

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM - SBBq

ANA PAULA RAMOS PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME
DE UM INIBIDOR DE PEPTIDASE DE *Inga cylindrica***

Campo Grande - MS

Março 2022

ANA PAULA RAMOS PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME
DE UM INIBIDOR DE PEPTIDASE DE *Inga cylindrica***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq. Da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Lígia Rodrigues Macedo.

Campo Grande – MS

Março - 2022

TERMO DE APROVAÇÃO

ANA PAULA RAMOS PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE UM
INIBIDOR DE PEPTIDASE DE *Inga cylindrica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

31 de março de 2022

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo
UFMS

Profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo
UFMS

Profa. Dra. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães
UFMS

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre esteve ao meu lado me apoiando e me dando força acima de tudo. À minha mãe, Elizabeth, que sempre me apoiou e incentivou. Ao meu namorado, que sempre foi meu suporte emocional e financeiro. Aos meus sogros, pelo acolhimento e dedicação. Ao meu irmão, que sempre teve um papel de pai em minha vida, sempre me encorajou a nunca desistir. À minhas irmãs Isadora e Renata, que sempre estiveram presentes dando os suportes necessários. Às minhas sobrinhas, Alícia e Cecília, razões pelas quais eu me motivo a ser melhor todo dia.

Agradeço, à minha orientadora professora Maria Lígia, por confiar na minha capacidade e me abrir as portas para realizar este trabalho em seu laboratório (LPPFB), e por todo o seu apoio, incentivo e carinho com os estudos. Por acreditar na nossa caminhada e que tudo daria certo. Por me auxiliar a levar nossas descobertas a comunidade científica.

Ao meu grupo de pesquisa, nossa família LPPFB. Sempre estiveram dispostos em me ajudar e sanar qualquer dúvida, além das reuniões em grupo regadas com tanto conhecimento e alegria. Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), a SBBq e a UFMS, por ter a oportunidade de ter participado dessas renomadas instituições.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FUNDECT e FINEP, por apoiarem e cederem recursos para a realização desta pesquisa no laboratório. A todos os meus queridos amigos da vida, em especial a Victória e Matheus, pelo suporte no ambiente acadêmico e fora dele, e à Ivini, minha grande amiga que me acompanha desse a época da escola. À Maria, minha eterna dupla. Talvez essa caminhada não fosse possível de ser realizada com alegria sem as nossas conversas, estudos em conjunto, saidinhas e muito amor envolvido.

A todos professores, pesquisadores e colaboradores, que puderam compartilhar um pouco do seu conhecimento. E a todos que contribuíram direta ou indiretamente durante essa caminhada. Aos professores membros da banca de qualificação e defesa, que aceitaram o convite e dedicaram-se a leitura desse trabalho, oferecendo sugestões que só somaram à essa dissertação.

A Deus, por me dar força, persistência e paciência.

RESUMO

A descoberta dos antibióticos revolucionou o controle das infecções. Entretanto, a história dos antibióticos e o desenvolvimento de resistência microbiana caminham lado a lado. Com isso, a busca por novos antimicrobianos se iniciou. Nas últimas décadas, os antimicrobianos oriundos de espécies vegetais vêm se destacando. Os inibidores de enzimáticos vegetais podem desestabilizar patógenos por meio de danos à membrana e/ou parede celular e alteração da permeabilidade celular. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano e antibiofilme do inibidor de tripsina de sementes de *Inga cylindrica*, investigar seu mecanismo de ação frente a leveduras patogênicas, bem como sua toxicidade em *Galleria mellonella*. Após o isolamento, a concentração inibitória mínima (CIM), concentração fungicida mínima (CFM) e a atividade antibiofilme foram avaliadas. Também foram analisados os efeitos sinérgicos do ICTI em associação a anfotericina B e a toxicidade do ICTI frente a *G. mellonella*. O ICTI é uma proteína constituída por uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 20 kDa. A atividade inibitória do ICTI foi específica para a tripsina. O ICTI não possui atividade bactericida, mas apresenta ação fungicida. ICTI apresentou CIM de 32,11 μ M para *C. albicans* 90028 e *C. gattii* AFLP4. A combinação de ICTI com anfotericina B apresentou efeito sinérgico. A CIM do ICTI inibiu a formação do biofilme de *C. albicans* 90028 e *C. gattii* AFLP4, em 38,5% e 21,5%, respectivamente. A CIM de ICTI também promoveu a erradicação de formas maduras de biofilme de *C. albicans* 90028 e *C. gattii* AFLP4, 37,2% e 22,1, respectivamente. Com base nos resultados obtidos, sugerimos que a atividade antifúngica do ICTI envolva a ligação ao ergosterol presente na membrana celular fúngica. Essa ação específica também é observada nos antifúngicos poliênicos, como a anfotericina B. Dada a capacidade do ICTI se ligar ao ergosterol, danos na membrana ocorrem, promovendo o extravasamento do conteúdo intracelular, como demonstrado pelos resultados deste trabalho. Por fim, o ICTI não se mostrou tóxico quando administrado no modelo *G. mellonella*, o que suporta ensaios futuros em outros modelos animais.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana, antimicrobianos de origem vegetal, leveduras patogênicas.

ABSTRACT

The discovery of antibiotics revolutionized infection control. However, the history of antibiotics and the development of microbial resistance go hand in hand. Thus, the search for new antimicrobials began. In the last decades, antimicrobials from plant species have been highlighted. Plant cellular enzyme inhibitors can destabilize pathogens through membrane and/or wall damage and changes in cell permeability. This study aimed to evaluate the antimicrobial potential of the trypsin inhibitor from *Inga cylindrica* seeds, investigate its mechanism of action against pathogenic yeasts, as well as its toxicity in *Galleria mellonella*. After the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum concentration (CFM) and antibiofilm activity were isolated, fungicidal. The synergistic effects of ICTI in association with amphotericin B and ICTI toxicity against *G. mellonella* were also analyzed. ICTI is a protein consisting of a single polypeptide chain of approximately 20 kDa. ICTI inhibitory activity was trip-specific. The ICTI does not have bactericidal activity, but has fungicidal action. The ICTI showed a MIC of 32.11 μM for *C. albicans* 90028 and *C. gattii* AFLP4. The action of ICTI with amphotericin B showed a synergistic effect. The ICTI at MIC inhibited the biofilm formation of *C. albicans* 90028 and *C. gattii* AFLP4, by 38.5% and 21.5%, respectively. The ICTI at MIC also promotes the eradication of mature biofilm forms of *C. albicans* 90028 and *C. gattii* AFLP4, 37.2% and 22.1%, respectively. Based on the results obtained, we suggest that the antifungal activity of ICTI involves binding to ergosterol present in the fungal cell membrane. This specific action is also observed in polyene antifungals such as amphotericin B. Given the ability of ICTI to bind to ergosterol, membrane damage occurring intracellularly, promoting work extravasation, as demonstrated by the work results. Finally, ICTI was not toxic when administered in the *G. mellonella* model, or that it supports future trials in other animal models.

Keywords: Antimicrobial resistance, antimicrobials of plant origin, pathogenic yeasts

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema da estrutura primária dos inibidores de Kunitz com base no número de ligações dissulfeto. (a) Inibidores com duas ligações dissulfeto e uma cadeia polipeptídica; (b) Inibidores com duas ligações dissulfeto e duas cadeias; Inibidores com uma ligação dissulfeto e duas cadeias polipeptídicas (c) ou uma cadeia polipeptídica (d); (e) Inibidores com um resíduo de cisteína e uma cadeia polipeptídica; (f) Inibidor desprovido de resíduo de cisteína e uma cadeia polipeptídica. RS: sítio reativo.....25
- Figura 2 - Inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz. Estrutura obtida a partir de estudos de cristalografia de raios-X.....26
- Figura 3 - Impacto da resistência antimicrobiana. Duas equipes da Europa modelaram o aumento das taxas de resistência antimicrobiana (RAM) com base nas informações disponíveis em 2014, cada uma usando sua própria metodologia, para entender o impacto que a RAM teria sobre a população mundial e seu resultado econômico. A) Mortes atribuíveis à RAM todos os anos, em comparação com outras causas importantes de morte. O número estimado de RAM aumentará para 10 milhões até 2050, aproximando-se do número total de mortes causadas por todas as doenças hoje. B) Mortes atribuíveis à RAM em diferentes partes do mundo até 2050. Há uma tendência de redução dos continentes de mortalidade com melhores condições econômicas e um manejo antibiótico mais rigoroso.....29
- Figura 4 - Formação de biofilmes de *Candida albicans*. (A) A formação de biofilmes de *Candida albicans* foi dividida em quatro estágios principais: aderência de células redondas em forma de levedura a uma superfície; início da formação do biofilme, pseudo-hifas e hifas (também conhecido como estágio de proliferação); maturação em um biofilme complexo e estruturado, no qual as células são encerradas na matriz extracelular; e dispersão de células em forma de levedura do biofilme para semear novos locais. (B) Microscopia confocal de varredura a laser da vista lateral de um biofilme maduro de *C. albicans*. Foi utilizado o corante Alexa flúor 594 conjugado com cocanavalina A34

Figura 5 - Visão geral da resistência aos antifúngicos de biofilme de *C. albicans*. Características dos biofilmes de *C. albicans* que contribuem para a resistência aos antifúngicos. Biofilmes de *C. albicans* são estruturas complexas que contêm células redondas em forma de levedura, células pseudo-hifais e células de hifas (mostradas em azul) que são encerradas em uma matriz extracelular (mostrada em azul clara). Uma população de células minoritárias, chamadas células "persistentes" (mostradas em laranja), pode existir na camada basal do biofilme.....35

Figura 6 - Mecanismo de ação da anfotericina B. Ação da anfotericina B na membrana fúngica, com formação dos poros e extravasamento de íons.....36

Figura 7 – *I. cylindrica*. (A) Árvore em floresta estacional; (B) superfície do ritidoma e cor da casca interna; (C) frutos maduros; (D) inflorescência.....37

Figura 8 - Purificação do ICTI. Cromatograma do EB de *I. cylindrica* separado em coluna HiPrep™ DEAE FF 16/10 (Cytiva). Pico 1 referente a material adsorvido durante etapa de lavagem da coluna e Pico 2 referente a material eluido (ICTI). Eixo Y referente a leitura da absorbância e Eixo X referente ao volume de tampão passado na coluna.....51

