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012). Esse paradoxo pode explicar a ausência de permeabilização nas células de *C. albicans*, apesar da sua inibição (Figura 23).

Ainda nesse contexto, é amplamente aceito por muitos cientistas que o principal mecanismo de ação pelos quais os AMPs exercem sua ação contra os patógenos é na formação de poros transmembranares, causando vazamentos de íons e metabólitos, despolarização do potencial de membrana e comprometimento das células levando à morte celular (CORRÊA et al., 2019). Essas características foram observadas indiretamente pelas imagens de MEV nas células de *S. cerevisiae*, *C. buinensis* e *C. albicans* nas alterações morfológicas ocasionadas por ApPI no fenômeno de debris celulares (Figura 28).

Todavia, alguns microorganismos produzem respostas para a ação de AMPs, por exemplo, as bactérias, desenvolveram mecanismos de defesa que alteram a carga negativa de moléculas de superfície, como ácido teicóico ou lipopolissacarídeo, modificando também a fluidez da membrana para evitar a interação do peptídeo (PESCHEL, 2002), secretam proteases, ativam bombas de efluxo e formação de biofilmes (MORAVEJ et al., 2018). Nesse prisma, os fungos podem fortalecer suas paredes por meio do aumento de síntese de quitina e β -(1,3)- glucanos (PAEGE et al., 2019). Em nosso estudo sobre mecanismo de ação, observamos que a levedura *C. albicans* alterou o espessamento da parede celular (Figura 29) e *C. tropicalis* cresceu em formato de hifa (Figura 23, Figura 24, Figura 25 e Figura 28) quando tratada com ApPI. O desenvolvimento de hifas está relacionado com o processo de virulência que causa infecções fúngicas graves, e também, em respostas ao estresse, como privação de nitrogênio, mudanças de pH e temperatura (GANCEDO, 2001; CHEN et al., 2020). Um estudo realizado por CHEN et al., (2014) demonstraram que a calcineurina e o Crz1 de *C. tropicalis* são essenciais para o crescimento de hifas, tolerância à fármacos e a virulência em um modelo de infecção sistêmica *in vivo*, embora ela também seja responsável pela integridade da parede celular. Isso sugere que a ativação desta via pode interferir diretamente na atividade antifúngica desempenhada por ApPI para esta espécie de *Candida*.

Atualmente, existem consistentes evidências de que AMPs possuem mecanismos intracelulares adicionais e que são responsáveis pela morte celular do patógeno, junto com a permeabilização da membrana. Para que os peptídeos possam atuar em alvos intracelulares, é fundamental atravessar a membrana e se translocar para o citoplasma. Uma vez dentro do citoplasma, AMPs tendem a se concentrar e desencadear diversos processos, como alterações em vias metabólicas, inibição da síntese de proteínas, bem como inibição de ácidos nucleicos.

Isso leva à interrupção de processos que envolvem DNA e RNA, especialmente replicação, transcrição e tradução, processos cruciais para o crescimento e multiplicação celular. Além disso, os AMPs também podem inibir a atividade enzimática, interferindo principalmente na síntese da parede celular (SCOCCHI et al., 2015; BECHINGER; GORR, 2017; CASTILLO et al., 2018);

Nosso grupo através do trabalho de SOARES et al. (2017) propôs que a permeabilização de membranas é um evento indireto da interação de *ApDef1* – *S. cerevisiae* e que o efeito tóxico causado pelo peptídeo nas células ocorre via estresse oxidativo, devido ao acúmulo de ROS no interior da célula. Essas moléculas geralmente se mantêm em equilíbrio com antioxidantes dentro das células, e quando esse equilíbrio é perturbado, ocorre uma produção excessiva de ROS, resultando em danos ao DNA, oxidação de proteínas, carboidratos e lipídios, além de desencadear ativação de vias apoptóticas. Portanto, neste estudo, verificou-se se *ApPI* poderia aumentar a produção endógena de ROS, o que foi de fato observado em *S. cerevisiae* e *C. buinensis*, quando tratados com o peptídeo purificado (Figura 29). Acreditamos que a indução de ROS nessas células podem ocorrer como uma consequência do efeito primário da permeabilização de membrana e, em conjunto, esses danos celulares podem ser responsáveis pela atividade fungicida. Em contrapartida, o estresse oxidativo demonstrou ser responsável pela atividade antifúngica de *C. albicans* e *C. tropicalis* nas condições testadas.

