

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE - PPGSD
MATHEUS MAGANHA DA SILVA

**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA DO INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES
DE *Enterolobium gummiferum***

Linha de pesquisa: Processo saúde-doença na região Centro-oeste: aspectos
biopsicossociais, socioculturais, ecoambientais, epidemiológicos e clínicos

CAMPO GRANDE

2024

MATHEUS MAGANHA DA SILVA

**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA DO INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES
DE *Enterolobium gummiferum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste– PPGSD, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Lígia Rodrigues
Macedo
Coorientador: Prof. Dr. Caio Fernando Ramalho de
Oliveira

Campo Grande – MS
2024



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Mestrado

Aos onze dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e quatro, às sete horas e trinta minutos, na Videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Maria Ligia Rodrigues Macedo (UFMS), Ludovico Migliolo (UCDB) e Thalita Bachelli Riul (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: MATHEUS MAGANHA DA SILVA, CPF 06533466542, Área de concentração em Saúde e Sociedade, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA DO INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE Enterolobium gummiferum" e orientação de Maria Ligia Rodrigues Macedo. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR(A)	ASSINATURA	AValiação
Dra. Maria Ligia Rodrigues Macedo (Interno) Presidente da Banca Examinadora	 Documento assinado digitalmente MARIA LIGIA RODRIGUES MACEDO Data: 13/03/2024 08:15:28-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dra. Danielle Bogo (Interno) (Suplente)		☐ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dr. Ludovico Migliolo (Externo)	 Documento assinado digitalmente LUDOVICO MIGLIOLO Data: 11/03/2024 16:34:37-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dra. Thalita Bachelli Riul (Externo)	 Documento assinado digitalmente THALITA BACHELLI RIUL Data: 12/03/2024 08:37:48-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação

RESULTADO FINAL:

☒ APROVAÇÃO

☐ APROVAÇÃO COM REVISÃO

☐ REPROVAÇÃO

OBSERVAÇÕES: _____

 Documento assinado digitalmente
MATHEUS MAGANHA DA SILVA
Data: 11/03/2024 11:29:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do(a) Aluno(a)

Nada mais havendo a ser tratado, o(a) Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me apoiou e me deu todo o apoio necessário para a realização do mestrado. À minha mãe, Janete, que sempre fez o possível para que eu pudesse alcançar todos os meus objetivos. Ao meu pai, Jair, que sempre me deu o suporte necessário para prosseguir durante todo o mestrado. Aos meus irmãos Thiago e Douglas, que sempre estiveram ao meu lado.

Agradeço também a minha orientadora, Maria Lígia Rodrigues Macedo, a qual abriu as portas do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas em 2019, onde com o seu apoio e incentivo, consegui aprender muito mais sobre o mundo de purificação e caracterização de proteínas que hoje sou apaixonado.

Ao meu coorientador, Caio Fernando Ramalho de Oliveira, que sempre se dispôs a me ajudar, corrigir e transmitir seus conhecimentos em sua área de interesse, sempre mostrando o melhor caminho para a realização dos experimentos. Que hoje, além de coorientador, virou um amigo para a vida.

A todos os membros do LPPFB, que sempre estiveram dispostos a me ajudar e a me ajudar nos momentos difíceis dos experimentos, ensinando e esclarecendo diversas dúvidas. Aos técnicos e ex-técnicos do laboratório que sempre deram o suporte necessário para a execução dos experimentos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento e à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo convite para realizar o mestrado, onde pude adquirir conhecimentos que nunca teria em outro lugar.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FUNDECT, por permitirem e apoiarem, com o fornecimento de recursos para o laboratório, a realização das pesquisas.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram, especialmente Rafael, Gabriel e Matheus, que sempre me apoiaram e participaram dos momentos de maior descontração. E a Carolina Amianti, que esteve presente nos melhores e piores momentos, onde sempre me apoiou e acreditou, dando um grande suporte emocional para seguir em frente.

A todos os professores e pesquisadores que participaram da trajetória, que compartilharam seus conhecimentos e contribuíram para minha formação. Aos docentes que se dedicaram à leitura deste trabalho, oferecendo sugestões para aprimorar ainda mais esta dissertação.

RESUMO

Os inibidores de peptidases (IPs) vegetais desempenham papéis cruciais nos processos fisiológicos das plantas. Neste estudo, isolamos e caracterizamos um novo inibidor de tripsina da família Kunitz, a partir de sementes de *Enterolobium gummiferum* (Fabaceae, Mimosoideae), denominado EgPI (inibidor de peptidases de *E. gummiferum*). O processo de purificação envolveu cromatografias de gel filtração e hidrofobicidade, resultando em uma molécula com elevado grau de pureza. O EgPI exibiu uma única banda de ~20 kDa em eletroforese de poliacrilamida (SDS-PAGE). Em condições redutoras, duas cadeias polipeptídicas foram observadas, com 15 kDa e 5 kDa. A caracterização funcional revelou que EgPI apresentou uma estequiometria de inibição molar na razão de 1:1 contra tripsina bovina, indicando uma interação direta entre o sítio reativo do inibidor e o sítio ativo da enzima. A constante de dissociação (K_i) de $8,4 \times 10^{-9}$ $\mu\text{mol/L}$ foi determinada, demonstrando uma alta afinidade entre EgPI e tripsina. O sequenciamento amino-terminal de EgPI determinou os primeiros 25 resíduos de aminoácidos, que revelaram a homologia de EgPI com inibidores da família Kunitz. A análise de dicroísmo circular forneceu informações sobre a estrutura secundária de EgPI sob diferentes condições. Em condições nativas, o inibidor apresenta um elevado teor de folhas- β (21,6 %) e estruturas desordenadas (45,7 %). Estudos de estabilidade térmica demonstraram que o EgPI manteve a conformação necessária para a sua atividade inibitória até 70 °C. Sua conformação secundária foi estável em uma ampla faixa de pH, compreendida entre 2 e 10. Em relação as suas propriedades antimicrobianas, o EgPI apresentou atividade antibiofilme contra biofilmes fúngicos maduros, em concentrações menores que as testadas para o medicamento comercial, anfotericina B. A caracterização do EgPI contribui para nossa compreensão das propriedades funcionais, estruturais e biológica dos inibidores Kunitz. A alta afinidade do EgPI para tripsina permite que estudos futuros com potenciais aplicações em vários campos de pesquisa, incluindo agricultura, terapia antimicrobiana e pesquisas em diversas áreas da saúde. Investigações adicionais sobre outras atividades biológicas do EgPI aumentarão nosso conhecimento de suas aplicações e ampliarão seu escopo na pesquisa biotecnológica.

Descritores: Atividade antibiofilme; Estequiometria de inibição; Dicroísmo circular; Inibidor de peptidases; Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Plant peptidase inhibitors (PIs) play crucial roles in plant physiological processes. In this study, we isolated and characterized a new trypsin inhibitor from the Kunitz family, from seeds of *Enterolobium gummiferum* (Fabaceae, Mimosoideae), called EgPI (*E. gummiferum* peptidase inhibitor). The purification process involves gel filtration chromatography and hydrophobicity, resulting in a molecule with a high degree of purity. EgPI exhibited a single band of ~20 kDa on polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE). Under reducing conditions, two polypeptide chains were observed, with 15 kDa and 5 kDa. Functional characterization revealed that EgPI presented a molar inhibition stoichiometry in the ratio of 1:1 against bovine trypsin, providing a direct interaction between the reactive site of the inhibitor and the active site of the enzyme. A dissociation constant (K_i) of 8.4×10^{-9} $\mu\text{mol/L}$ was determined, demonstrating a high affinity between EgPI and trypsin. Amino-terminal sequencing of EgPI determined the first 25 amino acid residues, which revealed the homology of EgPI with Kunitz family inhibitors. Circular dichroism analysis provided information about the secondary structure of EgPI under different conditions. Under native conditions, the inhibitor presents a theoretical increase in β -sheets (21.6 %) and disordered structures (45.7 %). Heated thermal stability studies showed that EgPI maintained the conformation necessary for its inhibitory activity up to 70 °C. Its secondary conformation was stable over a wide pH range, detailed between 2 and 10. Regarding its antimicrobial properties, EgPI showed antibiofilm activity against mature fungal biofilms, at concentrations lower than those tested for the commercial drug, amphotericin B. Characterization of EgPI contributes to our understanding of the functional, structural, and biological properties of Kunitz inhibitors. The high affinity of EgPI for trypsin allows for future studies with potential applications in various fields of research, including agriculture, antimicrobial therapy, and research in various areas of health. Further investigation into other biological activities of EgPI increases our knowledge of its applications and broadens its scope in biotechnology research.

Keywords: Antibiofilm activity; Circular Dichroism; Inhibition stoichiometry; Peptidase inhibitor; Antimicrobial resistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais mecanismos de ação dos antibióticos e sua resistência	18
Figura 2 – Ilustração da formação do biofilme.....	20
Figura 3 – Sítios de comensalismo	23
Figura 4 – Combinação de fatores de virulência que promovem infecções fúngicas.	24
Figura 5 – Formação de biofilme de <i>C. albicans</i>	25
Figura 6 – Visão geral da resistência antimicrobiana de biofilme de <i>C. albicans</i>	26
Figura 7 – Cascata da coagulação.....	29
Figura 8 – Mecanismos de interação dos inibidores de peptidases.	30
Figura 9 – Esquema de estrutura primária dos inibidores do tipo Kunitz baseado no número de ligações dissulfeto e cadeias polipeptídicas.....	32
Figura 10 – Estrutura obtida por cristalografia do EcTI.	33
Figura 11 - Planta <i>E. gummiferum</i> e suas características morfológicas.....	35
Figura 12 – Ensaio de atividade inibitória contra tripsina dos três picos obtidos pela coluna de gel filtração Sephadex G-100.	44
Figura 13 – Primeira etapa de purificação do EgPI.	44
Figura 14 – Segunda etapa de purificação do EgPI.....	45
Figura 15 - SDS-PAGE 12,5%	47
Figura 16 – Estequiometria da inibição de tripsina bovina do EgPI.....	48
Figura 17 – Dicroísmo circular do EgPI nativo e em condições de redução após incubação com DTT 1mmol/L.....	50
Figura 18 - Dicroísmo circular do EgPI em diferentes temperaturas.	51
Figura 19. Análise térmica de atividade inibitória contra tripsina do EgPI.	52
Figura 20 - Dicroísmo circular do EgPI em diferentes pH.	52
Figura 21 – Avaliação da inibição do biofilme de <i>C. albicans</i>	55
Figura 22 - Avaliação da atividade de erradicação do biofilme maduro de <i>C. albicans</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de purificação de EgPI. A purificação foi realizada a partir de 100 mg de EB.....	46
Tabela 2 - Alinhamento da sequência aminoterminal.....	49
Tabela 3 – Determinação da estrutura secundária do EgPI em diferentes condições por dicroísmo circular.	49
Tabela 4 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra bactérias.	53
Tabela 5 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra fungos. ...	54

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e
Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN). Cadastro número A315278.....78

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Símbolo	Abreviação
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato	Asp	D
Glutamato	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Bactérias	16
2.2 Fungos	21
2.3 Inibidores de peptidases	26
2.4 Inibidores do tipo Kunitz	31
2.5 Inibidor de peptidases de sementes de <i>Enterolobium gummiferum</i>	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Purificação do inibidor de peptidases de <i>Enterolobium gummiferum</i> ..	36
4.1.1 Obtenção da farinha de sementes de <i>E. gummiferum</i>	36
4.1.2 Obtenção do extrato bruto proteico	36
4.1.3 Cromatografia em coluna de gel filtração Sephadex G-100	36
4.1.4 Cromatografia em coluna de hidrofobicidade Phenyl-Sepharose	37
4.2 Quantificação de proteínas	37
4.3 Atividade inibitória	37
4.4 Determinação da constante de dissociação e estequiometria	38
4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12,5%.....	38
4.6 Sequenciamento amino terminal	39
4.7 Dicroísmo Circular	39
4.8 Ensaio microbiológicos	39

4.8.1	Ensaio antibacteriano	40
4.8.2	Ensaio antifúngico	41
4.8.3	Ensaio de inibição do biofilme	41
4.8.4	Ensaio de erradicação do biofilme	42
5	RESULTADOS	42
5.1	Purificação do EgPI.....	42
5.1.1	Cromatografia em coluna de gel filtração Sephadex G-100	43
5.1.2	Cromatografia em coluna de hidrofobidade Phenyl-Sepharose	44
5.1.3	Tabela de purificação	45
5.2	SDS-PAGE 12,5%	46
5.3	Propriedades inibitórias do EgPI.....	47
5.3.1	Estequiometria de inibição.....	47
5.3.2	Coeficiente de inibição.....	48
5.4	Sequenciamento Amino-terminal	48
5.5	Estudos de estabilidade do EgPI.....	49
5.5.1	Estabilidade a o Ditioneitol (DTT)	50
5.5.2	Estabilidade térmica	50
5.5.3	Estabilidade a variação de pH	52
5.6	Ensaio microbiológico.....	53
5.6.1	Atividade antibacteriana	53
5.6.2	Atividade antifúngica.....	53
5.6.3	Atividade antibiofilme fúngico	54
6	DISCUSSÃO.....	56
6.1	Purificação do EgPI.....	57
6.2	Atividade inibitória e determinação do <i>K_i</i> do EgPI.....	58
6.3	Determinação da sequência amino-terminal	58

6.4	Análise de estrutura secundária e estabilidade térmica e de pH por dicroísmo circular	59
6.5	Ensaio de atividade microbiana	61
7	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXO	78

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais para o tratamento de doenças acompanhou o desenvolvimento da sociedade humana, sendo até hoje utilizados como fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos. A procura por novos bioativos tem aumentado com a discussão sobre medicamentos sintéticos, devido ao seu alto custo de produção, toxicidade, efeitos colaterais e a redução da eficácia. Tomando como por exemplo o uso de produtos naturais, tem sido observado a associação de medicamentos de origem natural como forma de complementar ou substituir os tratamentos atuais, como o uso de plantas do gênero *Enterolobium* sp. para o tratamento de diarreias, resfriados e infecções gastrointestinais (MARIAM et al., 2017).

Atualmente, grande parte dos antibióticos já sofrem com quebra de resistência por cepas bacterianas, sendo este um dos grandes problemas de saúde pública. A OMS já incluiu a resistência microbiana entre uma das dez maiores ameaças globais. Para tentar contornar essa resistência, terapias alternativas têm sido investigadas, incluindo a associação de diversas técnicas (MULANI et al., 2019).

Fungos patogênicos a humanos, que representam apenas 0,1% das espécies conhecidas, infectam milhares de pessoas todos os anos, sendo em sua grande maioria, infecções leves (DE OLIVEIRA et al., 2018). Porém, a incidência de infecções fúngicas hospitalares tem crescido ao decorrer do tempo, onde infecções sistêmicas adquiridas em hospitais têm aumentado a taxa de mortalidade. Diversos problemas estão relacionados com o uso dos medicamentos atuais, dentre eles a toxicidade hepática, reações cutâneas semelhantes ao lúpus, diversas interações medicamentosas e a resistência aos azóis que alguns fungos têm apresentado (SHEN et al., 2020).

Os IPs têm apresentado diversas atividades antimicrobianas contra fungos e bactérias, sendo uma alternativa ao tratamento de infecções de bactérias de grande interesse clínico, como as pertencentes à classificação SKAPE (MACEDO et al., 2016). Bem como apresentam atividade antibiofilme bacteriano e fúngico, sendo esse um dos maiores causadores de infecções devido à sua alta resistência aos antimicrobianos.

Os IPs podem ser divididos em 9 classes, representando as respectivas famílias de enzimas proteolíticas: serinopeptidases, cisteinopeptidases,

treoninopeptidases, peptidases asparticas, glutamicopeptidases, metalopeptidases, asparigino peptídio liases, peptidases mistas e peptidases com sítio catalítico desconhecido (RAWLINGS et al., 2018). As famílias dos IPs são classificadas de acordo com sua sequência primária, denominadas inibidores das famílias Abóbora, Bowman-Birk, Batata tipo I e Batata tipo II, Cereal, Cistatinas, Kunitz, Mostarda, Tomate, Thaumatin-like, dentre outros (BIRK, 2011; MARATHE et al., 2019; OLIVA et al., 2010).

Os IPs são peptídeos ou proteínas que tem a capacidade de impedir a atividade catalítica das enzimas. Eles podem ser encontrados em todas as famílias de plantas, bem como em animais e microrganismos. Em plantas, os IPs podem atuar na regulação de processos biológicos e na defesa contra o ataque de animais, insetos e microrganismos (CLEMENTE et al., 2019). Dos inibidores de serinopeptidases, podemos citar os inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk. Esses inibidores diferem em massa molecular, número de cadeias polipeptídicas e pontes dissulfeto, além do número de sítios reativos. Esses inibidores têm apresentado diversas propriedades biológicas, como atividade anticâncer, antimicrobiana e inseticida (BONTURI et al., 2022).

Considerando a problemática descrita, foi pertinente o desenvolvimento de um método de purificação e caracterização de um novo inibidor vegetal, o EgPI, e investigar suas propriedades antimicrobiana, antibiofilme e antiparasitária. A bioprospecção de novas moléculas vai de encontro ao desenvolvimento de novos produtos. A descoberta de novas estruturas é importante pois pode sobrepujar os episódios de resistência microbiana cada vez mais frequentes. Com um maior número de moléculas descritas, bem como suas propriedades e estruturas, medicamentos mais seguros e eficazes podem ser desenvolvidos, otimizando o tratamento de doenças infecciosas e parasitárias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bactérias

Bactérias são os menores microrganismos unicelulares do planeta. As células bacterianas não apresentam membrana nuclear e organelas membranosas, tendo o DNA disperso no citoplasma como característica sua estrutura celular procariótica (GUPTA; GUPTA; SINGH, 2017). A movimentação desses microrganismos é realizada majoritariamente por flagelos e pelo pili, além de ser responsável pela

movimentação, é responsável também por realizar a conjugação bacteriana, tendo como função a transferência de material genético, na forma de plasmídeos, contribuindo na disseminação de genes relacionados à resistência bacteriana (GUPTA; GUPTA; SINGH, 2017).

A descoberta de antibióticos revolucionou o controle de infecções bacterianas. Todavia, essa descoberta tem andado lado a lado com a resistência bacteriana aos antibióticos (DE OLIVEIRA et al., 2018). Após o início da era dos antibióticos, em 1928 com a descoberta da penicilina, relatos acerca da resistência bacteriana muitas vezes impossibilitam seu uso e trazem novos problemas clínicos (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). A resistência bacteriana é um problema global, onde bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes vêm ocasionando infecções hospitalares e infecções comunitárias (GUPTA; DATTA, 2019). Essa resistência é ocasionada principalmente pelo uso irracional de antibióticos, onde o microbioma humano tem sido um grande reservatório de bactérias multirresistentes, principalmente as bactérias intestinais (YU et al., 2021).

Dentre os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos, é possível relatar a ocorrência de bombas de efluxo (*Enterococcus* sp.), a modificação do sítio alvo (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), a síntese de enzimas (β -lactamases e carbapenemases) e a alteração na permeabilidade das membranas bacterianas (*Pseudomonas aeruginosa*) (Figura 1) (CARDOSO et al., 2021; LI et al., 2023).

Figura 1 - Principais mecanismos de ação dos antibióticos e sua resistência

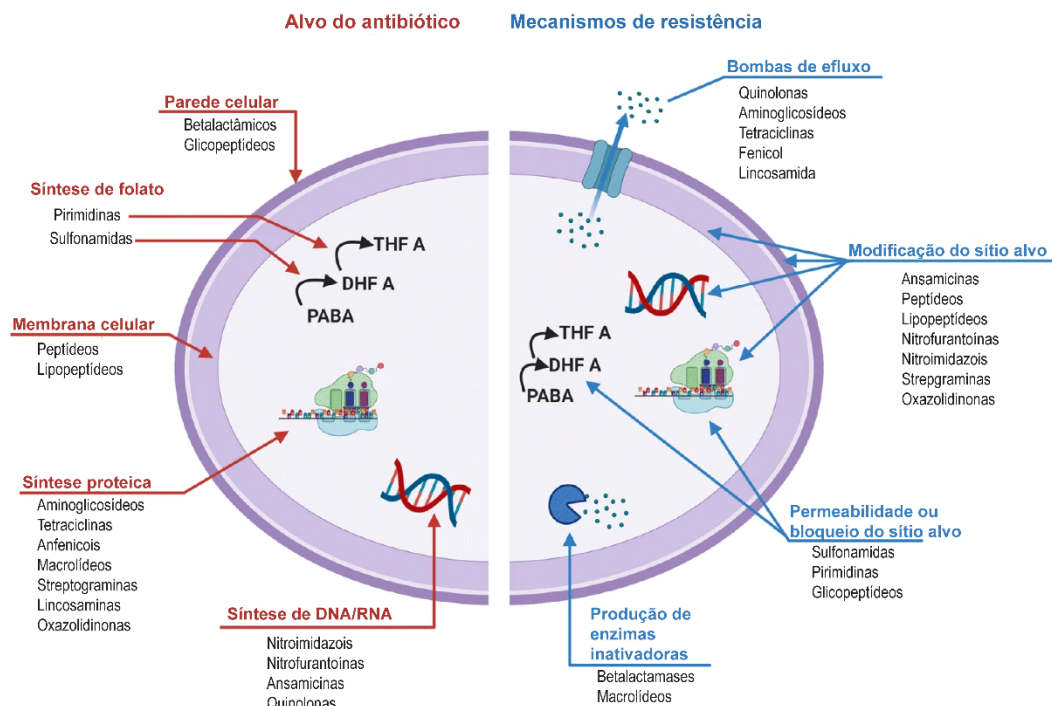


Imagem adaptada de CARDOSO et al., 2021.

