

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
MESTRADO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE

ISMAELL AVELINO DE SOUSA SOBRINHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE UM
INIBIDOR DE TRIPSINA EXTRAÍDO DAS SEMENTES DE *Poincianella pyramidalis*
(Tul) L.P. Queiroz**

CAMPO GRANDE

2024

ISMAELL AVELINO DE SOUSA SOBRINHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE UM
INIBIDOR DE TRIPSINA EXTRAÍDO DAS SEMENTES DE *Poincianella pyramidalis*
(Tul) L.P. Queiroz**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Metabolismo e Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Ligia Rodrigues Macedo

Coorientadora: Dr^a Tamaeh Monteiro Alfredo

CAMPO GRANDE
2024

ISMAELL AVELINO DE SOUSA SOBRINHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE UM
INIBIDOR DE TRIPSINA EXTRAÍDO DAS SEMENTES DE *Poincianella pyramidalis*
(Tul) L.P. Queiroz**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Metabolismo e Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Ligia Rodrigues Macedo

Coorientadora: Dr^a Tamaeh Monteiro Alfredo

Banca examinadora:

Nota/conceito

Maria Ligia Rodrigues Macedo – Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Rita de Cássia Avellaneda Guimarães – Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Teofilo Fernando Mazon Cardoso – Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Fabiana Fonseca Zanoelo – Instituto de Biociências –
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Maria Lígia, que confiou e acolheu um aluno que não conhecia, mas que sempre acreditou no meu potencial e nunca deixou de depositar sua confiança em mim. Além disso, com muito carinho e dedicação, me guiou pelos melhores caminhos com seus ensinamentos e orientações. Obrigado por tudo, professora!

À minha coorientadora, Tamaeh Monteiro, sou grato pelas horas que passamos juntos em bancada, seja trabalhando com microrganismos invisíveis à olho nu, ou com ratos e camundongos no biotério da UFMS. Também sou grato pelo seu carinho, amizade construída e companheirismo. Obrigado!

À minha família de Maceió, sobretudo à minha mãe, avó e tia, que sempre dedicaram todo o seu tempo e esforços para garantir que eu tivesse a melhor educação possível. Sem elas, eu não seria nada.

Também sou grato à minha família do Mato Grosso do Sul, composta por meus sogros, carinhosamente apelidados de Nonô e Ciduxa, e Marcelo, que me acolheram sem medir esforços e me acompanharam nesta jornada.

Ao meu noivo, Mateus, que sempre apoiou minhas escolhas e decisões, me ouviu falar sobre todos os experimentos que realizei nestes dois últimos anos e até compartilhou dúvidas comigo.

À Claudiane que me ajudou em diversos experimentos e me ensinou grande parte do que eu sei. Também sou grato por toda a parceria nas manhãs e tardes no laboratório, repletas de risos, conversas e companheirismo.

À Patrícia Matos, técnica de laboratório da UFMS, que tanto me ensinou nos laboratórios do LPPFB, além de ajudar em diversas etapas deste trabalho.

Aos demais membros do LPPFB, que sempre se dispuseram a sanar minhas dúvidas e me ajudar, além de encher de alegria as reuniões de cunho científico e as confraternizações.

A todos os professores, pesquisadores e colaboradores, que puderam transmitir um pouco do seu conhecimento. E a todos que contribuíram direta ou indiretamente durante essa caminhada. Aos professores membros da banca de qualificação que aceitaram o convite e dedicaram-se a leitura desse trabalho.

A Deus, por me encher de luz, força, sabedoria e entusiasmo, permitindo que eu vivesse e desfrutasse desses dois anos da melhor forma possível!

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FUNDECT e FINEP, e a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina e Programa de Pós-graduação em Saúde e

Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, por ajudarem na manutenção do laboratório e fazerem com que a realização deste trabalho fosse possível.

RESUMO

A capacidade adaptativa dos microrganismos levou ao desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência que permitiram sua sobrevivência. A resistência antimicrobiana é uma preocupação global e uma ameaça à saúde pública, promove prejuízos socioeconômicos e resulta em altas taxas de mortalidade. Assim, torna-se evidente a necessidade da bioprospecção de compostos com atividade antimicrobiana. Os inibidores de peptidases (IPs) são polipeptídeos ou proteínas responsáveis pela defesa das plantas, e possuem aplicabilidade biotecnológica, como é o exemplo o inibidor de tripsina das sementes de *Poincianella pyramidallis* (PpyTI). Apesar de sua comprovada atividade inseticida, não existem relatos disponíveis na literatura sobre seu potencial antimicrobiano e antibiofilme. Portanto, este trabalho possuiu como objetivo determinar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do PpyTI. O PpyTI foi isolado por técnicas cromatográficas, seguido de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A concentração inibitória, bactericida e fungicida mínima (CIM, CBM e CFM, respectivamente) foram determinadas para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Sorbitol, ergosterol e a sonda fluorescente Sytox™ Green foram utilizados para investigar possíveis mecanismos de ação do inibidor. O PpyTI não apresentou atividade frente bactérias Gram-positivas e negativas, porém apresentou importante atividade fungicida, com a CIM e CFM para *C. tropicalis* de 3,28 µM, enquanto para *C. albicans* apresentou CIM e CFM de 6,56 µM. Em associação com o fluconazol, o inibidor apresentou efeito sinérgico, reduzindo a CIM de ambos os compostos contra *C. albicans*. A adição do ergosterol resultou no aumento da CIM de ambas as cepas, sugerindo que o mecanismo de ação PpyTI envolve a alteração da integridade da membrana plasmática fúngica, sendo este resultado corroborado por meio do corante de ácidos nucleicos Sytox™ Green. Adicionalmente, o PpyTI foi capaz de inibir a formação de biofilme por meio de danos à membrana celular das células constituintes do biofilme fúngico, reduzindo sua massa, sendo estes resultados superiores aos observados pelos antifúngicos anfotericina B e fluconazol. Os resultados apresentados neste estudo fornecem evidências que PpyTI possa ser utilizado no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas.

Descritores: Inibidores de tripsina; resistência microbiana; biofilme; *Candida albicans*; *Candida tropicalis*.

ABSTRACT

Microorganisms have evolved various resistance mechanisms to survive, which has led to the rise of antimicrobial resistance. This global issue poses a significant threat to public health, resulting in economic damage and high mortality rates. Given this, there's a clear need to search for new compounds with antimicrobial properties. Peptidase inhibitors (PIs) are polypeptides or proteins that play a role in plant defense and have potential biotechnological applications, such as the trypsin inhibitor derived from *Poincianella pyramidalis* (PpyTI). Despite its proven insecticidal activity, there are no reports in the literature regarding its potential antimicrobial and antibiofilm properties. Therefore, this study aimed to determine the antimicrobial and antibiofilm activity of PpyTI. PpyTI was isolated using chromatographic techniques followed by SDS-PAGE for protein electrophoresis. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and minimum fungicidal concentration (MFC) were determined for Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as yeasts. Sorbitol, ergosterol, and the fluorescent dye Sytox™ Green were used to investigate potential mechanisms of action of the inhibitor. PpyTI showed no activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria but exhibited significant fungicidal activity, with MIC and MFC values of 3.28 µM for *C. tropicalis* and MIC and MFC values of 6.56 µM for *C. albicans*. When used in combination with fluconazole, the inhibitor displayed a synergistic effect, reducing the MIC of both compounds against *C. albicans*. The addition of ergosterol led to an increase in the MIC for both strains, suggesting that the mechanism of action of PpyTI involves altering the integrity of the fungal plasma membrane. These findings were supported by results from Sytox™ Green, a nucleic acid stain that cannot penetrate intact membranes. Additionally, PpyTI was able to inhibit biofilm formation by damaging the cell membrane of the fungal biofilm cells, reducing its mass. These results were superior to those observed with the antifungals amphotericin B and fluconazole. The data presented in this study provide evidence that PpyTI could be used in developing therapeutic strategies for treating fungal infections.

Keywords: Trypsin inhibitors; drug resistance; biofilms *Candida albicans*; *Candida tropicalis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Epidemiologia da Candidemia na América do Sul	22
Figura 2 – Linha do tempo relacionada a resistência aos antibióticos.....	23
Figura 3 – Impactos da resistência antimicrobiana a nível global	24
Figura 4 – Consequências da resistência bacteriana e principais mecanismos adaptativos associados à RAM.....	25
Figura 5 – Mecanismos de ação dos principais agentes antifúngicos disponíveis atualmente....	26
Figura 6 – Estágios do desenvolvimento do biofilme fúngico.....	31
Figura 7 – Mecanismos de ação dos IPs.....	34
Figura 8 – <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P. Queiroz	35
Figura 9 – Purificação do PpyTI.....	50
Figura 10 – Atividade fungicida tempo-dependente do PpyTI frente a <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i>	52
Figura 11 – Permeabilização da membrana plasmática das leveduras <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i> tratados com PpyTI.....	55
Figura 12 – Efeito antibiofilme do PpyTI, anfotericina B e fluconazol frente a <i>C. tropicalis</i>	56
Figura 13 – Efeito antibiofilme do PpyTI, anfotericina B e fluconazol frente a <i>C. albicans</i>	57
Figura 14 – Efeito do PpyTI, anfotericina B e fluconazol na erradicação do biofilme maduro.....	58
Figura 15 – Taxa de sobrevivência (%) de larvas de <i>G. mellonella</i> tratadas com PpyTI.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Drogas antifúngicas, alvos e mecanismos de resistência antifúngica.....	28
Tabela 2 – Atividade antibacteriana do PpyTI e do antibiótico ciprofloxacina.....	51
Tabela 3 – Atividade antifúngica do PpyTI e dos antifúngicos anfotericina B e fluconazol	51
Tabela 4 – Avaliação do efeito sinérgico do PpyTI associado a anfotericina B e fluconazol frente as leveduras <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i>	53
Tabela 5 – Atividade antifúngica do PpyTI na presença do sorbitol (0.8 M) e ergosterol (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i>	54

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).....	74
---	----

LISTA DO CÓDIGO DOS AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Aspartato	D
Cisteína	C
Fenilalanina	F
Glicina	G
Glutamato	E
Glutamina	Q
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Prolina	P
Serina	S
Tirosina	Y
Treonina	T
Triptofano	W
Valina	V

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AATI – Inibidor de tripsina das sementes de *Achyranthes aspera*
Abs – Absorbância
ATCC – American Type Culture Collection
BAPNA – N-benzoyl-L-arginina-p-nitroanilida
BHI – Brain Heart Infusion
CBM – Concentração Bactericida Mínima
CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos
CFM – Concentração Fungicida Mínima
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
CLTI – Inibidor de tripsina das sementes de *Cassia leiandra* Benth
DMSO – Dimetilsufóxido
DO – Densidade Óptica
EB – Extrato Bruto
ENA – Espécies Não-albicans
EPS – Exopolissacarídeos
EpTI – Inibidor de tripsina das sementes de *Erythrina poeppigiana*
EUA – Estados Unidos da América
H₂O – Água
HCl – Ácido Clorídrico
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
IKR18 – Peptídeo Antimicrobiano Sintético
IP – Iodeto de Propídio
IPs – Inibidores de Peptidases
IRAS – Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde
JcTI-I – Inibidor de tripsina das sementes de *Jatropha curcas*
kDa – Quilodalton
LPPFB – Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas
M – Unidade de Concentração Molar
MEROPS – Base de Dados para Peptidases e Inibidores
Mg – Miligrama
MHA – Muller Hinton Ágar

MHC – Muller Hinton Caldo

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MRA – Microrganismos Resistentes à Múltiplas Drogas

NaCl – Cloreto de Sódio

Nm – Nanômetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAM – Peptídeos Antimicrobianos

pH – Potencial hidrogeniônico

PpyTI – Inibidor de Tripsina de *Poincianella pyramidalis*

RAM – Resistência Antimicrobiana

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

rpm – Rotações por Minuto

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SDA – Sabouraud Dextrose Ágar

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético Conhecimento Tradicional Associado

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

μM – Micromolar

μL – Microlitro

μg – Micrograma

°C – Grau celsius

% – Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	Infecções nosocomiais bacterianas e fúngicas	20
2.2	Resistência antimicrobiana	22
2.3	Biofilme como mecanismo de resistência microbiana	30
2.4	Considerações gerais sobre os inibidores de peptidases	32
2.5	Inibidores de peptidases como agentes antibacterianos, antifúngicos e antibiofilme	34
2.6	Inibidor de tripsina das sementes de <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P. Queiroz	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Obtenção do PpyTI	39
4.1.1	Acesso ao patrimônio genético	39
4.1.2	Material vegetal e reagentes	39
4.1.3	Obtenção do extrato bruto	39
4.1.4	Obtenção do PpyTI	40
4.2	Análise da atividade inibitória frente a enzima tripsina	40
4.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
4.4	Quantificação de proteínas	41
4.5	Avaliação da atividade antimicrobiana	41
4.5.1	Microrganismos e cultura	41
4.5.2	Atividade antibacteriana	42
4.5.3	Atividade antifúngica	42
4.5.3.1	Preparo do inóculo fúngico	42
4.5.3.2	Determinação da CIM e da concentração fungicida mínima (CFM)	43
4.5.4	Singergismo pelo método Checkerboard	43
4.5.5	Ensaio da atividade fungicida tempo-dependente	44
4.5.6	Investigação do mecanismo de ação do PpyTI frente a leveduras	44

4.5.6.1	Ensaio de proteção osmótica com sorbitol	44
4.5.6.2	Ensaio de ligação ao ergosterol	45
4.5.6.3	Permeabilização da membrana plasmática	45
4.5.6.4	Análise da permeabilização de membrana plasmática por microscopia de fluorescência	46
4.6	Avaliação da atividade antibiofilme do PpyTI	46
4.6.1	Inibição da formação de biofilme	46
4.6.2	Erradicação do biofilme maduro	47
4.6.3	Inibição da formação do biofilme por microscopia de fluorescência	47
4.7	Avaliação da toxicidade do PpyTI em modelo <i>in vivo</i> de <i>Galleria mellonella</i>	48
4.8	Análise estatística	48
5	RESULTADOS	50
5.1	Obtenção do PpyTI	50
5.2	Atividade antimicrobiana	51
5.2.1	Determinação da concentração inibitória, bactericida e fungicida mínima	51
5.2.2	Efeito fungicida tempo-dependente do PpyTI	52
5.2.3	Efeito sinérgico entre PpyTI e os antifúngicos anfotericina B e fluconazol	52
5.3	Mecanismos de ação	53
5.3.1	Ensaio de ligação ao sorbitol e ergosterol	53
5.3.2	Permeabilização da membrana celular	54
5.4	Avaliação da atividade antibiofilme do PpyTI	55
5.4.1	Inibição da formação de biofilme de <i>C. tropicalis</i> e <i>C. albicans</i>	55
5.4.2	Efeito do PpyTI sobre biofilme maduro	57
5.5	Toxicidade <i>in vivo</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	58
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO A – Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).....	75

1 INTRODUÇÃO

Há décadas os agentes antimicrobianos vêm sendo empregados de forma eficaz no tratamento de uma ampla gama de infecções (Brinkac *et al.*, 2017). A descoberta e o desenvolvimento dos antibióticos na metade do último século revolucionaram a saúde, sendo nomeada como “era do antibiótico”, responsável por gerar uma gama de mudanças terapêuticas no combate as doenças infecciosas, permitindo o desenvolvimento da medicina (Asenjo; Oteo-Iglesias; Alós, 2021; Huemer *et al.*, 2020). Entretanto, a capacidade adaptativa dos microrganismos levou ao surgimento de diferentes mecanismos de defesa que permitiram sua sobrevivência frente aos agentes terapêuticos, o que ficou conhecido como resistência antimicrobiana (RAM) (Corrêa *et al.*, 2022). A RAM é uma preocupação global de magnitude crescente e que ameaça a saúde pública, promovendo prejuízos socioeconômicos e altas taxas de mortalidade (Arzanlou; Chai; Venter, 2017; Asenjo; Oteo-Iglesias; Alós, 2021).

No último relatório global de RAM e do sistema de vigilância de uso de antimicrobianos da Organização Mundial de Saúde (OMS), foram observados altos níveis (> 50%) de resistência a bactérias que frequentemente causam sepse em hospitais, como *Klebsiella pneumoniae* ou *Acinetobacter* spp. (OMS, 2022). Estima-se que as infecções causadas por bactérias resistentes sejam responsáveis por cerca de 700.000 mil óbitos ao ano em todo mundo, com estimativa de atingir 10 milhões de mortes em 2050 (Huemer *et al.*, 2020). Adicionalmente, a OMS destacou 6 bactérias que compõem o grupo ESKAPE, constituído por bactérias Gram-positivas e negativas que representam ameaça global pela sua capacidade de causar infecções nosocomiais e “escapar” da ação biocida de antibióticos convencionais, sendo elas *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (Mulani *et al.*, 2019).

Os fungos representam outro grupo de patógenos que merece atenção. Eles têm o potencial de impactar significativamente tanto a saúde humana quanto a segurança alimentar, apesar de muitas vezes serem negligenciados no contexto dos microrganismos (Revie *et al.*, 2018). De modo geral, a maioria dos casos de infecções fúngicas são reconhecidas como infecções leves e afetam a pele, cabelo, unhas, olhos e as mucosas oral e vaginal. Entretanto, estima-se que estas infecções representem aproximadamente 135 milhões de casos, com elevadas taxas de mortalidade, sobretudo em pacientes imunocomprometidos, sendo responsáveis por mais de 1,6 milhões de mortes anualmente (Rokas, 2022). Leveduras do gênero *Candida*, com destaque para *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e, em algumas regiões, *Candida auris*, estão associadas

ao desenvolvimento de candidemia – infecção sistêmica causada por espécies do gênero *Candida* (McCarty; White; Pappas, 2021) e são responsáveis por cerca de 90% das mortes decorrentes de infecções fúngicas (Lee *et al.*, 2021).

Além das infecções bacterianas e fúngicas, a presença de biofilmes – comunidades tridimensionais de microrganismos protegidos por uma matriz extracelular composta por macromoléculas – também representa um problema de saúde pública e está associada ao desenvolvimento de várias doenças como a fibrose cística, endocardite, osteomielite, sinusite, infecções do trato urinário e periodontite, além de apresentar uma maior resistência aos tratamentos antimicrobianos usuais, com até 1.000 vezes mais resistência que células planctônicas (Del Pozo, 2018; Rabin *et al.*, 2015). Diante da problemática envolvendo infecções bacterianas e fúngicas, além da formação de biofilmes, torna-se evidente a necessidade da bioprospecção de compostos que atuem no controle e tratamento destas infecções (Bassetti *et al.*, 2013; De Oliveira *et al.*, 2020; Santajit; Indrawattana, 2016).

Os compostos naturais derivados de plantas representam uma importante fonte de moléculas com potencial biotecnológico (Gutierrez-Gongora; Geddes-McAlister, 2021), como é o caso dos Inibidores de Peptidases (IPs). Os IPs atuam na defesa das plantas contra pragas e patógenos, regulando vários processos biológicos (Clemente *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2009). A expressão destas moléculas é influenciada por diversas condições, como o ataque de herbívoros e microrganismos, injúrias e condições de estresse ambiental (Alencar de Barros *et al.*, 2021). Os IPs possuem importante aplicabilidade na biotecnologia e medicina (Srikanth; Chen, 2016) pelas suas propriedades inseticida (Dantzger *et al.*, 2015; Guimarães *et al.*, 2015), antimicrobiana e antifúngica (Karray *et al.*, 2020; Macedo *et al.*, 2016; Mohan; Kumari; Elyas, 2018; Silva *et al.*, 2017), antibiofilme (Alencar de Barros *et al.*, 2021) e anticâncer (Magee *et al.*, 2012; Srikanth; Chen, 2016). Também são empregados na síntese de peptídeos sintéticos, como o Adevonin, um peptídeo com atividade antimicrobiana bioinspirado no inibidor de tripsina da *Adenanthera pavonina* (Rodrigues *et al.*, 2018) e dos peptídeos antimicrobianos IKR18, KWI-19 e RQ18 (Almeida, C. V. *et al.*, 2024; Almeida, L. H. de O. *et al.*, 2024; Ramalho *et al.*, 2022).