Diversos AMPs de plantas também têm a capacidade de aumentar os níveis de ROS nas células fúngicas. A tionina *CaThi*, isolada de frutos *C. annuum*, demonstrou induzir um aumento de ROS em *C. tropicalis* (TAVEIRA et al., 2016). Para a família dos inibidores de protease em específico, (RESENDE et al., 2023) demonstraram que a fração G3 de aproximadamente 6.5 kDa induziu o aumento de ROS em *F. oxysporum*. DA SILVA et al. (2023) identificaram que o inibidor PEF3 induziu aumento de ROS em *Colletotrichum lindemuthianum* e *F. oxysporum*.

Nos organismos eucarióticos, as mitocôndrias desempenham um papel fundamental no estresse oxidativo, na formação do radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, subprodutos do metabolismo da cadeia transportadora de elétrons. Sendo assim, avaliamos a dissipação do potencial de membrana pelo corante Mitotracker red após 12 h de exposição ao peptídeo purificado, e foi possível observar que a fluorescência emitida por *S. cerevisiae*, *C. buinensis* e *C. albicans* diminuiu em relação ao controle, quando tratadas com *ApPI*, demonstrando que esse inibidor de protease acarreta colapso de potencial de membrana mitocondrial. (Figura 25). Em consonância com esse ensaio, o resultado obtido por MET

redução do tamanho na mitocôndria e diminuição do seu número nas leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis* e *C. albicans*, confirmando os achados experimentais acima e sugerindo que as mitocôndrias podem ser um alvo direto de degradação desse peptídeo e ativar uma via de indução de apoptose em leveduras.

Em organismos superiores, a condensação e a fragmentação do DNA cromossômico frequentemente estão associadas à morte celular programada em estágio tardio (MADEO; FRÖHLICH; FRÖHLICH, 1997); (RIBEIRO; CÔRTE-REAL; JOHANSSON, 2006) e caspases são proteases aspartato específicas contendo resíduos de cisteínas em seu sítio ativo e fazem parte da rede de sinalização apoptótica (ROCHA et al., 2017). Neste estudo, além da demonstração do acúmulo de ROS, ApPI foi capaz de induzir esses marcadores de células apoptóticas. Após o tratamento com o peptídeo, o núcleo das células apresentava uma intensa e concentrada fluorescência, indicando condensação de cromatina, exceto em *C. tropicalis* (Figura 26), o que também foi confirmado por MET (Figura 29). Paralelamente, observamos que ApPI aumentou o nível de caspases nas leveduras *S. cerevisiae* e *C. buinensis* (Figura 27), ao passo que para *C. tropicalis* o peptídeo não exerceu suas propriedades antifúngicas por indução de apoptose e para *C. albicans*, indica que a via de morte celular pode ter sido ativada e avaliada tardiamente, conforme visto no ensaio feito por DAPI e MET ou ativada por uma via de caspase independente. No caso da tionina CaThi, foi demonstrado que este AMP causa colapso do potencial de membrana mitocondrial e também aumenta a atividade de caspase em *C. tropicalis* (TAVEIRA et al., 2018). Outros AMPs, derivados sintéticos da defensina isolada de *V. unguiculata* (VuDef) apresentaram um padrão de ação semelhante na ativação de caspases, diferindo na dissipação do potencial de membrana mitocondrial que teve a fluorescência aumentada nas primeiras horas de morte celular, em relação ao controle. (LUCAS et al., 2023).

Os inibidores de proteases serínicas são moléculas que possuem propriedades imunomoduladoras importantes e com grande potencial biotecnológico, os quais possibilitam a prospecção de novos fármacos (XU; HUANG, 2020). Essa família de AMPs ganhou destaque no cenário da COVID-19 por atuar em desordens inflamatórias intrínsecas (EL AMRI, 2021). De maneira análoga, decidimos testar se o nosso inibidor ApPI possui toxicidade para células de mamíferos, bem como a capacidade de inibir mediadores inflamatórios, como NO, TNF- α e IL-1 β . Em consonância com os achados bibliográficos, o peptídeo não demonstrou toxicidade para células de RAW 264.7 nas concentrações testadas, sendo IC₅₀ > 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mesmo na maior concentração utilizada para os ensaios biológicos e determinação do mecanismo de ação (Figura 30). Ademais, podemos perceber que o

peptídeo purificado apresentou propriedades anti-inflamatórias importantes nas linhagens celulares RAW 264.7 e J774A estimuladas por LPS (Figura 31 e Figura 32).