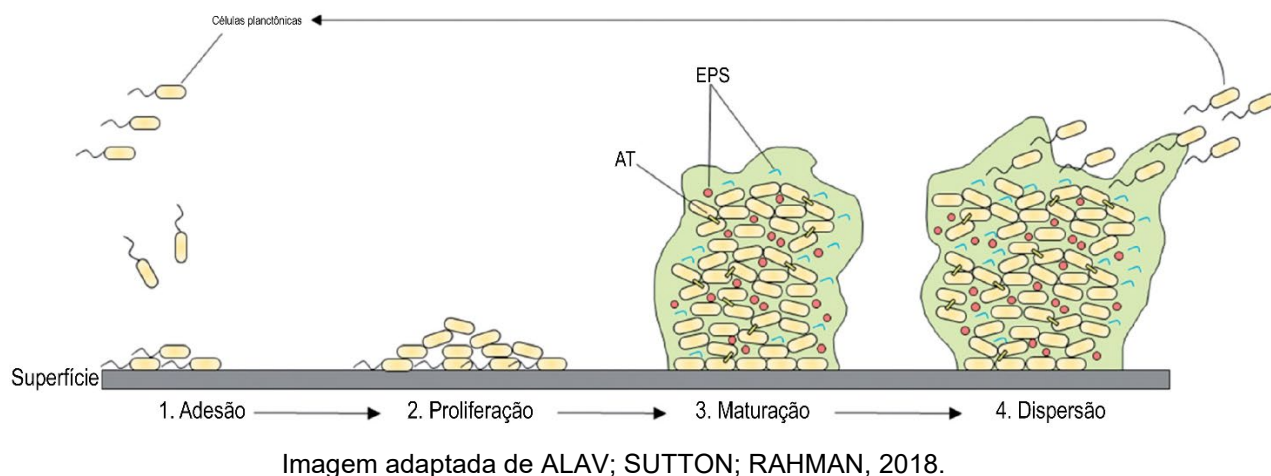
A disseminação dos genes de resistência aos antimicrobianos se dá por duas principais vias, a transferência vertical e a transferência horizontal (STEVENSON et al., 2017; TAO et al., 2022). A transferência vertical é aquela que é passada entre gerações, onde uma bactéria passa a outra durante a divisão celular. Já a transferência horizontal é aquela de maior importância na disseminação de resistência, onde uma bactéria transfere genes a outra por transformação, transdução e conjugação, sendo a conjugação a mais comum (ARNOLD; HUANG; HANAGE, 2022).

Em 2017, a OMS publicou uma lista contendo 12 famílias de bactérias que apresentam riscos à saúde humana, classificadas em 3 categorias: crítica, alta e média prioridade, baseado na urgência no desenvolvimento de antimicrobianos (MANCUSO et al., 2021). Dentre as bactérias citadas, é possível citar seis bactérias nosocomiais de alto risco, que são determinadas pelo termo *ESKAPE*: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp., que apresentam resistência bacteriana a uma alta gama de antibióticos e alta virulência, trazendo a urgência do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (ALÓKE; ACHILONU, 2023; MULANI et al., 2019).

Atualmente, grande parte dos antibióticos já apresentam cepas bacterianas resistentes, sendo este um dos grandes problemas de saúde pública. A OMS já incluiu a resistência microbiana e uma das dez maiores ameaças globais (MANCUSO et al., 2021; TAO et al., 2022). Para tentar contornar a problemática da resistência, terapias alternativas têm sido praticadas ou estão em teste, incluindo a associação de diversas técnicas de controle (MULANI et al., 2019). Dentre essas associações, temos: bacteriófago + antibiótico (ex: OMKO1 + Ceftazidima) (CHAN et al., 2018); nanopartículas de prata (AgNPs) + antibiótico (ex: AgNPs + tetraciclina) (SANGAONKAR; PAWAR, 2018); nanopartículas + peptídeos antimicrobianos (AMPs) (ex: SWCNTs-Ag em uma ligação covalente com TP359) (CHAUDHARI et al., 2016); terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) + antibiótico (ex: luz a 660 nm + vancomicina) (CHIBEBE JUNIOR et al., 2013); aPDT + AMPs (ex: aPDT + aurein 1.2) (DE FREITAS et al., 2018); aPDT + inibidor da bomba de efluxo (ex: aPDT + INF55-(AC)ec-MB)(RINEH et al., 2018).

Grande parte dos microrganismos não vivem sozinhos, mas sim na forma de biofilmes. Quando em biofilmes, essas bactérias cooperam entre si, formando uma condição favorável para seu crescimento e proteção contra agentes agressores, tais como sistema imune e antibióticos (Figura 2) (LI; CHEN; LIN, 2021). Segundo Flemming et al. (2022), biofilmes são comunidades estruturadas de microrganismos incorporados em uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, DNA extracelular, proteínas, amiloides, lipídeos, vesículas de membrana e substâncias derivadas desses microrganismos.

Figura 2 – Ilustração da formação do biofilme em 4 etapas: sendo 1) a adesão de células planctônicas na superfície; 2) a etapa de proliferação, onde as bactérias aderidas passam a se multiplicar; 3) Maturação, com a formação de uma matriz extracelular; e 4) a dispersão, onde bactérias planctônicas são liberadas para a adesão em novas superfícies.



Todos os tipos de bactérias podem formar biofilme. Em humanos, 80% das infecções são originadas por biofilmes bacterianos (JAMAL et al., 2018). Infecções adquiridas em hospitais representam um dos maiores riscos para pacientes internados, onde o uso de estratégias de limpeza utilizando combinação de diferentes desinfetantes, detergentes e radiação ultravioleta tem apresentado insuficiência na eliminação de microrganismos, sendo o *Clostridium difficile* e bactérias ESKAPE as mais frequentemente isoladas (NUNEZ et al., 2023). No Brasil, devido ao alto uso de antibióticos, bactérias como a *P. aeruginosa* tem apresentado resistência ao tratamento convencional, que ocorre pela mutação dos genes cromossomais ou transferência horizontal de genes plasmidiais. Dentre um dos fatores de virulência, está a capacidade da formação de biofilme, dificultando ainda mais a ação dos antibióticos. Na forma de biofilmes, as bactérias podem ficar de 10 a 1.000 vezes mais resistentes aos antibióticos (ROSSI GONÇALVES et al., 2017).

O *Quorum Sensing* (QS) é processo amplamente utilizado na comunicação célula-célula bacteriana no controle coletivo quanto ao comportamento, sendo ele desde a produção, liberação e detecção, onde regulam a densidade populacional, composição da comunidade e expressão genética (DUDDY; BASSLERI, 2021). Como exemplo, diversas bactérias Gram-negativas patogênicas utilizam N-acil homoserina lactonas nesses sistemas de comunicação, sendo essa comunicação extracelular autoinduzida (DERYABIN et al., 2019; DUDDY; BASSLERI, 2021). Dentre as funções do QS está a proteção contra agentes agressores, como bioluminescência, captação

de DNA extracelular e regulação da defesa contra bacteriófagos. Além disso, essa integração favorece a codificação extracelular autoinduzida intraespécies, intragenêro e a comunicação intraespécies (DERYABIN et al., 2019; DUDDY; BASSLERI, 2021). Portanto, encontrar moléculas capazes de inibir a formação e/ou desfazer formas maduras de biofilme tem sido um grande desafio, dada a dificuldade de encontrar moléculas capazes de bloquear a comunicação via QS.

2.2 Fungos

Fungos patogênicos a humanos, que representam apenas 0,1% das espécies descritas, infectam milhares de pessoas todos os anos, sendo em sua grande maioria, infecções leves (DE OLIVEIRA et al., 2018). Todavia, a incidência de infecções fúngicas invasivas tem demonstrado um aumento significativo na mortalidade e custos de hospitalização por dia sem o tratamento com medicamentos antifúngicos adequados e dificuldade de detecção (FANG et al., 2023). A frequência de determinados tipos infecções fúngicas nosocomiais é relacionado a diferentes graus de imunossupressão. Por exemplo, menores índices de imunossupressão são relacionados a infecções causadas por *Candida* spp. Já níveis mais severos de imunossupressão são relacionados a infecções causadas por *Aspergillus* spp., sendo a aspergilose a segunda infecção mais comum em hospitais, onde ambas as infecções têm em comum a dificuldade de diagnóstico (PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007). Dentre os pacientes imunossuprimidos, podemos citar pacientes com neutropenia, pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), imunossupressão crônica, transplantados, queimados, diabéticos e pessoas em terapia com antibióticos (SANGUINETTI et al., 2019). Diversos efeitos colaterais são descritos pelo uso dos medicamentos atualmente em uso, como toxicidade hepática, reações cutâneas semelhantes ao lúpus e diversas interações medicamentosas (SHEN et al., 2020).

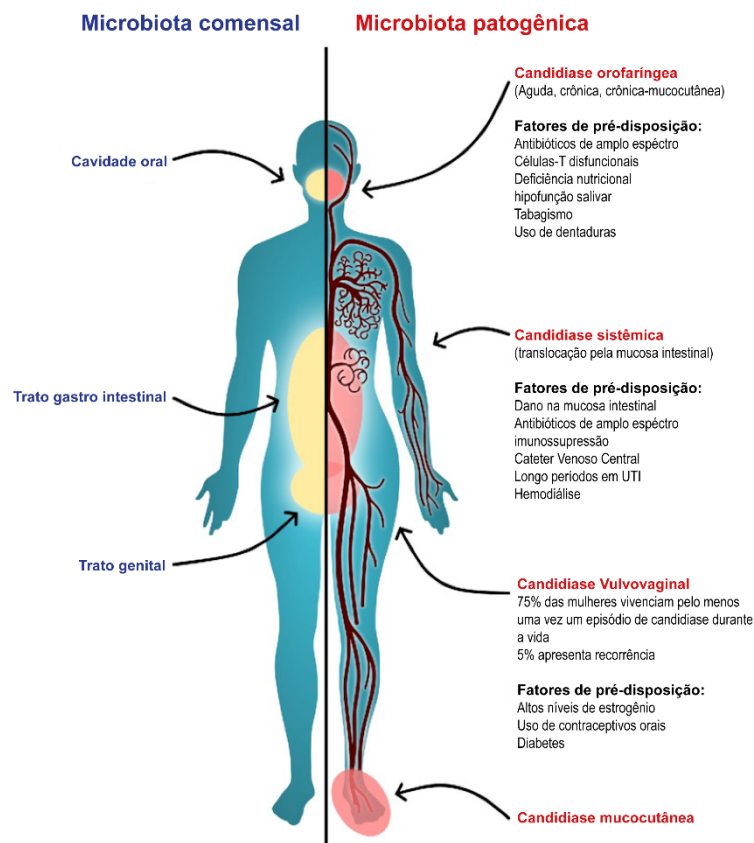
A pandemia de crise respiratória aguda causada pelo coronavírus SARS-CoV 2, também conhecido como COVID-19, infectou 300 milhões de pessoas apenas em 2019, onde log. Logo no início da pandemia, em 2020, os primeiros casos de COVID-19 associado a aspergilose pulmonar foram descritos (HOENIGL et al., 2022). Desde então, diversos outros casos foram relatados, onde muitos apresentaram *Aspergillus* azol-resistente, sendo os casos mais comuns em pacientes recebendo corticoterapia

ou tocilizumabe (HOENIGL et al., 2022). O gênero *Cryptococcus* sp. é geralmente subnotificado por conta de sua apresentação laboratorial, que geralmente são inconclusivas e clínicas, onde apresentam em casos mais leves uma infecção assintomática ou leve que pode desenvolver a uma síndrome que leve a falha respiratória (SHARMA; AGRAWAL; DAS, 2022). Geralmente esse tipo de infecção é associado altos níveis de imunossupressão, como em pacientes com o Vírus da imunodeficiência Humana, apresentando contagem de células CD4 baixa (< 200 células/ μ L). Estes pacientes apresentam meningoencefalites, sendo a *C. gattii* e *C. neoformans* as espécies mais comuns (SONG; LIANG; LIU, 2020).

Além do COVID-19 associado a aspergilose pulmonar, outras infecções fúngicas também foram associadas, como a COVID-19 associada a mucomicose, que apresentou maior relevância na segunda onda da pandemia e afetou principalmente a Índia, com 71% dos casos mundiais, denominada erroneamente de “*Black fungus*” (fungo preto) (HOENIGL et al., 2022; RAUT; HUY, 2021). Essa denominação foi associada a necrose tecidual que a infecção causa, porém, associada erroneamente pois já existem outras doenças com esse nome. Os casos mais comuns de COVID-19 associada a mucomicose se deram em pacientes com diabetes descontrolada, uso de corticoterapia e tempo longo de internação em UTIs (RAUT; HUY, 2021). Um dos fungos de maior relevância associado a COVID-19 associada a mucomicose é a *Candida auris*. Todavia, o tratamento de *C. auris* apresenta alguns desafios, como a difícil detecção, fácil proliferação e multirresistência a diversas drogas, onde todas as cepas testadas apresentaram resistência a anfotericina B (ARASTEHFAR et al., 2020; BHATT et al., 2021).

Apesar de infecções associadas ao COVID-19, as leveduras do gênero *Candida* são microrganismos comensais que habitam a cavidade oral, gastrointestinal e genital. Em situações de desequilíbrio da microbiota, lesões em barreiras teciduais ou em pacientes imunocomprometidos podem tornar esses fungos importantes patógenos (Figura 3) (D'ENFERT et al., 2021).

Figura 3 – Sítios de comensalismo, como exemplo, foi utilizado a *C. albicans*. A esquerda está os sítios comensais de *C. albicans*, que envolvem cavidade oral, trato gastrointestinal e genital. A direita, está os sítios infecciosos de *C. albicans*, que podem causar candidíase em orofaringe e vulvovaginal, além de candidíase sistêmica em infecções sanguíneas e de órgãos internos, podendo essa infecção ser transferida do intestino ao sangue. Além disso, pode causar candidíase cutânea na pele e pelos.



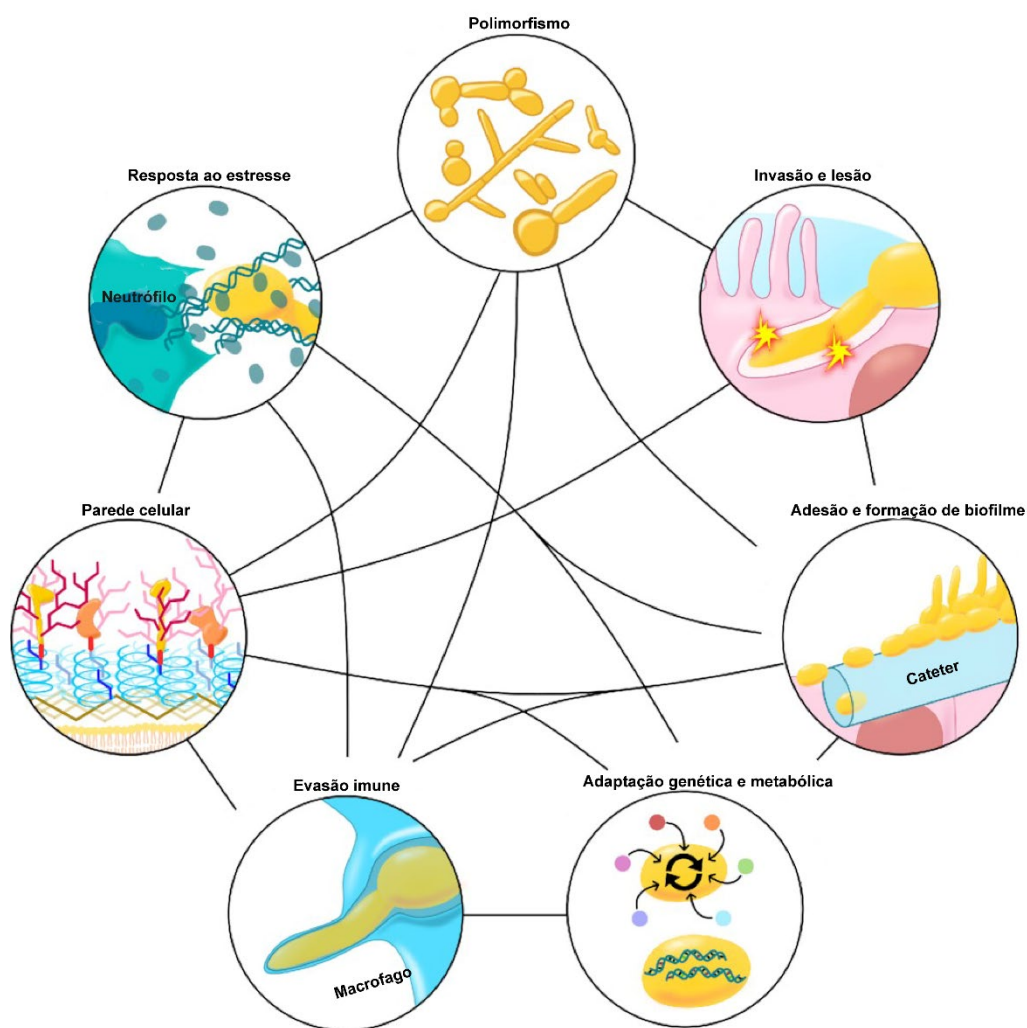
Fonte: (D'ENFERT et al., 2021)

Existem aproximadamente 200 espécies fungos do gênero *Candida*, porém, mais de 90% dos casos de infecções são causadas por *C. albicans*, *Candida parapsilosis*, e *Candida krusei*, sendo a *C. albicans* a mais prevalente nas infecções (ARAÚJO et al., 2019; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). Apesar da alta prevalência dessas espécies, outras espécies têm demonstrado um surgimento gradual em candidíases, como a *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae*, e outras que apesar de apresentarem menores taxas de incidência, tem tido um registro considerado nos últimos 15 anos, como a *Candida kefyr*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa*, *Candida dubliniensis*, e *Candida norvegensis* (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011; PAPON et al., 2013; PFALLER et al., 2010).

Dentre as formas de virulência apresentada pelos fungos, é possível analisar o polimorfismo, onde podem mudar sua cor e formato dependendo do meio, como pH, presença de nutrientes, oxigênio, temperatura, presença ou não de bactérias, dentre

outros (Figura 4). Sabendo dessas características, é possível deduzir se está havendo dano tecidual, onde geralmente há a presença de hifas, ou se está em fase de disseminação em sua forma de levedura, geralmente relacionado a infecções sistêmicas, com seu acesso por cateter ou implantes, ou infecção cutânea (D'ENFERT et al., 2021).

Figura 4 – Combinação de fatores de virulência que promovem infecções fúngicas.



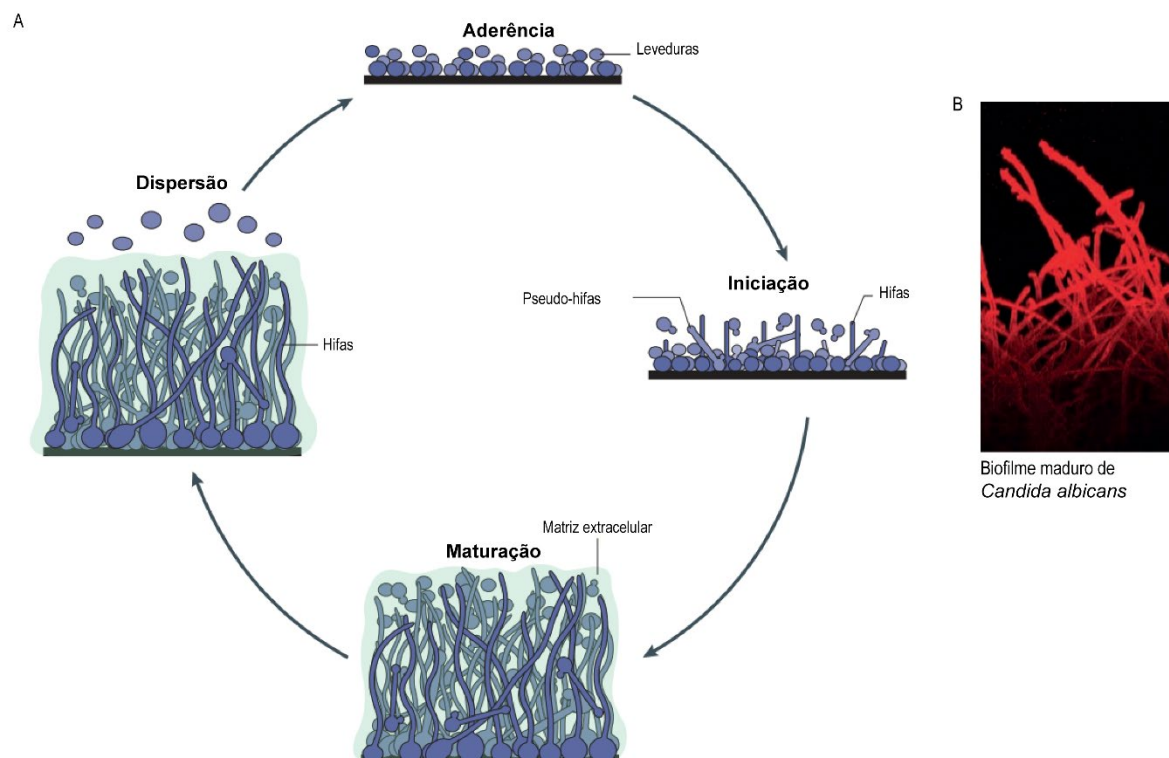
Adaptado de D'ENFERT et al., 2021.

Outra característica desses fungos é a capacidade de se aderirem a superfícies abióticas, como catéteres ou implantes dentários, promovendo a colonização e formação de biofilmes, onde cada fungo apresenta uma maior eficiência para se aderir em diferentes superfícies (MALINOVSKÁ; ČONKOVÁ; VÁCZI, 2023).

A formação de biofilme pode ser dividida, de maneira geral, em 4 etapas (Figura 5): aderência da levedura na superfície, seja ela biótica ou abiótica; iniciação ou

proliferação da formação do biofilme, onde a célula aderida à superfície forma uma camada basal que contém leveduras, pseudo-hifas e hifas; maturação de um complexo estruturado do biofilme, onde as células são cobertas por uma matriz extracelular composta por proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleico; e a liberação de leveduras do biofilme para colonização e formação de novos biofilmes (LOHSE et al., 2018). Alguns fungos podem não apresentar polimorfismo, como por exemplo, a *C. glabrata*, que contém apenas sua forma de levedura ou apresentam menos formas, como a *C. parapsilosis*, que não apresenta hifas, apenas pseudohifas e leveduras (MALINOVSKÁ; ČONKOVÁ; VÁCZI, 2023).

Figura 5 – Formação de biofilme de *C. albicans*. A) A formação de biofilme pode ser dividida em 4 etapas principais, sendo: A aderência da levedura de formato arredondado na superfície; A iniciação ou ploriferação da formação do biofilme, onde a célula aderida forma uma camada basal que apresenta leveduras, pseudohifas e hifas; A maturação de um complexo estruturado do biofilme, onde as células são cobertas por uma matriz extracelular composta por proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleico; e a dispersão de leveduras circulares do biofilme para a colonização de novos biofilmes. B) Microscopia confocal de varredura a laser da vista lateral de um biofilme maduro de *C. albicans*.