Nosso grupo descreveu o processo de purificação de um inibidor de tripsina do tipo Kunitz, proveniente das sementes da *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae, Caesalpinioideae) (Guimarães *et al.*, 2015). A espécie *P. pyramidalis* é popularmente conhecida como catingueira e amplamente distribuída na região semiárida do Brasil. Suas cascas, folhas e flores são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças como influenza, resfriados, diarreia, desintéria, infecções respiratórias e urinárias, além de inflamações de forma geral

(Chaves *et al.*, 2016; Mendes *et al.*, 2014). Além das aplicações etnofarmacológicas, Guimarães e colaboradores (2015) demonstraram a atividade inseticida do inibidor de tripsina PpyTI. Este inibidor foi eficaz contra larvas de *Anagasta kuehniella*, uma espécie de inseto-praga que se alimenta de uma variedade de produtos armazenados, como frutas, grãos, farinhas e castanhas, causando prejuízos econômicos (Macedo *et al.*, 2010). Apesar do efeito inseticida já descrito, até o momento não existem relatos sobre o potencial antifúngico desta proteína. Desta forma, novos estudos são necessários para explorar as propriedades antimicrobianas do PpyTI. Sendo assim, nosso objetivo foi avaliar as propriedades antimicrobiana, antibiofilme e a toxicidade do inibidor de tripsina de sementes de *P. pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Infecções nosocomiais bacterianas e fúngicas

As infecções contribuem de forma substancial para as taxas de mortalidade (Magana *et al.*, 2020) e representam um problema de saúde pública mundial (Soares *et al.*, 2017). No que diz respeito as infecções hospitalares (infecções nosocomiais), 25% dos óbitos são registrados nos países em desenvolvimento e 5 a 15% nos países desenvolvidos (Lemiech-Mirowska *et al.*, 2021), resultando em US\$ 45 bilhões de gastos anuais em países como Estados Unidos e Europa (Storr *et al.*, 2017). As infecções nosocomiais representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade, sobretudo nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), onde as infecções são 2 a 5 vezes mais recorrentes quando comparadas as enfermarias (Negri *et al.*, 2012). Indivíduos imunocomprometidos constituem o principal grupo de risco para este tipo de infecção, principalmente quando associado ao uso de dispositivos intravasculares (Liu; Dickter, 2020). Bactérias Gram-negativas, em especial, são descritas como as responsáveis pela maioria das infecções bacterianas (Klímová *et al.*, 2016). No ambiente hospitalar, as principais bactérias associadas ao desenvolvimento de infecções são representadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella* spp., e *Brucella* spp.

A existência de microrganismos resistentes à múltiplas drogas (MRA) resulta em um cenário de grande preocupação e incertezas na comunidade médica e científica mundial (de Oliveira Santos *et al.*, 2022), sobretudo pela sua capacidade de transmissão entre humanos e a falta de opções terapêuticas (Mills; Marchaim, 2021). Ao contrário das infecções bacterianas e da resistência aos antibióticos, doenças associadas a infecções fúngicas geralmente são subestimadas. Neste contexto, patógenos fúngicos tem emergido como uma das principais causas de morbimortalidade humana, onde as estimativas apontam que cerca de 150 milhões de pessoas possuem infecções fúngicas e 1,5 milhões de mortes são associadas à estas infecções em todo o mundo (Lee *et al.*, 2021; Prasad; Banerjee; Shah, 2017; Revie *et al.*, 2018). As infecções fúngicas variam de infecções superficiais na cavidade oral ou trato geniturinário até infecções sistêmicas (Delarze; Sanglard, 2015). Os agentes etiológicos predominantes das infecções fúngicas sistêmicas incluem os microrganismos da espécie *Aspergillus*, responsáveis por causar doença sinopulmonar em pacientes com câncer hematológico e receptores de transplante de células-tronco; *Cryptococcus neoformans*, responsáveis por causar meningoencefalite em pessoas imunocomprometidas; e espécies do gênero *Candida*, que

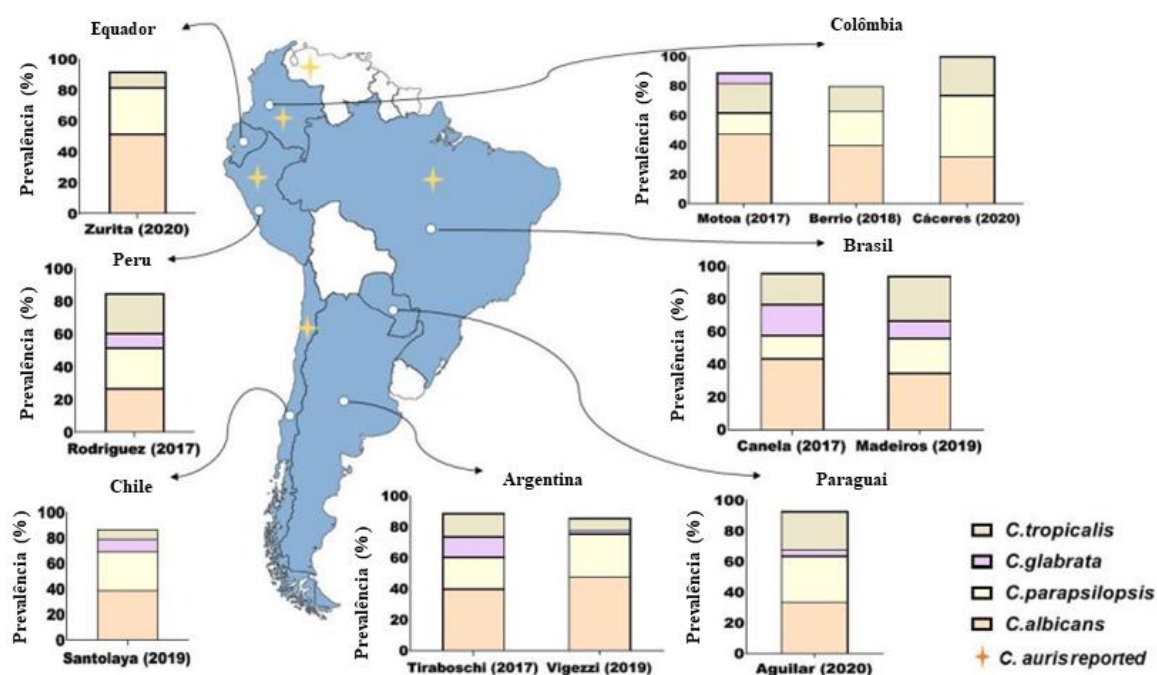
frequentemente causam infecções na corrente sanguínea de pacientes hospitalizados (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021). Juntas, as espécies supracitadas são responsáveis por cerca de 90% das mortes decorrentes de infecções fúngicas (Lee *et al.*, 2021).

As espécies do gênero *Candida* são importantes membros da microbiota comensal de humanos e animais, sendo comumente isolada da pele e mucosa de indivíduos saudáveis (Guimarães *et al.*, 2015). Entretanto, as infecções fúngicas causadas por esta espécie estão emergindo como um problema de saúde pública (Pereira *et al.*, 2021), sobretudo nos casos onde a disbiose, desnutrição, deficiências imunológicas, abuso do uso de antibióticos e condições sanitárias precárias estão presentes (Cordeiro *et al.*, 2015). O gênero de fungos *Candida* abrange cerca de 200 espécies fúngicas, sendo que mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, que são patógenos oportunistas em humanos e que podem causar candidíase invasiva (Araújo *et al.*, 2019; Atencia-Carrera *et al.*, 2022). As espécies de *Candida* representam a 4ª causa mais comum de infecções nosocomiais encontradas na corrente sanguínea nos EUA, com taxa de mortalidade de aproximadamente 50% (Cavalheiro; Teixeira, 2018). As taxas de mortalidade associadas aos casos de candidemia por si só, excede todos os casos de septicemia aguda associada à bactérias Gram-negativas (Prasad; Banerjee; Shah, 2017), sendo a candidíase invasiva uma das maiores ameaças nas UTIs, apresentando uma significativa mortalidade em pacientes debilitados (Maubon *et al.*, 2014). No Brasil, em um estudo epidemiológico conduzido por 6 anos na região nordeste, publicado em 2019 por Medeiros e colaboradores, foi encontrada uma alta incidência de candidemia (2,23 casos/1.000 admissões hospitalares) com tendência de crescimento e alta taxa de mortalidade após 7 e 30 dias de internação (33,8 e 55,9% respectivamente). Na UTI, a mortalidade atingiu 70,8% dos pacientes admitidos, sendo maior que em qualquer outro setor hospitalar (Medeiros *et al.*, 2019).

Embora a *C. albicans* continue sendo o principal patógeno associado à candidemia, observa-se uma redução na incidência de casos associados a este microrganismo. Espécies não-*albicans* (ENA) como *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* vêm tomando espaço no desenvolvimento desta complicação (Medeiros *et al.*, 2019), e essa tendência é observada, inclusive, na América do Sul (Figura 1). A *C. tropicalis* é a mais importante espécie de *Candida* dentre as ENA, principalmente pelo desenvolvimento de resistência à tratamentos empíricos, como o fluconazol, e sua associação com infecções sistêmicas, onde a candidemia associada à *C. tropicalis* possui incidência de 3 a 66% em regiões tropicais e subtropicais (Atencia-Carrera *et al.*, 2022; de Souza *et al.*, 2023). Além disso, *C. tropicalis* aparenta ter um maior potencial de disseminação em pacientes neutropênicos que a *C. albicans* e outras ENA, o que pode justificar

sua alta taxa de mortalidade (Negri *et al.*, 2012). Ambas, *C. albicans* e *C. tropicalis* são conhecidas por possuírem uma gama de fatores virulentos e características comensais que conferem habilidades invasora e colonizadora do tecido do hospedeiro por meio da expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, capacidade de promover lesão celular, secretar enzimas proteolíticas e formar biofilmes (Atiencina-Carrera *et al.*, 2022).

Figura 1 – Epidemiologia da Candidemia na América do Sul.



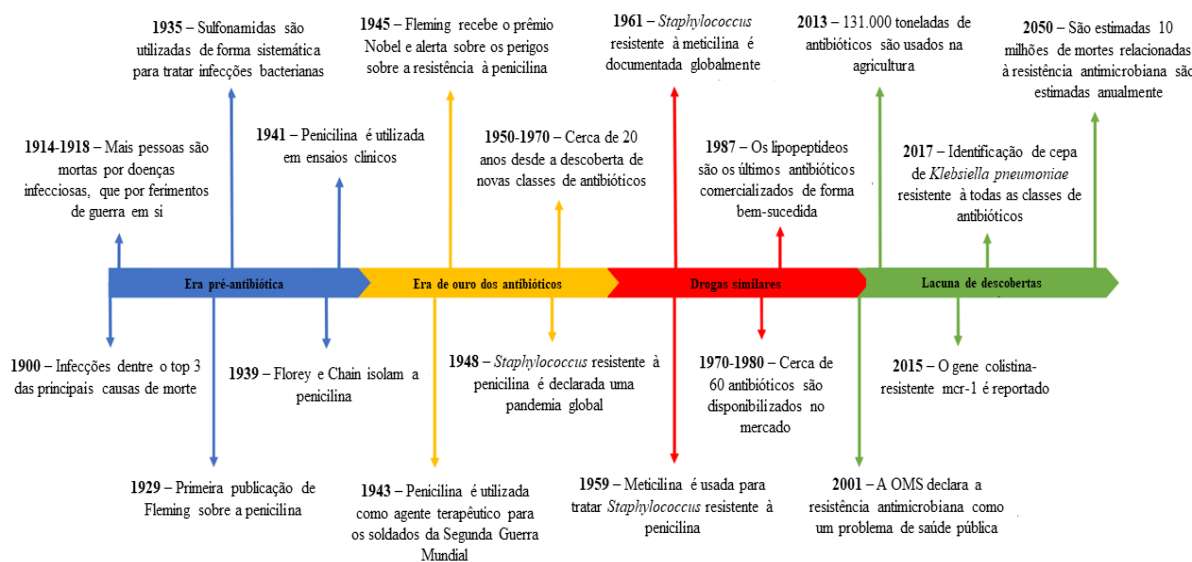
Fonte: Adaptado de Rieira *et al.*, 2022.

2.2 Resistência antimicrobiana

A descoberta da penicilina em 1928, por Alexander Fleming, e o subsequente desenvolvimento de uma gama de antibióticos representaram um marco na medicina, sobretudo no tratamento de infecções que eram consideradas como sentenças de morte, como a tuberculose e pneumonia. Este avanço reduziu drasticamente as taxas de morbimortalidade e promoveu o desenvolvimento nas áreas das ciências médicas e cirúrgicas (Lewies; Du Plessis; Wentzel, 2019). Desde a sua descoberta, os antibióticos vêm sendo amplamente utilizados na medicina, alimentação e agricultura (Luo; Song, 2021). Embora os antibióticos já tenham sido eficazes para o tratamento de infecções bacterianas, o amplo e indiscriminado uso destes agentes resultou no surgimento da RAM (Magana *et al.*, 2020), nos levando para a conhecida

era “pós-antibiótica” (Figura 2) (Lee *et al.*, 2021). Este cenário se tornou uma das principais preocupações para a saúde pública, no âmbito comunitário e hospitalar, em virtude do rápido e crescente aumento na resistência à medicamentos comumente utilizados (Bin Hafeez *et al.*, 2021; Magana *et al.*, 2020).

Figura 2 – Linha do tempo relacionada a resistência aos antibióticos.

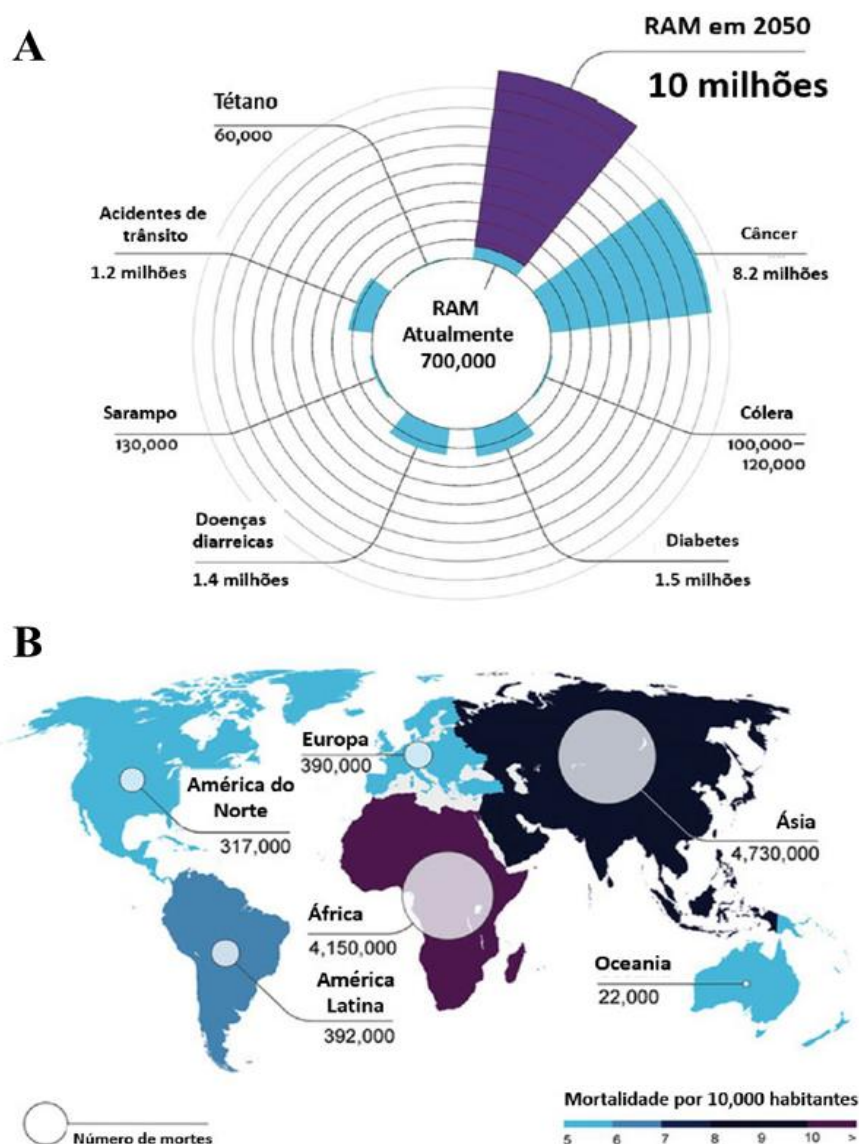


Fonte: Adaptado de Browne *et al.*, 2020.

Dados apontam que a RAM precede a identificação, síntese ou comercialização destes medicamentos, com histórico de bactérias com mais de 2000 anos, isoladas de águas glaciais e resistentes à ampicilina (Morrison; Zembower, 2020). Os microrganismos encontram maneiras de driblar os desafios encontrados em ambientes hostis num sistema adaptativo há milhões de anos. São capazes de herdar genes de gerações anteriores e de adquirir material genético de outras espécies num sistema conhecido como transferência horizontal de genes, o que favorece a RAM (Lewies; Du Plessis; Wentzel, 2019). Estima-se que a RAM seja responsável por causar aproximadamente 700.000 mortes em todo o mundo, podendo chegar a 10 milhões de mortes ao ano em 2050 (Figura 3) (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020). Associado a estes dados, estima-se que a economia mundial também será brutalmente afetada pela RAM, onde as mortes prematuras serão responsáveis por gerar prejuízos superiores a 100 trilhões de dólares (Munita; Arias, 2016). As bactérias podem apresentar resistência à múltiplas drogas – condição em que os microrganismos apresentam resistência a um ou mais agentes antimicrobianos, em três ou mais classes de antibióticos; e ainda podem ser classificadas como extremamente resistentes a medicamentos, quando são resistentes à ação de todos os agentes antibióticos, condições que

impactam de forma significativa nos custos, tempo de internação e mortalidade hospitalar (Bassetti *et al.*, 2013). A RAM é responsável por 15,5% das infecções hospitalares adquiridas (Mulani *et al.*, 2019), e é classificada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e a OMS como uma ameaça iminente à saúde humana e uma das três mais importantes ameaças à saúde pública do século 21 (De Oliveira *et al.*, 2020; Munita; Arias, 2016).