Sabe-se que os AMPs em geral possuem habilidade de neutralizar diretamente o LPS, impedindo o seu reconhecimento pelas células do sistema imunológico e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tendo um papel crucial na resposta ao processo infeccioso. Recentemente, (RAJEGOWDA; HONNAGIRIGOWDA, 2023) caracterizaram e purificaram um inibidor de protease serínico com aproximadamente 25 kDa (CsTI), obtido de sementes de *Cassia siamea* (Fabaceae), sendo capaz de inibir IL-6, TNF- α , nitrito e elastase, confirmando a presença das mesmas propriedades dos inibidores de diferentes massas moleculares.

Diante desse mosaico analítico, podemos observar o ineditismo das atividades biológicas de um novo inibidor de protease bifuncional com massa molecular de 6 kDa, obtida de sementes de *Adenantha pavonina* (Fabaceae) com múltiplas atividades inibitórias antimicrobianas, antiproteolíticas e anti-inflamatórias *in vitro*, bem como baixa citotoxicidade para células de mamíferos. Esses resultados servirão de modelo para a clonagem e *design* de peptídeos sintéticos, após a sua caracterização molecular, a partir do sequenciamento primário de proteínas obtido, visando melhorar a atividade biológica, embora ApPI tenha se mostrado um possível candidato a fármaco para o controle de infecções causadas por fungos e micobactérias.

7. CONCLUSÕES

As análises realizadas no desenvolvimento do trabalho permitem concluir que:

- A metodologia de extração padronizada foi eficiente no processo de concentração de proteínas de baixo peso molecular para sementes de *A. pavanina* L, com massa molecular variando de 6-26 kDa;
- A fração FARP foi capaz de inibir a levedura *C. albicans* em 97.69 % e 99.10% nas concentrações testadas;
- A fração FARP apresentou características fungicidas, ocasionando 100% de perda de viabilidade celular na maior concentração testada;
- As frações D1 e D2 apresentaram atividade contra *C. albicans* e para duas cepas de *M. tuberculosis* com diferentes tipos de virulência;
- A fração D1 foi selecionada para purificação em HPLC, devido ao menor número de bandas proteicas, melhor potencial antifúngico e antimicobacteriano, bem como menor citotoxicidade para células de mamíferos;
- A fração D1 foi subdividida em 10 frações em HPLC (P1-P10), sendo a fração P4 a que apresentou melhor atividade para *C. albicans* com duas bandas de baixo peso molecular (6 e 14 kDa);
- A fração P4 foi recromatografada em duas frações, sendo a fração P4r1 (6 kDa) biologicamente ativa;
- A sequência de aminoácidos da fração P4r1 apresentou similaridade com inibidores de protease da família Solanacea;
- A fração P4r1 foi capaz de inibir extratos de leveduras contendo proteases serínicas;
- A fração P4r1, denominada de ApPI, foi capaz de inibir a enzima α -amilase salivar humana e do intestino das larvas do inseto *T. molitor*, sendo um inibidor bifuncional;
- O ApPI demonstrou estabilidade à alta temperatura (130 °C), mantendo atividade biológica contra *C. albicans*;
- O ApPI apresentou atividade antifúngica sobre as leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, sendo dose dependente.
- O ApPI foi capaz de causar permeabilização de membranas das leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*;
- O ApPI causou alterações estruturais e morfológicas nas leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis*;

- O tratamento com ApPI induz o aumento da produção de ROS pelas células de *S. cerevisiae* e *C. buinensis* respectivamente;
- O ApPI causou um colapso no potencial de membrana mitocondrial nas leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis* e *C. albicans*;
- O ApPI induz a condensação de cromatina nas células de leveduras, exceto em *C. tropicalis*;
- O ApPI induz alterações ultraestruturais no núcleo, mitocôndria e na parede celular das leveduras *S. cerevisiae*, *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis*;
- A exposição das células de *S. cerevisiae* e *C. buinensis* ao ApPI resulta na ativação de caspases;
- O ApPI causa morte por apoptose nas células de *S. cerevisiae*, *C. buinensis* e *C. albicans*;
- O ApPI apresentou baixa citotoxicidade para células de mamíferos (RAW 264.7), sendo $IC_{50} > 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$;
- O ApPI apresentou propriedades anti-inflamatórias ao inibir NO, TNF- α e IL-1 β ;
- O ApPI demonstrou atividade antimicobacteriana para Mtb H37Rv e M299;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDINZADEH, M.; GAEINI, M.; SARDARI, S. Natural antimicrobial peptides against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1285–1289, maio 2015.