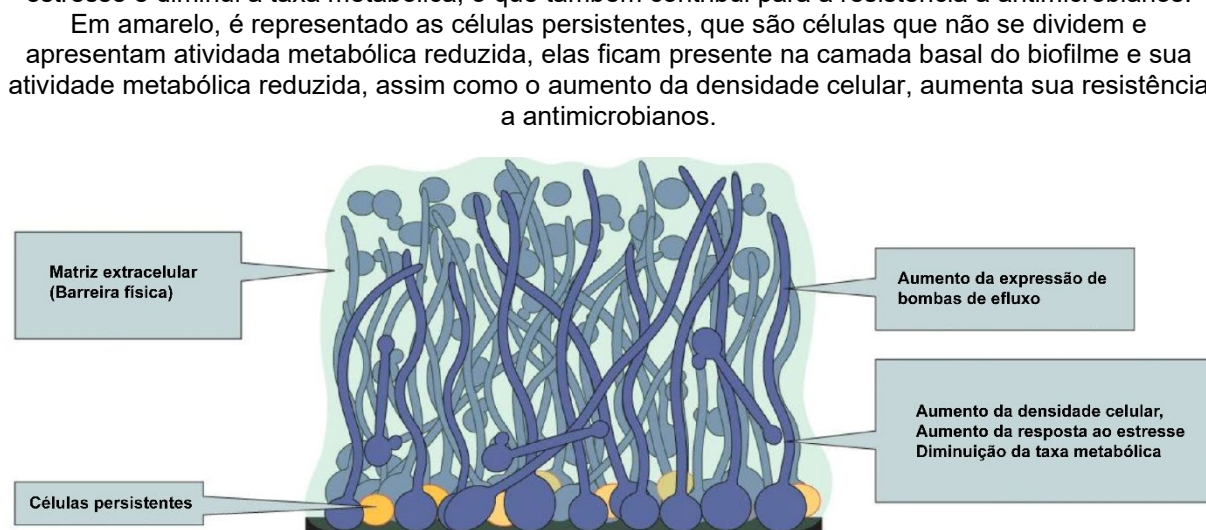


Adaptado de LOHSE et al., 2018.

A formação de biofilme fornece a colônia microbiana alta resistência a antimicrobianos, sendo essa resistência uma combinação de fatores, como o aumento

da expressão de bombas de efluxo, fatores protetores da matriz extracelular e a presença de células persistentes, que são células não se dividem e apresentam atividade metabólica reduzida, a tornando mais resistente a antimicrobianos (Figura 6) (LOHSE et al., 2018).

Figura 6 – Visão geral da resistência antimicrobiana de biofilme de *C. albicans*. Esses biofilmes são estruturas complexas que contêm leveduras circulares, pseudohifas e hifas (Azul escuro) cobertas por uma matriz extracelular (Azul claro). A matriz extracelular tem como função a formação de uma barreira física contra antimicrobianos. O aumento da densidade celular aumenta a resposta ao estresse e diminui a taxa metabólica, o que também contribui para a resistência a antimicrobianos.



Fonte: (LOHSE et al., 2018)

Outra estratégia utilizada pelos microrganismos são as evasões do sistema imune, onde se utilizam do biofilme a fim de esconder compostos que são reconhecidos por células epiteliais, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, fornecendo a habilidade de penetrar em células epiteliais e em células fagocíticas (Figura 6) (D'ENFERT et al., 2021; LOHSE et al., 2018). Devido ao tratamento sistêmico apresentar alta hepatotoxicidade e baixa tolerabilidade, muitos microrganismos já estão começando a apresentar resistência aos antimicrobianos e alta interação medicamentosa. Por este motivo, o estudo de novos tratamentos tem se tornado pertinente (DE OLIVEIRA et al., 2018; SHEN et al., 2020).

2.3 Inibidores de peptidases

O uso de produtos naturais e seus bioativos para o tratamento de doenças acompanhou todo o desenvolvimento humano, sendo até hoje utilizados como fonte

para o desenvolvimento de novos medicamentos. Os primeiros registros do uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças foram o Papiro Ebers, um dos tratados médicos mais antigos e importantes que se conhece (Egito, 1.500 a.C), o qual registrou mais de 700 extratos naturais; a Materia Médica Chinesa (China, 1.100 A.C), contendo 52 prescrições; e o *Aiurveda* (Índia, 1.000 a.C), contendo o registro de mais de 300 extratos (COTABARREN et al., 2020).

A procura por novos bioativos tem aumentado com a discussão sobre medicamentos sintéticos, devido ao seu alto custo de tratamento, toxicidade, efeitos colaterais e a redução da eficácia, como por exemplo em microrganismos, onde tem sido observado a associação de medicamentos de origem natural como forma de complementar ou substituir os tratamentos atuais (OTVOS et al., 2019).

O Brasil apresenta a maior biodiversidade do mundo, contando com 18% de toda a biodiversidade do planeta (BLAZOTTO et al., 2019). Com o apoio do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente e do *Global Environment Facility*, o estudo dessa biodiversidade tem sido estimulado com a implementação de um sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira, buscando disseminar o conhecimento sustentável e científico no país (DA SILVA; FANZERES, 2019).

A proteólise é um mecanismo essencial para a manutenção da vida de qualquer organismo, por isso devem-se existir mecanismos para seu controle no momento certo (PESQUET, 2012). Durante o desenvolvimento de plantas, esse processo é regulado para a funcionalidade planta e armazenamento de proteínas nos tecidos, e principalmente, na semente das plantas (SANTAMARÍA et al., 2014). Como forma de sobrevivência, as plantas utilizam uma combinação de diversos mecanismos de defesa contra os mais variados tipos de estresse, utilizando diferentes reguladores e sinalizadores (SACHDEV et al., 2021). Dentre alguns dos mecanismos de defesa e regulação, as plantas apresentam duas classes de proteínas responsáveis por inibição enzimática: os inibidores de α -amilase e o IPs (DE OLIVEIRA; MARANGONI; MACEDO, 2014).

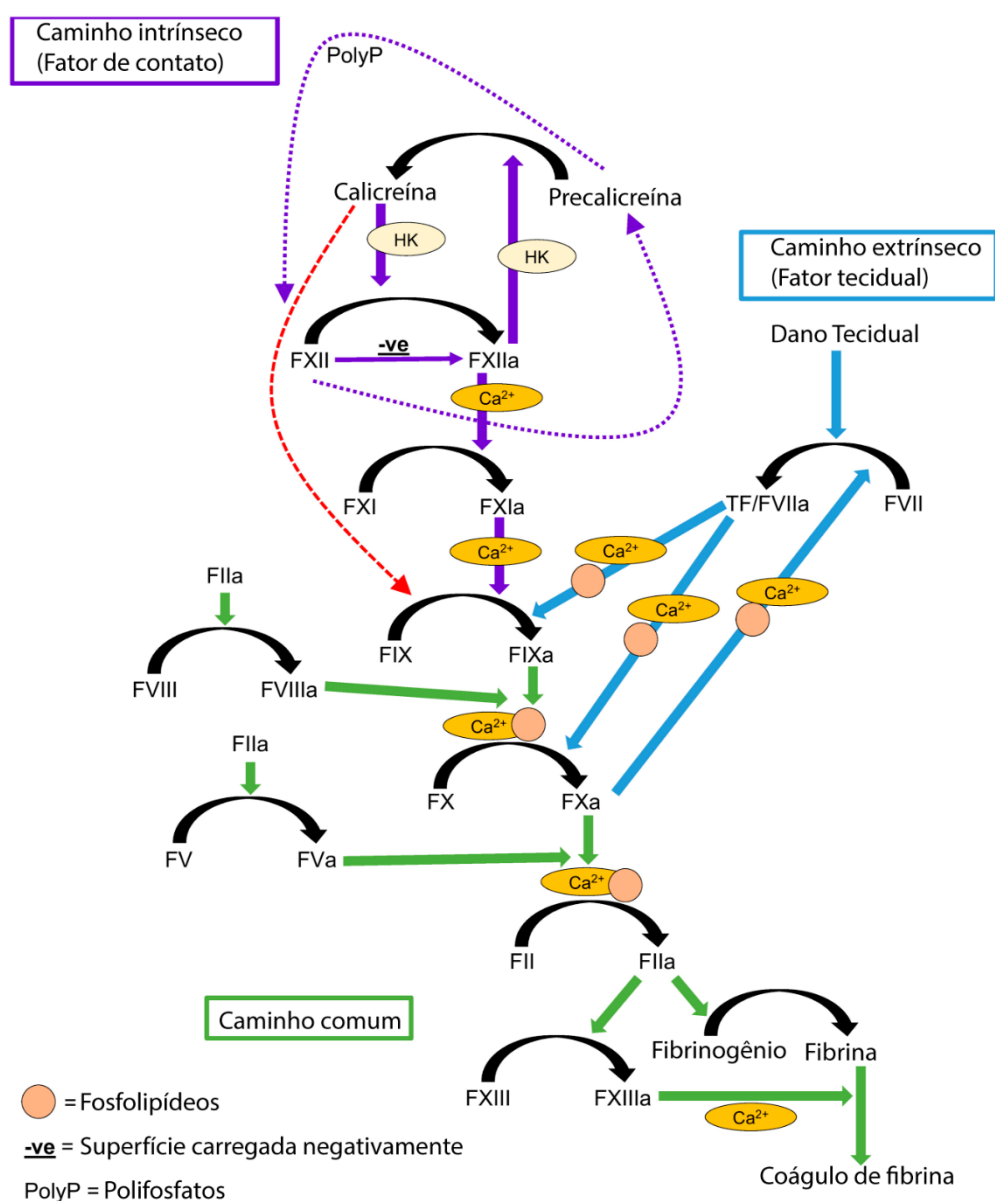
Os IPs são peptídeos ou proteínas que tem a capacidade de impedir a atividade catalítica de enzimas, podendo ser encontrada em todas as famílias de plantas, bem como, animais e microrganismos. Em plantas, os IPs podem atuar na regulação de processos biológicos e na defesa contra o ataque de animais, insetos e microrganismos (CLEMENTE et al., 2019; MOHAN et al., 2018). A esses IPs tem sido atribuídas diversas funções biológicas, como atividade inseticida (DANTZGER et al.,

2015), atividade anticâncer e antimicrobiana (CRUZ et al., 2019; SILVEIRA et al., 2017), atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonensis* (SILVA-LOPEZ et al., 2007) e *Trypanossoma cruzi* (NOGUEIRA, et al., 2013), atividade anti-inflamatória (MORAIS et al., 2018) e atividade antitrombótica (OLIVA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2021).

Como agente antimicrobiano, os IPs têm a capacidade de promover danos à membrana e/ou parede celular, alteração da permeabilidade celular, inibição da transcrição e/ou tradução e indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando transtornos metabólicos e energéticos (BONTURI et al., 2022; DIB et al., 2019). Além disso, eles têm um papel importante no controle do crescimento bacteriano e fúngico, com a inibição de peptidases secretadas e, em alguns casos como de fungos, alterações morfológicas que afetam a viabilidade celular ou geram apoptose (BONTURI et al., 2022).

Como agente anticancerígeno, o uso de IPs sugere a inibição a superexpressão ou ativação de peptidases que estimulam o desenvolvimento do câncer, uma vez que essas enzimas aumentam o fornecimento sanguíneo, extravasamento celular e a migração celular em casos de metástase (BONTURI et al., 2022). Um inibidor do tipo Kunitz, o inibidor de tripsina de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI), apresentou citotoxicidade a diversas cepas cancerígenas, como a células de câncer colorretal (HCT116 e HT29), células câncer de mama (SkBr-3 e MCF-7), células de leucemia humana (K562 e THP-1) e fibrosarcoma de rato (L929) sem afetar fibroblasto humano ou células-tronco mesenquimais (hMSCs) (BONTURI et al., 2022). No tratamento com o EcTI em linhagens de câncer de estômago (Hs726T), o inibidor apresentou um importante papel na alteração morfológica e no bloqueio da adesão, migração e invasão pela inibição da proteína-tirosina quinase de adesão focal (FAK) e redução da indução da plasmina ativadora de Pro-MMP-9 e Pro-MMP-2 mediadas por MT1-MMP (DE PAULA et al., 2012; NAKAHATA et al., 2011). Outros inibidores de serinopeptidases tem apresentado efeitos anticancerígenos, mas seu mecanismo de ação ainda não é bem definido, porém estudos indicam que seu mecanismo envolve a inibição da calicreína tecidual ("*Tissue Kallikrein*"), uma serinopeptidase importante na ativação e desenvolvimento do câncer (IM et al., 2021).

Figura 7 – Cascata da coagulação. O caminho intrínseco da coagulação é iniciado após ativação do Fator XII (FXII) em contato com uma superfície negativamente carregada (FXIIa). O FXIIa ativa a precalicreína para calicreína, que ativa ainda mais FXII. Na presença de uma superfície (como exemplo, colágeno ou endotoxinas), a ativação do FXII e da precalicreína em FXIIa e calicreína é amplificada pelo cofator cininogênio de alto peso molecular (HK), esse cofator é necessário para a adsorção à superfície ligada o FXII. Todavia, o FXII apresenta enzimas proteolíticas capazes de ativar a calicreína sem uma superfície (setas em roxo). Já a calicreína pode ativar a FXII, mas é necessária uma superfície carregada negativamente (setas em roxo). Seguindo FXII, o FXI é ativado para FXIa, e o FIX é ativado para FIXa. No caminho extrínseco é iniciado com lesão no tecido e exposição do fator tecidual (setas em azul). Ambos os fatores fazem a conversão de FX em FXa e realizam a ativação de protrombina em trombina (setas em verde). A trombina cliva o fibrinogênio em fibrina, que polimeriza e forma fibras de fibrina e ativam a FXIII. A calicreína pode ativar diretamente o FIX em FIXa, seguindo para a conversão do FX em FXa (seta em vermelho). Vale ressaltar que todos os fatores da coagulação são serinoproteases.



Fonte: (KEARNEY et al., 2021)

Os mecanismos de inibição dos IPs são categorizados em inibição irreversível e inibição reversível. A inibição irreversível é caracterizada quando ocorre a formação de uma ligação covalente entre a enzima e o inibidor, havendo uma alteração conformacional da enzima, alterando assim, seu mecanismo catalítico (RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004). A inibição reversível é quando o sítio reativo dos IPs, que possuem uma complementariedade estrutural ao sítio ativo das enzimas cognatas, interagem fortemente, havendo a formação de um complexo enzima inibidor inativo (CLEMENTE et al., 2019) (Figura 8).

Figura 8 – Mecanismos de interação dos inibidores de peptidases. A) Inibição irreversível. O inibidor faz uma clivagem em uma ligação peptídica, onde tem uma alteração conformacional. Por ser irreversível, o inibidor não recupera sua forma inicial e é chamado de inibidor suicida. B) Inibição reversível. O inibidor interage com o sítio reativo da enzima de uma forma semelhante ao do complexo enzima-substrato. O complexo enzima inibidor coexiste em equilíbrio com o inibidor em sua forma inicial. O inibidor varia de sua forma intacta, sem interação com a enzima e de sua forma modificada, com interação com a enzima. P1: Sítio reativo e RL: Loop reativo.

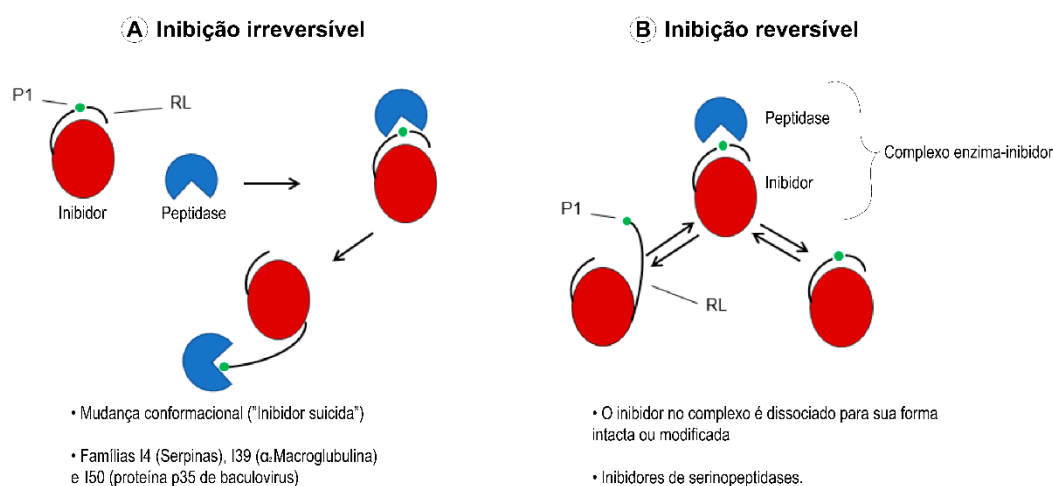


Imagem adaptada de CLEMENTE et al., 2019.

A classificação dos IPs segue o banco de dados MEROPS, definido por Rawling (2018), que separa os inibidores em 82 famílias, de acordo com sua homologia, que são agrupados em 39 classes em relação a sua estrutura terciária. Os IPs podem ser classificados segundo a classe de enzima que inibem. Segundo Rawling (2018), existem 9 diferentes grandes classes de enzimas proteolíticas: serinopeptidases, cisteinopeptidases, treoninopeptidases, peptidases aspárticas, glutamicopeptidases, metalopeptidases, asparigino peptídio liases, peptidases mistas e peptidases com sítio catalítico desconhecido. Essa classificação é baseada na tríade

catalítica de cada enzima (KOIWA; BRESSAN; HASEGAWA, 1997). Os IPs, podem ser separados por famílias, as quais são classificadas de acordo com sua estrutura primária: Abóbora, Bowman-Birk, Batata tipo I e Batata tipo II, Cereal, Cistatinas, Kunitz, Mostarda, Tomate, Thaumatin-like, dentre outros (BIRK, 2011; MARATHE et al., 2019; OLIVA et al., 2010). No banco de dados MEROPS, proposto por Rawlings e colaboradores (2004), a classificação dos IPs se dá de forma hierárquica, em novas classes, com famílias e espécies de inibidores (RAWLINGS et al., 2018).

Dentre as peptidases, temos as serinopeptidases, uma classe de enzima amplamente distribuída em todos os reinos, sendo sua grande maioria endopeptidases que são responsáveis por realizar hidrólises internas nas cadeias polipeptídicas, denominadas endopeptidases. Essas serinopeptidases apresentam semelhanças na questão estrutural, todavia apresentam especificidades quanto ao substrato, além disso, os resíduos catalíticos presentes na tríade catalítica dessas enzimas no geral são, *His*, *Asp* e *Ser*, sendo a *Ser* presente obrigatoriamente em todas elas (PAGE; DI CERA, 2008). Como exemplo, é possível citar a tripsina e a quimiotripsina, onde ambas apresentam *Ser*, *His* e *Asp* em sua tríade-catalítica. Enzimas com características semelhantes as da tripsina, apresentam maior afinidade de hidrólise de ligações adjacentes a aminoácidos de caráter básico, como Lys e Arg. Já enzimas com características semelhantes as da quimiotripsina, tem maior afinidade por hidrólise adjacente a aminoácidos aromáticos, como a Phe, Tyr, e Trp (SOUTO; BRANQUINHA; SANTOS, 2019).

2.4 Inibidores do tipo Kunitz

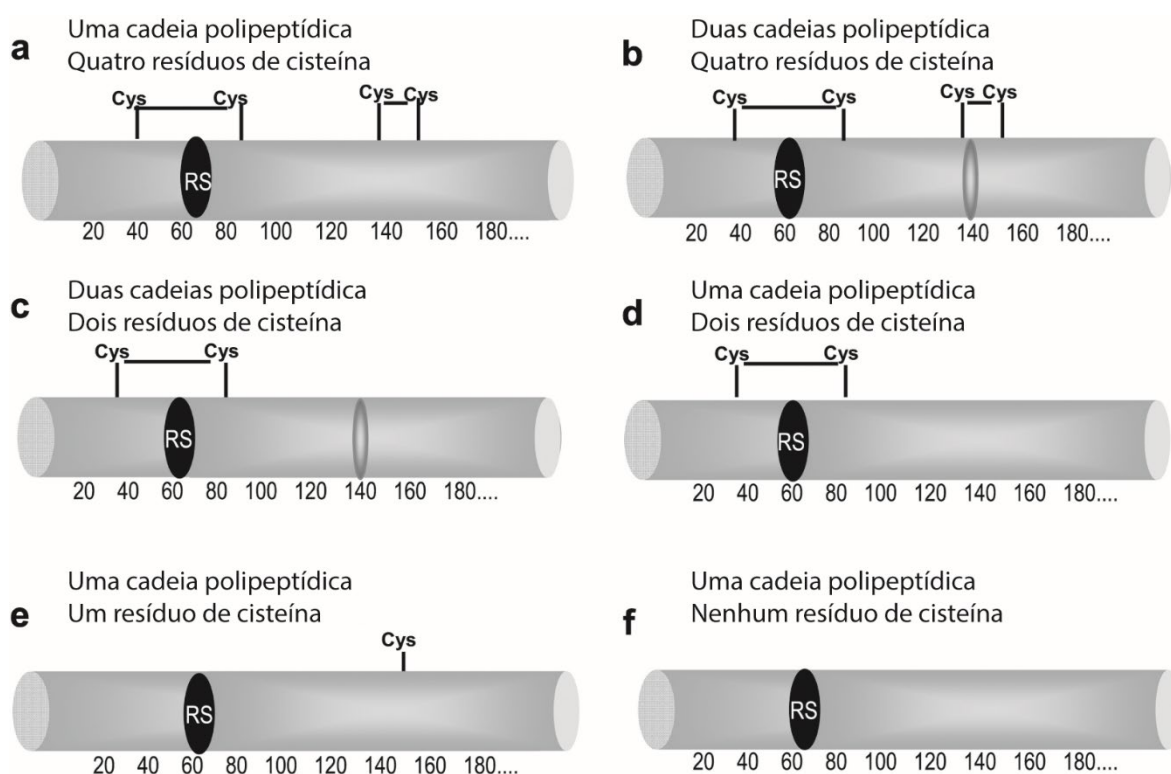
Dos inibidores de serinopeptidases que conhecemos, os inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk são amplamente encontrados em sementes da família Fabaceae, que é composta por três subfamílias: Faboideae (Papilionideae), Caesalpinioideae e Mimosoideae (OLIVA et al., 2010).