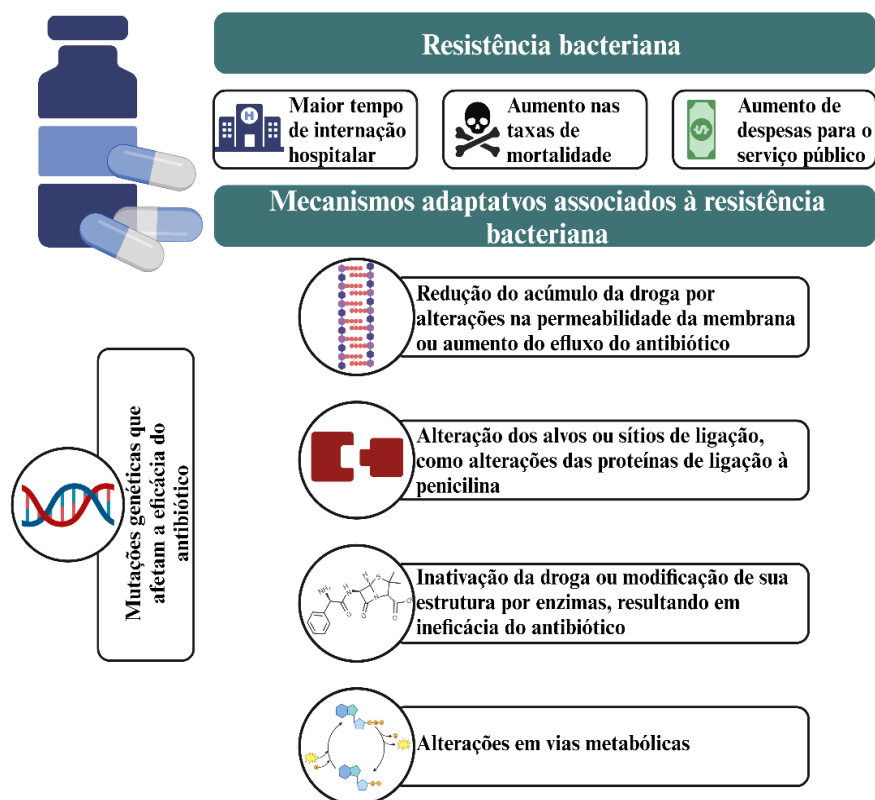
Figura 3 – Impactos da resistência antimicrobiana a nível global. (A) RAM como principal causa de morte no mundo em 2050. (B) Distribuição geográfica das mortes associadas à RAM em escala global.



Fonte: Adaptado de Ma *et al.*, 2020.

Além da base genética, existem 4 mecanismos adaptativos descritos na literatura associados à RAM (Morrison; Zembower, 2020) (Figura 4). Embora exista necessidade do desenvolvimento de novos antibióticos que possam ser utilizados contra microrganismos resistentes, esta demanda não consegue ser suprida, fazendo com que poucas classes de medicamentos tenham sido desenvolvidas desde o início dos anos 2000 (Bassetti *et al.*, 2013). Assim, a conhecida era dos antibióticos, que durou cerca de 80 anos, caminha para o período de surgimento progressivo e generalizado de microrganismos cada vez mais resistentes (Gow *et al.*, 2022). Neste contexto, as bactérias do grupo ESKAPE, representadas por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*. Estas bactérias são responsáveis pelo desenvolvimento de infecções potencialmente fatais entre indivíduos imunocomprometidos e possuem a capacidade de “escapar” da ação biocida dos agentes antimicrobianos, justificando a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos que sejam eficientes e se possível, de baixo custo (Bassetti *et al.*, 2013; De Oliveira *et al.*, 2020; Santajit; Indrawattana, 2016).

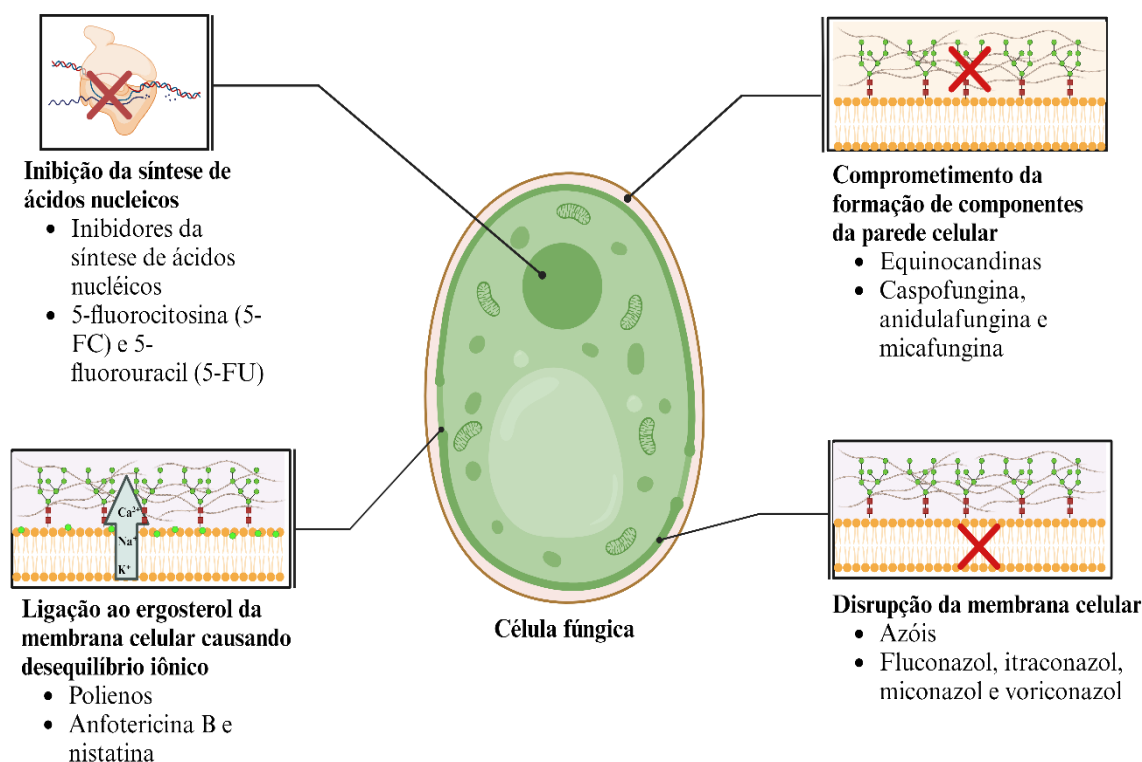
Figura 4 – Consequências da resistência bacteriana e principais mecanismos adaptativos associados à RAM.



Fonte: Autoria própria (2024).

Embora a resistência bacteriana seja o maior alvo de investimento e pesquisas pela alta prevalência de infecções hospitalares (Delarze; Sanglard, 2015), a RAM é alvo de grande apreensão no contexto dos patógenos fúngicos (Lee *et al.*, 2021), sobretudo porque o uso frequente e profilático de agentes antifúngicos promoveram o desenvolvimento de resistências de importância médica (Revie *et al.*, 2018). Atualmente o arsenal de antifúngicos sistêmicos disponíveis para utilização na prática clínica consiste em apenas 4 classes de medicamentos – os azóis, os polienos (representados pela anfotericina B), os inibidores da síntese de ácido nucleico e as equinocandinas (Figura 5). O que faz com que a resistência à antifúngicos seja preocupante é o limitado número de agentes terapêuticos disponíveis, o que implica dizer que a resistência a apenas uma classe de drogas, pode reduzir significativamente as opções de tratamentos e piorar os desfechos clínicos (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021; Muhaj *et al.*, 2022).

Figura 5 – Mecanismos de ação dos principais agentes antifúngicos disponíveis atualmente.



Fonte: Autoria própria (2024).

Apesar da introdução de novas classes medicamentos para o combate à infecções fúngicas, como é o caso das equinocandinas, e o desenvolvimento de novos medicamentos da classe dos azóis que possuem maior espectro de ação (voriconazol, posaconazol), o arsenal de antifúngicos ainda é pequeno e pouco eficiente (Maubon *et al.*, 2014; Prasad; Banerjee; Shah,

2017). Diante do crescente número de infecções fúngicas associadas à resistência e a toxicidade dos agentes antifúngicos atualmente disponíveis, faz-se necessário que novos agentes terapêuticos com diferentes mecanismos de ação e maior segurança sejam desenvolvidos (Maubon *et al.*, 2014; Muhaj *et al.*, 2022). Um resumo dos mecanismos adaptativos associados a resistência fúngica estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Drogas antifúngicas, alvos celulares e mecanismos adaptativos da resistência antifúngica

Classe farmacológica	Modo de ação	Mecanismo de ação/ alvo celular	Mecanismo de resistência	Exemplos de drogas
Azóis	Fungistático	Afetam a biossíntese do ergosterol por meio do bloqueio da lanosterol 14- α -desmetilase, prejudicando a conversão de lanosterol para ergosterol	Regulação positiva de transportadores de efluxo de droga. Mutações pontuais e regulação positiva do gene <i>ERG11</i> .	Fluconazol, itraconazol, miconazol e voriconazol
Polienos	Fungicida	Liga-se ao ergosterol da membrana, causando a formação de poros aquosos, causando desequilíbrio celular iônico	Mutações nos genes <i>ERG3</i> e <i>ERG6</i> , causando redução no conteúdo de ergosterol da membrana.	Anfotericina B e nistatina
Equinocandinas	Fungistático ou fungicida	Inibidores da codificação de FKS1/FKS2 (1,3) β -D-glucano sintase, importante para a síntese de β -D-glucano, componente da parede celular	Mutações nos genes <i>FKS</i>	Caspofungina, anidulafungina e micafungina

Inibidores da síntese de ácido nucleico	Fungicida	Inibição da síntese de DNA/RNA, afetando a maquinaria molecular	Modificações pontuais nos genes <i>FCY1/2</i> e <i>FUR</i> , causando problemas na captação da droga e alterações metabólicas responsáveis por sua efetividade	5-fluorocitosina (5-FC) e 5-fluorouracil (5-FU)
--	-----------	---	--	---

Fonte: Prasad; Banerjee; Shah, 2017; Srinivasan; Lopez-Ribot; Ramasubramanian, 2014.

2.3 Biofilme como mecanismo de resistência microbiana

Na década de 1970, as bactérias eram vistas como microrganismos singulares e flutuantes. Baseado no modelo de cultura de células planctônicas, foram desenvolvidos diversos estudos e agentes biocidas para o combate destes microrganismos. Entretanto, com os microrganismos resistentes a drogas e a dificuldade de combatê-los, foi necessário realizar a revisão do estilo de vida destes patógenos. Sendo assim, pôde ser observado que além de viverem apenas como células únicas em suspensão, microrganismos podem viver em comunidades, aderidas a superfícies ou umas às outras. Os chamados biofilmes, promovem uma proteção adicional aos microrganismos e funcionam como um mecanismo de resistência aos agentes antimicrobianos (Rabin *et al.*, 2015; Schuster; Markx, 2014). Os biofilmes representam ecossistemas estruturados de uma ou mais espécies microbianas. Estas espécies são firmemente aderidas em uma superfície e incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares que pode conter exopolissacarídeos (EPS), proteínas fibrosas e globulares (incluindo enzimas extracelulares), lipídeos, ácidos nucleicos e outras macromoléculas (Karygianni *et al.*, 2020; Wang; Flint; Palmer, 2019). Esta matriz representa um espaço tridimensional estruturado e compartilhado, gerado e controlado por microrganismos que se encontram no interior do biofilme e que formam uma barreira e camada protetora. Esta proteção confere mais resistência à ambientes extremos, quando comparados à microrganismos planctônicos, sendo essa uma importante função na persistência de infecções microbianas (Figura 6) (Flemming *et al.*, 2023; Rabin *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2019).

Os biofilmes são as maiores causas de infecções fúngicas intratáveis em pacientes imunocomprometidos (Srinivasan; Lopez-Ribot; Ramasubramanian, 2014). Os estudos a respeito do tema vêm crescendo ao longo do tempo, sobretudo pela alta associação com infecções crônicas e a resistência medicamentosa. Além disso, os biofilmes causam mais de 80% de infecções de forma direta ou indireta, principalmente relacionadas a equipamentos médicos e superfícies corporais (pele e tecidos moles, pulmão, bexiga, coração etc.) (de la Fuente-Núñez *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2022). Uma taxa de 50% das infecções nosocomiais estão associadas ao uso de equipamentos médicos, como os cateteres, instrumentos que dispõem de uma superfície ideal (porosa e hidrofóbica) para a fixação de células capazes de formar biofilme (de Souza *et al.*, 2023; Roy *et al.*, 2018).

O desenvolvimento do biofilme consiste em uma sucessão de etapas que envolvem a adesão inicial, colonização, desenvolvimento, maturação e dispersão ativa (Yin *et al.*, 2019). A adesão inicial é uma etapa reversível onde células superam a repulsão eletrostática inicial por

meio de apêndices celulares, polímeros associados à superfície e características como hidrofobicidade da superfície celular, seguido da produção de EPS e adesinas (Wang; Flint; Palmer, 2019). Posteriormente, na fase de colonização, os microrganismos aderem de forma irreversível à superfície por meio de fortes ligações hidrofílicas/hidrofóbicas promovidas pelos flagelos, pili, lipopolissacarídeos, EPS e proteínas adesivas de ligação ao colágeno (Yin *et al.*, 2019). Na fase de maturação dos biofilmes ocorre o desenvolvimento de uma morfologia madura caracterizada por uma estrutura onde as células estão agrupadas e protegidas de agentes estressores como a imunidade do hospedeiro, agentes antimicrobianos e danos oxidativos (Rather; Gupta; Mandal, 2021). Por fim, ocorre a dispersão das células dos biofilmes, de forma ativa ou passiva, por meio de processos internos como degradação (Rather; Gupta; Mandal, 2021; Yin *et al.*, 2019).

Figura 6 – Estágios do desenvolvimento do biofilme fúngico.



Fonte: Adaptado de Sauer *et al.*, 2022.

Os microrganismos que se encontram dentro do biofilme são extremamente problemáticos, pois são mais resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro e a terapia antimicrobiana convencional quando comparados aos microrganismos planctônicos. Estas características permitem sua sobrevivência em ambientes hostis, mesmo em condições de fome e dissecação (de la Fuente-Núñez *et al.*, 2013; Rabin *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2018). Alguns mecanismos adaptativos justificam a resistência dos biofilmes aos agentes terapêuticos, tais

como expressão de bombas de efluxo, presença de moléculas como eDNA e glucanos periplasmáticos derivados de NdvB – que sequestram as drogas e favorecem a produção de β -lactamases pela matriz do biofilme (Hall; Mah, 2017). Como resultado ocorre a redução intracelular, de afinidade e de efeito entre microrganismos e agentes terapêuticos (Pereira *et al.*, 2021). Além disso, os biofilmes apresentam múltiplas células em sua composição, o que é um fator chave no desenvolvimento da resistência (Sharma; Bisht, 2023).

Espécies de *Candida* podem formar biofilmes bem estruturados, compostos de múltiplos tipos de células e microrganismos. Estes microrganismos promovem resistência intrínseca a uma ampla variedade de fatores estressores, como os agentes antifúngicos e o sistema imune (Atencia-Carrera *et al.*, 2022; Prasad; Banerjee; Shah, 2017). Os biofilmes de *C. albicans* formados em equipamentos médicos agem como um reservatório de células fúngicas patogênicas que apresentam grande resistência às drogas e ao sistema imunológico do hospedeiro. Como consequência, passam a apresentar alta capacidade de disseminação e causar infecções sistêmicas, resultando em altas taxas de mortalidade (entre 30 e 40%) (Maione *et al.*, 2022). Igualmente preocupante aos biofilmes formados por *C. albicans*, são os biofilmes formados por *C. tropicalis*, já que estes estão associados a altas taxas de mortalidade entre pacientes com candidemia (de Souza *et al.*, 2023).

2.4 Considerações gerais sobre os inibidores de peptidase

Ao longo do tempo as plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa contra animais herbívoros e patógenos. Estes mecanismos estão relacionados com a produção de metabólitos primários, a base de peptídeos ou proteínas, e os metabólitos secundários como polifenóis, terpenos, flavonas, saponinas, alcaloides e taninos (Hellinger; Gruber, 2019). Dentro da classe dos metabólitos primários vegetais destacamos os IPs, uma classe de polipeptídeos que participam de diversos processos fisiológicos nas plantas. Estes IPs podem atuar de duas maneiras: (i) promovendo a proteção contra o ataque de animais, insetos e microrganismos por meio de regulação de atividade enzimática endógena, modulação da apoptose e estabilização de proteínas de defesa, resultando em inibição de enzimas digestivas ou danos ao trato gastrointestinal dos agentes agressores; ou (ii) como uma forma de reserva de proteínas, correspondendo a 1-10% do conteúdo proteico total de sementes e tubérculos, além de controlar a mobilização deste nutriente na forma de aminoácidos ou pequenos peptídeos (Bonturi *et al.*, 2022; Clemente *et al.*, 2019; Hellinger; Gruber, 2019).

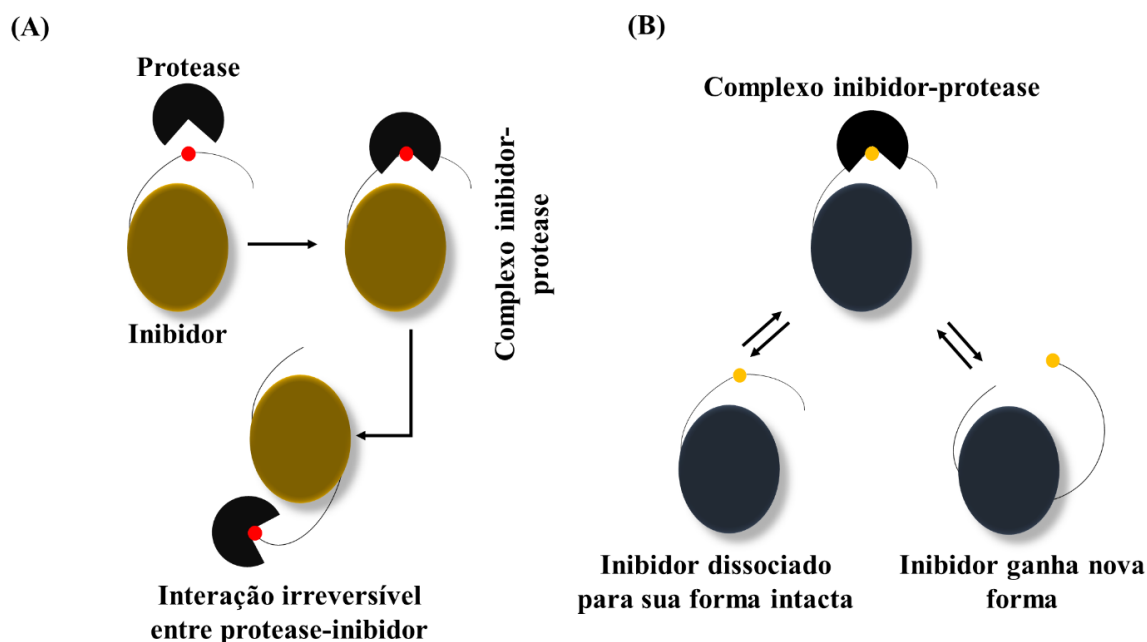
Há uma crescente identificação de IPs em diferentes organismos (Rawlings, 2010). Os IPs são moléculas que possuem grande quantidade de pontes dissulfeto – o que confere uma grande estabilidade a estes inibidores. Os IPs também podem ser classificados de acordo com a sua especificidade enzimática, como os inibidores de peptidases serínicas, aspárticas e de cisteína, ou de acordo com as suas características estruturais (Gutierrez-Gongora; Geddes-McAlister, 2021). A mais abrangente e compreensiva classificação foi conduzida pelo instituto Sanger, que deu origem a base de dados de inibidores MEROPS, que traz informações a respeito de peptidases (também chamadas de proteases, proteinases e enzimas proteolíticas) e as proteínas que as inibem, provenientes de microrganismos, plantas e animais, comumente utilizada pela comunidade científica. Atualmente existem quase 100 famílias de IPs descritas na base de dados MEROPS, que foram classificadas por sua sequência primária de aminoácidos e subdividas em 39 clãs, de acordo com suas similaridades na estrutura secundária e terciária, assim como nas funções apresentadas pelo inibidor (Hellinger; Gruber, 2019).