ADHIKARI, B. et al. Potential roles of medicinal plants for the treatment of viral diseases focusing on COVID -19: A review. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1298–1312, mar. 2021.

AGIZZIO, A. P. et al. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 416, n. 2, p. 188–195, ago. 2003.

AGIZZIO, A. P. et al. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, v. 171, n. 4, p. 515–522, out. 2006.

AMALA, S. E.; HANSON, A.; WOKEM, G. N. Candida Co-Infection with Mycobacterium tuberculosis in Tuberculosis Patients and Antifungal Susceptibility of the Isolates Susceptibility of the Isolates. **Journal of Tuberculosis Research**, v. 08, n. 02, p. 53–65, 2020.

ARA, A. et al. Anti-inflammatory activity of *Adenanthera pavonina* L., Fabaceae, in experimental animals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 929–932, dez. 2010.

ARDIANI, A.; HIGGINS, J. P.; HODGE, J. W. Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 8, p. 1060–1069, dez. 2010.

ARENDRUP, M. C. et al. Diagnostic Issues, Clinical Characteristics, and Outcomes for Patients with Fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3300–3308, set. 2011.

ARRANZ-TRULLÉN, J. et al. Host Antimicrobial Peptides: The Promise of New Treatment Strategies against Tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–17, nov. 2017.

BANERJEE, S.; DENNING, D.; CHAKRABARTI, A. One Health aspects priority roadmap for fungal diseases : A mini-review. **Indian Journal of Medical Research**, v. 153, n. 3, p. 311-319, mar. 2021.

BARD, G. C. V. et al. Purification, biochemical characterization, and antimicrobial activity of a new lipid transfer protein from *Coffea canephora* seeds. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1-16, out. 2016.

BARR, M. M. Super models. **Physiological Genomics**, v. 13, n. 1, p. 15–24, mar. 2003.

BÁRTOVÁ, V.; BÁRTA, J.; JAROŠOVÁ, M. Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 14, p. 5533–5547, jul. 2019.

- BECHINGER, B.; GORR, S.-U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 3, p. 254–260, mar. 2017.
- BENKO-ISEPPON, A. M. et al. Overview on Plant Antimicrobial Peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 11, n. 3, p. 181–188, mai. 2010.
- BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 12, p. 918–931, 1 dez. 2002.
- BHATT, B. et al. Pre-existing mycobacterial infection modulates *Candida albicans* -driven pyroptosis. **The FEBS Journal**, v. 289, n. 6, p. 1536–1551, 9 mar. 2022.
- BIDOU, L.; ROUSSET, J.-P.; NAMY, O. Translational errors: from yeast to new therapeutic targets. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 8, p. 1070–1082, dez. 2010.
- BOLOTIN-FUKUHARA, M.; DUMAS, B.; GAILLARDIN, C. Yeasts as a model for human diseases. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 8, p. 959–960, dez. 2010.
- BOYSEN, R. I.; HEARN, M. T. W. HPLC of Peptides and Proteins. **Current Protocols in Protein Science**, v. 23, n. 1, 15 mar. 2001.
- BROEKAERT, W. F. et al. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, n. 1–2, p. 55–59, 1 maio 1990.
- BROEKAERT, W. F. et al. Critical Reviews in Plant Sciences Antimicrobial Peptides from Plants Antimicrobial Peptides from Plants. **Critical Review in Plant Sciences**, v. 16, n. 3, p. 297–323, 1997.
- BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 19 dez. 2012.
- BURGESS, R. R. **Protein Precipitation Techniques**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 463
- CAMPOS, M. L. et al. A structural perspective of plant antimicrobial peptides. **Biochemical Journal**, v. 475, n. 21, p. 3359–3375, 15 nov. 2018.
- CARBONARO, M.; NUCARA, A. Legume Proteins and Peptides as Compounds in Nutraceuticals: A Structural Basis for Dietary Health Effects. **Nutrients**, v. 14, n. 6, p. 1188, 11 mar. 2022.
- CARRILLO-MUÑOZ, A. J. et al. Combination antifungal therapy: A strategy for the management of invasive fungal infections. **Revista española de quimioterapia**, v. 27, n. 3, p. 141–158, 2014.
- CARVALHO, A. O. et al. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 137–146, fev. 2001.
- CASTILLO, J. I. et al. Antimicrobial synergy between mRNA targeted peptide nucleic acid and antibiotics in *E. coli*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 18, p. 3094–3098, out. 2018.
- CHAKRABARTI, A.; SOOD, P. On the emergence, spread and resistance of *Candida auris*: host, pathogen and environmental tipping points. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 3, 1 mar. 2021.