Os inibidores Bowman-Birk pertencem a subfamília I12 (inibidores de tripsina/quimiotripsina) e I199 (Inibidores de tripsina) (RAWLINGS et al., 2018). Esses inibidores geralmente apresentam 7 pontes dissulfeto, e quando originados de dicotiledôneas apresentam baixo peso molecular, com cerca de 6 a 9 kDa, apresentando 2 sítios reativos independentes. Quando originados de monocotiledôneas, esses inibidores são mais variados, como peso molecular que

varia de 8 a 16 kDa, onde podem apresentar variações no seu segundo sítio reativo e duplicações das regiões que contém cisteínas (GITLIN-DOMAGALSKA; MACIEJEWSKA; DĘBOWSKI, 2020).

Os inibidores do tipo Kunitz pertencem a subfamília I3A (origem vegetal) e I3B (origem animal) (RAWLINGS et al., 2018). No geral, esses inibidores são macromoléculas compostas por uma cadeia polipeptídica com um tamanho de aproximadamente 20 kDa, podendo variar entre 10 e 25 kDa, e apresentam 4 resíduos de Cys, formando duas pontes dissulfeto e apenas um sítio reativo. Porém existem inibidores Kunitz que não seguem esse padrão, podendo apresentar de 0 a 4 resíduos de Cys, formando uma ou nenhuma ponte dissulfeto (Figura 9). Esses inibidores geralmente tendem a inibir aspártico, cisteino e serinopeptidases, não sendo relatado inibição em metalopeptidases (DIB et al., 2019; OLIVA et al., 2010).

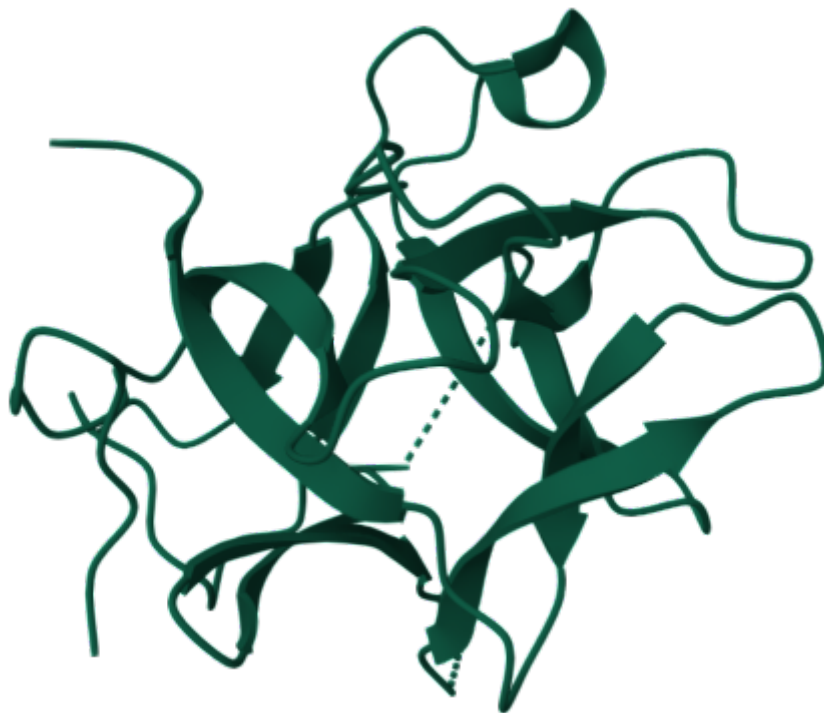
Figura 9 – Esquema de estrutura primária dos inibidores do tipo Kunitz baseado no número de ligações dissulfeto e cadeias polipeptídicas. A) uma cadeia polipeptídica e 4 resíduos de cisteína, com 2 pontes dissulfeto; B) duas cadeias polipeptídicas e 4 resíduos de cisteína, com 2 pontes dissulfeto; C) duas cadeias polipeptídicas e 2 resíduos de cisteína, com uma ponte dissulfeto; D) uma cadeia polipeptídica e 2 resíduos de cisteína, com uma ponte dissulfeto; E) uma cadeia polipeptídica e 1 resíduo de cisteína, com nenhuma ponte dissulfeto; e f) uma cadeia polipeptídica e nenhum resíduo de cisteína, com nenhuma ponte dissulfeto.



Fonte: (OLIVA et al., 2010)

Quanto a sua estrutura secundária, os inibidores do tipo Kunitz não apresentam α -hélice, sendo sua estrutura composta por 12 folhas- β antiparalelas interconectadas por *loops* e *random coils* (Figura 10) (OLIVA et al., 2010).

Figura 10 – Estrutura obtida por cristalografia do EcTI.



Fonte: PDB:4J2Y (ZHOU et al., 2013a).

A formação do complexo enzima-inibidor se dá pela forma como os resíduos de ambas macromoléculas conseguem se estabilizar pelo compartilhamento de nuvens eletrônicas. O resíduo Asn189 do sítio ativo enzimático é capaz de interagir com resíduos de aminoácidos básicos, como Lys e Arg, presente na cadeia lateral dos sítios reativos dos inibidores ou ainda presentes em seus substratos. A exemplo do inibidor EcTI, que possui na posição P1 o resíduo Arg64, capaz de interagir com o resíduo S1 Asn189 no sítio ativo enzimático. Além dessa interação, 8 resíduos do EcTI formam ligações de hidrogênio e outros 11 estabelecem interações hidrofóbicas com o sítio ativo enzimático. Grande parte dos resíduos citados em EcTI estão presentes no sítio reativo do inibidor (ZHOU et al., 2013a).

Além da tripsina, o EcTI apresentou alta atividade inibitória contra outras serinopeptidases, como àquelas relacionadas aos fatores da coagulação, onde conseguiu inibir a calicreína, plasmina e o fator de coagulação XIIa (ZHOU et al., 2013a). Diversos inibidores do tipo Kunitz tem apresentado propriedades biológicas contra microrganismos patogênicos, atividade anticâncer, inseticida e outros efeitos, o que tem elencado cada vez mais o estudo sobre novos IPs e suas ações biológicas.

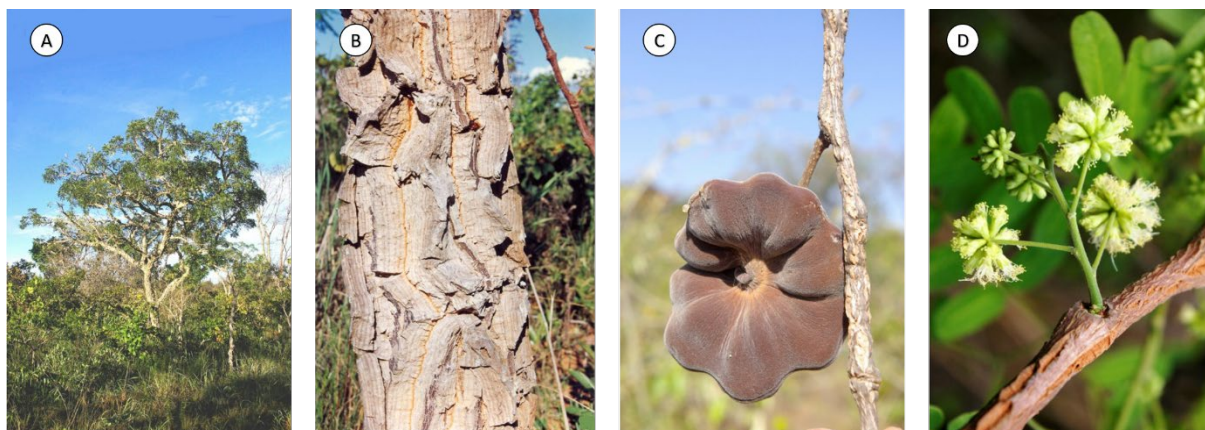
2.5 Inibidor de peptidases de sementes de *Enterolobium gummiferum*

Fabaceae é a terceira maior família de plantas, com 740 gêneros e 19.400 espécies (TEKDAL, 2021). É classificada em três subfamílias: Faboideae (Papilionideae), Caesalpinioideae e Mimosoideae (KENICER, 2006). As sementes dessa família são ricas em IPs, principalmente os inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk.

O gênero *Enterolobium* sp. é um importante gênero da família Fabaceae e pertencente a subfamília Mimosoideae. O uso tradicional de plantas do gênero *Enterolobium* varia, sendo: o *Enterolobium cyclocarpum* utilizado na produção de barcos, carvão e readequação do solo. Suas sementes são utilizadas como fonte de proteínas e minerais em sopas, caldos e infusões, além de ter tido propriedades medicinais associadas.; *Enterolobium saman* é utilizado como remédio para resfriados, diarreias, dores de cabeça e problemas gastrointestinais. A cocção de sua raiz é utilizada no tratamento de câncer de estômago. A infusão de sua folha é utilizada como laxativo e suas sementes como tratamento para tosse. O extrato alcoólico de suas folhas é utilizado para inibição do *Mycobacterium tuberculosis* e a decocção do fruto como analgésico (GAMAL EL-DIN et al., 2017).

O *E. gummiferum* (Fabaceae, Mimosoideae) é uma árvore com ampla distribuição no Brasil, principalmente na Amazônia e no Cerrado (Figura 11) (MORIM; SILVA; MESQUITA, [s.d]).

Figura 11 - Planta *E. gummiferum* e suas características morfológicas. A) Árvore em habitat natural; B) Superfície do ritidoma; C) Fruto maduro; e D) Cacho de inflorescências.



Fonte: <https://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/07/01/enterolobium-gummiferum-mart-j-f-macbr-2/>

Os IPs do tipo Kunitz são amplamente encontrados nas sementes de *Enterolobium* sp., onde as propriedades biológicas desses inibidores têm demonstrado atividade contra diversos tipos de câncer (DE PAULA et al., 2012; NAKAHATA et al., 2011); inseticida (DA SILVA FERREIRA et al., 2019); e antifúngica (DE OLIVEIRA et al., 2018). Todavia, não foi encontrado na literatura estudos que demonstrem características moleculares e biológicas sobre o inibidor de peptidases de *E. gummiferum*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização físico-química e investigar o potencial antimicrobiano do inibidor de peptidases de sementes de *E. gummiferum* (EgPI).

3.2 Objetivos específicos

Estabelecer um processo cromatográfico para a purificação para o EgPI;

Investigar as atividades inibitórias do EgPI contra as enzimas tripsina e quimiotripsina;

Determinar a sequência primária aminoterminal do EgPI;

Investigar o potencial antimicrobiano do EgPI contra bactérias e fungos planctônicos e formadores de biofilme;

Investigar o potencial antiparasitário do EgPI contra *T. cruzi*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Purificação do inibidor de peptidases de *Enterolobium gummiferum*

4.1.1 Obtenção da farinha de sementes de *E. gummiferum*

As sementes de *E. gummiferum* foram obtidas da empresa Arbocenter (Birigui, São Paulo, Brasil). As sementes tiveram seu tegumento retirado e em seguida o endosperma foi triturado em um moinho elétrico. A farinha obtida passou por uma peneira para uniformização e obtenção de farinha de fina granulação. Essa farinha passou por um processo de delipidação com hexano por 8 h, havendo a troca do solvente cada 2 h, onde foi retirado grande parte de seus componentes apolares. Após delipidação, a farinha foi transferida para uma bandeja contendo papel filtro para volatilização do solvente.

4.1.2 Obtenção do extrato bruto proteico

O extrato bruto proteico (EB) foi obtido através da farinha delipidada, a qual foi submetida a uma extração proteica utilizando tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH 7,6, na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante *overnight* em uma temperatura de 4 °C. O material obtido dessa extração foi centrifugado a 10.600 xg por 30 min em uma temperatura de 4 °C, sendo obtido 2 frações: precipitado e sobrenadante. O sobrenadante e o precipitado foram separados, onde a fração precipitado foi descartada e a fração sobrenadante, contendo as proteínas da extração, foi dialisada em saco de diálise de 3,4 kDa contra água destilada e liofilizada. O material obtido foi denominado extrato bruto (EB), sendo utilizado nas etapas de purificação.

4.1.3 Cromatografia em coluna de gel filtração Sephadex G-100

O EB obtido foi dissolvido em tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,02 mol/L (125 mg/mL). A solução obtida foi homogeneizada e incubada em banho de ultrassom por 5 min e posteriormente clarificada em centrífuga a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi filtrado com auxílio de uma seringa e filtro de 0,2 µm e aplicado em coluna de gel filtração Sephadex G-100 (3 x 80 cm) equilibrada previamente em tampão AMBIC 0,02 mol/L. Frações de 5 mL foram coletadas a 18

mL/h. As frações coletadas foram analisadas quanto ao teor de proteínas utilizando o espectrofotômetro *Evolution 200* (Thermo Scientific) nos comprimentos de onda 216 e 280 nm, para a construção do perfil cromatográfico. As frações que corresponderam aos picos reunidos e utilizados em ensaios de atividade inibitória contra tripsina bovina, para a determinação do pico onde o inibidor estivesse majoritariamente presente. As frações foram reunidas, dialisadas e liofilizadas. O pico com atividade inibitória foi denominado EgPI G-100.

4.1.4 Cromatografia em coluna de hidrofobicidade Phenyl-Sepharose

A fração EgPI G-100 foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L contendo sulfato de amônio 0,04 mol/L, pH 7,2 e injetado em coluna de hidrofobicidade HiPrep 16/10 Phenyl HP (*Cytiva*), equilibrada no mesmo tampão, em uma vazão de 5 mL/min. Como tampão de lavagem, foi utilizado fosfato de sódio 0,1 mol/L contendo sulfato de amônio 0,04 mol/L, pH 7,2, e após 5 volumes de coluna, as moléculas adsorvidas foram eluídas com água destilada. Os picos foram coletados automaticamente em um *Akta Pure* (*Cytiva*). O *software Unicorn* foi ajustado para realizar a coleta automática dos picos. Assim, os picos coletados tiveram suas atividades inibitórias determinadas. O pico que apresentou maior atividade inibitória contra a enzima tripsina bovina foi dialisado, liofilizado e denominado EgPI.

4.2 **Quantificação de proteínas**

Todo o material proteico obtido teve sua concentração determinada através do método de Bradford (1976). Como padrão, foram utilizadas soluções de albumina do soro bovino (BSA) na concentração de 0,5 – 0,03 mg/mL. Para a leitura de absorbância foi utilizado o leitor de microplacas *Varioskan LUX* (*Thermo Scientific*) no comprimento de onda de 595 nm.

4.3 **Atividade inibitória**

Os ensaios de atividade inibitória contra a enzima tripsina bovina foram realizados de acordo com Oliveira et al. (2012). Uma alíquota de 4 µL de tripsina (0,25 mg/mL) e 62 µL de Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8,0, foi misturada com 4 µL de diferentes concentrações de EgPI, as quais foram incubadas por 10 min a 30 °C. Um volume de 200 µL de 1 mmol/L de BApNA foi adicionado e a hidrólise do substrato acompanhada

a 410 nm durante 30 min, com leituras em intervalos de 5 min, em um leitor de microplacas *Varioskan LUX* (*Thermo Scientific*, São Paulo, Brasil). Uma Unidade de Inibidor de Tripsina (TIU) foi definida como a quantidade de inibidor capaz de diminuir em 0,01 unidades de absorbância a 410 nm.

4.4 Determinação da constante de dissociação e estequiometria

Para determinação dos parâmetros cinéticos da constante de dissociação (K_i), foram utilizadas diferentes concentrações de EgPI (0,021, 0,0105, 0,00525, 0,002625 e 0,001312 mmol/L) e BApNA (0,5, 1,0 e 3,0 mmol/L). A razão estequiométrica entre EgPI e tripsina foi determinada usando o ensaio de atividade inibitória da tripsina. Foram realizados ensaios na proporção de 0, 0,25, 0,5 e 1,0 entre tripsina e EgPI. Três ensaios independentes foram realizados em triplicata.

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12,5%

O SDS-PAGE foi realizado de acordo com o método definido por Laemmli (1970). O gel preparado é feito em duas partes, sendo a primeira parte definida como gel de corrida, onde apresenta uma malha de poliacrilamida de 12,5%, sendo essa responsável pela separação das proteínas de acordo com o peso molecular. A segunda parte definida como gel de empilhamento e apresenta uma malha de poliacrilamida de 5%, sendo essa responsável por alinhar as proteínas para o início da separação.

O gel de corrida é preparado utilizando 12,5% de acrilamida; tampão Tris-HCl 1,5 mol/L, pH 8,8; 0,1% de dodecil sulfato de sódio; água; persulfato de amônio; e Tetrametiletilenodiamina. O gel de empilhamento é preparado utilizando 5% de acrilamida; tampão Tris-HCl 0,5 mol/L, pH 6,8; 0,1% de dodecil sulfato de sódio; água; persulfato de amônio; e Tetrametiletilenodiamina. Para o preparo dos géis, foi utilizado o sistema de eletroforese *SE 250 Minivertical*, da empresa *Cytiva*. As amostras preparadas foram dissolvidas em tampão de amostra contendo Tris, glicina, dodecil sulfato de sódio, água e azul de bromofenol. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Amersham ECL Rainbow marker – High Range* (*Cytiva*). A corrida foi realizada a 100 V com amperagem livre. Os géis obtidos foram corados em uma solução de *Comassie Blue*, e o excesso foi removido em solução contendo ácido acético e metanol.

4.6 Sequenciamento amino terminal

A sequência amino-terminal de EgPI foi determinada em um sequenciador automático de proteínas *Shimazu* PPSQ-33B (*Shimadzu*, Japão), realizando a degradação de Edman. Aminoácidos de feniltiohidantoína (PTH), os derivados de aminoácidos liberados durante a análise de sequência, foram detectados a 269 nm em uma coluna *Wakopak® Wakosil* PTH-II (4,6 mm x 250 mm) (*Wako Fujifilm*, Japão). O alinhamento foi pesquisado usando o sistema de busca NCBI-Blastp (ALTSCHUL et al., 1990). O alinhamento múltiplo foi realizado com *T-Coffee* expresso (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). A similaridade dos resíduos apresentados no alinhamento foi realizada com o *software* Clustal W (LARKIN et al., 2007).

4.7 Dicroísmo Circular

O EgPI foi submetido a uma análise de espectro de Dicroísmo Circular (DC) na região do UV-distante (160 - 240 nm) em um espectropolarímetro JASCO J-1100. Inicialmente, a estrutura secundária de EgPI (33 µmol/L) foi determinada em tampão fosfato 10 mmol/L, pH 7,6, a 25 °C. Em seguida, foi obtida uma curva de desnaturação térmica submetendo o inibidor a uma faixa de temperatura de 20 a 90 °C, com um período de 10 min de incubação em cada temperatura antes da coleta dos espectros. Para analisar a conformação da estrutura secundária sob condições redutoras, EgPI foi incubado com 1 mmol/L DTT. Além disso, a coleção de estrutura secundária de EgPI em diferentes pH foi analisada com tampão citrato de sódio 10 mmol/L (pH 2 e 4); tampão fosfato 10 mmol/L (pH 6 e 8) e bicarbonato de sódio 10 mmol/L (pH 10). Os espectros de varredura (190 – 250 nm) foram coletados em cubetas de quartzo de 1 mm com uma taxa de varredura de 50 nm/min, com alcance de 0,1 nm e tempo de integração digital de 4 seg. Cada espectro obtido é o resultado de 10 acumulações. A porcentagem de estrutura secundária foi prevista utilizando o servidor *Dichroweb* por meio do algoritmo *CONTIN*.

4.8 Ensaios microbiológicos

Os microrganismos utilizados para os ensaios microbiológicos pertencem à coleção do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas

(LPPFB), constituída por fungos e bactérias da *American Type Culture Collection* (ATCC). As suspensões contendo os microrganismos são armazenadas em glicerol 10% estéril, a -80 °C.

Para os ensaios antibacterianos, as cepas utilizadas foram: Gram-positivas *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 49453, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) ATCC 43300, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970 e *Staphylococcus epidermits* ATCC 12228; e uma Gram-negativa, a *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os meios foram preparados de acordo com o fabricante e os microrganismos foram primeiramente inoculados em TSA (Ágar Triptona de Soja, 15,0 g/L triptona, 5,0 g/L digestão papaica de soja e 5,0 g/L cloreto de sódio) e incubados a 37 °C por 24 h, seguindo a exigência de oxigênio de cada bactéria. As colônias foram adicionadas em solução salina (NaCL 0,9%) estéril e homogeneizadas em vórtex por 15 seg até a obtenção de suspensão com turvação igual a 0,5 da escala Mac Farland ($1,0 \times 10^8$ Unidades Formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL)) determinado em um turbidímetro. Essa suspensão foi diluída para a obtenção de uma solução apresentando o equivalente à concentração final de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL.

Para ensaios antifúngicos, as cepas utilizadas foram: *Candida albicans* ATCC 5314, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida guilliermonds* ATCC 6260, *Candida tropicalis* ATCC 750 e *Candida glabrata* ATCC 90030. Os meios foram preparados de acordo com o fabricante e os microrganismos foram primeiramente semeados em ASD (Ágar de Dextrose Sabouraud, 40,0 g/L dextrose, 10,0 g/L peptona e 20,0 g/L ágar) e incubados a 37 °C por pelo menos 24 h, seguindo a exigência de oxigênio de cada fungo. As colônias foram adicionadas em solução salina (NaCL 0,9%) estéril até a obtenção de suspensão com turbidez equivalente à concentração final de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL.

4.8.1 Ensaio antibacteriano

O ensaio antimicrobiano realizado foi o de concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição, de acordo com o protocolo M07 09 do *Clinical and Laboratory Standarts Institute* (CLSI) (2012). O meio de cultura estéril foi utilizado como controle negativo do ensaio, por não ocasionar nenhuma inibição sobre o crescimento bacteriano; o antibiótico cloranfenicol ($124 \mu\text{mol/L}$) foi utilizado como

controle positivo, por ser um antibiótico eficiente na inibição do crescimento de bactérias. A CIM é definida com a menor concentração dos compostos que inibem o crescimento bacteriano em 24 h.

4.8.2 Ensaio antifúngico

O ensaio antifúngico realizado foi o de CIM pela técnica de microdiluição, de acordo com o protocolo M07 09 do CLSI. O meio de cultura estéril foi utilizado como controle negativo do ensaio, por não ocasionar nenhuma inibição sobre o crescimento fúngico; o antifúngico Anfotericina B ($10,82 \mu\text{mol/L}$) foi utilizado como controle positivo, por ser um antifúngico eficiente na inibição de crescimento de fungo. A CIM é definida com a menor concentração dos compostos que inibem o crescimento fúngico em 24 h.