Mais de 104 famílias de plantas com capacidade de expressão de IPs já foram identificadas. A maioria dos IPs vegetais são encontrados nas plantas das famílias Fabaceae, Gramineae, Leguminosae e Solanceae (Herwade *et al.*, 2021). Estes inibidores são heterogêneos, e podem ser representados por proteínas (>15 kDa) como os inibidores do tipo Kunitz, Cistatinas e Serpinas, e peptídeos (<15 kDa), como é o caso dos inibidores do tipo Bowman-Birk, Batata tipo 1 e tipo 2, Mostarda, entre outros (Hellinger; Gruber, 2019). O mecanismo de ação responsável pela atividade dos IPs envolve a interação com as peptidases de diferentes formas, embora existam dois mecanismos amplamente distribuídos na natureza (Figura 6), nomeadamente: (i) ligação irreversível entre protease-inibidor e (ii) interação reversível entre protease-inibidor. Os inibidores que se ligam de forma irreversível à protease são encontrados normalmente na família das serpinas, α_2 macroglobulinas e inibidores da proteína p53 de baculovírus. Nestes casos, a interação entre protease-inibidor promove a clivagem de um peptídeo interno presente na estrutura do inibidor e causa uma mudança irreversível em sua estrutura e seu mecanismo catalítico (Figura 7A). Por outro lado, os inibidores que se ligam de forma reversível são capazes de estabelecer uma forte interação com sítio alvo das enzimas cognatas, havendo a formação de um complexo enzima inibidor inativo (Figura 7B) (Clemente *et al.*, 2019).

Dentre os inibidores de proteases, destacamos os inibidores do tipo Kunitz, ao qual o PpyTI faz parte. Os inibidores do tipo Kunitz pertencem a subfamília I3A (origem vegetal) e I3B (origem animal). Trata-se de macromoléculas compostas por uma única cadeia polipeptídica, com tamanho variável entre 16 e 24 kDa, com 4 resíduos de Cys, formando duas

pontes dissulfeto e um único sítio reativo. Essas características podem não seguir esse padrão, apresentando entre 0 e 4 resíduos de Cys, formando uma ou nenhuma ponte dissulfeto. Esses inibidores geralmente inibem aspártico, cisteino e serinopeptidases (Alencar de Barros *et al.*, 2021; Bendre; Ramasamy; Suresh, 2018; Herwade *et al.*, 2021).

Figura 7 – Mecanismos de ação dos IPs. (A) Ligação irreversível entre o inibidor e protease. O peptídeo interno do inibidor é clivado pela protease, dando origem ao complexo inibidor-protease que não consegue ser desfeito, caracterizando este inibidor como sendo do tipo “suicida”. (B) Ligação reversível entre o inibidor e protease. A protease se liga ao inibidor de forma reversível, formando um complexo protease-inibidor que pode ser dissociado dando origem ao inibidor em sua forma intacta ou modificada.



Fonte: Adaptado de Clemente *et al.* (2019).

2.5 Inibidores de peptidases como agentes antibacterianos, antifúngicos e antibiofilme

Os IPs vem despertando interesse no meio científico por conta das suas potenciais aplicabilidades biotecnológicas no ramo da agricultura e medicina (da Silva Bezerra *et al.*, 2016). Estudos comprovaram os efeitos dos IPs como agentes inseticidas (da Silva Bezerra *et al.*, 2016; Dantzger *et al.*, 2015; Guimarães *et al.*, 2015) e antimicrobianos (Alencar de Barros *et al.*, 2021; da Silva Bezerra *et al.*, 2016; Dib *et al.*, 2019; Macedo *et al.*, 2016), além de servir como base para o desenvolvimento de outras moléculas, como é o caso dos peptídeos

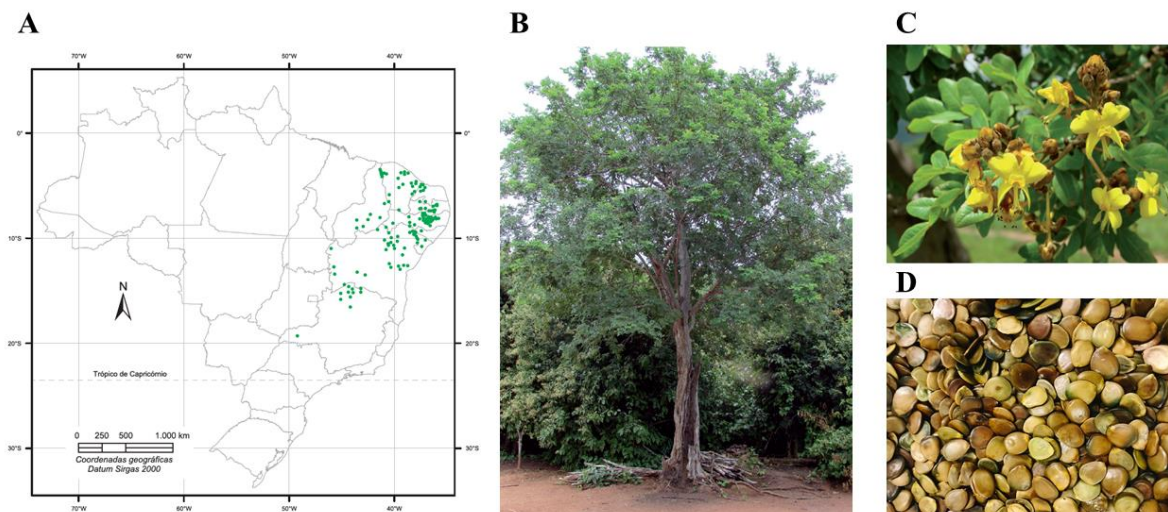
antimicrobianos (PAM) (Almeida, C. V. *et al.*, 2024; Almeida, L. H. de O. *et al.*, 2024; Ramalho *et al.*, 2022). Moléculas bioativas vegetais, com atenção especial para os IPs e PAM, vêm se destacando como compostos promissores no desenvolvimento de agentes antimicrobianos e no combate de infecções bacterianas (de Souza Nascimento *et al.*, 2022). Inibidores como o inibidor de tripsina das sementes de *E. poeppigiana* (EpTI), inibidor de tripsina de sementes de *Achyranthes aspera* (AATI), inibidor de tripsina das sementes de *Jatropha curcas* (JcTI-I), inibidor de protease das folhas de *Cassia fistula* (Fistulin) e inibidor de protease da *Conyza dioscoridis* (PDI inibitor) apresentaram efeitos positivos no combate de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive contra os microrganismos do grupo ESKAPE, ressaltando seu potencial antimicrobiano (Alencar de Barros *et al.*, 2021; Arulpandi; Sangeetha, 2012; Costa *et al.*, 2014; Karray *et al.*, 2020). Os mecanismos de ação associados ao efeito antimicrobiano destas moléculas podem ser atribuídos à inibição da atividade de proteases, alteração na permeabilidade da membrana celular dos microrganismos e estímulo para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que causam danos à membrana, resultando em lise e morte celular (Arulpandi; Sangeetha, 2012; de Souza Nascimento *et al.*, 2022).

Além de apresentarem atividade contra bactérias, diversos IPs são descritos na literatura como agentes antifúngicos (da Silva *et al.*, 2023; Dib *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017), como é o caso do CLTI, um inibidor do tipo Kunitz, proveniente das sementes de *Cassia leiandra* Benth., que apresentou atividade contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, por meio do aumento da permeabilidade celular fúngica, alteração na bomba de prótons da membrana plasmática, indução do estresse oxidativo e danos ao DNA (Araújo *et al.*, 2019). O inibidor de tripsina das sementes de *Inga vera* (IVTI), que apresentou atividade fungicida frente a *C. buniensis* (da Silva Bezerra *et al.*, 2016) e o Inibidor de Tripsina de *Inga laurina* (ILTI), que apresentou atividade contra *C. tropicalis* e *C. buinensis*, também apresentaram atividade fungicida por meio do aumento da produção de EROs, causando danos a membrana e levando a morte celular, sendo esse um mecanismo de ação responsável pela atividade fungicida de diversos inibidores (Gutierrez-Gongora; Geddes-McAlister, 2021; Macedo *et al.*, 2016). Os estudos que avaliam a atividade antibiofilme dos IPs são escassos, porém alguns inibidores já se mostraram capazes de impedir a formação de biofilmes bacterianos e fúngicos. Alguns exemplos de inibidores já identificados são o EpTI (Alencar de Barros *et al.*, 2021) e o CITI (Alencar de Barros *et al.*, 2021; Araújo *et al.*, 2019), o que revela uma outra funcionalidade destas moléculas, e reforça a importância de identificar e avaliar suas propriedades antimicrobianas.

2.6 Inibidor de tripsina das sementes de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz

O gênero *Poincianella* Britton & Rose pertence à família Fabaceae, subfamília *Caesalpinioideae*, e possui cerca de 35 espécies, com ocorrência predominante na América Central e no Caribe. A *P. pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz é nativa e endêmica da região nordeste do Brasil, ocorre principalmente no bioma caatinga, popularmente conhecida como “catingueira”, “catingueira-verdadeira”, “pau-de-rato” ou “caatinga-de-porco” (Figura 8) (de Sousa *et al.*, 2021). Suas folhas, cascas e flores são comumente utilizadas na medicina popular na preparação de infusões e decocções para uso como diurético, antidiarréico, no tratamento da febre e doenças como influenza, diarreia, desintéria, infecções respiratórias e urinárias, e inflamações de forma geral (Câmara *et al.*, 2017; Chaves *et al.*, 2016).

Figura 8 – *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz. (A) Locais identificados de ocorrência de catingueira (*P. pyramidalis*), no Brasil. (B) Árvore em floresta. (C) Frutos maduros. (D) Sementes de *P. pyramidalis*.



Fonte: Adaptado de Carvalho (2014) e http://www.nema.univasf.edu.br/site/index.php?pagenwespaper&record_id=40

Os inibidores de tripsina vêm sendo amplamente estudados, principalmente na avaliação da sua segurança, potencial biotecnológico, aplicação na área da saúde, além da avaliação das suas características químicas e estruturais. Os IPs apresentam multifuncionalidade, o que os tornam excelentes candidatos para estudos que visam a avaliação de sua atividade

antimicrobiana, podendo se comportar de forma semelhante aos PAM (de Souza Nascimento *et al.*, 2022). Recentemente nosso grupo de pesquisa identificou, purificou e caracterizou um inibidor de protease proveniente das sementes da *P. pyramidalis*, nomeado como PpyTI. Trata-se de um inibidor do tipo Kunitz, que apresenta uma única cadeia polipeptídica, peso molecular de 19,042 Da, alta estabilidade térmica, suporta temperaturas superiores a 70 °C, e ampla faixa de pH. Adicionalmente a caracterização do PpyTI, a capacidade inseticida do inibidor foi avaliada por meio da oferta crônica do PpyTI (0,25%) à dieta das larvas foi capaz de retardar o desenvolvimento larval. Já a suplementação de PpyTI a 1% foi capaz de promover a redução do peso (80%) e morte (70%) das larvas. A atividade inseticida do PpyTI foi associada à sua capacidade inibitória contra enzimas do intestino médio das larvas de *A. kuehniella* (Guimarães *et al.*, 2015). Entretanto, até o presente momento não existem dados disponíveis na literatura a respeito da aplicação do PpyTI no combate contra bactérias e fungos, na inibição da formação e/ou ruptura de biofilmes bacterianos e fúngicos, e não existem dados em relação a sua toxicidade, o que justifica a realização do presente estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do inibidor PpyTI, seus possíveis mecanismos de ação frente aos microrganismos e toxicidade em modelo *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

Em relação ao inibidor de tripsina de sementes de *Poincianella pyramidalis* (PpyTI), buscar-se-á:

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) frente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Determinar a CIM e concentração fungicida mínima (CFM) contra leveduras;
- Avaliar o efeito sinérgico em associação aos medicamentos anfotericina B e fluconazol;
- Determinar o mecanismo de ação antifúngico frente às leveduras *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. albicans* 90028, utilizando sorbitol, ergosterol e a sonda corante Sytox™ Green;
- Investigar o efeito do PpyTI sobre o desenvolvimento e erradicação de biofilmes fúngicos, por meio da coloração com cristal violeta;
- Avaliar a toxicidade do PpyTI em modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB), alocado na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

4.1 Obtenção do PpyTI

4.1.1 Acesso ao patrimônio genético

A atividade de acesso ao patrimônio genético está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número AC355D95.

4.1.2 Material vegetal e reagentes

As sementes de *P. pyramidallis* foram obtidas na cidade de Campo Grande, MS, Brasil (20°29'56.7"S 54°36'49.8"W), e mantidas a -20 °C no banco de sementes do LPPFB até o momento do uso. A tripsina bovina, albumina sérica bovina (BSA), N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide (BAPNA), *Coomassie Brilliant Blue R e G 250*, *Amershan ECL full-range Rainbow molecular weight*, anfotericina B, fluconazol, d-sorbitol e ergosterol foram adquiridos da empresa *Sigma-Aldrich*. Os kits de fluorescência *SytoxTM Green* e *Live/DeadTM* foram adquiridos da empresa *Thermo Fisher Scientific*. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.3 Obtenção do Extrato Bruto

As sementes foram descascadas e trituradas em moinho elétrico a 27.000 rpm. A farinha obtida foi submetida à delipidação com hexano, por 8 h, havendo troca de solvente a cada 2h, onde foi retirado grande parte de seus componentes apolares, com posterior transferência para uma bandeja com papel filtro para volatilização do solvente. Em sequência, a extração das proteínas foi realizada com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6 na proporção de 1:10 (farinha:tampão) (p/v), sob agitação constante por um período de 4 h em temperatura ambiente. Após extração, a suspensão foi submetida à centrifugação a 10.000 rpm, a 4° C, durante 30 min.

O sobrenadante foi aliquotado, dialisado (membrana de diálise 12 kDa *cutoff*) contra água destilada durante 48 h e, por fim, liofilizado. O material proveniente da liofilização foi denominado extrato bruto (EB).

4.1.4 Obtenção do PpyTI

Uma alíquota de 350 mg do EB foi dissolvida em 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, e incubada em banho ultrassônico por 5 minutos. Subsequentemente a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de exclusão molecular Sephacryl® S-200 *High Resolution* (Sigma-Aldrich), equilibrada previamente com o mesmo tampão. Foram coletadas frações de 3 mL em um fluxo de 40 mL.h⁻¹. Um perfil cromatográfico foi traçado utilizando o espectrofotômetro *Evolution 200* (Thermo Scientific) nos comprimentos de onda 216 e 280 nm. As frações correspondentes aos picos identificados foram utilizados em um ensaio de atividade inibitória frente a tripsina bovina, a fim de identificar o pico que continha o PpyTI.

4.2 Análise da atividade inibitória frente a enzima tripsina

O EB e o pico 2 da coluna Sephacryl® S-200 *High Resolution* foram utilizados no ensaio de inibição da enzima tripsina. Foram utilizadas diferentes concentrações (0 – 2,0 mg.mL⁻¹) de ambas as amostras. A atividade da tripsina foi medida através da quantificação do corante p-nitroanilida, produto da hidrólise do substrato cromogênico N-benzoyl-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA). Para isso, em uma microplaca de 96 poços foram incubados 4 µL de tripsina (0,25 mg.mL⁻¹), 35 µL de amostra em diferentes concentrações e 31 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8.0 (totalizando 70 µL) a 30 °C, por 10 min. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de BAPNA 1 mM. O tempo total do ensaio foi de 30 min e a determinação da hidrólise do substrato foi feita em leitor de microplacas Varioskan Lux (Thermo Scientific) a 410 nm. Para os controles negativos (brancos), substituiu-se os 4 µL de tripsina por tampão Tris HCl 0,05 M pH 8.0, e para controles positivos, foram adicionados 66 µL de tampão e 4 µL de tripsina. Os ensaios foram reproduzidos em triplicata.

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 12,5% foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Foram preparados um gel de corrida, contendo 12,5% de acrilamida, seguido de um gel de empilhamento na concentração de 5% de acrilamida. A amostra foi dissolvida em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; glicerol; SDS 20%; H₂O e azul de bromofenol), incubada a 95 °C durante 5 min, e um volume de 5 µL foi aplicado em cada poço. A corrida foi realizada a 150 V. Foi utilizado o marcador de peso molecular *Amershan ECL High-Range Rainbow Molecular Weight* (Sigma Aldrich). As proteínas separadas nos géis foram detectadas pela coloração do gel com 0,1% (p/v) de *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Para a descoloração do gel, foi utilizada uma solução contendo água destilada, metanol e ácido acético (5:4:1 – v/v/v).

4.4 Quantificação de proteínas

A concentração proteica da amostra, utilizada como base para determinação de concentração nos experimentos subsequentes, foi estimada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina (*bovine serum albumin* - BSA) 1 mg.mL⁻¹ como padrão. A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de microplacas *Varioskan Lux* (Thermo Scientific) a 595 nm.

4.5 Avaliação de atividade antimicrobiana

4.5.1 Microrganismos e cultura

Foram utilizados um total de 13 cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras catalogadas na *American Type Culture Collection* (ATCC), nomeadamente: *Escherichia coli* ATCC 43895, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 49453, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970, *Candida glabrata* ATCC 90030 e 1707, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida nivariensis* ATCC 9983, *Candida bracarensis* ATCC 10154 e *Candida guilliermondi* ATCC 6260. Os microrganismos foram mantidos congelados a -80 °C até o momento do uso. Para a realização dos experimentos, as bactérias e leveduras foram cultivadas em placas de Petri contendo *Mueller Hinton agar* (MHA) ou *Sabouraud dextrose agar* (SDA) e incubadas a 37 °C por 24 h.

4.5.2 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do PpyTI foi determinada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2003). Os inóculos foram preparados em solução salina estéril (NaCl 0,9%) por meio do método de crescimento direto, utilizando colônias isoladas de bactérias previamente cultivadas em placas de Petri contendo MHA. A densidade óptica (DO) foi estabelecida entre 0,08 e 0,1 UA, determinada a 595 nm - equivalente a 0.5 na escala McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Em sequência, a suspensão bacteriana foi diluída em uma proporção de 1:20 (v/v), alcançando a densidade final de $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹, e adicionada aos poços (placas de 96 poços) previamente preenchidos com *Muller Hinton* caldo (MHC), amostras de PpyTI ou antibiótico. A adição do inóculo aos poços resultou em uma concentração final de bactérias de $1,5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹.