CHEN, H. et al. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 337–348, 31 dez. 2020.

CHEN, Y.-L. et al. Calcineurin Controls Hyphal Growth, Virulence, and Drug Tolerance of *Candida tropicalis*. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 7, p. 844–854, jul. 2014.

CLEMENTE, M. et al. Plant Serine Protease Inhibitors: Biotechnology Application in Agriculture and Molecular Farming. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1345, 17 mar. 2019.

CORDES, J. et al. The skin's own antibiotics. Important features of antimicrobial peptides for clinical practice. **Hautarzt**, v. 65, n. 1, p. 50–55, 19 jan. 2014.

CORRÊA, J. A. F. et al. Fundamentals on the Molecular Mechanism of Action of Antimicrobial Peptides. **SSRN Electronic Journal**, 2019.

COSTA, F. et al. Clinical application of AMPs. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1117, p. 281–298, 2019.

COTABARREN, J. et al. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, v. 292, p. 110398, mar. 2020.

DA SILVA, D. S. et al. Short and long-term antinutritional effect of the trypsin inhibitor ApTI for biological control of sugarcane borer. **Journal of Insect Physiology**, v. 61, p. 1–7, fev. 2014.

DA SILVA, F. C. V. et al. Recombinant production and α -amylase inhibitory activity of the lipid transfer protein from *Vigna unguiculata* (L. Walp.) seeds. **Process Biochemistry**, v. 65, p. 205–212, fev. 2018.

DA SILVA GEBARA, R. et al. Identification and Characterization of Two Defensins from *Capsicum annuum* Fruits that Exhibit Antimicrobial Activity. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 3, p. 1253–1265, 2020.

DA SILVA, M. S. et al. Bifunctional Inhibitors from *Capsicum chinense* Seeds with Antimicrobial Activity and Specific Mechanism of Action Against Phytopathogenic Fungi. **Protein & Peptide Letters**, v. 28, n. 2, p. 149–163, 22 mar. 2021.

DA SILVA, M. S. et al. Trypsin/ α -Amylase Inhibitors from *Capsicum chinense* Seeds: Characterization and Antifungal Activity against Fungi of Agronomic Importance. **Protein & Peptide Letters**, v. 30, n. 3, p. 260–274, mar. 2023.

DADAR, M. et al. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 128–138, abr. 2018.

DANESHVAR, P. et al. COVID-19 and tuberculosis coinfection: An overview of case reports/case series and meta-analysis of prevalence studies. **Heliyon**, v. 9, n. 2, p. 1–14, fev. 2023.

DIAS, G. B. et al. Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. seeds. **Protein Journal**, v. 32, n. 1, p. 15–26, 2013.

DIB, H. X. et al. Biochemical characterization of a Kunitz inhibitor from *Inga edulis* seeds with antifungal activity against *Candida* spp. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 2, p. 223–233, 27 mar. 2019.

DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. **Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 541

EL-MOUNADI, K. et al. Antifungal mechanisms of a plant defensin MtDef4 are not conserved between the ascomycete fungi *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum*. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 542–559, maio 2016.

EL AMRI, C. Serine Protease Inhibitors to Treat Lung Inflammatory Diseases. In: [s.l.: s.n.]. p. 215–226, mai. 2021.

ERDEM BÜYÜKKIRAZ, M.; KESMEN, Z. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 3, p. 1573–1596, 1 mar. 2022.

ESCANDÓN, M. et al. Identification of Proteases and Protease Inhibitors in Seeds of the Recalcitrant Forest Tree Species *Quercus ilex*. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 27 jun. 2022.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25–64, 28 jan. 2014.

FARADY, C. J.; CRAIK, C. S. Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. **ChemBioChem**, v. 11, n. 17, p. 2341–2346, 22 nov. 2010.

FELICIOLI, R. et al. Activity staining of protein inhibitors of proteases on gelatin containing polyacrylamide gel electrophoresis. **Anal Biochem**, v. 244, p. 176–178, 1997.

FRANCISCO GARCIA-OLMEDO ET AL. Plant Defense Peptides. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 47, p. 479–491, 1998.

FU, Y. et al. Expression of the *Candida albicans* Gene ALS1 in *Saccharomyces cerevisiae* Induces Adherence to Endothelial and Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1783–1786, abr. 1998.