Figura 9 - Perfil de SDS-PAGE 15%. EB e ICTI, material obtido da coluna cromatográfica HiPrep™ DEAE FF 16/10. Nos marcadores (GE Healthcare), pode-se observar as bandas referentes aos pesos utilizados. Na coluna do EB, pode-se observar uma banda predominante de aproximadamente 20 kDa, e algumas bandas menores de 8,5 kDa e 3,5 kDa. Já no Pico 2, apenas uma banda está em evidência, de aproximadamente 20 kDa (ICTI).....52

Figura 10 - Ensaio de inibição da tripsina bovina. Amostras EB e ICTI (0 - 1,4µg). O ensaio ocorreu durante 30 min utilizando o substrato BAPNA a 1 mM, e tripsina (0,25 mg/mL). Eixo Y referente a leitura da absorbância e Eixo X referente as concentrações utilizadas de EB e ICTI.....53

Figura 11: Avaliação da inibição e erradicação de biofilme maduro de *C. albicans* 90028 pelo ICTI. (A) Inibição de biofilme de *C. albicans* 90028 pelo ICTI em concentrações de 1 e 10 vezes o CIM do ICTI comparado a inibição de 1 e 10 vezes o CIM do antifúngico anfotericina B. (B) Erradicação do biofilme maduro de *C. albicans* 90028 pelo ICTI em concentrações de 1 e 10 vezes o CIM do ICTI comparado a inibição de 1 e 10 vezes o CIM do antifúngico anfotericina B.....54

Figura 12 - Avaliação da inibição e erradicação de biofilme maduro de *C. gattii* AFLP4 pelo ICTI. (A) Inibição de biofilme de *C. gattii* AFLP4 pelo ICTI em concentrações de 1 e 10 vezes o CIM comparado a inibição de 1 e 10 vezes o CIM do antifúngico Anfotericina B. (B) Erradicação do biofilme maduro de *C. gattii* AFLP4 pelo ICTI em concentrações de 1 e 10 vezes o CIM comparado a erradicação de 1 e 10 vezes o CIM do antifúngico Anfotericina B.....57

Figura 13 - Microscopia de fluorescência da inibição da formação do biofilme de *C. albicans* 90028. (A) Controle de crescimento do biofilme de *C. albicans* 90028. (B) Efeito da Anfotericina B na concentração de 1X CIM sob inibição do biofilme de *C. albicans* 90028. (C) Efeito da Anfotericina B na concentração de 10X CIM sob inibição do biofilme de *C. albicans* 90028. (D) Efeito do ICTI na concentração de 1X CIM sob inibição do biofilme de *C. albicans* 90028. (E) Efeito do ICTI na concentração de 10X CIM sob inibição do biofilme de *C. albicans* 90028. Aumento de 200 X. Células viáveis coradas em verde e não viáveis coradas em vermelho.....58

Figura 14 - - Microscopia de fluorescência da erradicação do biofilme pré formado de *C. albicans* 90028. (A) Controle de crescimento do biofilme de *C. albicans* 90028. (B) Efeito da Anfotericina B na concentração de 1X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. albicans* 90028. (C) Efeito da Anfotericina B na concentração de 10X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. albicans* 90028. (D) Efeito do ICTI na concentração de 1X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. albicans* 90028. (E) Efeito do ICTI na concentração de 10X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. albicans* 90028. Aumento de 200 X. Células viáveis coradas em verde e não viáveis coradas em vermelho.....59

Figura 15 – Microscopia de fluorescência da inibição da formação do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (A) Controle de crescimento do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (B) Efeito da Anfotericina B na concentração de 1X CIM sob inibição do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (C) Efeito da Anfotericina B na concentração de 10X CIM sob inibição do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (D) Efeito do ICTI na concentração de 1X CIM sob inibição do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (E) Efeito do ICTI na concentração de 10X CIM sob inibição do biofilme de *C. gattii* AFLP4. Aumento de 200 X. Células viáveis coradas em verde e não viáveis coradas em vermelho.....60

Figura 16 - Microscopia de fluorescência da erradicação do biofilme pré formado de *C. albicans* 90028. (A) Controle de crescimento do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (B) Efeito da Anfotericina B na concentração de 1X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. gattii* AFLP4. (C) Efeito da Anfotericina B na concentração de 10X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. gattii* AFLP4. (D) Efeito do ICTI na concentração de 1X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. gattii* AFLP4. (E) Efeito do ICTI na concentração de 10X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. gattii* AFLP4. Aumento de 200 X. Células viáveis coradas em verde e não viáveis coradas em vermelho.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) Bactericida. Atividade bactericida do ICTI frente as cepas <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. enterica</i> ...53	53
Tabela 2: Determinação da atividade antibiofilme de <i>Inga cylindrica</i> frente as cepas <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>54	54
Tabela 3 - CIM e CFM de EB e ICTI frente as leveduras patogênicas.....55	55
Tabela 4 – Efeito sinérgico do ICTI associado a Anfotericina B frente as leveduras patogênicas.....56	56
Tabela 5 - Efeito do sorbitol (0,8M) sobre a atividade antifúngica do ICTI em <i>C. albicans</i> e <i>C gattii</i>62	62
Tabela 6 – Efeito do ergosterol exógeno (400 µg/ml) na atividade antifúngica de ICTI em <i>C. albicans</i> 90028 e <i>C. gattii</i> AFLP4.....63	63
Tabela 7 – Número de larvas de <i>Galleria mellonella</i> mortas no intervalo de 0h a 72h tratadas com ICTI, Anfotericina B e Salina 0,9% (n=8).....63	63

LISTA DE ANEXOS

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

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

ATCC	American Type Culture Collection
AFLP	Polimorfismo De Comprimento De Fragmento Amplificado
Abs	Absorbância
BBIs	Inibidores Bowman-Birk
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIF	Concentração inibitória fracionada
CITI	Inibidor de tripsina de <i>Cassia leiandra</i> Benth
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTI	Inibidor de tripsina de <i>Dimorphandra mollis</i>
EATI	Inibidor de tripsina de <i>Entada acaccifolia</i>
ETTI	Inibidor de tripsina de <i>Enterolobium timbouva</i>
EB	Extrato Bruto
H	Horas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC ₅₀	Medida quantitativa que indica o nível da substância inibidora que é suficiente para inibir, <i>in vitro</i> , o processo ou componente biológico em 50% da quantidade inicial.
ICTI	Inibidor de tripsina de <i>Inga cylindrica</i>
IETI	Inibidor de tripsina de <i>Inga edulis</i>
ILTI	Inibidor de tripsina de <i>Inga laurina</i>
IVTI	Inibidor de tripsina de <i>Inga vera</i>
IP	Iodeto de Propídio
IPs	Inibidores de Peptidase

kDa	Quilodalton
LPPFB	Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas
M	Unidade de Concentração Molar
MEP	Matriz Extracelular Polimérica
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MHA	Muller Hinton Ágar
MH	Muller Hinton
NaCl	Cloreto de Sódio
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAM	Peptídeos Antimicrobianos
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	Proteína C Reativa
PpyTI	Inibidor de Tripsina de <i>Peltophorum dubium</i>
RAM	Resistência Antimicrobiana
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético Conhecimento Tradicional Associado
SNC	Sistema Nervoso Central
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WHO	World Health Organization
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1. Introdução.....	19
2. Revisão Bibliográfica.....	21
2.1. Interações biológicas entre plantas e microrganismos.....	22
2.2. Inibidores de peptidases.....	23
2.3. Tripsina.....	24
2.4. Bactérias.....	26
2.5. Fungos.....	31
2.6. Inibidor de peptidase de sementes de <i>Inga cylindrica</i>	36
3. Objetivos.....	39
3.1. Objetivo Geral.....	39
3.2. Objetivos Específicos.....	39
4. Material E Métodos.....	40
4.1. Acesso ao patrimônio genético.....	40
4.2. Insetos.....	40
4.3. Obtenção do ICTI.....	40
4.3.1. Obtenção do Extrato Bruto.....	40
4.3.2. Purificação do ICTI.....	41
4.4. Quantificação de proteínas.....	41
4.5. Eletroforese SDS-PAGE.....	41
4.6. Análise da atividade inibitória frente a enzima tripsina.....	41
4.7. Ensaio <i>In vitro</i>	42
4.7.1. Atividade antibacteriana.....	42
4.7.1.1. Preparo do inóculo bacteriano.....	42
4.7.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	42
4.7.1.3. Inibição do biofilme bacteriano.....	43
4.7.2. Atividade antifúngica.....	44
4.7.2.1. Preparo do inóculo fúngico.....	44
4.7.2.2. Determinação da CIM e Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	44
4.7.2.3. Sinergismo pelo método Checkboard.....	45
4.7.2.4. Efeito sobre a inibição do biofilme fúngico.....	46
4.7.2.5. Atividade de erradicação do biofilme maduro.....	47
4.7.2.6 Análise por microscopia de fluorescência.....	48

4.7.2.7. Mecanismo de ação.....	48
4.7.2.7.1. Ensaio de ligação ao sorbitol.....	48
4.7.2.7.2. Ensaio de ligação ao ergosterol.....	49
4.8. Ensaio <i>In vivo</i>	50
4.8.1. Avaliação da Toxicidade Aguda <i>In vivo</i> em <i>Galleria mellonella</i>	50
5. Resultados.....	51
5.1. Purificação do ICTI.....	51
5.2. Eletroforese.....	51
5.3. Atividade inibitória frente a enzima tripsina.....	52
5.4. Ensaio <i>In vitro</i>	53
5.4.1. Determinação da CIM bactericida.....	53
5.4.2. Inibição do biofilme bacteriano.....	54
5.4.3. Determinação da CIM e CFM.....	54
5.4.4. Sinergismo pelo método Checkboard.....	55
5.4.5 Inibição e erradicação do biofilme fúngico.....	56
5.4.6. Microscopia de fluorescência.....	57
5.4.7. Mecanismo de ação do inibidor sobre leveduras.....	62
5.4.7.1. Ensaio de ligação ao sorbitol.....	62
5.4.7.2. Ensaio de ligação ao ergosterol.....	62
5.5. Ensaio <i>In vivo</i>	63
5.5.1. Toxicidade aguda <i>in vivo</i> em <i>Galleria mellonella</i>	63
6. Discussão.....	64
7. Conclusão.....	69

Referências

Anexos

1. INTRODUÇÃO

As primeiras plantas terrestres se estabeleceram na Terra há aproximadamente 500 milhões de anos. Após o contato com os microrganismos, deu-se início as primeiras interações entre estes organismos com as plantas. Especula-se que logo após o início das interações com os microrganismos, as plantas iniciaram um processo de interação molecular com demais organismos (Oliveira et al., 2011; Dib et al., 2019). Entretanto, essas relações entre plantas e organismos eram tanto benéficas como deletérias, e ao longo do tempo, as plantas precisaram desenvolver mecanismos que diminuíssem as ações deletérias (Sugio et al., 2015).