Para determinar a CIM do PpyTI, foram adicionados 80 µL de MHC e 10 µL do inibidor (em concentrações variadas 0,10 - 52,52 µM, previamente preparado em solução estéril de NaCl 0,9%); ou 10 µL de ciprofloxacino em diferentes concentrações (*Sigma-Aldrich*) para o grupo controle positivo. Para o controle de crescimento e controle de esterilidade, adicionou-se 10 µL de solução estéril de NaCl 0,9%. Para todos os grupos, com exceção do controle de esterilidade, foram adicionados 10 µL do inóculo bacteriano aos poços. A CIM foi definida como a menor concentração de PpyTI ou ciprofloxacino capaz de inibir o crescimento bacteriano visível após 24 h de incubação a 37 °C. A concentração bactericida mínima (CBM) foi definida como a menor concentração do PpyTI capaz de inibir o crescimento bacteriano visível após 24 h de incubação a 37 °C em placa de Petri contendo MHA. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.3 Atividade antifúngica

4.5.3.1 Preparo do inóculo fúngico

Os inóculos foram preparados a partir de culturas de *Candida glabrata* ATCC 90030 e 1707, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida nivariensis* ATCC 9983, *Candida bracarensis* ATCC 10154 e *Candida guilliermondii* ATCC 6260. O método empregado foi de crescimento direto, utilizando colônias

isoladas das leveduras supracitadas, previamente cultivadas em placas de Petri contendo SDA. O inóculo fúngico foi preparado em solução salina estéril (NaCl 0,9%), até atingir DO equivalente a 0.5 na escala McFarland (equivalente a $5,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹) determinada a 620 nm. A suspensão fúngica foi diluída em uma proporção de 1:20 (v/v), alcançando a densidade final de $2,5 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ (CLSI, 2017).

4.5.3.2 Determinação da CIM e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CIM das leveduras foi determinada por meio da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placa de 96 poços, seguindo a metodologia proposta pelo CLSI (2017). Os inóculos foram preparados conforme descrito previamente (4.5.3.1), e adicionados às placas de 96 poços contendo caldo RPMI 1640, amostras de PpyTI, anfotericina B (*Sigma-Aldrich*) ou fluconazol (*Sigma-Aldrich*). Em seguida, 80 µL de caldo RPMI 1640, 10 µL de PpyTI (em diferentes concentrações 0,10 – 52,52 µM, previamente preparado e solução estéril de NaCl 0,9%) e 10 µL do inóculo foram adicionados em cada poço. Como controle positivo, adicionou-se 10 µL de anfotericina B ou fluconazol (*Sigma-Aldrich*), como controle negativo, 10 µL de solução estéril de NaCl 0,9% e 10 µL da suspensão fúngica e, por fim, para o controle de esterilidade, foram adicionados mais 10 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%). A CIM foi definida como a menor concentração de PpyTI capaz de inibir o crescimento fúngico visível após 24 h de incubação a 37 °C. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada como a menor concentração do PpyTI capaz de inibir o crescimento fúngico visível após 24 h de incubação a 37 °C em placa de Petri contendo SDA. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.4 Sinergismo pelo método Checkerboard

O efeito sinérgico do PpyTI em associação com os antifúngicos referência anfotericina B e fluconazol foi investigado pelo método *Checkerboard* de microdiluição em caldo (Odds, 2003; White *et al.*, 1996), em microplacas de 96 poços. Os inóculos fúngicos foram preparados conforme descrito anteriormente (4.5.3.1). O PpyTI, anfotericina B e fluconazol foram analisados em combinação, a partir das suas respectivas CIMs, por meio de diluição seriada para ambas as cepas (*C. tropicalis* e *C. albicans*). A densidade fúngica atingiu uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ em meio RPMI-1640 e as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. O resultado do ensaio combinatório foi interpretado como a menor

concentração de cada combinação que inibiu completamente o crescimento fúngico. O índice de concentração inibitória fracionada (FICI) foi calculado utilizando a equação abaixo:

$$\Sigma FIC = FICA + FICB$$

FIC é a razão da CIM da droga em combinação com a CIM apenas. Os resultados foram interpretados como: efeito sinérgico quando o FICI $\leq 0,5$; efeito aditivo $>0,5$ e ≤ 1 ; indiferente quando FICI >1 e ≤ 4 ; e antagonista quando FICI $>4,0$.

4.5.5 Ensaio da atividade fungicida tempo-dependente

A atividade fungicida tempo-dependente do PpyTI frente às leveduras *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. albicans* ATCC 90028 foi determinada seguindo a metodologia descrita por por Mitić-Ćulafić et al. (2005), com modificações. O inóculo fúngico foi preparado, e adicionado aos poços tratados com PpyTI na CFM (3,28 e 6,56 μM para *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente), assim como o controle positivo, constituído pelos fármacos antifúngicos referência fluconazol e anfotericina B, utilizados em suas respectivas CFM. Para o ensaio, alíquotas de 10 μL de cada grupo foram adicionadas e distribuídas em placas de Petri contendo SDA nos intervalos de incubação de 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 min, utilizando a técnica de esgotamento com auxílio de uma alça de *Drigalski*. Placas sem tratamento, contendo apenas o inóculo fúngico, foram utilizadas como controle de crescimento. As culturas tratadas e não tratadas foram incubadas durante 24 h a 37 °C. Após este período, foram realizadas as contagens de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em 3 experimentos independentes, em triplicata.

4.5.6 Investigação do mecanismo de ação do PpyTI frente a leveduras

4.5.6.1 Ensaio de proteção osmótica com sorbitol

O ensaio de proteção osmótica utilizando sorbitol foi conduzido para investigar se o PpyTI tem como alvo a parede celular dos fungos, de acordo com a metodologia descrita por Frost et al. (1995), com modificações. Neste ensaio, a CIM é determinada na presença ou ausência de sorbitol a 0,8 M. Quando o agente antifúngico (neste caso, PpyTI) possui a parede celular fúngica como alvo, a CIM aumenta, em comparação com a análise realizada na ausência

de sorbitol. Para o ensaio, os inóculos fúngicos de ambas as cepas (*C. tropicalis* e *C. albicans*) foram preparados conforme item 4.5.3.1. O sorbitol (*Sigma- Aldrich*, São Paulo, SP, Brasil) foi adicionado ao meio de cultura, em uma concentração final de 0,8 M, e o PpyTI foi adicionado aos poços nas mesmas concentrações utilizada para determinação da CIM (0,10 – 52,52 μM). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de prevenir o crescimento fúngico visível. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata.

4.5.6.2 Ensaio de ligação ao ergosterol

Para determinar se o PpyTI se liga aos esteróis da membrana celular fúngica, o ensaio de ligação ao ergosterol foi realizado em meio RPMI 1640 suplementado ou não com ergosterol exógeno (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) numa concentração final de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de acordo com a metodologia descrita por Freires *et al.* (2014). O inóculo fúngico foi preparado conforme item 4.5.3.1, as placas foram tratadas com PpyTI em concentrações que variaram entre 0,10 e 52,52 μM , e incubadas a 37 °C por 24 h. Nos casos em que o agente antifúngico possui o ergosterol como alvo, os valores da CIM aumentam, quando em comparação ao CIM obtido na ausência deste composto. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de prevenir o crescimento fúngico visível. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata.

4.5.6.3 Permeabilização da membrana plasmática

A permeabilidade da membrana celular fúngica foi investigada utilizando a sonda Sytox™ Green (Almeida *et al.*, 2021). Os inóculos fúngicos de *C. tropicalis* e *C. albicans* foram preparados em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7.5 até atingir DO de 0.5 UA a 620 nm. Um volume de 280 μL de cada suspensão fúngica foi transferido para uma placa de 96 poços preta com o fundo transparente (apropriada para ensaios com fluorescência), e posteriormente foram adicionados 10 μL de Sytox™ Green 30 μM (concentração final de 1 μM), e incubada por 10 minutos a 37 °C. Em sequência, foram adicionados 10 μL de PpyTI 30 x a CIM das leveduras (98,4 μM para *C. tropicalis* e 199,8 μM para *C. albicans* – para uma concentração final de 3,28 e 6,56 μM) em cada poço, e um perfil cinético de avaliação foi traçado durante 240 minutos sob constante agitação. A fluorescência do Sytox™ Green (excitação a 485 nm e emissão a 520 nm) foi determinada para avaliar a permeabilização da membrana plasmática fúngica com o

auxílio de um leitor de microplacas Varioskan Lux (*Thermo Fisher Scientific*, Brazil). Como controle negativo, as leveduras foram incubadas apenas com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7.6. O percentual de captura da sonda fluorescente foi calculado utilizando a fluorescência emitida por *Sytox™ Green* no minuto 240 subtraído do controle negativo, considerado 100%. Três ensaios independentes foram realizados em triplicata.

4.5.6.4 Análise da permeabilização da membrana plasmática por microscopia de fluorescência

Células fúngicas (1×10^4 células.mL⁻¹) de *C. tropicalis* e *C. albicans* foram incubadas em caldo RPMI-1640 na CIM do PpyTI em microplacas de 96 poços. A permeabilização da membrana plasmática foi medida pela emissão do *Sytox™ Green* em microscópio de fluorescência, de acordo com a metodologia descrita por THEVISSEN et al., (1996). Após 24 h de incubação a 37 °C, um volume de 12 µL de *Sytox™ Green* (30 µM) foi adicionado aos poços seguidos de incubação por 15 min. As células foram analisadas utilizando um microscópio de fluorescência de LED Leica DM 2000, equipado com uma câmera Leica DFC 7000 T e um conjunto de filtros fluorescentes para detecção de fluoresceína (excitação em 450-490 nm e emissão em 520 nm). As imagens foram coletadas com o software LAS V4.12. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

4.6 Avaliação da atividade antibiofilme do PpyTI

4.6.1 Inibição da formação de biofilme

A coloração com cristal violeta foi usada para avaliar a formação do biofilme e erradicação do biofilme maduro de *C. tropicalis* e *C. albicans* em uma placa de 96 poços (FILLOUX; RAMOS, 2014). O corante cristal violeta se liga a moléculas carregadas negativamente presentes na membrana dos microrganismos, ao peptidoglicano e aos EPS na matriz do biofilme (Khara et al., 2017). O preparo do inóculo fúngico foi realizado por meio do método de crescimento direto. Colônias isoladas da placa de Petri contendo SDA foram diluídas em solução estéril de NaCl 0,9% e sua DO ajustada no intervalo de 0,08 a 0,1 no comprimento de onda de 620 nm ($1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹) e ajustado para a concentração de $1,5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹. Para verificar a inibição da formação de biofilme, 170 µL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) com 1% de glicose foi adicionado em cada poço. Posteriormente, 10 µL de

PpyTI, anfotericina B ou fluconazol a 20 x a CIM frente a *C. tropicalis* (65,2 μ M, 54,2 μ M e 650 μ M, respectivamente) e *C. albicans* (131,2 μ M, 13,4 μ M e 1300 μ M, respectivamente) foram adicionados aos poços. Por fim, um volume de 20 μ L do inóculo preparado foi adicionado aos poços e a placa foi incubada por 24 h a 37 °C. Após o período de incubação, os poços foram lavados uma vez com água destilada estéril para a remoção de células planctônicas e mortas, e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foram adicionados 125 μ L de solução aquosa de cristal violeta a 0,5% aos poços, seguidos de incubação por 10 min. O sobrenadante dos poços foi descartado, lavado uma vez com água destilada estéril e deixado secar por 2 h. O biofilme foi dissolvido em 150 μ L de solução de ácido acético a 30% e a DO foi determinada a 550 nm em um leitor de microplacas Varioskan Lux (*Thermo Scientific*). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

4.6.2 Erradicação do biofilme maduro

Em placas de 96 poços foram adicionados 180 μ L de caldo BHI contendo 1% de glicose em conjunto com 20 μ L do inóculo fúngico, com posterior incubação por 24 h a 37 °C. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 190 μ L de meio BHI com 1% de glicose e 10 μ L do PpyTI, anfotericina B e fluconazol nas mesmas concentrações do ensaio de inibição da formação de biofilme (4.6.1). Posteriormente, a placa foi incubada novamente por 24 h a 37 °C e os poços foram lavados uma vez com água destilada estéril e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 125 μ L de solução aquosa de cristal violeta a 0,5% aos poços e a placa foi incubada por 10 min. O sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados uma vez com água destilada estéril e permaneceram em temperatura ambiente por um período de 2 h para secagem. O biofilme foi dissolvido em 150 μ L de ácido acético a 30% e a DO determinada a 550 nm em um leitor de microplacas Varioskan Lux (*Thermo Scientific*). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

4.6.3 Inibição da formação do biofilme por microscopia de fluorescência

A viabilidade das células fúngicas foi avaliada com o auxílio do kit de coloração *Live/Dead BacLight™* (*Thermo Fisher Scientific*) preparado de acordo com as instruções do fabricante. Este kit permite a avaliação da viabilidade celular e a integridade da membrana e é composto por SYTO 9™ e Iodeto de Propídio (PI). As células que apresentaram comprometimento na membrana celular e que estavam em processo de morte ou mortas, foram

coradas de vermelho; enquanto as células que apresentaram a membrana intacta, foram coradas de verde.

Para realização do ensaio de inibição da formação do biofilme, foi utilizada uma microplaca de 24 poços contendo uma lamínula circular removível. O inóculo fúngico foi preparado pelo método de crescimento direto em placa de Petri contendo SDA e sua DO ajustada para alcançar $1,5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹, e adicionado à placa por 2 h a 37 °C para a etapa inicial de pré-adesão do biofilme. Após este período, o sobrenadante foi removido e 500 µL de suspensão fúngica em caldo BHI a 1% glicose foram adicionados como controle de crescimento. Para o tratamento, foram utilizados o PpyTI, anfotericina B e fluconazol na CIM em caldo BHI suplementado com 1% de glicose. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C. Após o tratamento da placa, o sobrenadante foi removido e as células não aderidas foram lavadas com 500 µL de solução estéril de NaCl 0,9%. Um volume de 500 µL da solução de coloração foi adicionado aos poços da microplaca e incubados por 10 min a 37 °C, protegido da luz. A lamínula foi retirada do poço, o excesso de corante foi removido com solução estéril de NaCl 0,9%, e esta foi posicionada sobre uma lâmina e lida em microscópio Leica DM 2000 LED equipado com câmera Leica DFC 7000 T. A fluorescência emitida foi avaliada com os seguintes filtros: para o SYTO 9™ - excitação em 490 nm e emissão em 520 nm; e o iodeto de propídio - excitação em 490 nm e emissão em 635 nm. As imagens foram coletadas no software LAS V4. 12. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.7 Avaliação da toxicidade do PpyTI em modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*

A toxicidade aguda do PpyTI foi determinada em modelo *in vivo* utilizando larvas de *G. mellonella*. Neste sentido, 10 larvas com peso entre 200 e 300 mg, sem sinais de melanização, foram selecionadas randomicamente para cada grupo experimental. 10 µL de PpyTI na CIM observada para *C. tropicalis* e *C. albicans* (3,28 e 6,56 µM), solução salina 0,9% (controle positivo) e dimetilsufóxido (DMSO) a 100% (controle negativo) foram injetados na hemocele de cada larva através da penúltima propata esquerda com o auxílio de uma seringa Hamiton. Por fim, as larvas foram incubadas ao abrigo de luz, em temperatura ambiente (30 °C) e a sobrevivência foi monitorada em intervalos de 12 h, por um período de 72 h. Foram consideradas mortas as larvas que não apresentaram movimento ao torque e com altos níveis de melanização (Allegra *et al.*, 2018; Lazarini *et al.*, 2018).

4.8 Análise estatística

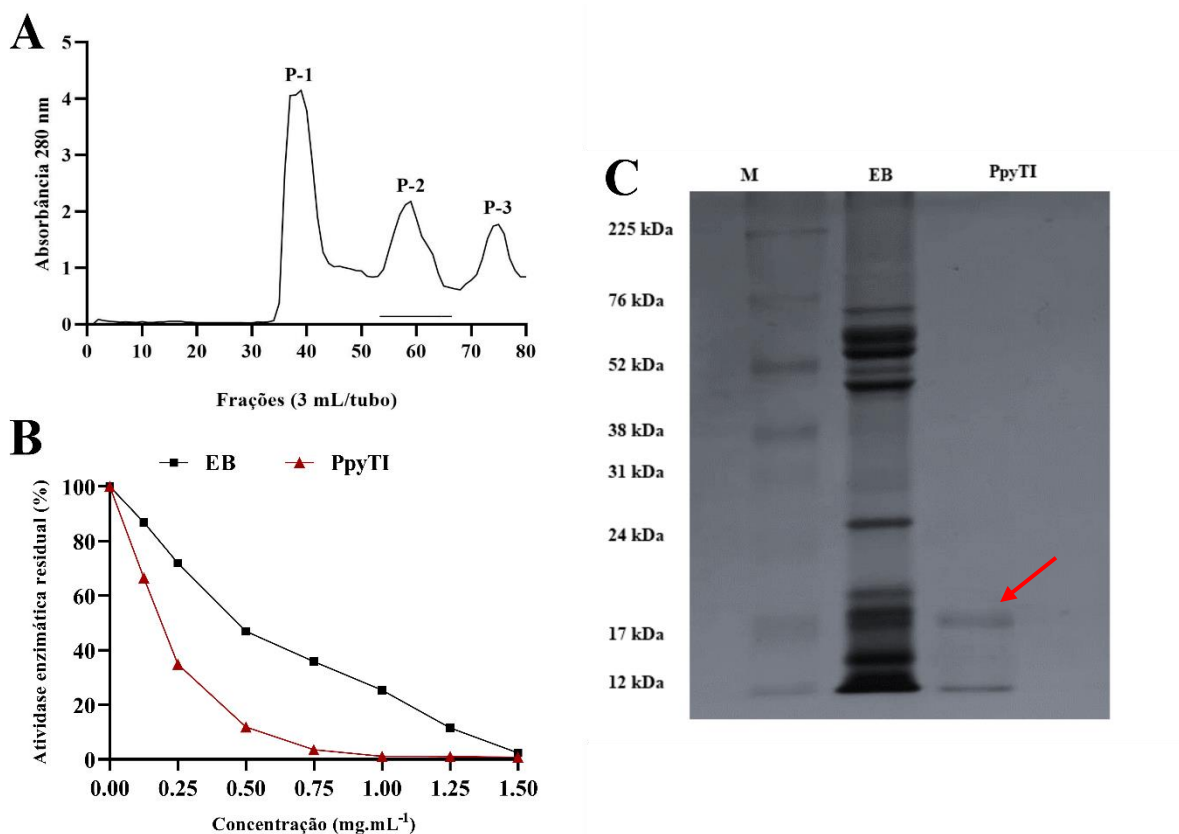
Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão da média (DP) e comparados por análise de variância (ANOVA de uma via). Para os dados obtidos no ensaio de biofilme utilizou-se o pós-teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações. Para avaliar a taxa de sobrevivência larval no ensaio *in vivo* com *G. mellonella*, o teste de *Long-rank* foi empregado. Os dados foram avaliados utilizando o software *GraphPad Prism* versão 8.0. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção do PpyTI

O perfil cromatográfico do EB das sementes de *P. pyramidalis* apresentou 3 picos bem definidos (Figura 9A). O Pico 2 apresentou atividade inibitória frente à enzima tripsina, de forma dose-dependente, atingindo 100% de inibição na concentração de $0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Figura 9B). Quando analisado em SDS-PAGE 12,5%, o Pico 2 apresentou uma única banda, com peso molecular aparente entre 17 e 24 kDa, assim como observado no trabalho original de Guimarães *et al.* (2015), que descreve o processo de purificação do PpyTI. Este procedimento de purificação foi utilizado para o preparo do inibidor utilizado nos demais experimentos.

Figura 9 – Purificação do PpyTI. (A) Perfil cromatográfico das sementes de *P. pyramidalis* separado em coluna de exclusão molecular Sephacryl® S-200. (B) Atividade inibitória do EB e PpyTI frente à enzima tripsina. (C) Perfil de SDS-PAGE 12,5%, onde: M - marcador de peso molecular; EB - extrato bruto; PpyTI – inibidor de tripsina das sementes de *Poincianella pyramidalis*.