4.8.3 Ensaio de inibição do biofilme

Os ensaios antibiofilme foram adaptados da metodologia proposta por Filloux e Ramos (2014). O ensaio consiste na utilização de microplaca de 96 poços com fundo chato e tampa. Na placa, foi distribuído 170 μL de BHI com 1% de glicose, 20 μL do inóculo fúngico e 10 μL de salina nos poços de controle negativo; 10 μL de anfotericina B nos poços de controle positivo; e 10 μL do EgPI em diferentes concentrações. Após o processo de preparo, a placa foi incubada à 37 °C por 24 h. Em seguida, os poços foram cuidadosamente aspirados e lavados com 100 μL de água destilada estéril, no qual o sobrenadante foi descartado e adicionado 125 μL de cristal violeta 0,1% nos poços e a placa foi incubada por mais 10 min. Após incubação, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com 100 μL de água destilada estéril. Após lavagem, a placa foi seca, em temperatura ambiente, por pelo menos 2 h. Após secagem, foi adicionado 150 μL de ácido acético 30% e incubado por 10 min, então, os poços foram homogeneizados e 125 μL foi transferido para uma nova microplaca de 96 poços de fundo chato com tampa para leitura. Para a leitura de absorbância, foi utilizado o leitor de microplacas *Varioskan LUX (Thermo Scientific)* no comprimento de onda de 550 nm.

4.8.4 Ensaio de erradicação do biofilme

Os ensaios antibiofilme foram adaptados da metodologia proposta por Filloux e Ramos (2014). O ensaio consiste na utilização de microplaca de 96 poços com fundo chato e tampa. Na placa, foi distribuído 180 μ L de BHI com 1% de glicose, 20 μ L do inóculo fúngico em todos os poços a serem analisados. Após o processo de preparo, a placa foi incubada à 37 °C por 24 h. Em seguida, os poços foram cuidadosamente aspirados e foi adicionado 190 μ L de BHI com 1% de glicose e 10 μ L de salina no controle negativo; 10 μ L de anfotericina B no controle positivo; e 10 μ L de EgPI em diferentes concentrações. Em seguida, os poços foram cuidadosamente aspirados e lavados com 100 μ L de água destilada estéril, no qual o sobrenadante foi descartado e adicionado 125 μ L de cristal violeta 0,1% nos poços e a placa foi incubada por mais 10 min. Após incubação, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com 100 μ L de água destilada estéril. Após lavagem, a placa foi seca, em temperatura ambiente, por pelo menos 2 h. Após secagem, foi adicionado 150 μ L de ácido acético 30% e incubado por 10 min, então, os poços foram homogeneizados e 125 μ L foi transferido para uma nova microplaca de 96 poços de fundo chato com tampa para leitura. Para a leitura de absorbância, foi utilizado o leitor de microplacas *Varioskan LUX* (*Thermo Scientific*) no comprimento de onda de 550 nm.

4.9 **Análise estatística**

Todos os valores foram obtidos após realização dos experimentos ao menos 2 vezes em triplicata, onde os ensaios foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram examinados utilizando a análise de variância (ANOVA), seguida de teste *post hoc* de Tukey considerando p-valor de $\leq 0,05$ como significativo. A análise foi realizada através do Graphpad Prism 8.

5 **RESULTADOS**

5.1 **Purificação do EgPI**

O EB teve sua concentração proteica determinada por Bradford, onde apresentou uma concentração de 49% de proteína. O processo de purificação do inibidor foi realizado em duas etapas, onde ensaios de inibição enzimática foram realizados com tripsina bovina a fim de rastrear o inibidor desde o EB até os picos obtidos nas cromatografias.

5.1.1 Cromatografia em coluna de gel filtração Sephadex G-100

A cromatografia em coluna de gel filtração Sephadex G-100 separou o EB em três picos, os quais passaram por ensaios de atividade inibitória (Figura 12). O pico 2, denominado EgPI G-100, apresentou maior atividade inibitória contra a tripsina bovina (Figura 13).

Figura 12 – Ensaio de atividade inibitória contra tripsina dos três picos obtidos pela coluna de gel filtração Sephadex G-100.

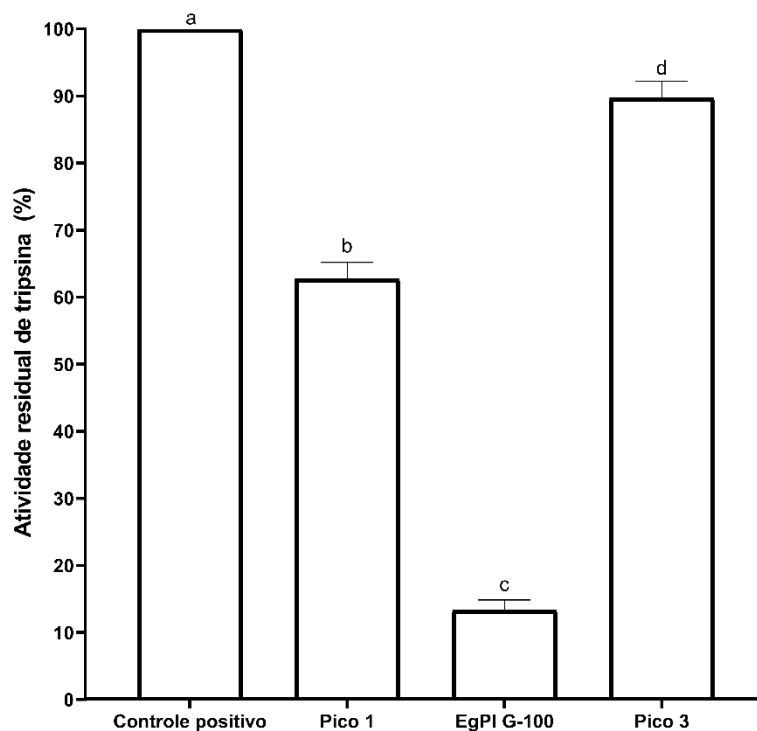
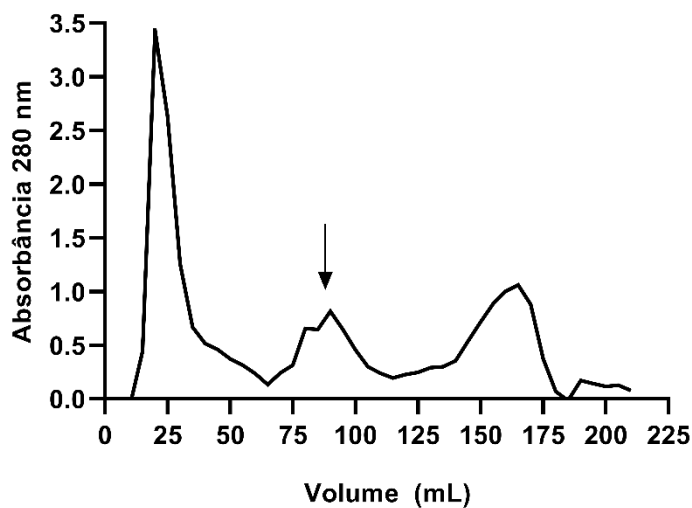


Figura 13 – Primeira etapa de purificação do EgPI. Cromatograma obtido do uso do EB separado em coluna de gel filtração Sephadex G-100. Pico 2 foi o pico que apresentou atividade inibitória, sendo denominado EgPI G-100 (Seta).

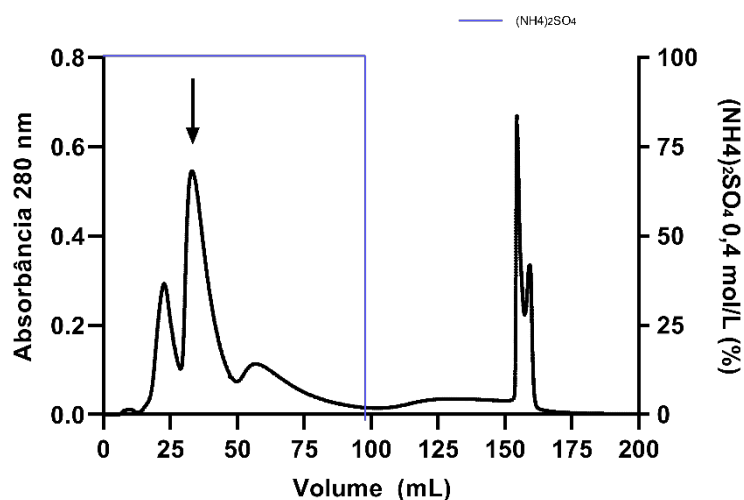


5.1.2 Cromatografia em coluna de hidrofobidade Phenyl-Sepharose

Após a obtenção do EgPI G-100, o pico foi dialisado e liofilizado, para então, ser submetido a cromatografia em coluna de hidrofobicidade Phenyl-Sepharose. A

Phenyl-Sepharose separou o EgPI G-100 em cinco picos, onde os três primeiros saíram na presença do tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4 mol/L (Figura 14). A presença de altas concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ocasiona o *salting out effect*, que é responsável por afetar o grau de solvatação das proteínas de maneiras diferentes, aumentando a interação proteína-proteína com o aumento de hidrofobicidade, consequentemente, aumentando sua afinidade com a coluna. Todavia, altas concentrações deste sal ocasionam precipitação da amostra, ocasionando diminuição no rendimento. Todos os 5 picos foram submetidos a ensaios de atividade inibitória, onde o pico 2, que foi denominado EgPI, apresentou maior atividade inibitória.

Figura 14 – Segunda etapa de purificação do EgPI. Cromatograma obtido do uso do EgPI G-100 separado em coluna de hidrofobicidade Phenyl-Sepharose. Pico 2 foi o que apresentou maior atividade inibitória, o qual saiu na concentração de tampão fosfato 0,1 M com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4 $\mu\text{mol/L}$, sendo denominado EgPI (Seta).



5.1.3 Tabela de purificação

A tabela de purificação foi realizada com as amostras obtidas desde o EB até o EgPI, onde foi possível observar que, quando comparado ao EB, o EgPI apresentou uma atividade específica para o inibidor e um processo de purificação maior que 10 vezes (Tabela 1).

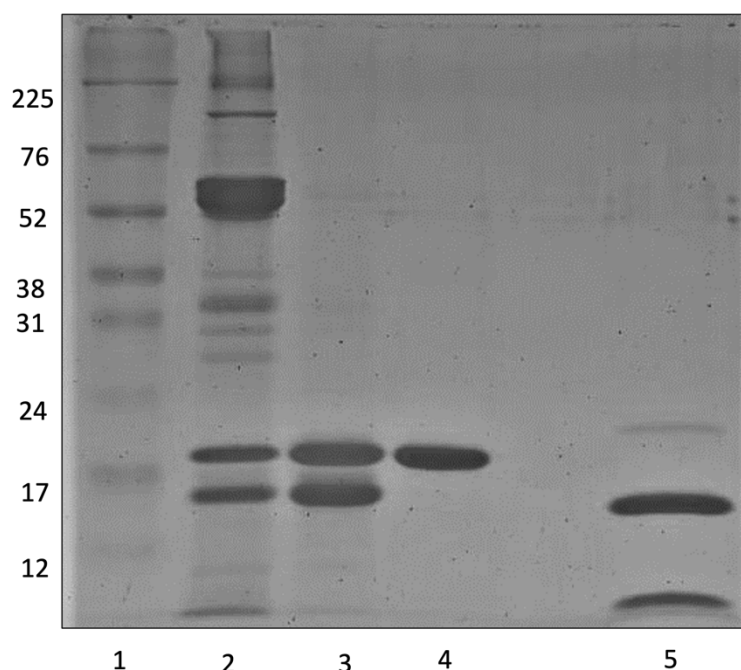
Tabela 1 - Tabela de purificação de EgPI. A purificação foi realizada a partir de 100 mg de EB.

Passos	Proteína Total (mg)	Atividade Total (TIU) x 10⁵	Atividade específica (TIU/mg) x 10⁴	Rendimento (%)	Purificação
Extrato Bruto	100,00	12,62	1,26	100,00	1,00
G-100	21,42	10,27	4,80	81,38	3,80
Phenyl-Sepharose	5,41	7,13	13,17	56,46	10,44

5.2 SDS-PAGE 12,5%

Para análise do processo de purificação dos picos obtidos durante os processos cromatográficos, foi utilizada a SDS-PAGE 12,5% (Figura 15). No EB, foi possível observar a presença de 3 bandas majoritárias, onde apenas duas se mantiveram no EgPI G-100 pela técnica utilizada, que separa a amostra por tamanho. Nesta primeira purificação, foi possível observar que duas bandas mantiveram majoritariamente, sendo elas, proteínas que apresentavam tamanho maior que 12,5 kDa e menor que 24 kDa. Quando o EgPI G-100 passou pela cromatografia por hidrofobicidade, apenas uma banda de ~18 kDa se manteve presente no gel, demonstrando que o processo de purificação foi bem-sucedido. Para um primeiro processo de análise estrutural, o inibidor foi incubado com um agente redutor DTT. Observamos que EgPI é formado por duas cadeias polipeptídicas de aproximadamente ~15 kDa e ~5 kDa.

Figura 15 - SDS-PAGE 12,5% mostrando os resultados das etapas de purificação e sua massa molecular: 1: Marcador de alto peso molar (kDa), 2: extrato bruto, 3: EgPI-G100, 4: EgPI, 5: EgPI reduzido com 0,1 M DTT.



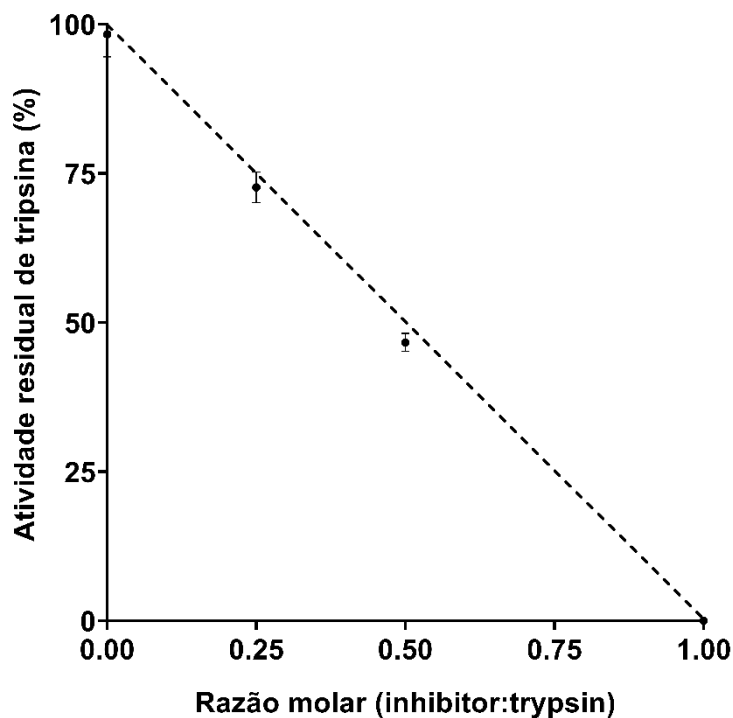
5.3 Propriedades inibitórias do EgPI

Com a realização aos ensaios inibitórios contra a tripsina bovina, foi realizado a estequiometria de inibição e a constante de dissociação (K_i) do EgPI. Essas análises são realizadas através da determinação da atividade catalítica da enzima em diferentes concentrações da enzima, inibidor e do substrato.

5.3.1 Estequiometria de inibição

Para a análise da estequiometria de inibição, o inibidor e a enzima foram incubados em diferentes concentrações molares, sendo assim, possível observar a molaridade necessária de inibidor para inibir uma certa quantidade de enzima. Os ensaios com EgPI, demonstraram que ele é um inibidor que chega em sua inibição completa na proporção molar de 1:1, ou seja, é necessária uma molécula de inibidor para inibir uma molécula de tripsina (figura 16). Essa razão de inibição 1:1 é observada em moléculas que apresentam apenas um único sítio reativo, característica de muitos inibidores do tipo Kunitz.

Figura 16 – Estequiometria da inibição de tripsina bovina do EgPI.



5.3.2 Coeficiente de inibição

Para análise do coeficiente de inibição (K_i) foi realizado testes de hidrólise enzimática com diferentes concentrações do substrato BApNA, onde os resultados foram submetidos às equações de Michaelis-Menten, Dixon e Lineweaver-Burk, onde demonstraram que o EgPI apresenta uma inibição do tipo competitiva e um valor de K_i de $8,4 \times 10^{-9}$ mol/L, o que indica uma alta afinidade entre o EgPI e a tripsina bovina, outra característica de inibidores do tipo Kunitz.

5.4 Sequenciamento Amino-terminal

O sequenciamento amino-terminal foi obtido pela análise dos 25 primeiros resíduos de aminoácidos. A pesquisa realizada através do NCBI-BLASTp revela que o EgPI apresenta homologia com outros inibidores da família Kunitz (I3) (Tabela 2), dentre eles, as maiores similaridades foram observadas para os EcTI (68%), AcTI (64%) e PjTI (60%).

Tabela 2 - Alinhamento da sequência aminoterminal. EcTI, *Enterolobium contortisiliquum*; AcTI, *confusa*; *Prosopis juliflora*; STI, *Glicine max*. Resíduos idênticos estão marcados em cinza, substituições conservadas estão marcados em cinza escuro. A similaridade está representada como: (*) resíduos idênticos; (:) resíduos com alta similaridade; (.) resíduos com baixa similaridade; e a ausência de marcação com resíduos sem similaridade.

		Identidade (%)
EgPI	SELLDSDGDILDAGGAYYALPAVVS	
EcTI	KELLSDGDILRNGGTYIILPALRG	68
AcTI	KELLDADGDILRNGGAYYIILPALRG	64
PjTI	QELLDVDGEILRNGGSYYIILPAFRG	60
Similaridade	.***** **:** **:** ***. .	

5.5 Estudos de estabilidade do EgPI

Os estudos de estabilidade do EgPI foram realizados utilizando o dicróismo circular, onde foi analisado os diferentes espectros obtidos em diferentes condições de temperatura e pH. As análises foram realizadas na região do UV-distante, que consiste na faixa de 160 a 240 nm, sendo essa a faixa ideal para análise de estrutura secundária de proteínas pela presença de transições eletrônicas das ligações peptídicas. A predição da estrutura secundária foi realizada utilizando o algoritmo CONTIN (Tabela 3).

Tabela 3 – Determinação da estrutura secundária do EgPI em diferentes condições por dicróismo circular.

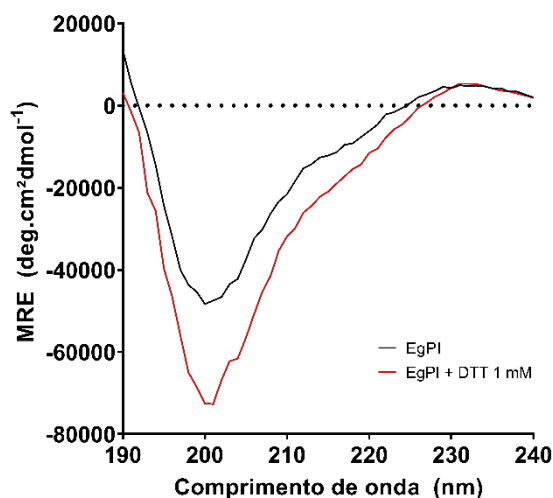
Condições de incubação	Conteúdo de estrutura secundária (%)			
	α -hélice	Folha- β	Random coil	Loop
EgPI	2,9	21,6	45,7	29,8
EgPI + DTT (1 mM, 30 °C, 30 min)	7,6	8,3	49,5	34,6
EgPI a 20 °C	6,6	38,3	32,9	22,2
EgPI a 30 °C	6,6	38,3	32,9	22,2
EgPI a 40 °C	9,9	14,4	40,7	35,0
EgPI a 50 °C	9,0	7,2	40,9	33,7
EgPI a 60 °C	9,2	15,1	42,1	33,5
EgPI a 70 °C	25,6	8,4	33,7	32,3
EgPI a 80 °C	36,1	8,0	24,6	31,2
EgPI a 90 °C	38,0	5,4	31,9	24,7
EgPI em pH 2.0	5,4	13,3	46,2	35,0
EgPI em pH 4.0	10,5	10,9	39,7	39,0
EgPI em pH 6.0	8,6	13,5	44,1	33,8
EgPI em pH 8.0	5,2	17,1	44,6	33,2
EgPI em pH 10.0	7,6	9,7	31,9	34,5

5.5.1 Estabilidade a o Ditiotreitól (DTT)

O EgPI em condições ideais apresenta uma elipticidade mínima e negativa em aproximadamente 200 nm, e uma elipticidade máxima e positiva em aproximadamente 230 nm (figura 18). A predição da estrutura secundária foi realizada utilizando o algoritmo CONTIN. Nativamente, o EgPI é composto majoritariamente de folhas- β (21,6%) e estrutura desordenada (45,7%).

Na presença do DTT, é possível observar uma intensificação na elipticidade mínima, que começa a reduzir a partir de aproximadamente 230 nm e tem seu mínimo em aproximadamente 200 nm (figura 17). A predição da estrutura secundária foi realizada utilizando o algoritmo CONTIN, que revelou que a presença do DTT reduziu significativamente a presença de folhas- β (8,3%) e apresentou um aumento de α -hélice (7,6%).

Figura 17 – Dicroísmo circular do EgPI nativo (preto) e em condições de redução após incubação com DTT 1mmol/L (vermelho).