GAMES, P. D. et al. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, v. 29, n. 12, p. 2090–2100, dez. 2008.

GANCEDO, J. M. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 107–123, jan. 2001.

GAUR, N. K.; KLOTZ, S. A. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 12, p. 5289–5294, dez. 1997.

GHOSH, C. et al. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 323–338, abr. 2019.

GILES, C. et al. The importance of fungal pathogens and antifungal coatings in medical device infections. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 264–280, jan. 2018.

- GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546–567, 25 out. 1996.
- GRANT, G. A.; LOUIS, S. Isolation/Purification of Proteins. **Encyclopedia of Cell Biology**, v. 1, p. 66–74, 2016.
- HARCUM, S. **Purification of protein solutions**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2008.
- HIETER, P. The yeast genome and clinical genetics. **Clinical Genetics**, v. 54, n. 2, p. 113–116, 28 jun. 2008.
- HONNENAHALLI RAJEGOWDA, S.; ATHAHALLI HONNAGIRIGOWDA, S. R. In-vitro anti-inflammatory activity of serine protease inhibitor from *Cassia siamea* and *Dolichos biflorus* : A comparative study. **Cell Biochemistry and Function**, v. 41, n. 1, p. 33–44, 17 jan. 2023.
- JAROMIN, A.; KORYCIŃSKA, M.; KOZUBEK, A. Coralwood (*Adenanthera pavonina* L.) Seeds and Their Protective Effect. In: **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 389–394.
- JISNA, V. A.; JAYARAJ, P. B. Protein Structure Prediction: Conventional and Deep Learning Perspectives. **The Protein Journal**, v. 40, n. 4, p. 522–544, 28 ago. 2021.
- JOSHI, R. S. et al. Complementation of intramolecular interactions for structural–functional stability of plant serine proteinase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 11, p. 5087–5094, nov. 2013.
- KANG, H.-K. et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–12, 30 jan. 2017.
- KATO, H. et al. Prevalence of, and risk factors for, hematogenous fungal endophthalmitis in patients with Candida bloodstream infection. **Infection**, v. 46, n. 5, p. 635–640, 29 out. 2018.
- KHAWBUNG, J. L.; NATH, D.; CHAKRABORTY, S. Drug resistant Tuberculosis: A review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 74, p. 1–9, fev. 2021.
- KIM, J.-Y. et al. Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 6, p. 2860–2872, 23 jun. 2009.
- KRISHNAN, H. B. et al. *Adenanthera pavonina*, a potential plant-based protein resource: Seed protein composition and immunohistochemical localization of trypsin inhibitors. **Food Chemistry: X**, v. 13, p. 100253, mar. 2022.
- KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, 2018.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.
- LE, C.-F.; FANG, C.-M.; SEKARAN, S. D. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, abr. 2017.
- LEWIS, J. S.; GRAYBILL, J. R. Fungicidal versus Fungistatic: what’s in a word? **Expert**

Opinion on Pharmacotherapy, v. 9, n. 6, p. 927–935, abr. 2008.

LI, J. et al. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. **Botanical Studies**, v. 62, n. 1, p. 1–5, 29 abr. 2021.

LIU, D. et al. Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, p. 132–137, abr. 2013.

LUCAS, D. R. et al. Bioinspired peptides induce different cell death mechanisms against opportunistic yeasts. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 20 abr. 2023.

M.L. KAKADE, J.J RACKIS, J.E. MCGHEE, AND G. P. Determination of Trypsin Inhibitor Activity of Soy Products: A Collaborative Analysis of an Improved Procedure. **American Association of cereal Chemists**, v. 51, p. 376–382, 1974.

MACEDO, M. L. R. et al. A Kunitz-Type Inhibitor of Coleopteran Proteases, Isolated from *Adenanthera pavonina* L. Seeds and Its Effect on *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2533–2540, 1 maio 2004.

MACEDO, M. L. R. et al. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1104–1111, abr. 2007.

MACEDO, M. L. R. et al. *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, p. 213–231, 2010.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K.-U. A Yeast Mutant Showing Diagnostic Markers of Early and Late Apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 3, p. 729–734, 3 nov. 1997.

MALIK, E. et al. pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 4, p. 67, 1 nov. 2016.

MASHABELA, G. T.; DE WET, T. J.; WARNER, D. F. *Mycobacterium tuberculosis* Metabolism. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, 19 jul. 2019.