5.2 Atividade antimicrobiana

5.2.1 Determinação da concentração inibitória, bactericida e fungicida mínima

A determinação da CIM, CBM e CFM do PpyTI frente às diferentes cepas revelou que o PpyTI não foi eficaz no combate às bactérias avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade antibacteriana do PpyTI e do antibiótico ciprofloxacina.

Microrganismos	PpyTI (µM)	Ciprofloxacina (µM)	
	CIM	CIM	CBM
<i>E. coli</i> ATCC 43895	>52,52	24	24
<i>K. pneumoniae</i>	>52,52	12	>24
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 49453	>52,52	24	24
<i>S. haemolyticus</i> ATCC 29970	>52,52	12	24

Por outro lado, o PpyTI mostrou-se eficaz no combate a diferentes espécies de *Candida*, sobretudo contra *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. albicans* ATCC 90028, assim como os antifúngicos anfotericina B e fluconazol (Tabela 3). O PpyTI chegou a ser aproximadamente 10 vezes mais eficaz que o fluconazol para as cepas de *C. tropicalis* e *C. albicans*, apresentando resultados próximos ao que foi observado para anfotericina B contra *C. tropicalis*. Considerando a importância clínica das espécies avaliadas e os dados obtidos, os ensaios subsequentes foram realizados com *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. albicans* ATCC 90028.

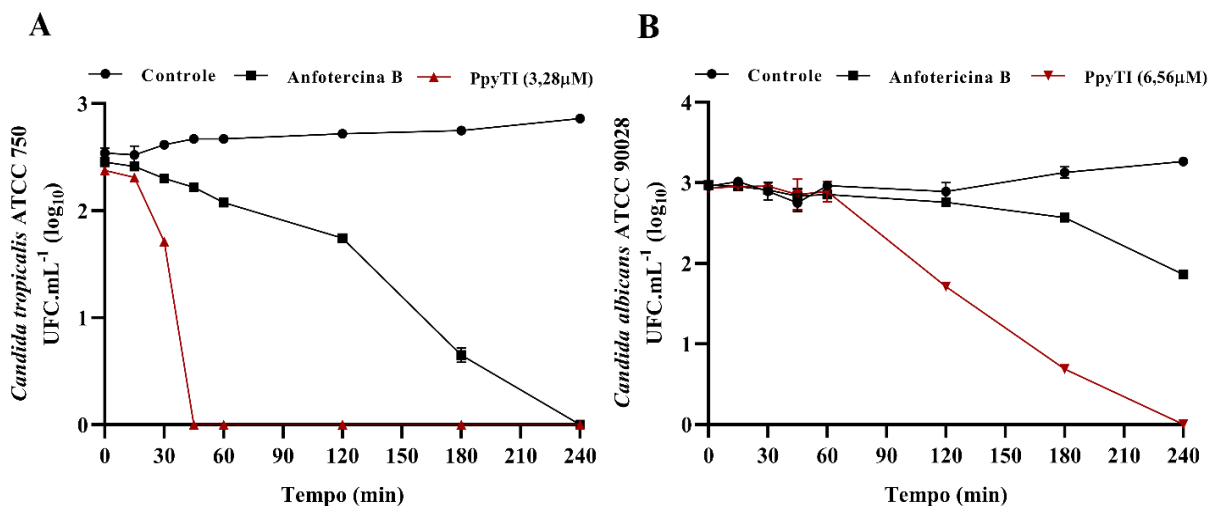
Tabela 3 – Atividade antifúngica do PpyTI e dos antifúngicos anfotericina B e fluconazol.

Microrganismos	PpyTI (µM)		Anfotericina B (µM)		Fluconazol (µM)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. glabrata</i> 90030	26,26	>26,26	0,13	0,54	>52	>52
<i>C. glabrata</i> 1707	6,56	6,56	0,27	0,54	>52	>52
<i>C. albicans</i> 90028	6,56	6,56	0,67	0,67	65	65
<i>C. tropicalis</i> 750	3,28	3,28	2,71	2,71	32,5	32,5
<i>C. krusei</i> 6258	6,56	6,56	0,27	0,54	>52	>52
<i>C. guilliermondii</i> 6260	6,56	>6,56	0,06	0,13	26,12	26,12

5.2.2 Efeito fungicida tempo-dependente do PpyTI

A cinética de morte por tempo realizada com as leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans* incubados com PpyTI na CFM está representada na Figura 10. Contra *C. tropicalis*, o PpyTI apresentou uma rápida atividade fungicida, com redução parcial das UFCs aos 30 min de incubação e erradicação total das células aos 45 min, sendo este efeito superior ao observado pela anfotericina B, cuja erradicação aconteceu apenas aos 240 min (Figura 10A). Para *C. albicans*, o PpyTI apresentou uma cinética mais lenta, onde a erradicação total das colônias ocorreu apenas aos 240 min, sendo sua atividade superior a anfotericina B, que mesmo após os 240 min não foi capaz de erradicar metade das UFCs (figura 10B). Ao contrário do grupo tratado com PpyTI, as leveduras utilizadas como controle apresentaram um crescente número de UFCs ao longo do experimento, demonstrando que, de fato, o PpyTI foi responsável pela morte celular nos tempos determinados até 240 min.

Figura 10 – Atividade fungicida tempo-dependente do PpyTI frente a *C. tropicalis* e *C. albicans*.



5.2.3 Efeito sinérgico entre PpyTI e os antifúngicos anfotericina B e fluconazol

O efeito sinérgico do PpyTI pôde ser observado apenas na associação com o fluconazol no combate a *C. albicans*, onde a CIM de ambos os compostos, foi reduzida. Adicionalmente, o PpyTI apresentou efeito aditivo na associação com a anfotericina B no combate às cepas de *C. tropicalis* e *C. albicans*, e foi indiferente quando em associação com o fluconazol contra *C. tropicalis* (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação do efeito sinérgico do PpyTI associado a anfotericina B e fluconazol frente as leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans*.

Microrganismos	Combinação	CIM individual		CIM combinação		Σ CIF	Atividade
		(μM)		(μM)			
		a	b	a	b	CIF _a + CIF _b	
<i>C. tropicalis</i>	PpyTI (a) + anfotericina B	3,28	2,71	0,41	1,35	0,625	Aditiva
	(b)						
	PpyTI (a) + fluconazol (b)	3,28	32,5	3,28	2,03	1,06	Indiferente
<i>C. albicans</i>	PpyTI (a) + anfotericina B	6,56	0,67	3,28	0,33	1,0	Aditiva
	(b)						
	PpyTI (a) + fluconazol (b)	6,56	65	0,41	2,03	0,09	Sinérgico

5.3 Mecanismos de ação

5.3.1 Ensaio de ligação ao sorbitol e ergosterol

Investigamos se o PpyTI atua por meio de interações com a parede celular ou membrana plasmática usando sorbitol (0,8 M) ou ergosterol (400 μg.mL⁻¹) exógenos, respectivamente. O sorbitol é um protetor osmótico que estabiliza os protoplastos fúngicos, o que permite o crescimento do patógeno. Por outro lado, o ergosterol exógeno adicionado ao meio possui afinidade pelos esteróis que constituem a membrana plasmática fúngica. Estes esteróis são responsáveis por formar um complexo que protege a célula fúngica, permitindo seu desenvolvimento. Em ambos os casos, a interação de um composto antifúngico – no caso deste estudo, o PpyTI, com o sorbitol ou ergosterol no meio de crescimento, resultará em uma CIM maior que aquela observada na ausência deste. Nós não observamos nenhuma mudança no valor da CIM para *C. tropicalis* ou *C. albicans* na presença do D-sorbitol, indicando que a atividade fungicida do PpyTI não está relacionada diretamente com alterações na parede celular dos

microrganismos estudados. Por outro lado, na presença do ergosterol, a CIM de ambas as cepas aumentou (4x maior para *C. tropicalis*, e 2x maior para *C. albicans*), indicando que o PpyTI atua por meio de interações com a membrana plasmática, causando danos e afetando a viabilidade fúngica (Tabela 5).

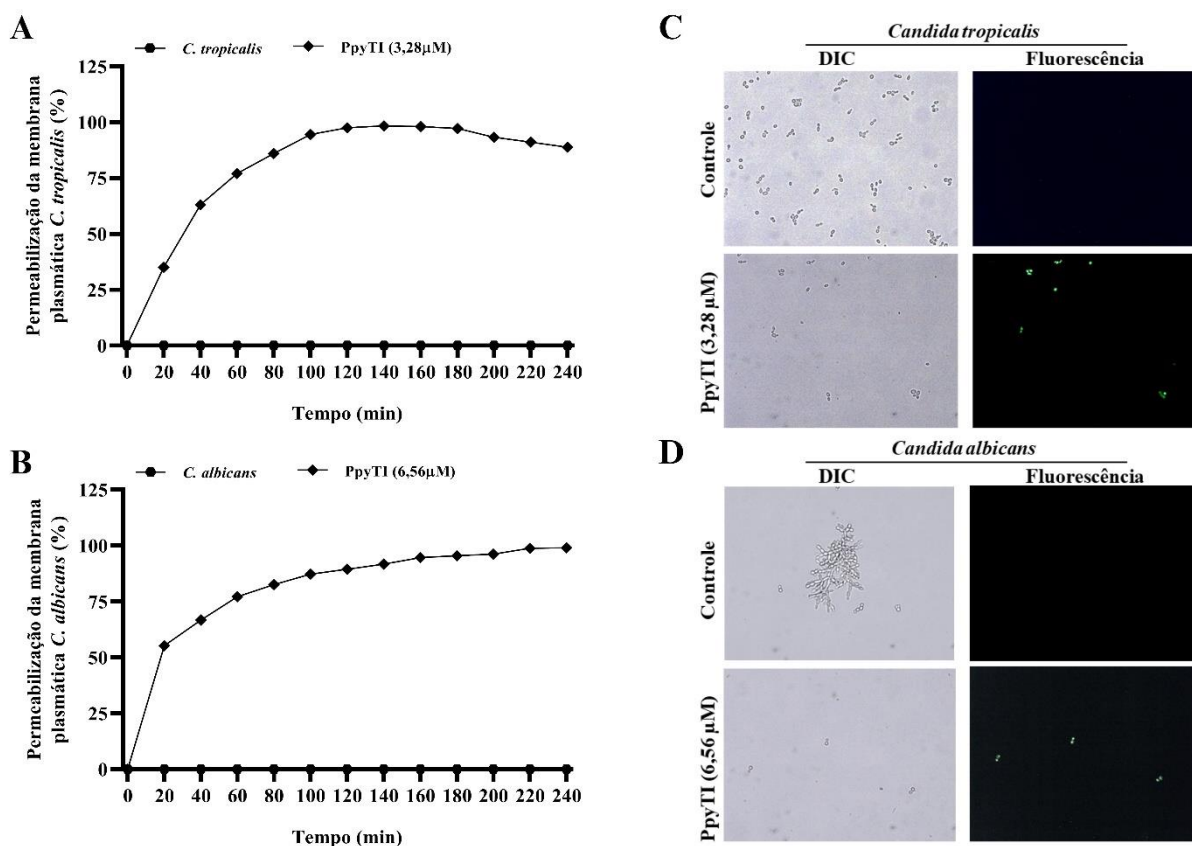
Tabela 5 – Atividade antifúngica do PpyTI na presença do sorbitol (0.8 M) e ergosterol (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra *C. tropicalis* e *C. albicans*.

Microrganismos	PpyTI – CIM (μM)		
	CIM	Sorbitol	Ergosterol
<i>C. tropicalis</i>	3,28	3,28	13,12
<i>C. albicans</i>	6,56	6,56	13,12

5.3.2 Permeabilização da membrana celular

Para identificar o mecanismo pelo qual o PpyTI causa danos à membrana celular e morte fúngica, foi realizada a avaliação da permeabilização de membrana utilizando Sytox™ Green. Este corante fluorescente é impermeável e se liga à ácidos nucleicos apenas quando a integridade membrana plasmática da célula fúngica está comprometida, emitindo uma fluorescência quantificável. *C. tropicalis* e *C. albicans* foram incubadas com o PpyTI na CFM (3,28 μM e 6,56 μM respectivamente) por 240 min. Para *C. tropicalis*, o tempo necessário para aumentar a captação de Sytox™ Green em mais de 75% foi de 60 min (Figura 11A). Para *C. albicans* o tempo necessário para provocar a permeabilização da sonda fluorescente em mais de 75% foi de 60 min, atingindo uma captação de Sytox™ Green superior a 99% e, um platô aos 240 min de ensaio (figura 11B). Os dados do ensaio de quantificação da permeabilização de membrana foram corroborados pela cinética de morte observado no ensaio tempo-dependente, e pela microscopia de fluorescência, onde as cepas tratadas com PpyTI, emitiram um alto sinal de fluorescência, confirmando a hipótese de que o mecanismo de ação do PpyTI envolve danos à membrana plasmática (figura 11C e D).

Figura 11 – Permeabilização da membrana plasmática das leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans* tratados com PpyTI na CFM avaliados por 240 min. Microscopia de fluorescência com a sonda Sytox™ Green - *C. tropicalis* (C) e *C. albicans* (D) tratados com PpyTI na CIM por 24 h, utilizando a sonda fluorescente Sytox™ Green. Barra = 50 μ M, objetiva 40 X.



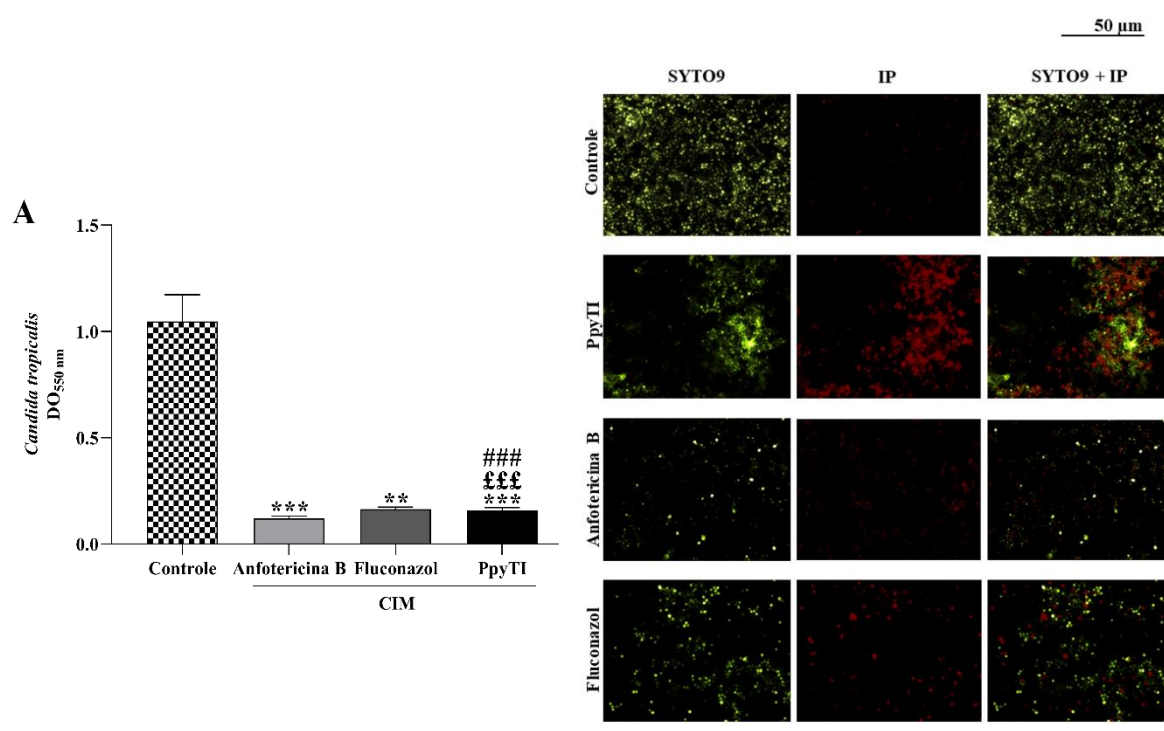
5.4 Avaliação da atividade antibiofilme do PpyTI

5.4.1 Inibição da formação de biofilme de *C. tropicalis* e *C. albicans*

O PpyTI apresentou potencial inibição contra a formação do biofilme de *C. tropicalis* (Figura 10). Em comparação ao grupo controle, o PpyTI foi capaz de inibir a formação do biofilme em 92,6%, resultado próximo ao observado no grupo tratado com anfotericina B e fluconazol (96,49% e 92,02% de inibição na CIM, respectivamente) (Figura 12A). A permeabilização da membrana plasmática do biofilme, avaliada com corantes de ácidos nucleicos, SYTO9, que cora de verde todas as leveduras presentes em uma população, e o iodeto de propídio, que penetra apenas nas leveduras que apresentam danos à membrana, emitindo

uma fluorescência vermelha, revelou que as células agrupadas no grupo controle (não tratadas) emitiram a fluorescência verde com SYTO9, porém não emitiram nenhuma fluorescência no campo com PI, o que corresponde a células viáveis. Já as células do grupo PpyTI, tratadas previamente com o inibidor na CIM, emitiram fluorescência positiva para ambas as marcações. Esta diferença sugere que o PpyTI causa danos à membrana plasmática, afetando assim a formação do biofilme de *C. tropicalis* (Figura 12B).

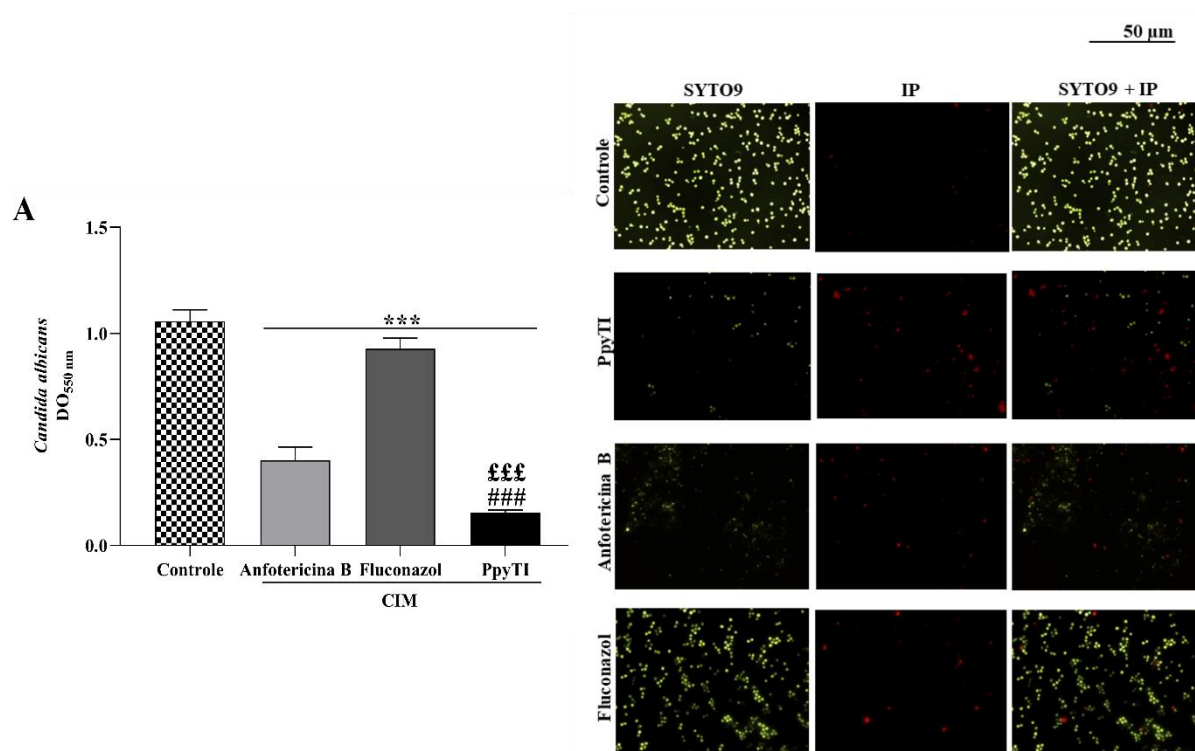
Figura 12 – Efeito antibiofilme do PpyTI, anfotericina B e fluconazol frente a *C. tropicalis*. (A) Análise quantitativa da inibição da formação de biofilme e (B) análise dos efeitos do PpyTI, anfotericina B e fluconazol em microscopia de fluorescência. Barra = 50 μ M, objetiva de 40X. (ANOVA unidirecional seguido de pós-teste de Tukey-Kramer, * vs controle; # vs anfotericina B; ξ vs fluconazol. **, ## e $\xi\xi$ p < 0.01; ***, ### e $\xi\xi\xi$ p < 0.001).