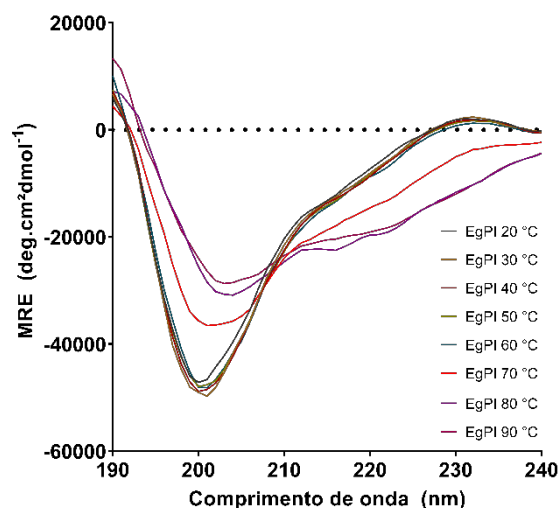


5.5.2 Estabilidade térmica

O espectro do EgPI foi obtido em diferentes temperaturas, onde as amostras foram incubadas por 10 min na temperatura de interesse. O EgPI apresentou estabilidade térmica até 60 °C, onde, a partir de 70 °C, o EgPI parou de apresentar a elipticidade máxima e positiva e a elipticidade mínima se mostrou menos intensificada, tendo seu perfil semelhante à de α -hélice, que se intensificou com o aumento da

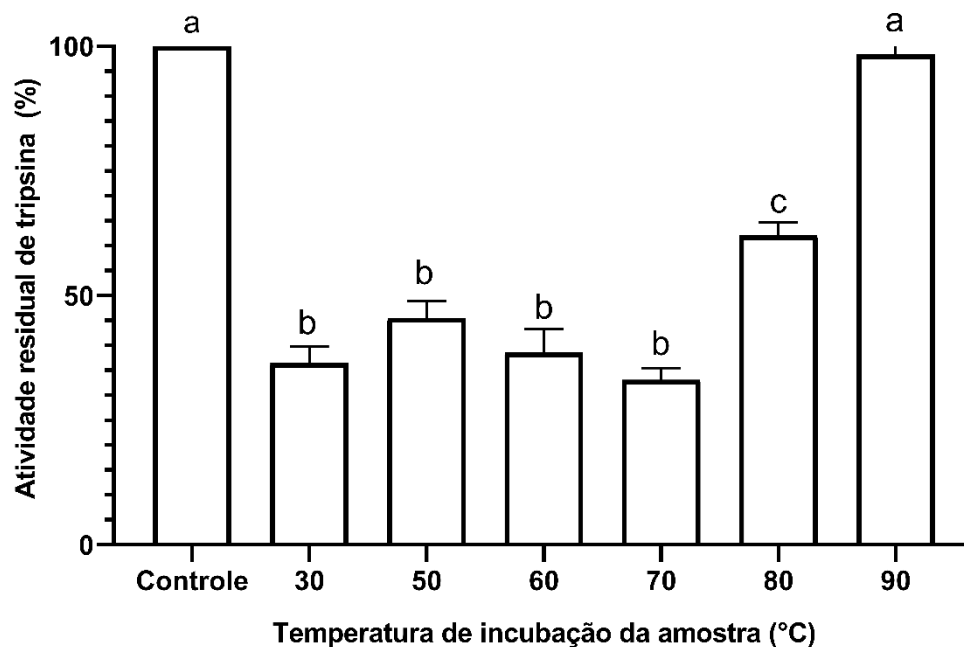
temperatura, o que demonstrou desnaturação térmica conforme predito com o algoritmo de CONTIN (Figura 18).

Figura 18 - Dicroísmo circular do EgPI em diferentes temperaturas.



A fim de analisar o efeito da temperatura na relação estrutura-atividade, foi realizado também o ensaio de atividade inibitória contra tripsina com as amostras incubadas em diferentes temperaturas, o qual sua atividade se manteve inalterada até 70 °C (figura 19). A partir de 80 °C, a atividade inibitória reduziu sensivelmente.

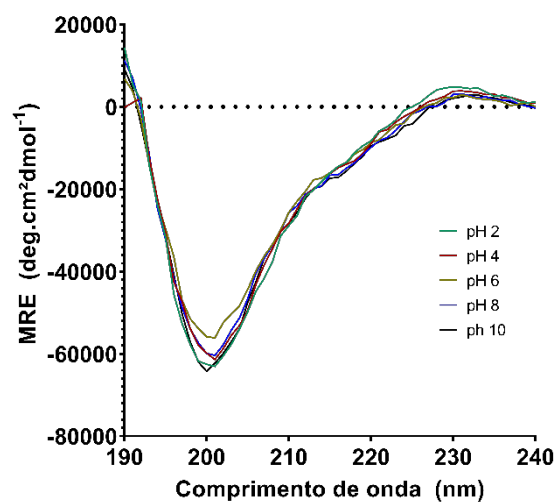
Figura 19. Análise térmica de atividade inibitória contra tripsina do EgPI.



5.5.3 Estabilidade a variação de pH

O espectro do EgPI foi obtido em diferentes tampões com diferentes pH, que variaram de 2 a 10. Em todos os espectros obtidos, o EgPI se mostrou estável a variação de pH (Figura 20).

Figura 20 - Dicroísmo circular do EgPI em diferentes pH.



5.6 Ensaios microbiológicos

5.6.1 Atividade antibacteriana

Foi avaliado a atividade antibacteriana do EgPI frente a diferentes cepas bacterianas patogênicas Gram-positivas: (*S. saprophyticus* ATCC 49453, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* resistente à meticilina [SARM] ATCC 43300, *S. haemoliticus* ATCC 29970 e *S. epidermits* ATCC 12228) e duas Gram-negativas (*E. coli* ATCC 35218 e *P. aeruginosa* ATCC 27853). As concentrações testadas variaram de 25 - 1,56 $\mu\text{mol/L}$. Nenhuma cepa bacteriana foi inibida com o EgPI na concentração máxima de 25 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 4).

Tabela 4 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra bactérias.

Bactéria	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{mol/L}$)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>25 $\mu\text{mol/L}$
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	>25 $\mu\text{mol/L}$
SARM ATCC 43300	>25 $\mu\text{mol/L}$
<i>S. epidermits</i> ATCC 12228	>25 $\mu\text{mol/L}$
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 49453	>25 $\mu\text{mol/L}$
<i>S. haemoliticus</i> ATCC 29970	>25 $\mu\text{mol/L}$
<i>E. coli</i> ATCC 35218	>25 $\mu\text{mol/L}$

5.6.2 Atividade antifúngica

Foi avaliado a atividade antifúngica do EgPI frente a diferentes cepas fúngicas patogênicas (*C. albicans* ATCC 5314, *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. guilliermonds* ATCC 6260, *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. glabrata* ATCC 90030). Nenhuma cepa fúngica foi inibida com o EgPI, onde foi testado em uma concentração máxima de 25 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 5).

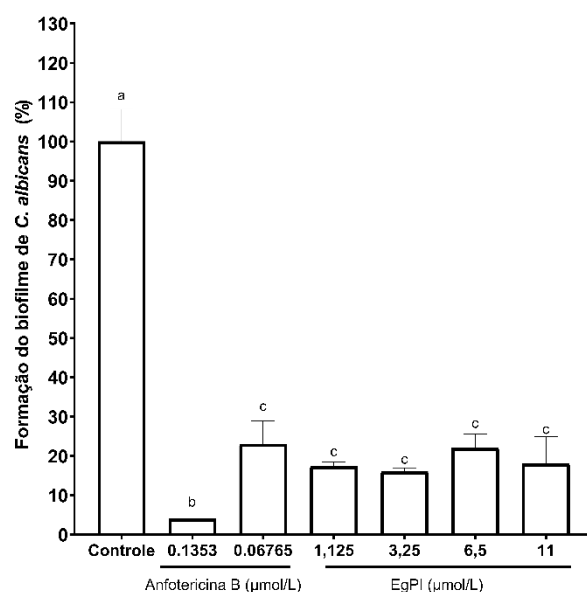
Tabela 5 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra fungos.

Fungo	Concentração inibitória mínima (μmol/L)
<i>C. albicans</i> ATCC 5314	>25 μmol/L
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	>25 μmol/L
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	>25 μmol/L
<i>C. guilliermonds</i> ATCC 6260	>25 μmol/L
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	>25 μmol/L
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	>25 μmol/L

5.6.3 Atividade antibiofilme fúngico

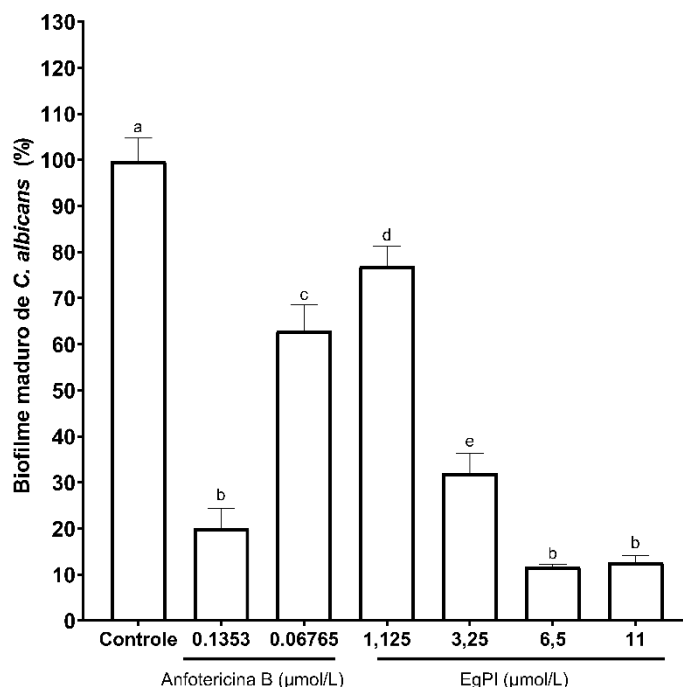
Foi avaliado o potencial antibiofilme do EgPI frente a cepa fúngica produtora de biofilme *C. albicans* ATCC 90028, o qual as concentrações testadas variaram de 11 – 1,125 μmol/L. Como controle, foi utilizado o CIM (0,1353 μmol/L) e metade do CIM (0,06765 μmol/L) da anfotericina. A anfotericina apresentou uma queda de sua atividade de inibição do biofilme significativamente com a redução de sua concentração. O EgPI apresentou inibitória de formação de biofilme semelhante àquela apresentada pela metade do CIM da anfotericina em todas as doses testadas, onde na concentração de 1,125 μmol/L, ele apresentou uma inibição de 82,7% mostrando uma atividade antibiofilme uniforme independente da concentração (Figura 21).

Figura 21 – Avaliação da inibição do biofilme de *C. albicans* ATCC 90028 pelo EgPI. As concentrações utilizadas foram de 1 vezes o MIC e 0,5 vezes o MIC da anfotericina e diluições seriadas do EgPI que variaram de 11 $\mu\text{mol/L}$ até 1,125 $\mu\text{mol/L}$.



Além disso, foi avaliado seu potencial contra o biofilme maduro. A anfotericina B apresentou queda na eficiência de sua atividade contra biofilme maduro na metade de sua concentração, enquanto o EgPI apresentou atividade semelhante àquela apresentada pelo CIM da anfotericina em uma concentração de 6,5 $\mu\text{mol/L}$ (88,3 %), atividade superior ao da metade do CIM da anfotericina em 3,25 $\mu\text{mol/L}$ (68 %) e atividade equivalente metade do CIM na concentração de 1,125 $\mu\text{mol/L}$ (23 %) (Figura 22).

Figura 22 - Avaliação da atividade de erradicação do biofilme maduro de *C. albicans* ATCC 90028 pelo EgPI. As concentrações utilizadas foram de 1 vez o MIC e 0,5 vezes o MIC da anfotericina e diluições seriadas do EgPI que variaram de 11 $\mu\text{mol/L}$ até 1,125 $\mu\text{mol/L}$.



6 DISCUSSÃO

As sementes da família Fabaceae constituem uma rica fonte de IPs, compostos principalmente pelos inibidores Kunitz e Bowman-Birk. A subfamília do inibidor Kunitz (I3) é abundante na família Fabaceae, composta por três subfamílias: Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (OLIVA et al., 2010). *Enterolobium* é um gênero que pertence à subfamília Mimosoideae (GAMAL EL-DIN et al., 2017). A subfamília de inibidores I3 exibe uma ampla gama de atividade para diferentes peptidases. Essas peptidases estão envolvidas em processos digestivos, como tripsina, fatores de coagulação e enzimas inflamatórias. A maioria dos inibidores Kunitz apresenta uma massa molar de 10-25 kDa com diferentes padrões de pontes dissulfeto e número de cadeias polipeptídicas (DIB et al., 2019). A subfamília I3 de inibidores Kunitz geralmente possui quatro resíduos de Cys que formam duas pontes dissulfeto, agrupando IPs com uma ou duas cadeias polipeptídicas (OLIVA et al., 2010). Quando comparado com outros inibidores, o EgPI apresenta grande semelhança estrutural com inibidores do tipo Kunitz, com uma massa molar de ~18 kDa, alta atividade inibitória contra tripsina e espectro no dicróismo semelhante a outros inibidores dessa

subfamília, demonstrando semelhança em sua estrutura secundária, com a ausência de α -hélice e alta presença de folhas- β antiparalelas.

6.1 Purificação do EgPI

A purificação do EgPI a partir do EB usando a técnica de filtração em gel foi importante para eliminar o excesso de pigmentação da amostra. A pigmentação foi eluída no primeiro pico, juntamente com proteínas de alto peso molecular, como observado em SDS-PAGE. O uso da coluna G-100 concentrou o EgPI no pico 2. No entanto, contaminantes com peso molecular semelhante foram detectados na amostra por SDS-PAGE. Por esse motivo, escolhemos uma cromatografia hidrofóbica como etapa de polimento, aproveitando as diferenças de hidrofobicidade superficial entre as proteínas. O sulfato de amônio possui um importante efeito de precipitação salina. Usando uma concentração moderada de sulfato de amônio, foi possível separar três picos com diferentes volumes de eluição. Com base em SDS-PAGE e ensaio de atividade inibitória, demonstramos que o segundo pico produziu o EgPI como uma única proteína pura, demonstrando que esse processo de 2 etapas se mostrou eficaz em sua purificação, havendo menos perda de amostra.

O SDS-PAGE mostrou que o EgPI possui uma massa molar relativa de ~20 kDa, em condições nativas (Figura 3). Em condições redutoras, o EgPI exibiu duas cadeias polipeptídicas. O padrão de massa molar e a ocorrência de duas cadeias polipeptídicas concordam com o observado em outras subfamílias de inibidores Kunitz I3, sendo também uma característica desses inibidores das subfamílias de Mimosoideae (BATISTA et al., 1996; BENDRE; RAMASAMY; SURESH, 2018; OLIVA et al., 2010). A atividade específica contra a enzima tripsina foi de $13,17 \times 10^4$ TIU/mg, com um rendimento de 56,46%. A purificação e o rendimento são importantes para proteínas que apresentam atividade biológica. Os valores de pureza e rendimento garantem repetibilidade nos ensaios biológicos, uma vez que essas proteínas apresentam atividade biológica e requerem uma grande quantidade de material antes de se tornarem candidatas a aplicações biotecnológicas.

Outros inibidores, como o EATI e o EcTI, foram necessárias 3 etapas de purificação, para um rendimento de 40,7% e 12%, respectivamente (BATISTA et al., 1996; DE OLIVEIRA et al., 2012). Quando comparado com o processo de obtenção

desses inibidores, é possível analisar que a purificação em 2 etapas do EgPI se mostrou mais eficiente e promoveu uma melhora nos resultados de rendimento.

6.2 Atividade inibitória e determinação do K_i do EgPI

A atividade inibitória contra tripsina e quimotripsina foi testada em todas as etapas de purificação, e contra tripsina, o inibidor demonstrou alta atividade inibitória, enquanto contra quimotripsina essa atividade foi menor (dados não mostrados). A atividade entre os inibidores Kunitz varia, alguns são específicos para certas enzimas (DE OLIVEIRA et al., 2012), e outros têm atividade contra várias peptidases serina (BATISTA et al., 1996), ou a capacidade de inibir outras classes de enzimas, como ApTI e PdKI-2, que inibem tripsina e papaína (OLIVEIRA et al., 2007; RODRIGUES MACEDO et al., 2010).

Os estudos de estequiometria de EgPI contra tripsina mostraram uma inibição linear, com 100% de inibição em uma razão molar de 1:1 de enzima:inibidor (Figura 4), o que é característico dos inibidores Kunitz. Análises adicionais, incluindo Michaelis-Menten, Dixon e Lineweaver-Burk, revelaram um valor de K_i de $8,40 \times 10^{-9}$ mol/L, em concordância com outros inibidores Kunitz, como o inibidor de tripsina de *Entada acacifolia* (EATI) ($1,75 \times 10^{-9}$ mol/L) (DE OLIVEIRA et al., 2012), TcTI ($4,08 \times 10^{-9}$ mol/L) (DO AMARAL et al., 2022), EcTI ($0,88 \times 10^{-9}$ mol/L) (ZHOU et al., 2013) e o inibidor de tripsina de soja (STI) ($3,20 \times 10^{-9}$ mol/L) (DESHIMARU et al., 2002). A atividade contra quimotripsina é maior em P2-G100 quando comparada com EgPI (gráfico não mostrado), sugerindo a possível presença de um inibidor de quimotripsina no nas sementes de *E. gummiferum*. Estudos envolvendo outras proteínas presentes nas sementes de *E. gummiferum* podem corroborar com a investigação de novos bioagentes, podendo apresentar efeitos aditivos ou sinérgicos entre eles ou outras moléculas.

6.3 Determinação da sequência amino-terminal

Os inibidores Kunitz (I3) apresentam estrutura primária altamente conservada (BONTURI et al., 2022). A identidade encontrada com os inibidores I3: EcTI, que contém quatro resíduos de cisteína e duas cadeias polipeptídicas (BATISTA et al., 1996); como observado para ACTI (WU; LIN, 1993) e PjTI (MONTE NEGREIROS et al., 1991); STI contém quatro resíduos de cisteína ao longo de uma única cadeia

polipeptídica. Quando a estrutura cristalizada de EcTI, STI e *Tamarind* Kunitz Inhibitor (TKI) são sobrepostas, as porções de folhas- β são sobrepostas com um valor de RMSD baixo. No entanto, as regiões de alça exibiram um valor de RMSD alto, sugerindo que as porções de alça exibem uma região estrutural mais variável entre os inibidores Kunitz. Uma exceção em relação à variabilidade das alças é observada na alça do sítio reativo, que possui uma forma similar entre diferentes inibidores Kunitz (ZHOU et al., 2013). Com essa semelhança entre o inibidor Kunitz da subfamília I3, demonstramos por CD que o EgPI possui uma estrutura secundária similar à subfamília I3, em especial nas porções de folhas- β .

6.4 Análise de estrutura secundária e estabilidade térmica e de pH por dicroísmo circular

Para analisar a estrutura secundária e mudanças estruturais em diferentes ambientes, foram realizados ensaios de CD em diferentes condições de pH e temperatura. A estrutura de todas as análises foi determinada pelo algoritmo CONTIN. Em todos os espectros, o EgPI exibiu um espectro de assinatura conhecido de proteínas com folhas- β antiparalelas. Esse padrão de espectros está de acordo com os inibidores Kunitz (MICSONAI et al., 2015). O algoritmo CONTIN sugere que o EgPI é formado por folhas- β , estruturas aleatórias e alças, com baixo teor de hélice- α , de acordo com a literatura (DE OLIVEIRA et al., 2012; ZHOU et al., 2013b).

Em concentrações mais altas, o DTT causa ruído e erros na aquisição dos espectros por dicroísmo circular. Por esse motivo, a concentração de DTT foi mantida $\leq 1\text{mmol/L}$. Em condições de redução, o EgPI mostrou redução no conteúdo de folhas- β e um leve aumento de α -hélices, estruturas aleatórias e alças. Essas alterações na conformação estrutural indicam perda da conformação nativa e consequentemente perda de suas propriedades inibitórias.

Os inibidores Kunitz possuem estabilidade térmica elevada (DO AMARAL et al., 2022). Uma vez que um espectro de assinatura foi determinado em condições nativas e na presença do agente redutor DTT, adotamos esses padrões para determinar as assinaturas na molécula nativa e desnaturada. Assim, podemos inferir o efeito da temperatura sobre a estrutura secundária do EgPI em uma ampla faixa de temperaturas, determinando o momento em que a atividade biológica seria abolida. Em altas temperaturas, o sinal em $\sim 200\text{ nm}$ foi mais positivo do que em temperaturas

mais baixas e em ~230 nm o sinal se tornou negativo. A 70 °C, o conteúdo de α -hélices aumentou e as folhas- β diminuíram, um padrão também observado a 80 °C e 90 °C, um forte indicativo de perda de estrutura e consequentemente de uma possível perda na atividade inibitória. Apesar de sua perda de estrutura ter iniciado a 70 °C, o inibidor apresentou atividade inibitória semelhante à sua forma não desnaturada, tendo início de perda de atividade em 80 °C e perda total em 90 °C. Mills et al. (2001) descreveram a redução das folhas- β com o aumento do conteúdo de hélice- α seguido pela desnaturação térmica na β -conglucina da globulina do grão de soja. Já em 90 °C, um aumento do conteúdo de estruturas aleatórias foi observado. O aquecimento do EgPI a 90 °C resultou na perda de estrutura secundária característica, sugerindo a desnaturação da proteína. Esse efeito de alteração na estrutura secundária pode estar relacionado diretamente com a capacidade de inibição dos inibidores do tipo Kunitz, onde apresentam redução de sua atividade inibitória em temperaturas elevadas, como: O inibidor de tripsina de batata (PTI) apresenta redução de 79% de sua atividade inibitória após incubação a 60 °C (LI et al., 2020); EATI apresenta redução de 84% de sua atividade inibitória após incubação a 80 °C (DE OLIVEIRA et al., 2012); e o ILTI apresentou redução de 20% na atividade inibitória após incubação a 80 °C (MACEDO et al., 2007).