Esses mecanismos têm função de conferir proteção a planta, e vão desde a produção de compostos tóxicos, até a utilização de defesa mecânica, como espinhos e tricomas glandulares (Zebelo et al., 2015). Dentre os genes que surgiram para contribuir com a perpetuação das espécies vegetais, podemos elencar as defensas como as mais relevantes (Mello et al., 2002; Oliveira et al., 2011; Dib et al., 2019). A classe de inibidores enzimáticos está relacionada à defesa das plantas e é composta por duas classes: os inibidores de α -amilase e os inibidores de peptidase (IPs) (Oliveira et al., 2014).

Os inibidores de α -amilase evitam a digestão das amilases no intestino dos insetos, enquanto os IPs atuam na inibição de peptidases (Dib et al., 2019). Os IPs são proteínas heterogêneas, produzidas endogenamente de forma constitutiva, ou ainda sob ataque de patógenos e insetos (Dib et al., 2019; Herwade et al., 2021). Os IPs desempenham um papel duplo, atuando na defesa dos tecidos vegetais (Herwade et al., 2021), ou até mesmo sendo armazenados e utilizados durante o processo de germinação das sementes e desenvolvimento das plantas (Ramalho, 2016; De Souza et al., 2016).

Dentre as funções desempenhadas pelos IPs em plantas, podemos citar a atividade inseticida e atividade antimicrobiana. A atividade inseticida pode ser atribuída a capacidade de inibir as peptidases digestivas (De Souza et al., 2016; Carneiro et al., 2018). A atividade antimicrobiana, por sua vez, pode vir dos danos que os IPs causam à membrana e/ou parede celular, alteração da permeabilidade celular, inibição da

transcrição e/ou tradução e indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Patriota et al., 2016; Dib et al., 2019).

Os IPs vêm sendo isolados de diversas famílias, destacando-se as famílias Poaceae, Solanaceae e Fabaceae, com essa última possuindo os IPs mais relevantes, além de melhor estudados e caracterizados (Colares et al., 2017; Herwade et al., 2021). Os IPs podem ser divididos em inibidores de serino, cisteína, treonina, aspártico e metalopeptidases, as 5 principais famílias de enzimas proteolíticas (Herwade et al., 2021). Os IPs podem ser subdivididos em mais de 40 famílias, sendo as principais: (1) inibidores Kunitz; (2) Bowman-Birk; (3) inibidores da metalo e carboxipeptidases; (4) inibidores de cisteínopeptidase (5) batata tipo I; (6) batata tipo II; (7) inibidores de abóbora; (8) serpinas e (9) inibidores de mostarda (Bendre et al., 2018; Herwade et al., 2021).

As serinopeptidases são enzimas proteolíticas. São exemplos de serinopeptidases tripsina, elastase e quimiotripsina (Bendre et al., 2018). A tripsina apresenta importância fisiológica na digestão de proteínas de origem alimentar (Muhlia-Almazán et al., 2008), já que atua na hidrólise de proteínas em peptídeos menores (Kaur, 2020). O que a difere das demais serinopeptidases é sua especificidade para a ligação peptídica formada pela extremidade carboxílica de resíduos arginina (Arg) e/ou lisina (Lys) (Muhlia-Almazán et al., 2008). Além disso, a tripsina pode afetar a biologia de organismos patogênicos, além de ter efeitos antivirais ou ativar a infectividade viral por clivagem de proteínas do envelope viral (Lazarević et al., 2015).

Existem duas principais famílias de inibidores de serinopeptidases, os inibidores do tipo Kunitz e do tipo Bowman-Birk. Eles diferem entre si pela massa molecular, números de cadeias polipeptídicas e quantidade de sítios reativos específicos para a ligação ao sítio ativo destas enzimas (Oliva et al., 2010; Rawlings et al., 2014; Bendre et al., 2018; Gitlin-Domagalska et al., 2020). Os inibidores de tripsina podem desestabilizar patógenos por meio de danos à membrana e/ou parede celular e alteração da permeabilidade celular (Patriota et al., 2016; Dib et al., 2019). Com isso, o objetivo do presente trabalho foi analisar as propriedades antimicrobiana e antibiofilme de um inibidor de tripsina isolado de sementes de *Inga cylindrica*, bem como sua possível toxicidade *in vivo*, em modelo de invertebrado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Interações biológicas entre plantas e microrganismos

Os primeiros registros de fósseis indicam o estabelecimento das primeiras plantas terrestres há quase 500 milhões de anos. Esse período foi provavelmente seguido pelas primeiras interações das plantas com microrganismos (Oliveira 2011). Embora possamos apenas especular sobre eventos subsequentes, a evolução das plantas desencadeou interações moleculares com todos os outros organismos (Dib et al., 2019). No entanto, essas relações entre plantas e organismos se desenvolveram de formas benéficas, como a polinização, e deletérias, pela herbivoria, por exemplo (Sugio et al., 2015).

As plantas desenvolveram diferentes mecanismos para reduzir o ataque de patógenos que levaram a uma miríade de interações moleculares nos níveis genômico e metabólico (Mello et al., 2002; Zebelo et al., 2015). Esses mecanismos incluem respostas específicas que ativam diferentes vias metabólicas as quais alteram consideravelmente suas características químicas e físicas (Stotz et al., 1999; Zebelo et al., 2015). Esses mecanismos tem a função de proteger diretamente a planta com compostos tóxicos, ou usando estruturas de defesa mecânica, como espinhos e tricomas glandulares (Zebelo et al., 2015).

Sugere-se que vários genes relacionados à defesa surgiram para lidar com ameaças à sobrevivência e perpetuação das plantas, incluindo barreiras químicas e físicas, como a indução de proteínas defensivas (Mello et al., 2002; Oliveira 2011; Dib et al., 2019).

2.2 Inibidores de peptidase

O Brasil possui a maior biodiversidade vegetal mundial. Essa biodiversidade tem sido objeto de pesquisa para a prospecção de produtos naturais (Valadares, 2017). O teor elevado de proteínas nas sementes de leguminosas desencadeou diversos estudos na intenção de examinar o papel destas proteínas na fisiologia da germinação.

Esses estudos demonstraram que ao longo dos tempos, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra a herbivoria e o ataque de patógenos (Dib et al., 2019; Herwade et al., 2021).

As plantas apresentam alto grau de resistência em resposta aos danos diversos, tendo desenvolvido ao longo do processo evolutivo mecanismos bioquímicos e morfológicos de defesa, como a produção de macromoléculas vegetais. Enzimas hidrolíticas, inibidores enzimáticos, lectinas, e fatores de morte celular são os mais representados (Ramalho, 2016; Carneiro et al., 2018). Dentre as famílias de proteínas relacionadas a defesa vegetal, podemos citar a classe dos inibidores enzimáticos. Existem duas classes de inibidores enzimáticos: os inibidores de α -amilase e os IPs (Oliveira et al., 2014).

Os IPs são um grupo de proteínas heterogêneas, envolvidas na defesa das plantas pela inibição de peptidases de organismos que se alimentam dos tecidos vegetais (Dib et al., 2019). Os IPs são produzidos endogenamente, de forma constitutiva, ou ainda sob determinadas condições, como ataque por patógenos e insetos, ferimentos e exposições a fatores ambientais. A maioria dos IPs interage com o sítio ativo das peptidases alvo, especificamente no domínio catalítico, formando um complexo inibidor-enzima estável (Herwade et al., 2021).

Amplamente distribuídos nos tecidos vegetais, particularmente nas sementes, bulbos e tubérculos, os IPs desempenham papel na defesa e armazenamento. Eles defendem os tecidos vegetais contra o ataque de patógenos e cumprem função de armazenamento (Ramalho, 2016; Herwade et al., 2021).

No que tange suas propriedades antimicrobianas, os IPs podem promover danos à membrana e/ou parede celular, alteração da permeabilidade celular, inibição da transcrição e/ou tradução e indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Patriota et al., 2016; Dib et al., 2019). Ao inibir as peptidases de patógenos, os IPs reduzem a eficiência do processo digestivo, minimizando o suprimento de aminoácidos essenciais necessários ao desenvolvimento do organismo (Herwade et al., 2021).

Além disso, os IPs também têm sido descritos como reguladores endógenos de processos proteolíticos e são conhecidos por estarem envolvidos em muitas funções biológicas, como coagulação sanguínea, tratamento de malária, agregação plaquetária e anticancerígeno (Guimarães et al., 2015; Cai et al., 2018).

As principais famílias vegetais de onde os IPs têm sido isolados são as famílias Fabaceae, Poaceae e Solanaceae. Entretanto, os IPs da família Fabaceae são os que apresentam maior relevância, pois são os mais estudados e caracterizados (Colares et al., 2017; Herwade et al., 2021). Fabaceae (Leguminosae) é uma família amplamente distribuída com alta diversidade de espécies, dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Sementes da família Fabaceae apresentam abundante conteúdo proteico e grande quantidade de IPs (De Souza et al., 2016).

Os IPs podem ser categorizados com base na sua interação com o aminoácido específico presente no sítio ativo das peptidases. Eles podem ser divididos em inibidores de serino, cistineína, treonina, aspártico e metalopeptidases, as 5 principais famílias de enzimas proteolíticas (Herwade et al., 2021). Atualmente, o banco de dados MEROPS agrupa quase 100 famílias diferentes de IPs (Rawlings et al., 2014). Sua classificação é baseada na estrutura molecular, homologia, relevância farmacêutica e mecanismo de inibição, e visa facilitar a troca, armazenamento e recuperação de informação sobre IPs (Bezerra et al., 2016; Oliveira et al., 2018). As principais famílias de IPs são: (1) inibidores Kunitz; (2) Bowman-Birk; (3) inibidores da metalo e carboxipeptidases; (4) inibidores de cisteínopeptidase (5) batata tipo I; (6) batata tipo II; (7) inibidores de abóbora; (8) serpinas e (9) inibidores de mostarda (Bendre et al., 2018; Herwade et al., 2021).

Dentre as peptidases que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, temos as peptidases da família serina (Muhlia-Almazán et al., 2008). Elas clivam ligações peptídicas tendo no resíduo de aminoácido serina o responsável pelo nucleofílico realizado na tríade catalítica. Essas serinopeptidases apresentam grandes semelhanças em suas sequências e estruturas tridimensionais; no entanto, eles apresentam especificidades de substrato diferentes (Souto et al., 2019).