MCCARTY, T. P.; WHITE, C. M.; PAPPAS, P. G. Candidemia and Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 389–413, jun. 2021.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, 6 abr. 2018.

MCGREGOR, D. Discovering and improving novel peptide therapeutics. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 616–619, out. 2008.

MELLO, E. O. et al. Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. **Current Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1209–1217, 2011.

MOODLEY, S. et al. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay is a rapid, cheap, screening test for the in vitro anti-tuberculous activity of chalcones. **Journal of Microbiological Methods**, v. 104, p. 72–78, set. 2014.

MORAVEJ, H. et al. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance

- Mechanisms in Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 747–767, jul. 2018.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- MURRI, R. et al. Systematic clinical management of patients with candidemia improves survival. **Journal of Infection**, v. 77, n. 2, p. 145–150, ago. 2018.
- NIELSEN, J. Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 9, p. 1800421, 20 set. 2019.
- PABST, T. M. et al. Separation of protein charge variants with induced pH gradients using anion exchange chromatographic columns. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 5, p. 1096–1106, set. 2008.
- PAEGE, N. et al. Species-Specific Differences in the Susceptibility of Fungi to the Antifungal Protein AFP Depend on C-3 Saturation of Glycosylceramides. **mSphere**, v. 4, n. 6, 18 dez. 2019.
- PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, dez. 2017.
- PESCHEL, A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 179–186, abr. 2002.
- PFALZGRAFF, A.; BRANDENBURG, K.; WEINDL, G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–23, 28 mar. 2018.
- R. CECI, L. Editorial [Hot Topic: Plant Protease Inhibitors, a Panoply of Enzymes for Plant Defense, and Not Only (Guest Editor: Luigi R. Ceci)]. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 339–340, 1 ago. 2011.
- RAMALHO, S. R. et al. Novel Peptidase Kunitz Inhibitor from *Platygodium elegans* Seeds Is Active against *Spodoptera frugiperda* Larvae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 6, p. 1349–1358, 14 fev. 2018.
- RAMAMOORTHY, V. et al. Glucosylceramide synthase is essential for alfalfa defensin-mediated growth inhibition but not for pathogenicity of *Fusarium graminearum*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 771–786, nov. 2007.
- RESENDE, L. M. et al. Inhibition of Serine Protease, α -Amylase and Growth of Phytopathogenic Fungi by Antimicrobial Peptides from *Capsicum chinense* Fruits. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 3, p. 502–515, 20 jun. 2023.
- RESNICK, M. A.; COX, B. S. Yeast as an honorary mammal. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 451, n. 1–2, p. 1–11, jun. 2000.
- RIBEIRO, G. F.; CÔRTE-REAL, M.; JOHANSSON, B. Characterization of DNA Damage in Yeast Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide, Acetic Acid, and Hyperosmotic Shock. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 10, p. 4584–4591, out. 2006.

RIBEIRO, S. F. F. et al. *Capsicum annuum* L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 657–670, 2012.

RIBEIRO SOARES, J. et al. Antimicrobial Peptides from *Adenanthera pavonina* L. Seeds: Characterization and Antifungal Activity. **Protein & Peptide Letters**, v. 19, n. 5, p. 520–529, 1 abr. 2012.

RICHARDSON, M. et al. The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian Carolina tree (*Adenanthera pavonina* L.). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 872, n. 1–2, p. 134–140, jul. 1986.

ROCHA, G. L. et al. Programmed Cell Death-Related Proteases in Plants. In: **Enzyme Inhibitors and Activators**. [s.l.] InTech, 2017.

RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 2, p. e0007964, 20 fev. 2020.

RODRÍGUEZ-CASTAÑO, G. P. et al. Antimicrobial Peptides: Avant-Garde Antifungal Agents to Fight against Medically Important Candida Species. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, p. 789, 27 fev. 2023.

RODRÍGUEZ-SIFUENTES, L. et al. Legumes Protease Inhibitors as Biopesticides and Their Defense Mechanisms against Biotic Factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3322, 8 maio 2020.

RONČEVIĆ, T.; PUIZINA, J.; TOSSI, A. Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5713, 14 nov. 2019.

SALVAUDON, L.; HÉRAUDET, V.; SHYKOFF, J. A. Parasite-Host Fitness Trade-Offs Change With Parasite Identity: Genotype-Specific Interactions in a Plant-Pathogen System. **Evolution**, v. 59, n. 12, p. 2518, 2005.

SCOCCHI, M. et al. Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 76–88, 16 set. 2015.