Os espectros coletados do EgPI em diferentes valores de pH mostraram variações leves, sugerindo que não foram observadas alterações na estrutura secundária entre os pH 2 e 8. Apenas no pH 10 foi observada uma alteração na estrutura secundária consideravelmente importante. A estabilidade dos inibidores Kunitz em uma faixa de pH é uma característica bem conhecida (MACEDO et al., 2007; CRUZ et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2015; RAMALHO et al., 2018). A alteração na estrutura secundária desses inibidores por sequência do pH pode afetar minimamente a capacidade de inibição, onde: o PTI apresentou uma redução de 8,56% da atividade inibitória em pH 2 (LI et al., 2020); o ILTI e o EATI não apresentaram redução de sua capacidade de inibição nos intervalos de pH entre 2 e 10 (MACEDO et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2012)

Devido à estabilidade em diferentes valores de pH, o EgPI pode apresentar potencial biotecnológico para o controle de pragas, uma vez que os tratamentos digestivos da maioria dos insetos-praga coleópteros e lepidópteros contêm serinopeptidases com atividade ótima em condições ácidas e alcalinas (YANG et al., 2009; FUZITA et al., 2022)

Os inibidores Kunitz têm sido utilizados em ensaios como ferramenta contra pragas: o inibidor de tripsina de *Adenanthera pavonina* (ApTI) retarda o crescimento de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera) (MACEDO et al., 2010), o inibidor de tripsina de *Inga laurina* (ILTI) apresenta atividade inseticida contra *Homalinotus coriaceus* (MACEDO et al., 2011) e retarda o crescimento de *Spodoptera frugiperda* (MACHADO et al., 2017). O uso de plantas transgênicas com expressão de genes de IPs é utilizado para proporcionar proteção contra pragas e patógenos. O ILIT recombinante, produzido por expressão heteróloga, exibiu atividade inibitória semelhante ao ILIT nativo. Quando expresso em plantas de cana-de-açúcar e tabaco, o ILTI apresentou propriedades inseticidas contra larvas de *D. saccharalis* e *H. virescens*, o que reforça o potencial biotecnológico dos IPs (RAMOS et al., 2012). O uso de IPs vegetais como fermenta biotecnológica é possível uma vez que eles compartilham estruturas secundárias simples e um menor número de modificações pós-traducionais.

6.5 Ensaios de atividade microbiológica

Estudos tem mostrado que compostos isolados de plantas como os IPs podem apresentar atividade antibacteriana e antifúngica (MACEDO et al., 2016). Estudos envolvendo inibidores do tipo Kunitz demonstraram que sua atividade antifúngica é mediada por diversos mecanismos, como inibição proteolítica, indução de estresse oxidativo por interação com mitocôndria, bloqueio de serinopeptidases importantes no bloqueio de apoptose, como metacaspases e mediador nuclear de apoptose, como o Nma111p (GUTIERREZ-GONGORA; GEDDES-MCALISTER, 2021). As metacaspases clivam substratos e interagem com inibidores que apresentam cadeias com aminoácidos básicos de Arg e Lys, essa característica é apresentada também no sítio ativo da enzima tripsina, que interage com seus substrato e inibidores que apresentam essa característica da mesma forma (CARMONA-GUTIERREZ et al., 2010; OLIVA et al., 2010).

Quanto a atividade antibacteriana, alguns inibidores do tipo Kunitz apresentam uma maior limitação quanto a sua inibição, como por exemplo o ILTI (MACEDO et al., 2016), IVTI (DA SILVA BEZERRA et al., 2016) e o EVTI (MACHADO et al., 2013). O EgPI, todavia, não demonstrou grande efetividade quanto a inibição de fungos e bactérias nas concentrações testadas, porém demonstrou atividade antibiofilme contra a cepa formadora de biofilme de *C. albicans*. O EgPI em uma concentração de

1,125 $\mu\text{mol/L}$ apresentou uma redução de 82,7% da formação do filme e em uma concentração de 6,5 $\mu\text{mol/L}$ apresentou uma redução de 88,4% do biofilme maduro de *C. albicans*. A atividade antibiofilme de inibidores do tipo Kunitz tem sido reportada recentemente, onde o CITI, em uma concentração de 2,1 $\mu\text{mol/L}$ apresentou uma redução de 34,30% na formação do biofilme e 38,58% da redução do biofilme pré-formado de *C. albicans* (ARAÚJO et al., 2019). Além do CITI, outros inibidores apresentaram atividade antibiofilme de outros microrganismos, onde o ILTI apresentou inibição e erradicação do biofilme pré-formado de cepas de *S. epidermidis* em uma concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e 150–200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (CARNEIRO et al., 2018). O EgPI, em todas as concentrações testadas, apresentou um efeito semelhante ao da anfotericina B na inibição da formação do biofilme, já na redução do biofilme pré-formado apenas as concentrações de 11 $\mu\text{mol/L}$ e 6,5 $\mu\text{mol/L}$ apresentaram um efeito semelhante ao CIM da anfotericina, concentrações menores apresentaram um efeito semelhante ao controle e à metade do CIM da anfotericina.

Assim como em bactérias, os fungos também liberam moléculas QS para comunicação intercelular a fim de regular os genes e densidade celular (KALIA, 2013; MEHMOOD et al., 2019). Dentre os fungos, a *C. albicans* é a mais estudada quanto as suas moléculas QS, tendo como uma de suas funções a transformação de levedura para hifas e pseudo-hifas, transformações que são importantes para seu desenvolvimento e patogenicidade de acordo com as condições do meio para o desenvolvimento celular e de um biofilme (MEHMOOD et al., 2019; SUDBERY, 2011). Dentre as moléculas, pode-se destacar o farnesol e o tirosol, onde o farnesol tem como principal função controlar o desenvolvimento de hifas com a supressão da cascata da RAS1-cAMP/ proteína cinase; e o tirosol acelera a formação de hifas e tubos de germinação (MEHMOOD et al., 2019).

Outra molécula relacionada ao QS de grande importância é o nucleotídeo guanosina 5'-tri/difosfato 3'-difosfato, que é produzido e liberado em situações de estresse, como limitação de nutrientes, temperatura e pH. O aumento dos níveis de guanosina 5'-tri/difosfato 3'-difosfato, regulam diversos genes relacionados a estresse, e reduz os relacionados ao crescimento, sendo ele um dos principais responsáveis a formação de biofilme pelo aumento da formação de AHLs (FONTAINE; DUGGAL; WEINERT, 2018).

O EgPI pode ter como mecanismo de ação contra o biofilme a inibição da biossíntese dos autoindutores; a degradação do sinal QS no ambiente extracelular

por enzimas *Quorum-Quenching* como a AHL-lactonase, oxidorreductase e acilases; o bloqueio de receptores ou interferência do complexo autoindutor/receptor; a atenuação do sinal QS devido à formação de um complexo entre AI/macromolécula; ou degradação de enzimas que interferem na comunicação célula-célula, levando à controle ativo da concentração (ESCOBAR-MUCIÑO; ARENAS-HERNÁNDEZ; LUNA-GUEVARA, 2022). Para confirmar seu mecanismo de ação, serão necessários ensaios futuros, como cromatografia de afinidade, testes colorimétricos, polímeros com alta afinidade pelas moléculas, dentre outros (LU et al., 2022).

7 CONCLUSÃO

As sementes da família Fabaceae são uma rica fonte de IPs, especialmente os inibidores Kunitz e Bowman-Birk. O EgPI, inibidor Kunitz derivado de sementes de Fabaceae, foi purificado e caracterizado com sucesso. Ele exibe atividade inibitória contra a tripsina e apresenta uma estrutura secundária típica dos inibidores Kunitz, com uma conformação predominante de folhas- β . O EgPI demonstra estabilidade em uma ampla faixa de pH e sofre alterações conformacionais em condições redutoras e altas temperaturas, mantendo atividade inibitória contra tripsina estável em elevadas temperaturas. Apesar de baixa atividade contra fungos e bactérias, o inibidor demonstrou atividade contra a formação de biofilmes e capacidade de desfazer biofilmes maduros de *C. albicans*, sendo necessário ensaios futuros para determinar seu mecanismo de ação. Esses resultados destacam o potencial do EgPI para diversas aplicações futuras, incluindo o controle de pragas e pesquisas biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [s. l.], v. 73, n. 8, p. 2003–2020, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29506149/>>. Acesso em: 25 jul. 2023.
- ALOKE, C.; ACHILONU, I. Coping with the ESKAPE pathogens: Evolving strategies, challenges and future prospects. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 175, p. 105963, 2023. . Acesso em: 27 jan. 2024.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, [s. l.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22317112/>>. Acesso em: 30 abr. 2023.
- ARASTEHFAR, A.; CARVALHO, A.; VAN DE VEERDONK, F. L.; JENKS, J. D.; KOEHLER, P.; KRAUSE, R.; CORNELLY, O. A.; PERLIN, D. S.; LASS-FLÖRL, C.; HOENIGL, M. COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA)—From Immunology to Treatment. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 1–17, 2020. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC7346000/>>. Acesso em: 22 jul. 2023.
- ARAÚJO, N. M. S.; DIAS, L. P.; COSTA, H. P. S.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M.; DE MORAIS, G. A.; OLIVEIRA, J. T. A. CITI, a Kunitz trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* Benth. seeds, exerts a candidicidal effect on *Candida albicans* by inducing oxidative stress and necrosis. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1861, n. 11, 2019.
- ARNOLD, B. J.; HUANG, I. T.; HANAGE, W. P. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 206–218, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34773098/>>. Acesso em: 15 jul. 2023.
- BARNADAS-CARCELLER, B.; MARTINEZ-PEINADO, N.; GÓMEZ, L. C.; ROS-LUCAS, A.; GABALDÓN-FIGUEIRA, J. C.; DIAZ-MOCHON, J. J.; GASCON, J.; MOLINA, I. J.; PINEDA DE LAS INFANTAS Y VILLATORO, M. J.; ALONSO-PADILLA, J. Identification of compounds with activity against *Trypanosoma cruzi* within a collection of synthetic nucleoside analogs. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2023. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC9880260/>>. Acesso em: 27 jan. 2024.
- BATISTA, I. F. C.; OLIVA, M. L. V.; ARAUJO, M. S.; SAMPAIO, M. U.; RICHARDSON, M.; FRITZ, H.; SAMPAIO, C. A. M. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 1017–1022, 1996. . Acesso em: 30 abr. 2023.
- BHATT, K.; AGOLLI, A.; PATEL, M. H.; GARIMELLA, R.; DEVI, M.; GARCIA, E.; AMIN, H.; DOMINGUE, C.; CASTILLO, R. G. Del; SANCHEZ-GONZALEZ, M. High mortality co-infections of COVID-19 patients: mucormycosis and other fungal infections. **Discoveries**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e126, 2021. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC8137279/>>. Acesso em: 22 jul. 2023.

BIAZOTTO, K. R.; DE SOUZA MESQUITA, L. M.; NEVES, B. V.; BRAGA, A. R. C.; TANGERINA, M. M. P.; VILEGAS, W.; MERCADANTE, A. Z.; DE ROSSO, V. V. Brazilian Biodiversity Fruits: Discovering Bioactive Compounds from Underexplored Sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 67, n. 7, p. 1860–1876, 2019. Disponível em:

<<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.8b05815>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

BIRK, Y. (Yehudith). **Plant protease inhibitors : significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering**. [s.l.] : Springer, 2011.

Disponível em: <<https://link.springer.com/book/9783642055140>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

BONTURI, C. R.; TEIXEIRA, A. B. S.; ROCHA, V. M.; VALENTE, P. F.; OLIVEIRA, J. R.; FILHO, C. M. B.; BATISTA, I. de F. C.; OLIVA, M. L. V. Plant Kunitz Inhibitors and Their Interaction with Proteases: Current and Potential Pharmacological Targets.

International Journal of Molecular Sciences **2022, Vol. 23, Page 4742**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 4742, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/9/4742/htm>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

CARDOSO, P.; GLOSSOP, H.; MEIKLE, T. G.; ABURTO-MEDINA, A.; CONN, C. E.; SAROJINI, V.; VALERY, C. Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities. **Biophysical Reviews** **2021 13:1**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 35–69, 2021. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s12551-021-00784-y>>. Acesso em: 15 jul. 2023.

CARMONA-GUTIERREZ, D.; EISENBERG, T.; BÜTTNER, S.; MEISINGER, C.; KROEMER, G.; MADEO, F. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. **Cell Death & Differentiation** **2010 17:5**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 763–773, 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/cdd2009219>>. Acesso em: 27 jan. 2024.

CARNEIRO, F. C.; WEBER, S. S.; SILVA, O. N.; JACOBOWSKI, A. C.; RAMADA, M. H. S.; MACEDO, M. L. R.; FRANCO, O. L.; PARACHIN, N. S. Recombinant *Inga Laurina* Trypsin Inhibitor (ILTI) Production in *Komagataella Phaffii* Confirms Its Potential Anti-Biofilm Effect and Reveals an Anti-Tumoral Activity. **Microorganisms** **2018, Vol. 6, Page 37**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 37, 2018. Disponível em:

<<https://www.mdpi.com/2076-2607/6/2/37/htm>>. Acesso em: 23 jun. 2023.

CHAN, B. K.; TURNER, P. E.; KIM, S.; MOJIBIAN, H. R.; ELEFTERIADES, J. A.; NARAYAN, D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Evolution, Medicine, and Public Health**, [s. l.], v. 2018, n. 1, p. 60, 2018. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC5842392/>>. Acesso em: 21 jul. 2023.

CHAUDHARI, A. A.; ASHMORE, D.; NATH, S. deb; KATE, K.; DENNIS, V.; SINGH, S. R.; OWEN, D. R.; PALAZZO, C.; ARNOLD, R. D.; MILLER, M. E.; PILLAI, S. R. A novel covalent approach to bio-conjugate silver coated single walled carbon nanotubes with antimicrobial peptide. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–15, 2016. Disponível em:

<<https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-016-0211-z>>. Acesso em: 21 jul. 2023.

CHIBEJE JUNIOR, J.; FUCHS, B. B.; SABINO, C. P.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C.; RIBEIRO, M. S.; GILMORE, M. S.; RICE, L. B.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R.; MYLONAKIS, E. Photodynamic and Antibiotic Therapy Impair the

Pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a Whole Animal Insect Model. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. e55926, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0055926>>. Acesso em: 21 jul. 2023.

CLEMENTE, M.; CORIGLIANO, M. G.; PARIANI, S. A.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. F.; SANDER, V. A.; RAMOS-DUARTE, V. A. Plant Serine Protease Inhibitors: Biotechnology Application in Agriculture and Molecular Farming. **International Journal of Molecular Sciences** 2019, Vol. 20, Page 1345, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 1345, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/6/1345/htm>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

COTABARREN, J.; LUFRANO, D.; PARISI, M. G.; OBREGÓN, W. D. **Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review**, Elsevier Ireland Ltd, 2020.

CRUZ, A. C. B.; MASSENA, F. S.; MIGLIOLO, L.; MACEDO, L. L. P.; MONTEIRO, N. K. V.; OLIVEIRA, A. S.; MACEDO, F. P.; UCHOA, A. F.; GROSSI DE SÁ, M. F.; VASCONCELOS, I. M.; MURAD, A. M.; FRANCO, O. L.; SANTOS, E. A. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduva (*Piptadenia moniliformis*) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 70, p. 61–68, 2013.

CRUZ, M. V.; JACOBOWSKI, A. C.; MACEDO, M. L. R.; BATISTA, K. A.; FERNANDES, K. F. Immobilization of antimicrobial trypsin inhibitors onto cashew gum polysaccharide/PVA films. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 127, p. 433–439, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30611812/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

DA SILVA BEZERRA, C.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; MACHADO, O. L. T.; DE MELLO, G. S. V.; DA ROCHA PITTA, M. G.; DE MELO RÊGO, M. J. B.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; DE FÁTIMA FERREIRA RIBEIRO, S.; GOMES, V. M.; SILVA, O. N.; MARIA-NETO, S.; FRANCO, O. L.; MACEDO, M. L. R. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 51, n. 6, p. 792–803, 2016.

DA SILVA, F. P.; FANZERES, A. **Megadiverse Brazil: giving biodiversity an online boost**. 2019. Disponível em: <<https://www.unep.org/news-and-stories/story/megadiverse-brazil-giving-biodiversity-online-boost>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

DA SILVA FERREIRA, R.; NAPOLEÃO, T. H.; SILVA-LUCCA, R. A.; SILVA, M. C. C.; PAIVA, P. M. G.; OLIVA, M. L. V. The effects of *Enterolobium contortisiliquum* serine protease inhibitor on the survival of the termite *Nasutitermes corniger*, and its use as affinity adsorbent to purify termite proteases. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 632–638, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.5154>>. Acesso em: 29 jul. 2023.

DANTZGER, M.; VASCONCELOS, I. M.; SCORSATO, V.; APARICIO, R.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 118, p. 224–235, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26330217/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

DE ALMEIDA NOGUEIRA, N. P.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PAES, M. C.; DA SILVA-LÓPEZ, R. E. Effects of a marine serine protease inhibitor on viability and morphology of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 128, n. 1, p. 27–35, 2013.

DE FREITAS, L. M.; LORENZÓN, E. N.; SANTOS-FILHO, N. A.; ZAGO, L. H. D. P.; ULIANA, M. P.; DE OLIVEIRA, K. T.; CILLI, E. M.; FONTANA, C. R. Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5844988/>. Acesso em: 21 jul. 2023.

DE OLIVEIRA, C. F. R.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. The trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* seeds affects negatively the development of Mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella*. **Pesticide biochemistry and physiology**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 74–79, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24485318/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

DE OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T.; TAVEIRA, G. B.; DE OLIVEIRA MELLO, E.; GOMES, V. M.; MACEDO, M. L. R. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor from *Enterolobium timbouva* with activity against *Candida* species. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 119, p. 645–653, 2018.

DE OLIVEIRA, C. F. R.; VASCONCELOS, I. M.; APARICIO, R.; FREIRE, M. D. G. M. H.; BALDASSO, P. A.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 929–935, 2012. . Acesso em: 30 abr. 2023.

DE PAULA, C. A. A.; COULSON-THOMAS, V. J.; FERREIRA, J. G.; MAZA, P. K.; SUZUKI, E.; NAKAHATA, A. M.; NADER, H. B.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. V. *Enterolobium contortisiliquum* Trypsin Inhibitor (EcTI), a plant proteinase inhibitor, decreases in vitro cell adhesion and invasion by inhibition of Src protein-Focal Adhesion Kinase (FAK) signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 287, n. 1, p. 170–182, 2012. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925820535035/fulltext>. Acesso em: 26 jul. 2023.

DE SOUSA SILVEIRA, Z.; MACÊDO, N. S.; DE FREITAS, T. S.; DA SILVA, A. R. P.; DOS SANTOS, J. F. S.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; DA COSTA, J. G. M.; TEIXEIRA, R. N. P.; KAMDEM, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; DA CUNHA, F. A. B. Antibacterial enhancement of antibiotic activity by *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 945–949, 2017.

D'ENFERT, C.; KAUNE, A. K.; ALABAN, L. R.; CHAKRABORTY, S.; COLE, N.; DELAVY, M.; KOSMALA, D.; MARSAUX, B.; FRÓIS-MARTINS, R.; MORELLI, M.; ROSATI, D.; VALENTINE, M.; XIE, Z.; EMRITLOLL, Y.; WARN, P. A.; BEQUET, F.; BOUGNOUX, M. E.; BORNES, S.; GRESNIGT, M. S.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D.; LEGRAND, M.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; MANICHANH, C.; MUNRO, C. A.; NETEA, M. G.; QUEIROZ, K.; ROGET, K.; THOMAS, V.; THORAL, C.; VAN DEN ABEELE, P.; WALKER, A. W.; BROWN, A. J. P. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 14, 2021.

Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuaa060>>. Acesso em: 22 jul. 2023.

DERYABIN, D.; GALADZHIEVA, A.; KOSYAN, D.; DUSKAEV, G. Plant-Derived Inhibitors of AHL-Mediated Quorum Sensing in Bacteria: Modes of Action. **International Journal of Molecular Sciences** 2019, Vol. 20, Page 5588, [s. l.], v. 20, n. 22, p. 5588, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5588/htm>>. Acesso em: 12 ago. 2023.

DIB, H. X.; DE OLIVEIRA, D. G. L.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; TAVEIRA, G. B.; DE OLIVEIRA MELLO, E.; VERBISK, N. V.; CHANG, M. R.; CORRÊA JUNIOR, D.; GOMES, V. M.; MACEDO, M. L. R. Biochemical characterization of a Kunitz inhibitor from *Inga edulis* seeds with antifungal activity against *Candida* spp. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 201, n. 2, p. 223–233, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-018-1598-8>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

DUDDY, O. P.; BASSLERI, B. L. Quorum sensing across bacterial and viral domains. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. e1009074, 2021. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1009074>>. Acesso em: 12 ago. 2023.

ESCOBAR-MUCIÑO, E.; ARENAS-HERNÁNDEZ, M. M. P.; LUNA-GUEVARA, M. L. Mechanisms of Inhibition of Quorum Sensing as an Alternative for the Control of *E. coli* and *Salmonella*. **Microorganisms** 2022, Vol. 10, Page 884, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 884, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/10/5/884/htm>>. Acesso em: 12 ago. 2023.

FANG, W.; WU, J.; CHENG, M.; ZHU, X.; DU, M.; CHEN, C.; LIAO, W.; ZHI, K.; PAN, W. Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments. **Journal of Biomedical Science** 2023 30:1, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 1–35, 2023. Disponível em: <<https://link.springer.com/articles/10.1186/s12929-023-00926-2>>. Acesso em: 27 jan. 2024.

FILLOUX, A.; RAMOS, J.-L. **Pseudomonas Methods and Protocols**. Hatfield. Disponível em: <<http://www.springer.com/series/7651>>.

FLEMMING, H. C.; VAN HULLEBUSCH, E. D.; NEU, T. R.; NIELSEN, P. H.; SEVIOUR, T.; STOODLEY, P.; WINGENDER, J.; WUERTZ, S. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. **Nature Reviews Microbiology** 2022 21:2, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 70–86, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-022-00791-0>>. Acesso em: 27 jan. 2024.

FONTAINE, B. M.; DUGGAL, Y.; WEINERT, E. E. Exploring the Links Between Nucleotide Signaling and Quorum Sensing Pathways in Regulating Bacterial Virulence. **ACS infectious diseases**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 1645, 2018. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfdis.7b00150>>. Acesso em: 12 ago. 2023.

FUZITA, F. J.; PALMISANO, G.; PIMENTA, D. C.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. A proteomic approach to identify digestive enzymes, their exocytic and microapocrine secretory routes and their compartmentalization in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 257, p. 110670, 2022. . Acesso em: 27 jan. 2024.