Estas enzimas são classificadas de acordo com sua especificidade pelo substrato. Peptidases semelhantes à tripsina têm afinidade para resíduos de aminoácidos básicos, elas clivam as cadeias polipeptídicas no lado carboxílico da Arg e da Lys. As peptidases semelhantes a quimotripsina têm afinidade para resíduos de aminoácidos aromáticas, como fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp). Já as peptidases semelhantes à elastase têm preferência por resíduos de aminoácidos alifáticos, particularmente alanina (Ala) (Lazarević et al., 2015; Souto et al., 2019). Estudos demonstram que as serinopeptidases possuem uma plasticidade em sua

estrutura que permite a eles uma ampla interação com diferentes substratos simultaneamente (Cai et al., 2018).

2.3 Tripsina

Os primeiros estudos de peptidases, principalmente tripsina e quimotripsina em espécies de vertebrados, começaram na primeira parte do século XX, descrevendo propriedades cinéticas, isolamento, algumas características moleculares e evolução da tripsina e tripsinogênio (Muhlia-Almazán et al., 2008).

A tripsina é uma peptidase que atua hidrolisando proteínas em peptídeos menores. Estes peptídeos menores são substratos de outras enzimas, exopeptidases, que geram peptídeos ainda menores e aminoácidos livres, a fim de facilitar a absorção intestinal (Kaur, 2020). As tripsinas possuem uma tríade catalítica que caracteriza todas as serinopeptidases, três aminoácidos no sítio ativo envolvidos na catálise: Histidina (His), Aspartato (Asp) e Serina (Ser) (Muhlia-Almazán et al., 2008; Lazarević et al., 2015). Normalmente apresentam duas características que as distinguem de outras serinopeptidases: (1) especificidade para a ligação peptídica formada pela extremidade carboxílica de resíduos Arg ou Lys e (2) capacidade de ativar outros zimogênios pancreáticos (Muhlia-Almazán et al., 2008).

Além da digestão, as tripsinas participam de uma ampla gama de outros processos fisiológicos, como muda, modelagem de tecido, imunidade inata, diapausa, fertilização, regulação do comportamento pós-acasalamento feminino e ativação de pré-cursos enzimáticos de tripsina, quimiotripsina, quitinase e fenoloxidase (Lazarević et al., 2015).

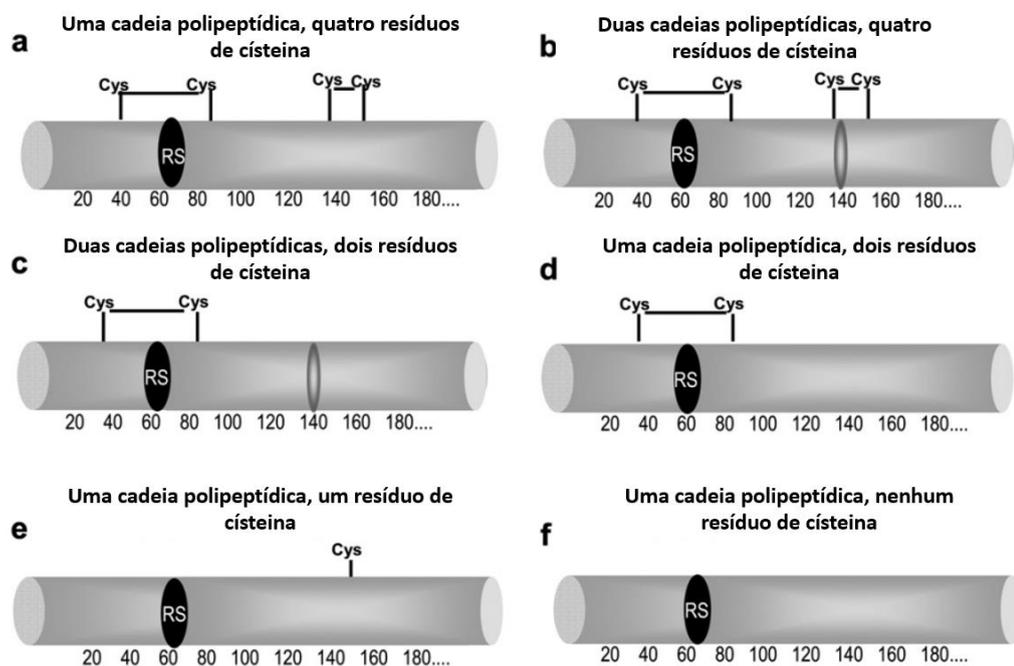
Além disso, a tripsina pode afetar a biologia de organismos patogênicos e pode ter efeitos antivirais ou ativar a infectividade viral por clivagem de proteínas do envelope viral. A caracterização bioquímica das tripsinas purificadas revelou grande variação na massa molecular, pH e temperatura ótima, bem como especificidade de substrato / inibidor (Lazarević et al., 2015).

Existem duas famílias de inibidores de serinopeptidases, os inibidores do tipo Kunitz e do tipo Bowman-Birk. Os inibidores Bowman-Birk (BBIs) são proteínas de baixo peso molecular, de 9-14 Quilodalton (kDa), e são mais estáveis a variações de temperatura por possuírem um maior número de ligações dissulfeto (até 7 ligações) (Gitlin-Domagalska et al., 2020). Possuem dois sítios reativos capazes de inibir duas

serinopeptidases independentemente e/ou simultaneamente (Dib et al., 2019; Herwade et al., 2021), e estão agrupados no banco de dados MEROPS como Família I2 (Rawlings et al., 2014; Gitlin-Domagalska et al., 2020).

As massas moleculares dos inibidores Kunitz são relativamente mais altas, variando de 18-25 kDa. Possuem uma ou duas cadeias polipeptídicas e único sítio reativo específico para uma enzima (tripsina, quimiotripsina e/ou elastase). Possuem um número variado de ligações dissulfeto (nenhuma, uma ou duas ligações) (Figura 1), e não possuem inibição frente a metalopeptidases (Oliva et al., 2010; Bendre et al., 2018).

Figura 1 - Esquema da estrutura primária dos inibidores de Kunitz com base no número de ligações dissulfeto. (a) Inibidores com duas ligações dissulfeto e uma cadeia polipeptídica; (b) Inibidores com duas ligações dissulfeto e duas cadeias; Inibidores com uma ligação dissulfeto e duas cadeias polipeptídicas (c) ou uma cadeia polipeptídica (d); (e) Inibidores com um resíduo de cisteína e uma cadeia polipeptídica; (f) Inibidor desprovido de resíduo de cisteína e uma cadeia polipeptídica. RS: sítio reativo.

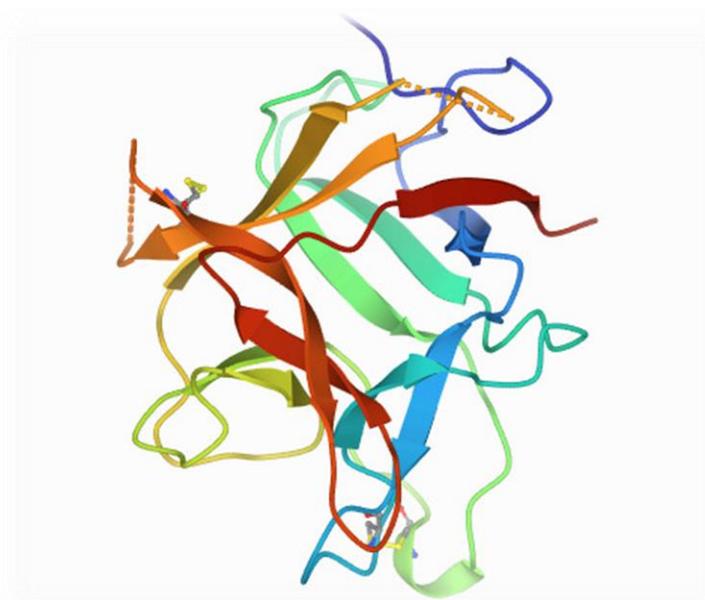


Adaptado de Oliva et al. (2010)

A família Kunitz está agrupada no banco de dados MEROPS como Família I3 (Rawlings et al., 2014). O amplo espectro de atividades biológicas dos IPs parece ser

a consequência de um enovelamento estrutural característico, denominado de barril- β , composto por 12 folhas beta interconectadas (Figura 2) (Dib et al., 2019).

Figura 2 - Inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz. Estrutura obtida a partir de estudos de cristalografia de raios-X.



Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/1AVU>

Diversos autores já relataram a atividade de inibidores do tipo Kunitz frente a microrganismos patogênicos (Macedo et al., 2016; Oliveira et al., 2018; Dib et al., 2019), elencando um potencial farmacêutico nestas moléculas.

2.4 Bactérias

A descoberta dos antibióticos revolucionou o controle das infecções (Oliveira et al., 2018). A penicilina, considerada a droga milagrosa, iniciou a era dos antibióticos em 1928 e, desde então, desenvolveu a medicina moderna (Mulani et al., 2019). Entretanto, a história das descobertas de antibióticos e o desenvolvimento de resistência aos antibióticos caminham lado a lado (Oliveira et al., 2018). O uso persistente de antibióticos, automedicação e exposição a infecções em hospitais criaram desafios sem precedentes para a civilização humana devido ao aumento da resistência antimicrobiana (RAM) (Ma et al., 2020). Esse aumento na resistência provocou o

surgimento de bactérias multirresistentes, responsáveis por 15,5% dos quadros de infecção hospitalar no mundo (Mulani et al., 2019).

A RAM é um fenômeno natural que ocorre devido a exposição dos microrganismos a antimicrobianos, e sua consequente pressão de seleção (Ma et al., 2020). Não apenas o uso excessivo de antibióticos na área de saúde, agricultura e meio ambiente, mas também o consumo, escolha e dosagem inadequado de antibióticos e baixa adesão às diretrizes de tratamento, contribuem para o aumento da seleção da RAM (Ma et al., 2020).

A RAM representa um risco mundial para a saúde humana, especialmente aqueles hospitalizados em unidades de terapia intensiva (UTI), visto que mais comumente requerem dispositivos médicos invasivos e o uso de medicamentos de diferentes classes terapêuticas, resultando em aumento da exposição a antibióticos (Emeri et al., 2019). O número crescente de patógenos resistentes a antimicrobianos, que estão cada vez mais associados a infecções nosocomiais, representa uma carga significativa para os sistemas de saúde e tem custos econômicos globais importantes (Santajit et al., 2016). Os efeitos incluem altas taxas de mortalidade e morbidade, aumento dos custos do tratamento, incertezas diagnósticas e falta de confiança na medicina tradicional (Santajit et al., 2016).