O PpyTI também foi eficaz contra a formação do biofilme de *C. albicans* (Figura 11). Em comparação ao grupo controle, a utilização do PpyTI na CIM provocou a inibição da formação de biofilme em 93,8% (Figura 13A). Este efeito foi superior ao encontrado nos antifúngicos comerciais anfotericina B e fluconazol, cuja inibição foi de 64,9% e 9,8%, respectivamente. Os antifúngicos anfotericina B e fluconazol também apresentaram emissão de

fluorescência no campo com PI, porém, em menor intensidade do que a observada no grupo PpyTI. Estes dados corroboram os resultados quantitativos do ensaio de inibição da formação de biofilme (Figura 13B). Além disso, os dados obtidos na análise por microscopia de fluorescência sugerem que, assim como observado contra *C. tropicalis*, o mecanismo de ação envolvido na inibição da formação do biofilme de *C. albicans* se dá pelo menos em partes através de danos à membrana plasmática.

Figura 13 – Efeito antibiofilme do PpyTI, anfotericina B e fluconazol frente a *C. albicans*. (A) Análise quantitativa da inibição da formação de biofilme e (B) análise dos efeitos do PpyTI, anfotericina B e fluconazol em microscopia de fluorescência. Barra = 50 μ M, aumento 40 X. (ANOVA unidirecional seguido por pós-teste de Tukey-Kramer, * vs controle; # vs anfotericina B; ξ vs fluconazol. ***, ###, $\xi\xi\xi$ $p < 0.001$).

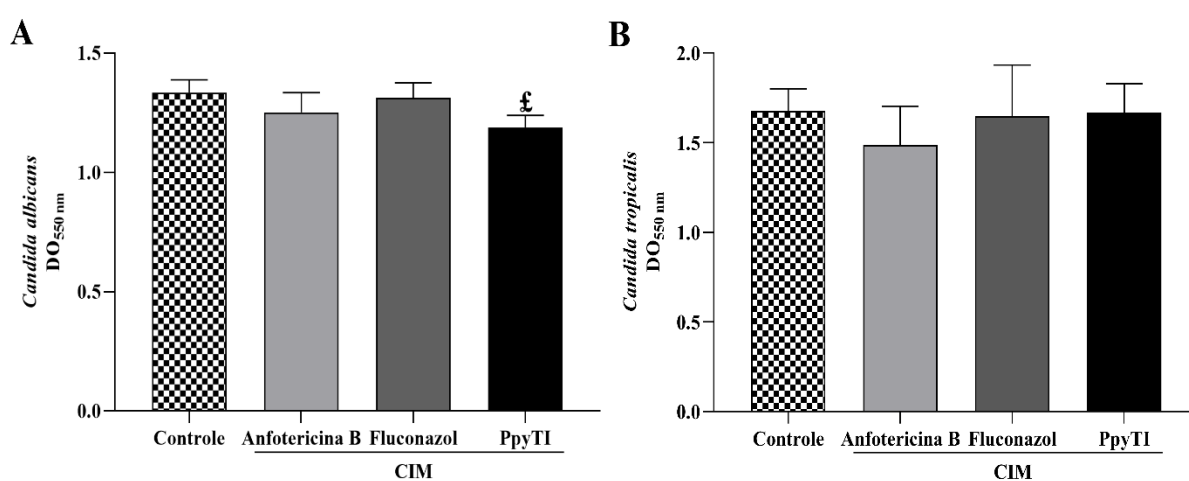


5.4.2 Efeito do PpyTI sobre biofilme maduro

Nos ensaios de erradicação de biofilme maduro, o PpyTI, assim como os antifúngicos anfotericina B e fluconazol, foram incapazes de reduzir a biomassa de biofilme de *C. tropicalis* e *C. albicans*, quando tratados com a CIM (Figura 14). Contra *C. tropicalis* o PpyTI, anfotericina B e fluconazol reduziram a biomassa do biofilme em apenas 0,5%, 11,9% e 1,8%,

respectivamente (Figura 14A). Já contra *C. albicans*, os tratamentos reduziram apenas 11,7%, 6,5% e 1,7%, respectivamente (Figura 14B). Diante da ausência de eficácia satisfatória na erradicação de biofilme maduro, não foram realizados experimentos para verificar possíveis mecanismos de ação associados.

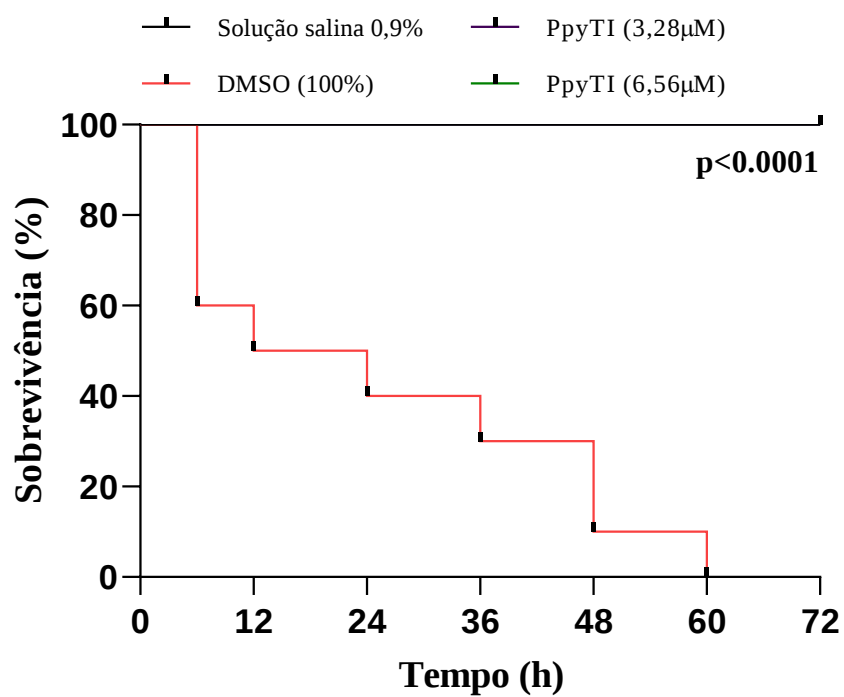
Figura 14 – Efeito do PpyTI, anfotericina B e fluconazol na erradicação do biofilme maduro. Análise quantitativa (A) *C. tropicalis* e (B) *C. albicans*. (ANOVA unidirecional seguido do pós-teste de Tukey-Kramer para o biofilme de *C. albicans* ATCC 90028 (figura. 11B), [£] vs Fluconazol.



5.5 Toxicidade *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*

A toxicidade do PpyTI em modelo *in vivo* de *G. mellonella* foi analisada com o PpyTI na CIM observada para *C. albicans* e *C. tropicalis* (3,28 e 6,56 μ M, respectivamente). Como controle positivo, foi utilizada solução salina 0,9%. Como controle negativo, o DMSO a 100% foi utilizado. O grupo de larvas tratado com o PpyTI na CIM apresentou 100% de sobrevivência após as 72h de experimento, assim como o grupo controle tratado com NaCl 0,9% (Figura 15).

Figura 15 – Taxa de sobrevivência (%) de larvas de *G. mellonella* tratadas com PpyTI na CIM de *C. tropicalis* e *C. albicans*, solução salina 0,9% e DMSO 100% no intervalo de 72h ($p < 0.001$ test de *long-rank*).



6 DISCUSSÃO

Moléculas como IPs e peptídeos, podem exibir atividade antimicrobiana (Macedo *et al.*, 2016; Mohan; Kumari; Elyas, 2018) e importante potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Nosso inibidor foi isolado e sua atividade antimicrobiana e antibiofilme foi determinada no presente estudo. Ao contrário de outros inibidores de tripsina como EPTI, que apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus haemolyticus* (Alencar de Barros *et al.*, 2021), o PpyTI não foi efetivo no combate as bactérias patogênicas avaliadas no presente estudo. Em contrapartida, o PpyTI mostrou-se eficaz frente a diversas espécies de *Candida*. As células fúngicas possuem como principais componentes de parede e membrana celular a quitina e o ergosterol, respectivamente. Nas plantas, o ergosterol é reconhecido como um antígeno não próprio, o que justifica o efeito antifúngico do PpyTI (Leite *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2018). Neste sentido, caracterizamos o efeito fungicida do PpyTI e buscamos determinar possíveis mecanismos de ação associados a esta atividade, além de avaliar seu potencial antibiofilme.

As espécies de *Candida*, comumente encontradas em humanos e animais, especialmente na pele e na mucosa de indivíduos saudáveis, desempenham um papel crucial nas infecções (Kim *et al.*, 2009). Infecções por *Candida* spp. afetam aproximadamente 400.000 pessoas por ano com uma taxa de mortalidade que varia entre 10 e 25%, dependendo do estado imunológico dos pacientes (Oliveira *et al.*, 2019). O desenvolvimento de agentes com atividade candidicida são de extrema importância uma vez que a epidemia de infecções fúngicas e os desafios impostos pela resistência aos medicamentos existentes são de grande preocupação para a saúde pública (Maione *et al.*, 2022). Embora a *C. albicans* continue sendo o principal patógeno associado à candidemia, outras espécies de *Candida*, denominadas de espécies não *albicans* (ENA), vem ganhando destaque no cenário epidemiológico, como é o caso da *C. tropicalis* (Medeiros *et al.*, 2019). Estes dados levaram a OMS a classificar ambas as espécies, *albicans* e *tropicalis*, como prioridade para a saúde pública (OMS, 2022), enfatizando a necessidade da descoberta de novas moléculas com atividade antimicrobiana para o combate a estes patógenos.

Neste sentido, destacamos o PpyTI como agente com promissora atividade antifúngica frente a diversas espécies de *Candida*, especialmente contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, em baixas concentrações – 3,28 e 6,56 μ M, respectivamente. Outros inibidores, com atividade inibitória semelhante, já foram descritos na literatura, como é o caso do inibidor de tripsina de

Enterolobium timbouva (EtTI), que foi capaz de apresentar atividade inibitória contra *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*, apresentando IC₅₀ de 11,66 µM, 16,36 µM e 21,63 µM, respectivamente, sendo esta atividade associada ao comprometimento da membrana plasmática e alterações morfológicas celulares (de Oliveira *et al.*, 2018). O inibidor de tripsina de *Cassia leiandra* Benth (CLTI) também apresentou atividade contra *C. albicans*, com uma CIM de 8,39 µM (Araújo *et al.*, 2019). Outros dois inibidores descritos previamente pelo nosso grupo, também já foram caracterizados quanto a sua atividade fungicida. O inibidor de tripsina de *Inga edulis* (IETI) apresentou atividade inibitória frente a *C. buinensis* e *C. tropicalis*, com uma CIM de 10,2 µM (Dib *et al.*, 2019), já o ILTI foi capaz de inibir o desenvolvimento de *C. tropicalis* a 125 µg.mL⁻¹ (Macedo *et al.*, 2016).

A eficácia do PpyTI como agente fungicida foi caracterizada usando a cinética de morte dependente do tempo. O inibidor apresentou atividade fungicida mais rápida contra *C. tropicalis*, erradicando as UFCs em menos de 60 minutos, em comparação com *C. albicans*, onde a erradicação total das UFCs ocorreu aos 240 minutos após o início do experimento. Os dados na literatura a respeito da cinética de morte dependente do tempo por IPs são escassos, mas já foram observadas cinéticas de morte mais longas em peptídeos antifúngicos (AFPs) com diferentes mecanismos de ação (Tan *et al.*, 2018). A atividade fungicida do peptídeo sintético K-au, por exemplo, foi determinada contra *C. albicans* ATCC 90028 e demonstrou cinética de eliminação semelhante à observada em nosso estudo, com uma redução no número de UFCs após 120 minutos de incubação, e erradicação total das UFCs após 180 minutos (Silva *et al.*, 2023). Complementarmente, o IKR18, um peptídeo sintético derivado da sequência do ILTI, um inibidor do tipo Kunitz com atividade antifúngica, mostrou um efeito bactericida em um curto período (Ramalho *et al.*, 2022), de forma semelhante ao PpyTI. Este rápido efeito fungicida é uma característica ideal para agentes antimicrobianos e indica que o agente terapêutico tem como alvo proteínas intracelulares e de membrana cruciais para a sobrevivência do microrganismo, reduzindo as chances de propagação e induzindo a sensibilidade microbiana (Ramalho *et al.*, 2022; Thankappan *et al.*, 2021).

As infecções causadas por *Candida* spp. são comumente tratadas com vários agentes antifúngicos para melhorar as respostas terapêuticas e evitar a resistência fúngica (de Aguiar *et al.*, 2020). Avaliamos os efeitos sinérgicos entre o PpyTI e os antifúngicos comerciais anfotericina B e fluconazol. A combinação de PpyTI e anfotericina B apresentou um efeito aditivo contra *C. tropicalis* e *C. albicans*, fazendo com que doses menores de ambos os agentes fossem necessárias para se ter o mesmo efeito inibitório alcançado com os fármacos isolados e em concentrações menores. Adicionalmente, a combinação de PpyTI com fluconazol

apresentou um efeito sinérgico contra *C. albicans*, reduzindo a CIM de ambos os compostos. Embora haja poucos dados disponíveis na literatura sobre a atividade sinérgica entre IPs e agentes antifúngicos, um peptídeo derivado de *Capsicum annuum* demonstrou efeito sinérgico com o fluconazol contra *C. albicans* (Taveira *et al.*, 2016). O efeito sinérgico entre agentes antifúngicos é de extrema importância, pois pode favorecer o aumento da eficácia de ambos os compostos, além de reduzir efeitos adversos indesejados, como é o caso do fluconazol, medicamento que apresenta altas taxas de toxicidade (Maione *et al.*, 2022). Além disso, diante dos efeitos do PpyTI sobre a membrana celular fúngica, é possível que os danos causados pelo inibidor facilitem o influxo de fluconazol, causando alterações estruturais na membrana plasmática, e em um mecanismo de *feedback* positivo ocorra a retroalimentação do influxo do PpyTI e fluconazol para o interior da célula fúngica, promovendo efeitos tóxicos em concentrações menores, assim como observado pelo peptídeo CaThi (Taveira *et al.*, 2016), entretanto, mais estudos são necessário para confirmar a hipótese.

Diante da promissora atividade antifúngica do PpyTI, procuramos determinar possíveis mecanismos de ação associadas aos seus efeitos terapêuticos. A interação do PpyTI com a membrana da célula fúngica foi investigada por meio da avaliação da absorção do Sytox™ Green, uma sonda fluorescente que penetra apenas em células com membranas danificadas, ligando-se aos ácidos nucleicos e emitindo uma fluorescência mensurável (Rajasekaran *et al.*, 2019). Em nosso trabalho, quando as células fúngicas foram tratadas com PpyTI, houve um aumento na emissão de fluorescência de ambas as cepas estudadas (*C. tropicalis* e *C. albicans*). Estes dados indicam que os danos à membrana plasmática fúngica é um dos mecanismos de ação responsáveis pela morte celular provocada pelo PpyTI. As análises de microscopia corroboraram essas descobertas, revelando morfologia celular e emissão de fluorescência prejudicadas. Um efeito fungicida semelhante ao observado com o PpyTI, envolvendo danos à membrana, foi observado em estudos com IETI (Magee *et al.*, 2012) e defensin ApDef1 (Soares *et al.*, 2017) que avaliaram os efeitos desses compostos na integridade da membrana de diferentes espécies de *Candida* e contra *Saccharomyces cerevisiae*. Efeitos semelhantes também foram observados na atividade antifúngica do inibidor de tripsina de *Capsicum annuum* L. (CaTI), que induziu a produção de óxido nítrico, resultando em morte celular, com consequente aumento da captação do corante Sytox™ Green (Ribeiro *et al.*, 2012), confirmando o potencial antifúngico destas moléculas por meio de diferentes mecanismos de ação.

O ensaio de ligação ao ergosterol também foi realizado para melhor caracterização da atividade fungicida do PpyTI. O ergosterol é o esteroide mais abundante na membrana dos fungos e um dos principais alvos dos antifúngicos, devido à sua abundância (Almeida *et al.*, 2024). O

PpyTI apresentou uma forte interação com a membrana celular fúngica, aumentando a CIM de ambas as cepas estudadas (*C. tropicalis* e *C. albicans*) quando na presença do meio suplementado com ergosterol exógeno. Este mecanismo de ação é semelhante a determinadas classes farmacológicas, como polienos e azóis, que também afetam o ergosterol ou as enzimas envolvidas em sua biossíntese (Biernasiuk; Baj; Malm, 2022). Por exemplo, a anfotericina B forma poros na membrana ao se ligar aos esteróis, alterando a permeabilidade celular e levando à morte (Kamiński, 2014), enquanto o fluconazol inibe a lanosterol 14- α desmetilase, uma enzima essencial na biossíntese do ergosterol (Alizadeh; Khodavandi; Zalakian, 2017).

Embora o PpyTI apresente uma atividade antifúngica promissora, as infecções causadas por *Candida* spp. são frequentemente desafiadoras devido à possibilidade de formação de biofilme, que oferece proteção contra os sistemas de defesa do hospedeiro (Biernasiuk; Baj; Malm, 2022). Considerando esse contexto complexo de resistência, investigamos as propriedades antibiofilme do PpyTI, que foi capaz de reduzir significativamente a biomassa de biofilme de *C. tropicalis* e *C. albicans* em 92,6% e 93,8%, respectivamente. A atividade inibitória do PpyTI foi superior a observada pelo inibidor de tripsina ClTI, que inibiu 34,30% do biofilme pré-formado de *C. albicans* (Araújo *et al.*, 2019). Entretanto, o PpyTI não teve impacto significativo nos biofilmes maduros. A ausência de atividade antifúngica frente aos biofilmes maduros pode ser justificada pela estrutura tridimensional composta de células leveduriformes, pseudo-hifas e hifas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, que permitem que células presentes em biofilmes tornem-se até 1.000 vezes mais resistentes que células planctônicas (Jafri *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2020). Entretanto, seus efeitos positivos na inibição da formação de biofilme sugerem um potencial para o desenvolvimento de agentes antifúngicos inspirados no PpyTI, capazes de erradicar biofilmes maduros, semelhante à ação do peptídeo antifúngico AMP-17, que erradicou o biofilme maduro de *C. albicans* ao inibir a expressão gênica associada a enzimas produtoras de polissacarídeos, interrompendo a produção da matriz do biofilme (Sun *et al.*, 2022).