- GAMAL EL-DIN, M.; ELDAHSHAN, O.; SINGAB, A.-N.; AYOUB, N. A. Genus *Enterolobium* : traditional uses, chemistry and biological activities. **Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2017.
- GITLIN-DOMAGALSKA, A.; MACIEJEWSKA, A.; DĘBOWSKI, D. Bowman-Birk Inhibitors: Insights into Family of Multifunctional Proteins and Peptides with Potential Therapeutical Applications. **Pharmaceuticals** **2020**, Vol. **13**, Page **421**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 421, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8247/13/12/421/htm>>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- GUIMARÃES, L. C.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; MARANGONI, S.; DE OLIVEIRA, D. G. L.; MACEDO, M. L. R. Purification and characterization of a Kunitz inhibitor from *Poincianella pyramidalis* with insecticide activity against the Mediterranean flour moth. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 118, p. 1–9, 2015. . Acesso em: 27 jan. 2024.
- GUPTA, A.; GUPTA, R.; SINGH, R. L. Microbes and Environment. **Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future**, [s. l.], p. 43, 2017. Disponível em: <pmc/articles/PMC7189961/>. Acesso em: 15 jul. 2023.
- GUPTA, V.; DATTA, P. Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: Antibiotic hybrids. **The Indian Journal of Medical Research**, [s. l.], v. 149, n. 2, p. 97, 2019. Disponível em: <pmc/articles/PMC6563750/>. Acesso em: 15 jul. 2023.
- GUTIERREZ-GONGORA, D.; GEDDES-MCALISTER, J. From Naturally-Sourced Protease Inhibitors to New Treatments for Fungal Infections. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 1016, 2021. Disponível em: <pmc/articles/PMC8704869/>. Acesso em: 22 jun. 2023.
- HOENIGL, M.; SEIDEL, D.; SPRUTE, R.; CUNHA, C.; OLIVERIO, M.; GOLDMAN, G. H.; IBRAHIM, A. S.; CARVALHO, A. COVID-19-associated fungal infections. **Nature Microbiology** **2022** **7**:8, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 1127–1140, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41564-022-01172-2>>. Acesso em: 21 jul. 2023.
- HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current opinion in microbiology**, [s. l.], v. 51, p. 72–80, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733401/>>. Acesso em: 15 jul. 2023.
- IM, S. Y.; BONTURI, C. R.; NAKAHATA, A. M.; NAKAIE, C. R.; POTT, A.; POTT, V. J.; OLIVA, M. L. V. Differences in the Inhibitory Specificity Distinguish the Efficacy of Plant Protease Inhibitors on Mouse Fibrosarcoma. **Plants** **2021**, Vol. **10**, Page **602**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 602, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2223-7747/10/3/602/htm>>. Acesso em: 26 jul. 2023.
- JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M. A.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018. . Acesso em: 27 jan. 2024.
- KALIA, V. C. **Quorum sensing inhibitors: An overview**, 2013.
- KEARNEY, K. J.; BUTLER, J.; POSADA, O. M.; WILSON, C.; HEAL, S.; ALI, M.; HARDY, L.; AHNSTRÖM, J.; GAILANI, D.; FOSTER, R.; HETHERSHAW, E.; LONGSTAFF, C.; PHILIPPOU, H. Kallikrein directly interacts with and activates Factor IX, resulting in thrombin generation and fibrin formation independent of Factor

XI. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [s. l.], v. 118, n. 3, p. e2014810118, 2021. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2014810118>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

KENICER, G. Legumes of the World. Edited by G. Lewis, B. Schrire, B. MacKinder & M. Lock. Royal Botanic Gardens, Kew. 2005. xiv + 577pp., colour photographs & line drawings. ISBN 1 900 34780 6. £55.00 (hardback).

Edinburgh Journal of Botany, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 195–196, 2006. Disponível em: <<https://journals.rbge.org.uk/ejb/article/view/1150>>. Acesso em: 29 jul. 2023.

KOIWA, H.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, [s. l.], 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** **1970** **227**:5259, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/227680a0>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics (Oxford, England)**, [s. l.], v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17846036/>>. Acesso em: 6 jan. 2024.

LI, J.; CHEN, D.; LIN, H. Antibiofilm peptides as a promising strategy: comparative research. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 105, n. 4, p. 1647–1656, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11103-6>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

LI, Q.; HUANG, L.; LUO, Z.; TAMER, T. M. Stability of trypsin inhibitor isolated from potato fruit juice against pH and heating treatment and in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 328, 2020.

LI, T.; WANG, Z.; GUO, J.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C.; WANG, J.; HAN, B.; TAO, H.; LIU, J.; WANG, X. Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 860, p. 160461, 2023. . Acesso em: 27 jan. 2024.

LOHSE, M. B.; GULATI, M.; JOHNSON, A. D.; NOBILE, C. J. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 19–31, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29062072/>>. Acesso em: 22 jul. 2023.

LOVO-MARTINS, M. I.; MALVEZI, A. D.; ZANLUQUI, N. G.; LUCCHETTI, B. F. C.; HIDEKO TATAKIHARA, V. L.; MÖRKING, P. A.; DE OLIVEIRA, A. G.; GOLDENBERG, S.; WOWK, P. F.; PINGE-FILHO, P. Extracellular vesicles shed By *Trypanosoma cruzi* potentiate infection and Elicit Lipid body formation and PGE2 production in murine macrophages. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, n. APR, p. 27, 2018. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5934475/](https://pmc/articles/PMC5934475/)>. Acesso em: 27 jan. 2024.

LU, L.; LI, M.; YI, G.; LIAO, L.; CHENG, Q.; ZHU, J.; ZHANG, B.; WANG, Y.; CHEN, Y.; ZENG, M. Screening strategies for quorum sensing inhibitors in combating

bacterial infections. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21418019/>>. Acesso em: 12 ago. 2023.

LUIZA VILELA OLIVA, M.; DA SILVA FERREIRA, R.; GASPERAZZO FERREIRA, J.; ALESSANDRA ANDRADE DE PAULA, C.; E SALAS, C.; UEMURA SAMPAIO, M. Structural and functional properties of kunitz proteinase inhibitors from leguminosae: a mini review. **Current protein & peptide science**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 348–357, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21418019/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

MACEDO, M. L. R.; GARCIA, V. A.; FREIRE, M. das G. M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 68, n. 8, p. 1104–1111, 2007.

MACEDO, M. L. R.; RIBEIRO, S. F. F.; TAVEIRA, G. B.; GOMES, V. M.; DE BARROS, K. M. C. A.; MARIA-NETO, S. Antimicrobial Activity of ILTI, a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Inga laurina* (SW.) Willd. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 5, p. 538–544, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-015-0970-z>>. Acesso em: 12 jun. 2023.

MACHADO, R. J. A.; MONTEIRO, N. K. V.; MIGLIOLO, L.; SILVA, O. N.; PINTO, M. F. S.; OLIVEIRA, A. S.; FRANCO, O. L.; KIYOTA, S.; BEMQUERER, M. P.; UCHOA, A. F.; MORAIS, A. H. A.; SANTOS, E. A. Characterization and Pharmacological Properties of a Novel Multifunctional Kunitz Inhibitor from *Erythrina velutina* Seeds. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. e63571, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063571>>. Acesso em: 23 jun. 2023.

MALINOVSKÁ, Z.; ČONKOVÁ, E.; VÁCZI, P. Biofilm Formation in Medically Important Candida Species. **Journal of Fungi** 2023, Vol. 9, Page 955, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 955, 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2309-608X/9/10/955/htm>>. Acesso em: 27 jan. 2024.

MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; GERACE, E.; BIONDO, C. **Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens**, MDPI, 2021.

MARATHE, K. R.; PATIL, R. H.; VISHWAKARMA, K. S.; CHAUDHARI, A. B.; MAHESHWARI, V. L. Chapter 6 - Protease Inhibitors and Their Applications: An Overview. Em: ATTA-UR-RAHMAN, B. T.-S. in N. P. C. (Ed.). [s.l.] : Elsevier, 2019. v. 62p. 211–242.

MARIAM, I. G.; OMAIMA, A. E.; NASSER, A.-; NAHLA, B. S. Genus Enterolobium: traditional uses, chemistry and biological activities. **Arch Pharm Sci ASU**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 16–25, 2017. . Acesso em: 3 maio. 2023.

MARLI PIRES MORIM; FRANCISMEIRE BONADEU SILVA; LILIAN A. MESQUITA. **Flora e Funga do Brasil - Enterolobium gummiferum (Mart.) J.F.Macbr.** [s.d.]. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB83156>>. Acesso em: 12 jun. 2023.

MEHMOOD, A.; LIU, G.; WANG, X.; MENG, G.; WANG, C.; LIU, Y. Fungal Quorum-Sensing Molecules and Inhibitors with Potential Antifungal Activity: A Review. **Molecules** 2019, Vol. 24, Page 1950, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 1950, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/24/10/1950/htm>>. Acesso em: 12 ago. 2023.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 142–151, 2011. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S1473309910702188/fulltext>>. Acesso em: 22 jul. 2023.

MICSONAI, A.; WIEN, F.; KERNYA, L.; LEE, Y. H.; GOTO, Y.; RÉFRÉGIERS, M.; KARDOS, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 112, n. 24, p. E3095–E3103, 2015. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1500851112>>. Acesso em: 3 maio. 2023.

MILLS, E. N. C.; HUANG, L.; NOEL, T. R.; GUNNING, A. P.; MORRIS, V. J. **Formation of thermally induced aggregates of the soya globulin L-conglycinin**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11410290/>>. Acesso em: 16 ago. 2023.

MM, B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

MOHAN, M.; KOZHITHODI, S.; NAYARISSEERI, A.; ELYAS, K. K. Screening, Purification and Characterization of Protease Inhibitor from *Capsicum frutescens*. **Bioinformation**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 285, 2018. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC6137568/>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

MORAIS, S. B.; FIGUEIREDO, B. C.; ASSIS, N. R. G.; ALVARENGA, D. M.; DE MAGALHÃES, M. T. Q.; FERREIRA, R. S.; VIEIRA, A. T.; MENEZES, G. B.; OLIVEIRA, S. C. *Schistosoma mansoni* SmKI-1 serine protease inhibitor binds to elastase and impairs neutrophil function and inflammation. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. e1006870, 2018. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006870>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

MOTTA, F. N.; BASTOS, I. M. D.; FAUDRY, E.; EBEL, C.; LIMA, M. M.; NEVES, D.; RAGNO, M.; BARBOSA, J. A. R. G.; DE FREITAS, S. M.; SANTANA, J. M. The *trypanosoma cruzi* virulence factor oligopeptidase B (OPBTc) assembles into an active and stable dimer. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2012.

MULANI, M. S.; KAMBLE, E. E.; KUMKAR, S. N.; TAWRE, M. S.; PARDESI, K. R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. APR, p. 539, 2019. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC6452778/>>. Acesso em: 21 jul. 2023.

NAKAHATA, A. M.; MAYER, B.; RIES, C.; DE PAULA, C. A. A.; KAROW, M.; NETH, P.; SAMPAIO, M. U.; JOCHUM, M.; OLIVA, M. L. V. The effects of a plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* on human tumor cell lines. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 392, n. 4, p. 327–336, 2011. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bc.2011.031/html>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of molecular biology**, [s. l.], v.

302, n. 1, p. 205–217, 2000. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10964570/>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

NUNEZ, C.; KOSTOULIAS, X.; PELEG, A.; SHORT, F.; QU, Y. A comprehensive comparison of biofilm formation and capsule production for bacterial survival on hospital surfaces. **Biofilm**, [s. l.], v. 5, p. 100105, 2023. . Acesso em: 27 jan. 2024.

OLIVA, M. L. V.; SILVA, M. C. C.; SALLAI, R. C.; BRITO, M. V.; SAMPAIO, M. U. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. **Biochimie**, [s. l.], v. 92, n. 11, p. 1667–1673, 2010. . Acesso em: 30 abr. 2023.

OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K. C.; MACEDO, L. L. P.; ANDRADE, L. B. S.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; DE SALES, M. P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 45, n. 10–11, p. 858–865, 2007.

OLIVEIRA, C.; VALOIS, M. V.; OTTAIANO, T. F.; MIRANDA, A.; HANSEN, 0020D.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. V.; DE ABREU MAFFEI, F. H. The recombinant plant *Bauhinia bauhinioides* elastase inhibitor reduces rat thrombus without alterations in hemostatic parameters. **Scientific reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34188079/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

OTVOS, R. A.; STILL, K. B. M.; SOMSEN, G. W.; SMIT, A. B.; KOOL, J. Drug Discovery on Natural Products: From Ion Channels to nAChRs, from Nature to Libraries, from Analytics to Assays. **SLAS discovery : advancing life sciences R & D**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 362–385, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30682257/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, [s. l.], v. 65, n. 7–8, p. 1220–1236, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18259688/>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R. J. Emerging and Emerged Pathogenic Candida Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. e1003550, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003550>>. Acesso em: 22 jul. 2023.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673617316124/fulltext>>. Acesso em: 27 jan. 2024.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. **Nosocomial fungal infections: Epidemiology, diagnosis, and treatment**, 2007.

PESQUET, E. Plant proteases - from detection to function. **Physiologia plantarum**, [s. l.], v. 145, n. 1, p. 1–4, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22420761/>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T. A. Results from the ARTEMIS DISK

Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 1366–1377, 2010. Disponível em:

<<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.02117-09>>. Acesso em: 22 jul. 2023.

RAMALHO, S. R.; BEZERRA, C. D. S.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, D. G.; SOUZA LIMA, L.; MARIA NETO, S.; RAMALHO DE OLIVEIRA, C. F.; VALÉRIO VERBISCK, N.; RODRIGUES MACEDO, M. L. Novel Peptidase Kunitz Inhibitor from *Platyptidium elegans* Seeds Is Active against *Spodoptera frugiperda* Larvae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 1349–1358, 2018.

Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.7b04159>>. Acesso em: 27 jan. 2024.

RAMOS, V. D. S.; CABRERA, O. G.; CAMARGO, E. L. O.; AMBRÓSIO, A. B.; VIDAL, R. O.; DA SILVA, D. S.; GUIMARÃES, L. C.; MARANGONI, S.; PARRA, J. R. P.; PEREIRA, G. A. G.; MACEDO, M. L. R. Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*.

Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, [s. l.], v. 156, n. 3–4, p. 148–158, 2012.

RAUT, A.; HUY, N. T. Rising incidence of mucormycosis in patients with COVID-19: another challenge for India amidst the second wave? **The Lancet Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. e77, 2021. Disponível em:

<<http://www.thelancet.com/article/S2213260021002654/fulltext>>. Acesso em: 22 jul. 2023.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; THOMAS, P. D.; HUANG, X.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database.

Nucleic Acids Research, [s. l.], v. 46, n. D1, p. D624–D632, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/46/D1/D624/4626772>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. **Evolutionary families of peptidase inhibitors**, 2004.

RINEH, A.; BREMNER, J. B.; HAMBLIN, M. R.; BALL, A. R.; TEGOS, G. P.; KELSO, M. J. Attaching NorA efflux pump inhibitors to methylene blue enhances antimicrobial photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, [s. l.], v. 28, n. 16, p. 2736–2740, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29519734/>>. Acesso em: 21 jul. 2023.

RODRIGUES MACEDO, M. L.; DURIGAN, R. A.; DA SILVA, D. S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M. das G. as M.; PARRA, J. R. P. *Adenanthra pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 213–231, 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/arch.20352>>. Acesso em: 3 maio. 2023.

ROSSI GONÇALVES, I.; DANTAS, R. C. C.; FERREIRA, M. L.; BATISTÃO, D. W. da F.; GONTIJO-FILHO, P. P.; RIBAS, R. M. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. **Brazilian**

Journal of Microbiology, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 211, 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5470431/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

SACHDEV, S.; ANSARI, S. A.; ANSARI, M. I.; FUJITA, M.; HASANUZZAMAN, M. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. **Antioxidants** **2021**, Vol. **10**, Page **277**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 277, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/2/277/htm>. Acesso em: 25 jul. 2023.

SANGAONKAR, G. M.; PAWAR, K. D. *Garcinia indica* mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles with antibacterial and antioxidant activities. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 164, p. 210–217, 2018.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; BEIGELMAN-AUBRY, C.; LAMOTH, F.; DUNET, V.; SLAVIN, M.; RICHARDSON, M. D. Diagnosis and treatment of invasive fungal infections: looking ahead. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 74, n. Supplement_2, p. ii27–ii37, 2019. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz041>. Acesso em: 21 jul. 2023.

SANTAMARÍA, M. E.; DIAZ-MENDOZA, M.; DIAZ, I.; MARTINEZ, M. Plant protein peptidase inhibitors: An evolutionary overview based on comparative genomics. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–14, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1471-2164-15-812>. Acesso em: 30 abr. 2023.

SANTOS, E. F.; SILVA, Â. A. O.; LEONY, L. M.; FREITAS, N. E. M.; DALTRO, R. T.; REGIS-SILVA, C. G.; DEL-REI, R. P.; SOUZA, W. V.; OSTERMAYER, A. L.; COSTA, V. M.; SILVA, R. A.; RAMOS, A. N.; SOUSA, A. S.; GOMES, Y. M.; SANTOS, F. L. N. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. e0008445, 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008445>. Acesso em: 27 jan. 2024.

SCHIJMAN, A. G. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. **Acta tropica**, [s. l.], v. 184, p. 59–66, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29476727/>. Acesso em: 27 jan. 2024.

SHARMA, S.; AGRAWAL, G.; DAS, S. COVID-19-associated Pulmonary Cryptococcosis: A Rare Case Presentation. **Indian Journal of Critical Care Medicine : Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 129, 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC8783228/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

SHEN, J. J.; JEMEC, G. B. E.; ARENDRUP, M. C.; SAUNTE, D. M. L. **Photodynamic therapy treatment of superficial fungal infections: A systematic review**, Elsevier B.V., 2020.

SILVA-LOPEZ, R. E.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; CHÁVEZ, M. A.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes. **Parasitology research**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 1627–1635, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17726617/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SONG, G.; LIANG, G.; LIU, W. Fungal Co-infections Associated with Global COVID-19 Pandemic: A Clinical and Diagnostic Perspective from China. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 185, n. 4, p. 599–606, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11046-020-00462-9>>. Acesso em: 24 jul. 2023.

SOUTO, X. M.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Chymotrypsin- and trypsin-like activities secreted by the multidrug-resistant yeasts forming the *Candida haemulonii* complex. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, [s. l.], v. 91, n. 3, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31553366/>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2013, 2013. . Acesso em: 22 jul. 2023.

STEVENSON, C.; HALL, J. P. J.; HARRISON, E.; WOOD, A. J.; BROCKHURST, M. A. Gene mobility promotes the spread of resistance in bacterial populations. **The ISME Journal**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1930, 2017. Disponível em: <pmc/articles/PMC5496671/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology** **2011 9:10**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 737–748, 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro2636>>. Acesso em: 12 ago. 2023.

TAO, S.; CHEN, H.; LI, N.; WANG, T.; LIANG, W. The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, [s. l.], v. 2022, 2022. Disponível em: <pmc/articles/PMC9314185/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

TEKDAL, D. Plant genes for abiotic stress in legumes. Em: **Abiotic Stress and Legumes: Tolerance and Management**. [s.l: s.n.].

VIOTTI, R.; ALARCÓN DE NOYA, B.; ARAUJO-JORGE, T.; GRIJALVA, M. J.; GUHL, F.; LÓPEZ, M. C.; RAMSEY, J. M.; RIBEIRO, I.; SCHIJMAN, A. G.; SOSA-ESTANI, S.; TORRICO, F.; GASCON, J. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 635–639, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24247135/>>. Acesso em: 27 jan. 2024.

YANG, L.; FANG, Z.; DICKE, M.; LOON, J. J. A. van; JONGSMA, M. A. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 55–61, 2009.

YU, D.; MENG, X.; DE VOS, W. M.; WU, H.; FANG, X.; MAITI, A. K. Implications of Gut Microbiota in Complex Human Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 23, p. 12661, 2021. Disponível em: <pmc/articles/PMC8657718/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

ZHOU, D.; LOBO, Y. A.; BATISTA, I. F. C.; MARQUES-PORTO, R.; GUSTCHINA, A.; OLIVA, M. L. V.; WLODAWER, A. Crystal Structures of a Plant Trypsin Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of Its Complex with Bovine Trypsin.

PLOS ONE, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 62252, 2013. a. Disponível em:
</pmc/articles/PMC3633903/>. Acesso em: 3 maio. 2023.

ZHOU, D.; LOBO, Y. A.; BATISTA, I. F. C.; MARQUES-PORTO, R.; GUSTCHINA, A.; OLIVA, M. L. V.; WLODAWER, A. Crystal Structures of a Plant Trypsin Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of Its Complex with Bovine Trypsin.

PLOS ONE, [s. l.], v. 8, n. 4, p. e62252, 2013. b. Disponível em:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0062252>. Acesso em: 28 jul. 2023.

ANEXO

Anexo 1 - Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN). Cadastro número A315278.



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A315278

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A315278
Usuário:	MARIA LIGIA RODRIGUES MACEDO
CPF/CNPJ:	221.061.703-00
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Inga cylindrica
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Escherichia coli
Salmonella enterica
Enterobacter aerogenes
Pseudomonas aeruginosa
Candida albicans
Candida tropicalis
Candida buinensis
Fagopyrum tataricum
Spodoptera frugiperda
Galleria mellonella

Staphylococcus saprophyticus
Staphylococcus haemolyticus
Klebsiella oxytoca
Proteus mirabilis
Enterobacter aerogenes
Enterobacter cloacae
Klebsiella pneumoniae
Acinetobacter baumannii
Serratia marcescens
Candida krusei
Candida parapsilosis
Candida glabrata
Erythrina poeppigiana
Staphylococcus aureus (MR)
Enterolobium gummiferum
Clitoria fairchildiana
Vigna unguiculata
Cucurbita maxima
Listeria monocytogenes
Enterococcus faecalis
Inga laurina
Enterolobium Timbouva

Título da Atividade:

BUSCA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DE ORIGEM NATURAL OU SINTÉTICA

Equipe

Ana Paula Ramos Pereira	UFMS
Caio Fernando Ramalho de Oliveira	UFMS
Claudiane Vilharroel Almeida	UFMS
Maria Caroline de Moura Cavalheiro	UFMS
Janaína de Cássia Orlandi Sardi	UFMS
Jesus Rafael Rodriguez Amado	UFMS
Cláudia Magno Pereira de Brito	UFMS

Luís Henrique de Oliveira Almeida	UFMS
Graziele Custodia Sandim	UFMS
Amanda Carolina Borges da Silva	UFMS
Leticia Souza Lima	UFMS
Simone Maria Neto	UFMS
Matheus Maganha da Silva	UFMS
Suellen Rodrigues Ramalho	UFMS
Bruna Sanae Moroto	UFMS
Milenna Queiroz Tobias	UFMS
Paula Bêlit Mazacote Zenteno	UFMS
Ricardo Abreu de Oliveira	UFMS
Thaís de Oliveira Anastácio	UFMS
Queisielle Magalhães Carvalho de Souza	UFMS

Data do Cadastro: 14/12/2020 18:19:14

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 7:57 de 06/08/2021.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**