Nas nações em desenvolvimento, as doenças transmissíveis continuam sendo a principal causa de morte, e agora são agravadas por doenças infecciosas emergentes e reemergentes. O desenvolvimento de genes relacionados a resistência pode ocorrer de forma natural. Entretanto, o uso inadequado de antibióticos também é capaz de selecioná-los. A falta de métodos de diagnóstico rápido para identificar patógenos bacterianos e genes de resistência em ambientes clínicos resultou no uso frequentemente desnecessário de antibióticos de amplo espectro (De Oliveira et al., 2020).

Bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a um antimicrobiano, quando é uma característica inerente a uma espécie, relacionada a genes cromossômicos (Silva et al., 2017). Além disso, podem adquirir resistência a certos antimicrobianos por meio de mutações cromossômicas ou transferência horizontal de genes por três mecanismos: 1) transdução mediada por bacteriófagos; 2) transformação por incorporação de cromatina de cromossomos, plasmídeos e ácido desoxirribonucléico (DNA) de organismos mortos; e 3) conjugação através de plasmídeos e transposons

conjugativos. Essas transferências podem ocorrer na água, solo, alimentos e no sistema digestivo de animais e humanos (Silva et al., 2017).

Essas resistências dificultam o tratamento dos pacientes, uma vez que o uso de antimicrobianos de amplo espectro é necessário, mas o desenvolvimento e a aprovação de novos medicamentos crescem em um ritmo muito mais lento do que o surgimento de resistência bacteriana (Silva et al., 2017).

Os mecanismos de resistência bacteriana geralmente ocorrem dois ou três anos após a introdução de um novo antimicrobiano na terapia e um medicamento desse tipo pode levar de 12 a 22 anos para estar disponível no mercado (Silva et al., 2017). Além disso, o tratamento com antibióticos para infecções bacterianas multirresistentes de difícil tratamento é limitado (Ma et al., 2020), o que pode aumentar o tempo de internação dos pacientes infectados e muitas vezes, leva a óbito (Silva et al., 2017).

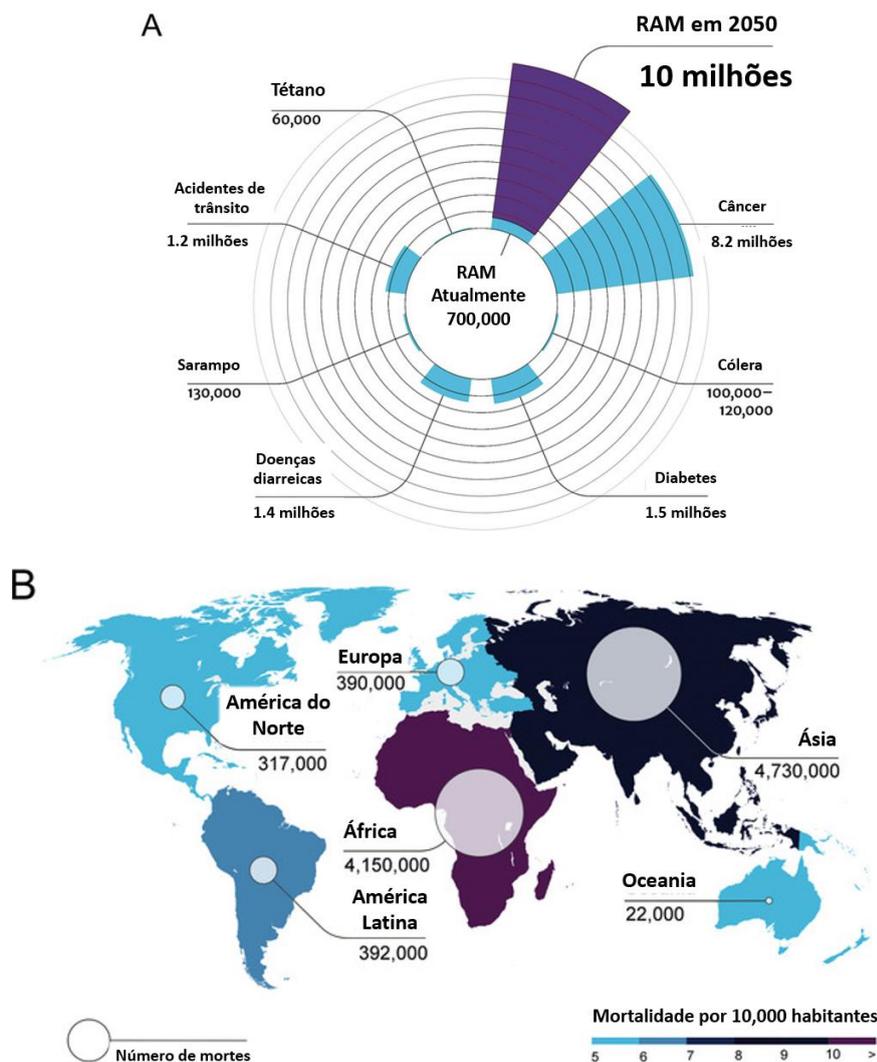
O surgimento de bactérias multirresistentes (bactérias resistentes a mais de três classes de antibióticos) foi acompanhado por uma linha de desenvolvimento de antibióticos em declínio. Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) categorizam os patógenos RAM como uma ameaça iminente à saúde humana (De Oliveira et al., 2020).

Em fevereiro de 2017, para focar e orientar a pesquisa e o desenvolvimento relacionados a novos antibióticos, a OMS publicou sua lista de patógenos para os quais o desenvolvimento de novos antimicrobianos é urgentemente necessário (De Oliveira et al., 2020). Dentro desta lista, os patógenos ESKAPE foram designados como “status de prioridade” (De Oliveira et al., 2020), e abrange os patógenos com resistência a drogas e virulência (Mulani et al., 2019). Os patógenos ESKAPE são responsáveis pela maioria das infecções nosocomiais. São capazes de “escapar” da ação dos agentes antimicrobianos (Silva et al., 2017; Mulani et al., 2019;) e desafiar a erradicação por terapias convencionais, o que é responsável por extensa morbidade e mortalidade para pacientes e aumento da utilização de recursos na área de saúde (Ma et al., 2020).

O acrônimo ESKAPE é empregado para designar um grupo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, formadas por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter* (Santajit et al., 2016; Mulani et al., 2019;). Uma revisão sistemática que reporta o impacto clínico e econômico da resistência aos antibióticos revela que os patógenos ESKAPE estão associados ao maior risco de mortalidade, resultando em aumento dos custos de saúde (Mulani et al., 2019; Ma et al., 2020).

Globalmente, espera-se que o número cepas resistentes aumente dez vezes até 2050 (Figura 3 A), com o cenário projetado de mortes variando entre os diferentes continentes (Figura 3 B). O consumo global de antibióticos aumentou 65% de 2000 a 2015 e, foi impulsionado principalmente por países de baixa/média renda.

Figura 3 - Impacto da resistência antimicrobiana. Duas equipes da Europa modelaram o aumento das taxas de resistência antimicrobiana (RAM) com base nas informações disponíveis em 2014, cada uma usando sua própria metodologia, para entender o impacto que a RAM teria sobre a população mundial e seu resultado econômico. (A) Mortes atribuíveis à RAM todos os anos, em comparação com outras causas importantes de morte. O número estimado de RAM aumentará para 10 milhões até 2050, aproximando-se do número total de mortes causadas por todas as doenças hoje. (B) Mortes atribuíveis à RAM em diferentes partes do mundo até 2050. Há uma tendência de redução dos continentes de mortalidade com melhores condições econômicas e um manejo antibiótico mais rigoroso.



Adaptado de Ma et al., (2020).

Essas bactérias são causas comuns de infecções nosocomiais com risco de vida entre indivíduos gravemente enfermos e imunocomprometidos e são caracterizadas por potenciais mecanismos de resistência aos medicamentos (Santajit et al., 2016). Os mecanismos de resistência a múltiplas drogas exibidos pelas ESKAPE são agrupados em três categorias, a saber, inativação de drogas comumente por uma clivagem catalisada por enzimas, modificação do local alvo onde o antibiótico pode se ligar, acúmulo reduzido de droga devido à permeabilidade reduzida ou por aumento do efluxo da droga (Mulani et al., 2019).

Certos microrganismos também são capazes de formar biofilmes, comunidades complexas de microrganismos que se aderem a superfícies e ficam envoltos por matriz de polissacarídeos (Mulani et al., 2019). Os biofilmes bacterianos impedem fisicamente a resposta imune das células do hospedeiro, bem como a ação dos antibióticos, o que confere a eles uma maior resistência (Orsi et al., 2017; Maciel et al., 2017). Além disso, os biofilmes protegem células dormentes especializadas, chamadas células persistentes, que são tolerantes a antibióticos que causam infecções recalcitrantes difíceis de tratar (Mulani et al., 2019).

A terapia antimicrobiana geral para tratar infecções de maneira eficaz envolve o uso de antibióticos isoladamente ou em combinação. A cada ano que passa, o número total de antibióticos eficazes contra as ESKAPE está diminuindo, o que nos predispõe a um futuro com antibióticos ineficazes (Mulani et al., 2019).

A análise das listas de antibióticos recomendadas nas diretrizes do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) revelou que muitos antibióticos sugeridos contra as ESKAPE desde 2010 foram excluídos com a adição de relativamente poucas combinações de antibióticos. Além disso, há incidências de resistência relatadas contra alguns desses antibióticos recém-adicionados. É, portanto, imperativo encontrar maneiras alternativas de tratar infecções, especialmente aquelas causadas por patógenos ESKAPE (Mulani et al., 2019).

Outros gêneros que não fazem parte do ESKAPE também representam importância sanitária, e um que podemos elencar é o gênero *Escherichia* sp. *Escherichia* sp., que recebeu o nome do pediatra alemão Theodor Escherich, consiste em bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos que pertencem à família Enterobacteriaceae (Gomes et al., 2016).

A espécie *Escherichia coli* é amplamente distribuída, onde é o principal anaeróbio facultativo que habita o intestino grosso de humanos e animais de sangue

quente (Cupertino et al., 2016; Gomes et al., 2016). As cepas de *E. coli* envolvidas em doenças diarreicas são um dos mais importantes agentes etiológicos da diarreia, onde as cepas evoluíram pela aquisição, por transferência horizontal de genes, de um conjunto particular de características que persistiram com sucesso no hospedeiro (Gomes et al., 2016).