SENOK, A. et al. Coinfections in Patients Hospitalized with COVID-19: A Descriptive Study from the United Arab Emirates. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 14, p. 2289–2296, jun. 2021.

SHERMAN, F. Getting started with yeast. Em: **Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology - Part B**. [s.l.] Elsevier, 2002. p. 3–41.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, out. 1985.

SILVA-LOPEZ, R. E. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Revista Fitos**, v. 04, n. 01, p. 108–119, 2018.

SOARES, J. R. et al. Interaction between the plant ApDef1defensin and *Saccharomyces*

cerevisiae results in yeast death through a cell cycle- and caspase-dependent process occurring via uncontrolled oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 1, p. 3429–3443, 2017.

SONG, W. et al. COVID-19 and Tuberculosis Coinfection: An Overview of Case Reports/Case Series and Meta-Analysis. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 1–13, 24 ago. 2021.

SPIVAK, E. S.; HANSON, K. E. *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 2, fev. 2018.

SRIVASTAVA, S. et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides from plants: The future of antimicrobial therapy. **Phytotherapy Research**, n. March, p. 1–22, 2020.

SRIVASTAVA, S. et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides from plants: The future of antimicrobial therapy. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 1, p. 256–277, 17 jan. 2021.

SRUTHI, C. K.; PRAKASH, M. Amino acid impact factor. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0198645, 13 jun. 2018.

STANISZEWSKA, M. Virulence Factors in *Candida* species. **Current Protein & Peptide Science**, v. 21, n. 3, p. 313–323, 26 mar. 2020.

STRUYFS, C.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. Membrane-Interacting Antifungal Peptides. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 12 abr. 2021.

SULTANA, M. S. et al. Proteinase inhibitors in legume herbivore defense: from natural to genetically engineered protectants. **Plant Cell Reports**, v. 41, n. 2, p. 293–305, 21 fev. 2022.

SUTER, B.; AUERBACH, D.; STAGLJAR, I. Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond. **BioTechniques**, v. 40, n. 5, p. 625–644, maio 2006.

SVENSSON, B. et al. Proteinaceous α -amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1696, n. 2, p. 145–156, fev. 2004.

TAM, J. P. et al. Antimicrobial peptides from plants. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 4, p. 711–757, 2015.

TANG, S. S. et al. Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. **Phytochemistry**, v. 154, n. May, p. 94–105, 2018.

TAVEIRA, G. B. et al. Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 102, n. 1, p. 30–39, 2014.

TAVEIRA, G. B. et al. Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: Mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species Applied microbiology. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2016.

TAVEIRA, G. B. et al. Programmed cell death in yeast by thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits involving activation of caspases and extracellular H^+ flux. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 2, 2018.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 2, p. 149–177, abr. 2012.

THEVISSSEN, K.; TERRAS, F. R. G.; BROEKAERT, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5451–5458, 1999.

VANDERWAEREN, L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11665, 1 out. 2022.

VIEIRA BARD, G. C. et al. Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are α -amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology. **Biopolymers**, v. 102, n. 4, p. 335–343, jul. 2014.

WALLS, D.; WALKER, J. M. Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application. **Protein Chromatography**, v. 1485, p. 423, 2017.

WANG, J. et al. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 3, p. 831–859, 24 maio 2019.

WICKRAMARATNE, M. N.; PUNCHIHEWA, J. C.; WICKRAMARATNE, D. B. M. In-vitro alpha amylase inhibitory activity of the leaf extracts of *Adenantha pavonina*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 466, 15 dez. 2016.

WINGFIELD, P. T. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. **Curr. Protoc. Protein Sci.**, n. April, p. 1–9, 2016.

XU, P.; HUANG, M. Small Peptides as Modulators of Serine Proteases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 22, p. 3686–3705, 30 jun. 2020.

YOSHIZAKI, L. et al. *Calliandra selloi* Macbride trypsin inhibitor: Isolation, characterization, stability, spectroscopic analyses. **Phytochemistry**, v. 68, n. 21, p. 2625–2634, nov. 2007.

ZHANG, R.; XU, L.; DONG, C. Antimicrobial Peptides: An Overview of their Structure, Function and Mechanism of Action. **Protein & Peptide Letters**, v. 29, n. 8, p. 641–650, ago. 2022.

ZOTTICH, U. et al. An antifungal peptide from *Coffea canephora* seeds with sequence homology to glycine-rich proteins exerts membrane permeabilization and nuclear localization in fungi. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3509–3516, jun. 2013.