Produtos naturais são excelentes candidatos no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Geralmente apresentam baixa toxicidade, impacto ambiental e apresentam um amplo espectro de ação, quando comparados a substâncias sintéticas. Embora essas características existam, ensaios *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para garantir a segurança do seu uso. Por exemplo, apesar de sua alta aplicabilidade biotecnológica, alguns inibidores de peptidase, como os inibidores do tipo Bowman-Birk, podem apresentar toxicidade quando utilizados em altas concentrações devido a sua capacidade inibitória frente a enzimas digestivas, inibindo o processo de digestão e absorção de nutrientes. Em nosso ensaio de toxicidade *in vivo*

com *G. mellonella*, o PpyTI não foi tóxico na CIM de ambas as cepas estudadas, o que ressalta a segurança associada ao uso deste inibidor. Esses resultados são promissores e podem ser utilizados como base para novos estudos que visem a utilização do PpyTI como agente terapêutico, ou para a síntese de compostos derivados do PpyTI, como PAMs, para o tratamento de infecções fúngicas.

7 CONCLUSÕES

O PpyTI é um inibidor de tripsina que demonstrou uma importante atividade antifúngica frente a espécies de leveduras do gênero *Candida*, sobretudo contra a *C. tropicalis* e *C. albicans*, espécies que comumente estão relacionadas a infecções nosocomiais e mortalidade em pessoas idosas, imunocomprometidas e em UTIs. Comprovamos ainda que o PpyTI age de forma rápida na redução das UFCs de ambas as cepas estudadas. Este efeito candidicida do PpyTI está relacionado com danos à membrana celular. Além disso, comprovamos que o PpyTI pode ser utilizado de forma aditiva ou sinérgica com antifúngicos comerciais como anfotericina B e fluconazol no combate a infecções. O PpyTI também foi eficaz na inibição da formação de biofilme de *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, com atividade superior a observada pelos antifúngicos anfotericina B e fluconazol. Além disso, o PpyTI não apresentou toxicidade no modelo experimental utilizado, reforçando sua segurança e sua potencial aplicação biotecnológica. Diante dos resultados apresentados, incentivamos a realização de novos estudos que explorem o potencial farmacológico do PpyTI para o desenvolvimento de novos agentes com atividade antimicrobiana, como peptídeos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR DE BARROS, K. M. *et al.* A new Kunitz trypsin inhibitor from *Erythrina poeppigiana* exhibits antimicrobial and antibiofilm properties against bacteria. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, [s. l.], v. 144, p. 112198, 2021.
- ALIZADEH, F.; KHODAVANDI, A.; ZALAKIAN, S. Quantitation of ergosterol content and gene expression profile of ERG11 gene in fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Current Medical Mycology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 13–19, 2017.
- ALLEGRA, E. *et al.* *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, [s. l.], v. 198, p. 469–472, 2018.
- ALMEIDA, L. H. de O. *et al.* A potent candidicidal peptide designed based on an encrypted peptide from a proteinase inhibitor. **Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects**, [s. l.], v. 1868, n. 5, p. 130583, 2024.
- ALMEIDA, C. V. *et al.* Computer-made peptide RQ18 acts as a dual antifungal and antibiofilm peptide through membrane-associated mechanisms of action. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 753, p. 109884, 2024.
- ALMEIDA, C. V. *et al.* Differential interactions of the antimicrobial peptide, RQ18, with phospholipids and cholesterol modulate its selectivity for microorganism membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects**, [s. l.], v. 1865, n. 9, p. 129937, 2021.
- ARAÚJO, N. M. S. *et al.* 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, p. 183032, 2019.
- ARULPANDI, I.; SANGEETHA, R. Antibacterial Activity of Fistulin: A Protease Inhibitor Purified from the Leaves of *Cassia fistula*. **ISRN pharmaceuticals**, [s. l.], v. 2012, p. 584073, 2012.
- ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 49–59, 2017.
- ASENJO, A.; OTEO-IGLESIAS, J.; ALÓS, J.-I. What's new in mechanisms of antibiotic resistance in bacteria of clinical origin? **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 291–299, 2021.
- ATIENCIA-CARRERA, M. B. *et al.* Evaluation of the biofilm life cycle between *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 953168, 2022.
- BASSETTI, M. *et al.* New antibiotics for bad bugs: where are we?. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [s. l.], v. 12, p. 22, 2013.

BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. Resistance to Antifungal Drugs. **Infectious Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 279–311, 2021.

BENDRE, A. D.; RAMASAMY, S.; SURESH, C. G. Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 113, p. 933–943, 2018.

BIERNASIUK, A.; BAJ, T.; MALM, A. Clove Essential Oil and Its Main Constituent, Eugenol, as Potential Natural Antifungals against *Candida* spp. Alone or in Combination with Other Antimycotics Due to Synergistic Interactions. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 215, 2022.

BIN HAFEEZ, A. *et al.* Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 21, p. 11691, 2021.

BONTURI, C. R. *et al.* Plant Kunitz Inhibitors and Their Interaction with Proteases: Current and Potential Pharmacological Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 4742, 2022.

BRINKAC, L. *et al.* The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 1001–1008, 2017.

CÂMARA, A. C. L. *et al.* Embryotoxic effects of *Poincianella* (Caesalpinia) pyramidalis leaves on pregnant rats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 137–142, 2017.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Frontiers in Medicine**, [s. l.], v. 5, p. 28, 2018.

CHAVES, T. P. *et al.* Evaluation of the Interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz Extract and Antimicrobials Using Biological and Analytical Models. **PloS One**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. e0155532, 2016.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 26–40, 2020.

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

CORDEIRO, R. de A. *et al.* *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 145–152, 2015.

CORRÊA, J. S. *et al.* Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. **Revista Da Escola De Enfermagem Da U S P**, [s. l.], v. 56, p. e20210589, 2022.

COSTA, H. P. *et al.* JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 5, 2014. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00005>. Acesso em: 15 out. 2023.

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

DA SILVA BEZERRA, C. *et al.* 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.

DANTZGER, M. *et al.* Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 118, p. 224–235, 2015.

DE AGUIAR, F. L. L. *et al.* The antiproliferative peptide Ctn[15-34] is active against multidrug-resistant yeasts *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 128, n. 2, p. 414–425, 2020.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. *et al.* Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 580–589, 2013.

DE OLIVEIRA, D. M. P. *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. e00181-19, 2020.

DE OLIVEIRA, C. F. R. *et al.* 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 SANTOS, J. V. *et al.* Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 79, n. 6, p. 175, 2022.

DE SOUSA, L. M. S. *et al.* *Poincianella pyramidalis* (Tul) L.P. Queiroz: A review on traditional uses, phytochemistry and biological-pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 264, p. 113181, 2021.

DE SOUZA, C. M. *et al.* Adhesion and biofilm formation by the opportunistic pathogen *Candida tropicalis*: what do we know?. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 207–218, 2023.

DE SOUZA NASCIMENTO, A. M. *et al.* Antibacterial action mechanisms and mode of trypsin inhibitors: a systematic review. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 749–759, 2022.

DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 51–65, 2018.

DELARZE, E.; SANGIARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. **Drug Resistance Updates: Reviews and**

Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, [s. l.], v. 23, p. 12–19, 2015.

DIB, H. X. *et al.* 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.

FAN, F. *et al.* *Candida albicans* biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 60, n. 5–6, p. 106673, 2022.

FLEMMING, H.-C. *et al.* The biofilm matrix: multitasking in a shared space. **Nature Reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 70–86, 2023.

FROST, D. J. *et al.* A Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. **The Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 306–310, 1995.

GOW, N. A. R. *et al.* The importance of antimicrobial resistance in medical mycology. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 5352, 2022.

GUIMARÃES, L. C. *et al.* 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.

GUTIERREZ-GONGORA, D.; GEDDES-MCALISTER, J. From Naturally-Sourced Protease Inhibitors to New Treatments for Fungal Infections. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 1016, 2021.

HALL, C. W.; MAH, T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS microbiology reviews**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 276–301, 2017.

HELLINGER, R.; GRUBER, C. W. Peptide-based protease inhibitors from plants. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 1877–1889, 2019.

HERWADE, A. P. *et al.* Characterization of a Bowman-Birk type trypsin inhibitor purified from seeds of *Solanum surattense*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 8648, 2021.

HUEMER, M. *et al.* Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO Reports**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. e51034, 2020.

JAFRI, H. *et al.* Synergistic interaction of eugenol and antimicrobial drugs in eradication of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **AMB Express**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 185, 2020.

KAMIŃSKI, D. M. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. **European biophysics journal: EBJ**, [s. l.], v. 43, n. 10–11, p. 453–467, 2014.

KARRAY, A. *et al.* Purification and Biochemical Characterization of a New Protease Inhibitor from *Conyza dioscoridis* with Antimicrobial, Antifungal and Cytotoxic Effects. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 25, n. 22, p. 5452, 2020.

KARYGIANNI, L. *et al.* Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 668–681, 2020.

KHARA, J. S. *et al.* Disruption of drug-resistant biofilms using de novo designed short α -helical antimicrobial peptides with idealized facial amphiphilicity. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 57, p. 103–114, 2017.

KIM, J.-Y. *et al.* PG-2, a Potent AMP against Pathogenic Microbial Strains, from Potato (*Solanum tuberosum* L cv. Gogu Valley) Tubers Not Cytotoxic against Human Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 4349–4360, 2013.

KIM, J.-Y. *et al.* Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 2860–2872, 2009.

KLÍMOVÁ, K. *et al.* Epidemiology of bacterial infections in patients with liver cirrhosis. Experience in a Spanish tertiary health center. **Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 121–132, 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAZARINI, J. G. *et al.* Bioprospection of *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, [s. l.], v. 102, p. 132–139, 2018.

LEE, Y. *et al.* Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 2021.

LEMIECH-MIROWSKA, E. *et al.* Nosocomial infections as one of the most important problems of healthcare system. **Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 361–366, 2021.

LEITE, M. C. A. **Citral e geraniol: atividade antifúngica sobre leveduras do gênero *Candida* de importância hospitalar**. 2015. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

LEWIES, A.; DU PLESSIS, L. H.; WENTZEL, J. F. Antimicrobial Peptides: the Achilles' Heel of Antibiotic Resistance? **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 370–381, 2019.

LIU, J.-Y.; DICKTER, J. K. Nosocomial Infections: A History of Hospital-Acquired Infections. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 637–652, 2020.

LUO, Y.; SONG, Y. Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 21, p. 11401, 2021.

MA, Y. X. *et al.* Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. **Advanced Science**, v. 7, n. 1, p. 1901872, 2020.

MACEDO, M. L. R. *et al.* Adenanthera 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.

MACEDO, M. L. R. *et al.* 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.

MAGANA, M. *et al.* The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **The Lancet. Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. e216–e230, 2020.

MAGEE, P. J. *et al.* Chickpea (*Cicer arietinum*) and other plant-derived protease inhibitor concentrates inhibit breast and prostate cancer cell proliferation in vitro. **Nutrition and Cancer**, [s. l.], v. 64, n. 5, p. 741–748, 2012.

MAIONE, A. *et al.* WMR Peptide as Antifungal and Antibiofilm against Albicans and Non-Albicans Candida Species: Shreds of Evidence on the Mechanism of Action. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 2151, 2022.

MAO, X. *et al.* Cetylpyridinium Chloride: Mechanism of Action, Antimicrobial Efficacy in Biofilms, and Potential Risks of Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 8, p. 10.1128/aac.00576-20, 2020.

MAUBON, D. *et al.* Resistance of Candida spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now?. **Intensive Care Medicine**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 1241–1255, 2014.

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

MEDEIROS, M. A. P. de *et al.* Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PloS One**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. e0221033, 2019.

MENDES, R. F. M. *et al.* RAPD analysis of the genetic diversity among accessions of Fabaceous forages (*Poincianella* spp) from the Caatinga. **Genetics and molecular research: GMR**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 5832–5839, 2014.

MILLS, J. P.; MARCHAIM, D. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Infection Prevention and Control Update. **Infectious Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 969–994, 2021.

MITIĆ-ĆULAFIĆ, D. *et al.* Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). **Archives of Biological Sciences**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 173–178, 2005.

MOHAN, M.; KUMARI, M.; ELYAS, K. K. Antifungal and Antimicrobial Properties of a Purified Protease Inhibitor from *Macrotyloma uniflorum* Seeds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 29, p. 2491–2501, 2018.

MORRISON, L.; ZEMBOWER, T. R. Antimicrobial Resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 619–635, 2020.

MUHAJ, F. F. *et al.* Antimicrobials and resistance part II: Antifungals, antivirals, and antiparasitics. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 1207–1226, 2022.

MULANI, M. S. *et al.* Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 539, 2019.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 4, n. 2, 2016.

NEGRI, M. *et al.* Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 1399–1412, 2012.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. **Biochimie**, [s. l.], v. 157, p. 10–21, 2019.

PEREIRA, R. *et al.* Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 131, n. 1, p. 11–22, 2021.

PRASAD, R.; BANERJEE, A.; SHAH, A. H. Resistance to antifungal therapies. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 157–166, 2017.

RABIN, N. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 493–512, 2015.

RAJASEKARAN, G. *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory activities of chemokine CXCL14-derived antimicrobial peptide and its analogs. **Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes**, [s. l.], v. 1861, n. 1, p. 256–267, 2019.

RAMALHO, S. R. *et al.* The synthetic antimicrobial peptide IKR18 displays anti-infectious properties in *Galleria mellonella* in vivo model. **Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects**, [s. l.], v. 1866, n. 12, p. 130244, 2022.

RATHER, M. A.; GUPTA, K.; MANDAL, M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 1701–1718, 2021.

RAWLINGS, N. D. Peptidase inhibitors in the MEROPS database. **Biochimie**, [s. l.], v. 92, n. 11, p. 1463–1483, 2010.

REVIE, N. M. *et al.* Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 45, p. 70–76, 2018.

RIBEIRO, S. F. F. *et al.* Capsicum annuum L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. **Antonie Van Leeuwenhoek**, [s. l.], v. 101, n. 3, p. 657–670, 2012.

RODRIGUES, M. S. *et al.* Adevonin, a novel synthetic antimicrobial peptide designed from the Adenantha pavonina trypsin inhibitor (ApTI) sequence. **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 112, n. 8, p. 438–447, 2018.

ROKAS, A. Evolution of the Human Pathogenic Lifestyle in Fungi. **Nature microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 607–619, 2022.

ROY, R. *et al.* Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 522–554, 2018.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2016, p. 2475067, 2016.

SCHUSTER, J. J.; MARKX, G. H. Biofilm architecture. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, [s. l.], v. 146, p. 77–96, 2014.

SHARMA, L.; BISHT, G. S. Synergistic effects of short peptides and antibiotics against bacterial and fungal strains. **Journal of Peptide Science**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. e3446, 2023.

SILVA, M. S. *et al.* Application and bioactive properties of CaTI, a trypsin inhibitor from Capsicum annuum seeds: membrane permeabilization, oxidative stress and intracellular target in phytopathogenic fungi cells. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 97, n. 11, p. 3790–3801, 2017.

SILVA, M. L. *et al.* K-aurein: A notable aurein 1.2-derived peptide that modulates Candida albicans filamentation and reduces biofilm biomass. **Amino Acids**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 1003–1012, 2023.

SOARES, J. R. *et al.* Interaction between the plant ApDef1 defensin and Saccharomyces cerevisiae results in yeast death through a cell cycle- and caspase-dependent process occurring via uncontrolled oxidative stress. **Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects**, [s. l.], v. 1861, n. 1 Pt A, p. 3429–3443, 2017.

SRIKANTH, S.; CHEN, Z. Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on Cancer Therapy. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 7, p. 470, 2016.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; RAMASUBRAMANIAN, A. K. Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today. Technologies**, [s. l.], v. 11, p. 65–71, 2014a.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; RAMASUBRAMANIAN, A. K. Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today. Technologies**, [s. l.], v. 11, p. 65–71, 2014b.

STORR, J. *et al.* Core components for effective infection prevention and control programmes: new WHO evidence-based recommendations. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, [s. l.], v. 6, p. 6, 2017.

SUN, C. *et al.* The Antimicrobial Peptide AMP-17 Derived from *Musca domestica* Inhibits Biofilm Formation and Eradicates Mature Biofilm in *Candida albicans*. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1474, 2022.

TAN, L. *et al.* Antifungal activity of spider venom-derived peptide lycosin-I against *Candida tropicalis*. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 216, p. 120–128, 2018.

TAVEIRA, G. B. *et al.* Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. **BMC microbiology**, [s. l.], v. 16, p. 12, 2016.

THANKAPPAN, B. *et al.* Dual antimicrobial and anticancer activity of a novel synthetic α -helical antimicrobial peptide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 161, p. 105784, 2021.

THEVISSSEN, K. *et al.* Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 271, n. 25, p. 15018–15025, 1996.

WANG, T.; FLINT, S.; PALMER, J. Magnesium and calcium ions: roles in bacterial cell attachment and biofilm structure maturation. **Biofouling**, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 959–974, 2019.

WHITE, R. L. *et al.* Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 1914–1918, 1996.

YIN, W. *et al.* Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 14, p. 3423, 2019.

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

ANEXO A – Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN). Número AC355D95.



**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 AC35D95

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: **AC35D95**

Usuário: **UFMS**

CPF/CNPJ: **15.461.510/0001-33**

Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**

Finalidade do Acesso:



Pesquisa Científica



Bioprospecção



Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Anadenanthera falcata

Albizia niopoides

Anadenanthera colubrina

Croton urucurana

Dolichos lablab

Leptolobium dasycarpum

Libidibia paraguariensis

Entada acaciifolia

Libidibia paraguariensis

Microlobius foetidus

Mimosa glutinosa

Mimosa hexandra

Morus nigra
Parkinsonia praecox
Poecilanthe parviflora
Poincianella pluviosa
Prosopis rubriflora
Pterogyne nitens
Senna occidentalis
Sesamun indicum
Talisia esculenta
Koelreuteria paniculata
Anadenanthera falcata
Caryocar brasiliense
Labramia bojeri
Poecilanthe parviflora
Peltophorum dubium
Inga vera
Adenanthera pavonina
Clitoria fairchildiana
Inga laurina
Acrocomia aculeata
Poincianella pyramidalis
Pouteria torta
Annona muricata
Dioclea violacea
Azadirachta indica
Rheedia gardneriana
Ricinus communis
Rattus norvegicus
Anticarsia gemmatilis
Ephestia kuehniella
Heliothis virescens
Helicoverpa zea

Rhodnius prolixus
Pachymerus nucleorum
Agrotis ipsilon
Spodoptera cosmioides
Spodoptera eridania
Spodoptera albula
Megalobulimus lopesi
Callosobruchus maculatus
Spodoptera frugiperda
Zabrotes subfaciatus
Corcyra cephalonica
Sitotroga cerealella
Diatraea saccharalis
Candida parapsilosis
Colletotrichum musae
Fusarium solani
Microsporum canis
Erwinia chrysanthemi
Acidovorax avenae
Bacillus licheniformis
Clavibacter michiganensis
Pseudomonas caricapapayae
Pseudomonas cichorii
Pseudomonas syringae
Streptococcus mutans
Xanthomonas campestris
Xanthomonas melonis
Pectobacterium chrysanthemi
Curtobacterium flaccumfaciens
Escherichia coli
Colletotrichum gloeosporioides
Plathymentia foliolosa

Título da Atividade: **Espécies vegetais com propriedades biológicas ativas**

Equipe

MARIA LIGIA RODRIGUES MACEDO

UFMS