As doenças diarreicas são um grave problema de saúde pública e uma das principais causas de morbidade e mortalidade em bebês e crianças pequenas (Gomes et al., 2016). A virulência de *E. coli* está relacionada a genes que possibilitam a caracterização destas cepas em linhagens ou grupo de cepas que compartilham atributos de virulência e que estão envolvidos em doenças de uma mesma natureza, o que está diretamente associado ao nicho de colonização da cepa (Cupertino et al., 2016; Maciel et al., 2017; Borba et al., 2018).

A era de ouro dos medicamentos para tratar doenças infecciosas bacterianas expirou. As bactérias resistentes aos medicamentos ameaçaram erradicar os antibióticos de um repertório já reduzido de arsenal terapêutico (Ma et al., 2020). As terapias alternativas que estão atualmente em prática ou em teste incluem o uso de antibióticos em combinação ou com adjuvantes, terapia bacteriófago, uso de peptídeos antimicrobianos, terapia fotodinâmica, anticorpos antibacterianos, fitoquímicos e nanopartículas como agentes antibacterianos (Mulani et al., 2019).

2.5 Fungos

As leveduras patogênicas infectam milhares de pessoas todos os anos, mas a maioria dos casos são reconhecidos como infecções leves (Oliveira et al., 2018). De todos os fungos descritos, apenas 0,1% são patógenos humanos. Dentre as leveduras patogênicas que apresentam maior relevância hospitalar, temos as espécies do gênero *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp.

Embora a maioria das espécies de *Cryptococcus* seja considerada não-patogênicas, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são patógenos que causam inflamação granulomatosa em muitos órgãos em animais e humanos (Maestrone et al., 2015).

A criptococose é uma micose sistêmica causada pela inalação de leveduras desidratadas ou esporos fúngicos de *Cryptococcus* spp., que entram nos pulmões e

chegam aos alvéolos (Dos Santos et al., 2021). É a terceira doença mais prevalente em indivíduos positivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Entre as micoses sistêmicas, é classificada como a de maior incidência em pacientes imunocomprometidos (Gullo et al., 2013). A meningite criptocócica é a forma mais comum de criptococose, sendo *C. neoformans* e *C. gattii* os principais patógenos humanos causadores dessas infecções (Silva et al., 2020).

Embora ambas as espécies geralmente causem infecções pulmonares ou do sistema nervoso central (SNC), elas diferem em epidemiologia, características clínicas e fisiopatologia (Xue et al., 2020). A primeira diferença diz respeito à ecologia da espécie. *C. neoformans* encontrado principalmente em solo contaminado por fezes de pássaros (*Columba livia*) e apresentando distribuição universal, enquanto o principal nicho de *C. gattii* são os ocos de árvores de eucalipto, razão pela qual a infecção da espécie *C. gattii* ocorre principalmente em indivíduos imunocompetentes em regiões tropicais e subtropicais.

C. gattii é uma levedura basidiomiceta, que cresce principalmente como uma levedura assexuada no meio ambiente e em hospedeiros humanos e animais (Chen et al., 2014). Após ser considerado restrito a áreas tropicais e subtropicais, na última década, *C. gattii* foi diagnosticada em muitas áreas temperadas em todo o mundo (Chowdhary et al., 2013; Maestrone et al., 2015).

Os dados epidemiológicos brasileiros sugerem *C. gattii* sendo endêmica nos estados do Amazonas, Bahia, Pernambuco, Piauí e Roraima (Chen et al., 2014). *C. gattii* pode infectar indivíduos com e sem uma deficiência imunológica, mas estudos recentes revelaram que *C. gattii* está se tornando cada vez mais prevalente em hospedeiros imunocomprometidos (incluindo pacientes com HIV/AIDS). O risco de meningite criptocócica em HIV/AIDS é estimado em 0,04–12% em adultos e cerca de 1% em crianças (Kangogo et al., 2015; Xue et al., 2020).

A espécie *C. gattii* foi classificada em vários genótipos distintos, baseados em estudos moleculares, usando impressão digital de proteína C reativa (PCR), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), análise da orotidina genes de monofosfato de pirofosforilase (URA5) por polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição: AFLP4/VGI, AFLP5/VGIII, AFLP6/VGII, AFLP7/VGIV e AFLP10/VGIV (Chowdhary et al., 2013; Kangogo et al., 2015). *C. gattii* AFLP4/VGI e AFLP6/VGII causam a grande maioria das infecções em hospedeiros saudáveis, enquanto AFLP5/VGIII, AFLP7/VGIV e AFLP10/VGIV infectam predominantemente

pacientes imunocomprometidos. Em pacientes com HIV/AIDS a infecção se apresenta como pulmonar assintomática seguida de meningite (Chowdhary et al., 2013; Xue et al., 2020).

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos comensais que normalmente habitam o intestino, sistema geniturinário, cavidade oral, pele e flora conjuntival da maioria dos humanos saudáveis, sem causar qualquer distúrbio fisiológico. No entanto, eles se tornam patógenos oportunistas sob algumas condições, particularmente em indivíduos que têm competência imunológica reduzida ou desequilíbrio da competição microbiana (Araújo et al., 2019).

A candidíase é a infecção fúngica oportunista que afeta humanos, causando infecções cutâneas e mucosas (oral ou vaginal), e podendo causar infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Patriota et al., 2016; Oliveira et al., 2018; Espino et al., 2019). Existem cerca de 200 espécies diferentes de fungos no gênero *Candida*. No entanto, mais de 90% das infecções oportunistas são causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, sendo *C. albicans* o principal agente causador da candidíase (Sardi et al., 2016; Araújo et al., 2019;). No Brasil, *C. albicans* e *C. tropicalis* são as mais prevalentes no ambiente hospitalar, e a candidemia (infecção no sangue) causada por *Candida* spp. é considerada a 7ª mais prevalente (Dib et al., 2019; Silva et al., 2020).

Pacientes hospitalizados têm maior risco de desenvolver infecções fúngicas nosocomiais devido a baixa imunidade associados a exposição a métodos invasivos, utilização de antibióticos de amplo espectro e suscetibilidade à colonização de microrganismos resistentes (Emeri et al., 2019). Pacientes com acesso endovenoso, que utilizam nutrição parenteral, passam por procedimentos cirúrgicos, hemodiálise entre outros procedimentos, requerem terapia antibiótica de amplo espectro prolongada e são suscetíveis à infecção (Dib et al., 2019).

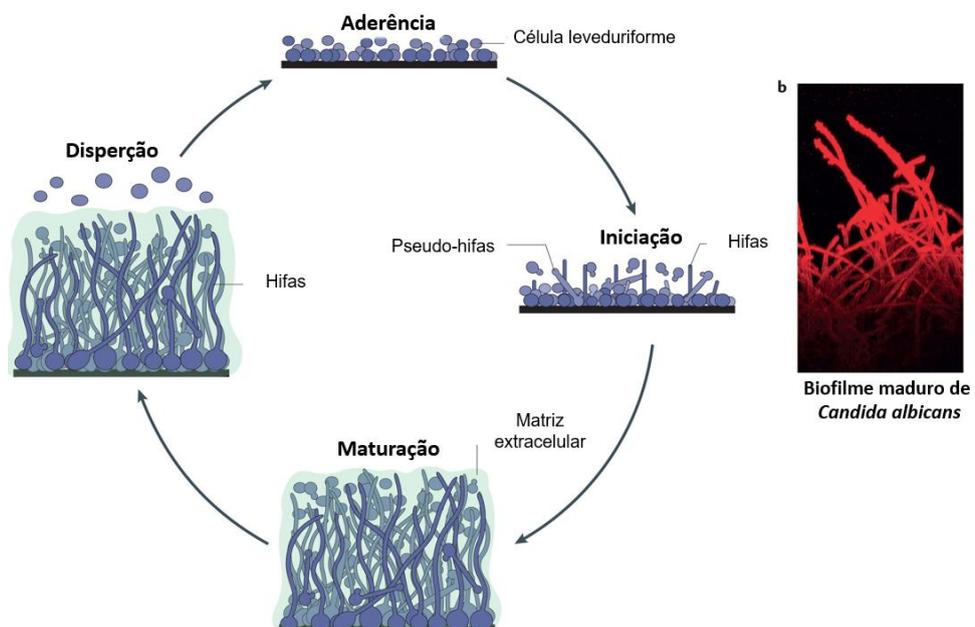
Os fungos patogênicos também podem aderir a superfícies abióticas, como próteses e cateteres; em particular, as leveduras aproveitam-se dessa condição para ter acesso à circulação sanguínea, chegando aos órgãos internos de pacientes. Isso é alarmante, pois as infecções fúngicas disseminadas apresentam uma alta taxa de mortalidade. (Verstrepen et al., 2006; Costa Orlandi et al., 2017)

A presença de biofilme desenvolvidos nestas regiões de sondas e cateteres dificulta a terapia antimicrobiana. Biofilmes são comunidades microbianas sésseis que

aderem fortemente às superfícies e entre si e são protegidos por uma matriz extracelular polimérica (MEP) composta principalmente de polissacarídeos (Harding et al., 2009). As células no biofilme apresentam maior resistência e diferentes fenótipos em comparação com células planctônicas ou livres e estão associados à persistência de infecções (Martinez et al., 2010).

Em relação às leveduras, *Candida albicans* é o modelo de formação de biofilme mais estudado e apresenta fases distintas de desenvolvimento semelhantes às dos biofilmes bacterianos (Figura 4) (Nett et al., 2006).

Figura 4 - Formação de biofilmes de *Candida albicans*. (A) A formação de biofilmes de *Candida albicans* foi dividida em quatro estágios principais: aderência de células redondas em forma de levedura a uma superfície; início da formação do biofilme, pseudo-hifas e hifas (também conhecido como estágio de proliferação); maturação em um biofilme complexo e estruturado, no qual as células são encerradas na matriz extracelular; e dispersão de células em forma de levedura do biofilme para semear novos locais. (B) Microscopia confocal de varredura a laser da vista lateral de um biofilme maduro de *C. albicans*. Foi utilizado o corante Alexa flúor 594 conjugado com cocanavalina A.

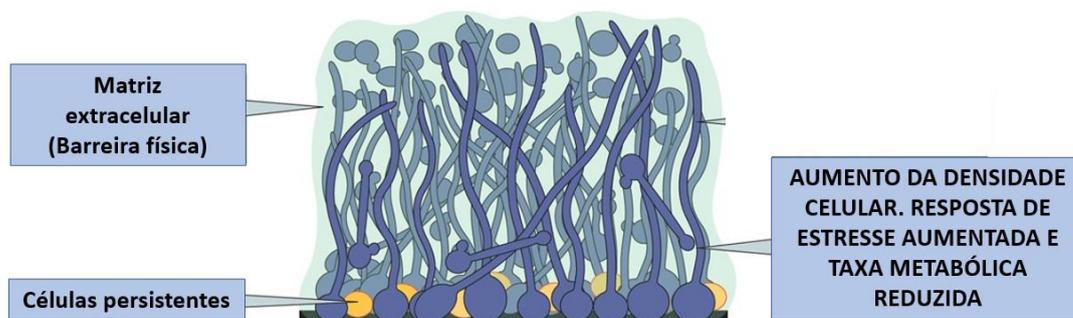


Adaptado de Lohse et al., (2018).

O desenvolvimento do biofilme de leveduras inclui adsorção de células de levedura a uma superfície; seguido pela adesão inicial, formação de camadas basais de levedura com desenvolvimento precoce de hifas e matriz extracelular; maturação de biofilme contendo um número significativo de leveduras, matriz extracelular e canais de

água que permitem a movimentação de nutrientes e a dispersão celular (Costa-Orlandi et al., 2017). Biofilmes de *C. albicans* são estruturas complexas que contêm células leveduriformes, pseudo-hifas e e hifas, além das “células persistentes”, células que não se dividem, com atividades metabólicas diminuídas, tornando-as altamente resistentes a drogas antimicrobianas e com probabilidade de semear novas infecções de biofilme após o tratamento com drogas (Figura 5) (Lohse et al., 2018).

Figura 5 -| Visão geral da resistência aos antifúngicos de biofilme de *C. albicans*. Características dos biofilmes de *C. albicans* que contribuem para a resistência aos antifúngicos. Biofilmes de *C. albicans* são estruturas complexas que contêm células redondas em forma de levedura, células pseudo-hifais e células de hifas (mostradas em azul) que são encerradas em uma matriz extracelular (mostrada em azul clara). Uma população de células minoritárias, chamadas células "persistentes" (mostradas em laranja), pode existir na camada basal do biofilme.

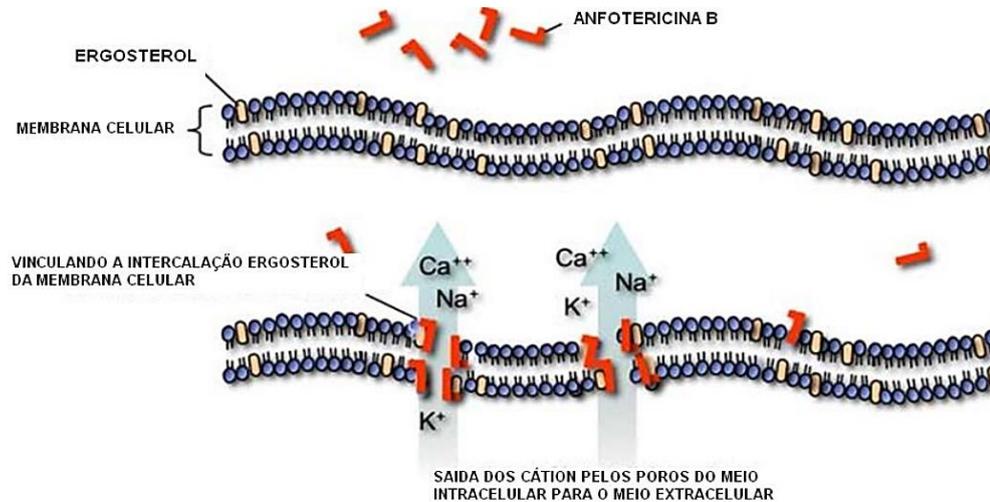


Adaptado de Lohse et al., (2018).

As células fúngicas tem como principal componente da parede celular a quitina, e o ergosterol é o principal componente da membrana. O ergosterol é alvo dos antifúngicos derivados poliênicos, como a anfotericina B e a nistatina (Oliveira et al., 2018; Gessner et al., 2020). Estas drogas ligam-se ao ergosterol, onde interferem na permeabilidade, fluidez e transporte (Leite et al., 2015; Rodrigues et al., 2018).

Os poliênicos tem a capacidade de formar grandes poros ou canais transmembranares que resultam no aumento da permeabilidade celular da membrana fúngica, causando alterações graves no equilíbrio iônico e, por conseguinte, em uma grande perda de uma variedade de pequenas moléculas e eletrólitos do meio intracelular, em especial a perda de K^+ intracelular, que altera a homeostase do micro-organismo (Figura 6). Nas plantas, o ergosterol é reconhecido como um antígeno não próprio, associado a microrganismos (Leite et al., 2015; Rodrigues et al., 2018).

Figura 6 - Mecanismo de ação da anfotericina B. Ação da anfotericina B na membrana fúngica, com formação dos poros e extravasamento de íons.



Adaptado de Gonçalves (2011).

O tratamento atual de infecções sistêmicas é complicado por fatores como alta toxicidade, baixa tolerabilidade ou um estreito espectro de atividade dos antifúngicos, além da incidência de cepas resistentes aos azóis (Sardi et al., 2016; Oliveira et al., 2018). Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias para minimizar os efeitos tóxicos dos antifúngicos atuais e melhorar sua eficácia tem sido fortemente encorajado. Os IPs podem apresentar um mecanismo de ação mais eficaz, causando menos efeitos colaterais, maior potência, tolerância e menores custos de produção (Sardi et al., 2016; Araújo et al., 2019; Emeri et al., 2019).

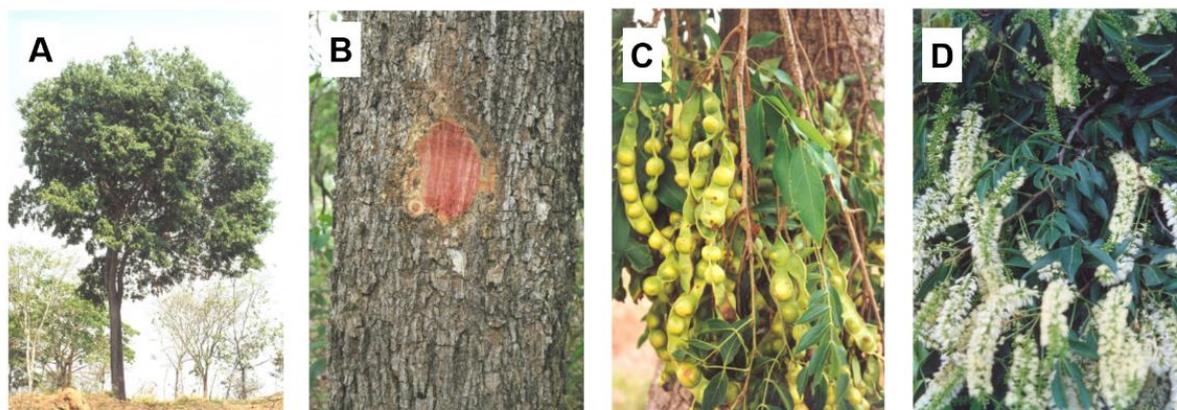
2.6 Inibidor de peptidase de sementes de *Inga cylindrica*

A família Fabaceae possui uma ampla distribuição no Brasil, apresentando cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies. É classificada em quatro subfamílias: Caesalpioideae, Cercideae, Faboideae e Mimosoideae (Caramori et al., 2009). Entre os gêneros presentes na família Fabaceae, destaca-se *Inga* spp., que pertence à subfamília Mimosoideae. *Inga* compreende cerca de 300 espécies, e seu nome é derivado da terminologia indígena “ingá”, que significa “tem semente envolvida”. Estudos farmacêuticos apontam importantes propriedades de interesse farmacológico para espécies deste gênero (Macedo et al., 2007; Bezerra et al., 2016; Carneiro et al.,

2018; Dib et al., 2019), com destaque para a atividade inseticida (Bezerra et al., 2016), antiparasitária, antimicrobiana, antifúngica e antitumoral (Lima et al., 2018; Dib et al., 2019).

O gênero *Inga* possui espécies com uma ampla distribuição no Brasil. A espécie *Inga cylindrica* Mart., com distribuição mais restrita, ocorre na região amazônica, em Goiás e na costa leste do país, desde o sul da Bahia até o Rio de Janeiro (Figura 7). Seus frutos representam uma importante fonte alimentar para a população de primatas da Amazônia que, por sua vez, dispersa as sementes (Caramori et al., 2009; Calderon et al., 2010).

Figura 7 – *Inga cylindrica*. (A) Árvore em floresta estacional; (B) superfície do ritidoma e cor da casca interna; (C) frutos maduros; (D) inflorescência.



Adaptado de: <http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/07/19/inga-cylindrica-vell-mart/>.

Calderon et al. (2010) caracterizaram um inibidor de tripsina de sementes de *I. cylindrica*, denominado ICTI (*Inga cylindrica trypsin inhibitor*). ICTI é uma proteína com massa molecular de 19.465,19 Da, com uma única cadeia polipeptídica. O ICTI inibiu a tripsina em uma razão molar de 1: 1, mas não mostrou nenhuma inibição significativa contra a α -quimiotripsina. O valor da constante de dissociação (K_i) foi de 4,3 nM, o que indica claramente que o ICTI é um inibidor potente e competitivo da tripsina bovina. Estudos de fluorescência em temperaturas crescentes demonstraram a estabilidade térmica da estrutura ICTI. O ICTI apresentou uma estabilidade térmica em pH 7,0 conforme indicado por T_m de 70 °C e ΔG_{25} de 48,5 kJ/mol⁻¹.

Estudos de dicroísmo celular (CD) mostraram que ICTI é por 65% de folhas- β , 33% de estrutura não-ordenada e 6,7% de estruturas secundárias de α -hélice,

corroborando a estrutura de outros IPs do tipo Kunitz já caracterizados. ICTI não possui a sequência primária de aminoácidos completa ou parcial. Apesar de Calderon et al. (2010) apresentarem o perfil bioquímico do ICTI, não foi encontrado na literatura trabalhos que investigassem a atividade biológica do inibidor frente a microrganismos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antimicrobiano e antibiofilme do inibidor de tripsina presente em sementes de *Inga cylindrica*, investigar seu mecanismo de ação frente a leveduras patogênicas, bem como sua toxicidade *in vivo* em *Galleria mellonella*.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar o inibidor de tripsina de sementes de *I. cylindrica*, ICTI;
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ICTI contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Investigar o efeito do ICTI sobre o desenvolvimento de biofilmes bacterianos;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) contra leveduras;
- Investigar o efeito do ICTI sobre o desenvolvimento de biofilmes fúngicos;
- Determinar o mecanismo de ação do ICTI frente as leveduras.
- Analisar o efeito sinérgico no ICTI em associação a antifúngicos comerciais;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do ICTI em *G. mellonella*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB), localizado na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

4.1 Acesso Ao Patrimônio Genético

O acesso ao patrimônio genético dos microrganismos e da espécie vegetal utilizados, foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número A315278 (Anexo 1).

4.2 Insetos

A colônia de *Galleria mellonella* foi mantida em câmara BOD, em condições padrão de temperatura (28 ± 1 °C) e umidade ($60 \pm 5\%$). As larvas foram alimentadas com uma dieta constituída por mel, fubá, leite em pó, farinha de soja, levedo de cerveja, água e cera de abelha.

4.3 Obtenção do ICTI

4.3.1 Obtenção do Extrato Bruto

Foi realizada a produção da farinha a partir de sementes de *I. cylindrica*, com a trituração do endosperma das sementes descascadas. A farinha foi então submetida ao processo de delipidação com hexano. Posteriormente, foi realizada a extração das proteínas presentes na farinha utilizando tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, na proporção de 1:10 farinha:tampão (p/v), sob agitação constante durante 4 h a temperatura ambiente. Após a extração, o extrato foi submetido a uma centrifugação a $6.000 \times g$ a 4 °C durante 30 min. A fração sobrenadante foi dialisada contra água destilada em membrana de diálise (12 kDa *cutoff*) contra água destilada por 24 h, liofilizado e denominada Extrato Bruto (EB).

4.3.2 Purificação do ICTI

O EB foi submetido a cromatografia no cromatógrafo AKTA *pure* (Cytiva), utilizando a coluna cromatográfica HiPrep™ DEAE FF 16/10 (Cytiva). A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. A eluição do material adsorvido a coluna foi realizada com um gradiente 0-100% de com NaCl 1M. O pico adsorvido da coluna foi dialisado contra água destilada por 24 h e liofilizado. Este material foi utilizado nas etapas do trabalho.

4.4 Quantificação de proteínas

O pico liofilizado teve sua quantificação proteica determinada pelo protocolo de Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) 1mg/ml como padrão.

4.5 Eletroforese SDS-PAGE

Utilizando gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, foi analisado o processo de purificação, de acordo com Laemmli (1970). As placas de poliacrilamida foram formadas por um gel de empilhamento na concentração a 5% de acrilamida e um gel de corrida contendo 15% de acrilamida. As amostras e os marcadores de massa molecular foram dissolvidos em tampão de amostra, incubados a 95 °C durante 5 min e aplicados. A corrida foi realizada em 150 V. As proteínas separadas nos géis foram posteriormente detectadas pela coloração do gel com 0,1% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 e descoloração com uma solução de água destilada, metanol e ácido acético (5:4:1–v/v /v).

4.6 Análise da atividade inibitória frente a enzima tripsina

O EB e o pico eluido da coluna HiPrep™ DEAE FF 16/10 foram utilizados no ensaio de inibição da enzima tripsina (Oliveira et al., 2011). Diferentes concentrações das amostras (0 a 1,4 µg), foram incubadas em tampão fosfato de sódio

0,1 M, pH 7,6, contendo NaCl 0,15 M, e 4 μ L de tripsina bovina (0,25 mg/mL) durante 10 min a 30 °C, num volume total de 70 μ L. Posteriormente, 200 μ L do substrato colorimétrico Benzoil-Arginina-p-nitroanilida (BAPNA) a 1 mM foi adicionado a cada um dos poços. O ensaio foi realizado durante 30 min a 30 °C, em um leitor de microplacas Varioskan Lux (Thermo Scientific).

4.7 Ensaios *in vitro*

4.7.1 Atividade antibacteriana

4.7.1.1 Preparo do inóculo bacteriano

Para os ensaios de atividade antibacteriana foram usadas as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 80958, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 49453, *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Salmonella enterica* ATCC 51741. As cepas foram retiradas do congelamento e transferidas para caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), mantidas em estufa a 37 °C por 24 h para crescimento e foram posteriormente repicadas utilizando a técnica de esgotamento por estrias, com auxílio da alça de inoculação, para ágar *Mueller Hinton* (MHA). O repique foi novamente incubado a 37 °C por 24 h, para obter colônias isoladas, utilizadas nos ensaios antibacterianos.

4.7.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do ICTI frente as cepas bacterianas foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2003), realizado em microplacas de 96 poços. Colônias isoladas em MHA foram adicionadas em solução de NaCl 0,9% estéril até atingir turvação igual a 0,5 da escala Mac Farland (1×10^8 UFC/mL) determinado em turbidímetro (MS Tecnopon). A suspensão bacteriana foi diluída na proporção 1:20 (v/v), atingindo assim a concentração de 5×10^6 UFC/mL. Como controle negativo de inibição, 10 μ L da suspensão bacteriana foram adicionadas

aos poços da primeira linha da microplaca, contendo 90 µL do meio de cultura MHB, obtendo uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL.

Uma alíquota estoque do ICTI foi preparada em solução NaCl 0,9% estéril e utilizada para o preparo de soluções de trabalho em concentrações variadas. Os poços receberam 80 µL de caldo MH, 10 µL das soluções de trabalho do inibidor e 10 µL do inóculo bacteriano.

No controle positivo de inibição foram adicionados 80 µL de caldo MH, 10 µL de cloranfenicol na concentração 40 µg/mL e 10 µL do inóculo bacteriano. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

A microplaca foi incubada a 37 °C e monitorada em intervalos de 30 minutos em leitor de microplaca Multiskan GO à 595 nm, sob agitação. A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi calculada utilizando uma regra de três simples, as médias obtidas das absorbâncias analisadas foram subtraídas pela primeira leitura, a qual é realizada no início da incubação.

4.7.1.3 Inibição do biofilme bacteriano

O protocolo de atividade de inibição do biofilme bacteriano foi baseado na metodologia de Stepanovic *et al.* (2007). O procedimento consistiu na utilização de microplaca de 96 poços de poliestireno. Foi realizada pipetagem em microplaca de 96 poços, e uma distribuição das colunas. No controle positivo para formação de biofilme, foram adicionados 180 µL de caldo BHI e 20 µL de suspensão bacteriana a 0,5 na escala de Mc Farland (1×10^8 UFC/mL). No controle negativo para formação de biofilme, foram adicionados 170 µL de caldo BHI, 20 µL de suspensão bacteriana e 10 µL de antibiótico. No tratamento com ICTI foram pipetados 170 µL de caldo BHI, 20 µL de suspensão bacteriana e 10 µL do inibidor em diferentes concentrações. Após o processo de preparo, a placa foi incubada à 37 °C por 18 h. Em seguida, os poços foram aspirados, cuidadosamente, com pipeta multicanal. Após, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de salina estéril, seguido de fixação com 150 µL de metanol 100% por 20 min. Posteriormente, cada poço recebeu solução cristal violeta 0,5% (p/v) por 15 min à temperatura ambiente. Como última etapa, o botão corado foi suspenso com 150 µL de etanol (95%) e realizado determinação das densidades óticas (D.O) a 450 nm.

4.7.2 Atividade antifúngica

4.7.2.1 Preparo do inóculo fúngico

Os inóculos foram preparados a partir de culturas de *Candida albicans* 90028, *Candida albicans* 5314, *Candida parapsilosis* 22019, *Candida glabrata* 9030, *Candida guilliermondii* 6260, *Candida krusei* 6258, *Candida tropicalis* 750 e *Cryptococcus gattii* AFLP4, semeadas em placas de ASD, por duas vezes, para garantir a pureza e viabilidade das culturas jovens, e incubados a 35 °C por 24-48 h. Após a incubação, 4 ou 5 colônias foram transferidas com alça esterilizada para um tubo de ensaio estéril contendo 5 mL de solução salina 0,9% estéril. A suspensão resultante foi agitada durante 15 seg com auxílio do aparelho Vortex. A turbidez da suspensão foi ajustada a uma concentração final de $1,5 \times 10^6$ Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL).

4.7.2.2 Determinação da CIM e concentração fungicida mínima (CFM)

A determinação da CIM e da concentração fungicida mínima (CFM) foi baseada no protocolo de LEITE (2015), com base na técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2007), com adaptações. Foi utilizada microplaca de 96 poços, estéril, de fundo chato e com tampa.

Os compostos foram diluídos e testados em concentrações variando de 10 até 0,0097 mg/mL. Anfotericina B (Sigma-Aldrich, São Paulo, São Paulo, Brasil) foi usada como droga padrão; e meio de cultura livre de qualquer outro agente foi incluído para verificar a esterilidade.

Foram distribuídos 100 µL de RPMI-1640 em cada poço da placa. Em seguida, foram distribuídos 100 µL dos compostos nos poços da segunda linha da placa, a uma concentração inicial de 10 mg/mL, e foram feitas diluições seriadas a uma razão de dois nas linhas subsequentes, no sentido vertical. A última linha foi preservada a fim de se realizar o controle de inibição do crescimento, utilizando 100 µL de Anfotericina B. Por fim, em cada poço de cada coluna a partir da segunda coluna foram dispensadas 100 µL do inóculo fúngico na concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL correspondente a cada uma das cepas submetidas ao ensaio.

A CIM foi definida como a concentração mais baixa dos compostos que inibiram o crescimento microbiano visível. A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada por subcultura de alíquotas dos poços correspondentes ao CIM placas contendo BHI sólido, que foram incubadas a 37° C por 48 h. O CFM foi definido como a menor concentração do ICTI que não permitiu crescimento visível no meio sólido.

4.7.2.3 Sinergismo pelo método Checkboard

Nesse ensaio, foram preparadas inicialmente duas microplacas de 96 poços de fundo chato com tampa. A primeira com a diluição seriada do ICTI e a segunda placa com o antifúngico anfotericina B.

A primeira microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640 em todos os poços das colunas 3 a 11. Nos poços da coluna 2 foram adicionados 200 µL de meio RPMI 1640 e após foi retirado o volume referente a solução da amostra para que nos poços dessa fileira houvesse uma concentração com três concentrações acima da CIM. Após o preparo dos poços da coluna 2 da microplaca de 96 poços, foi feita uma diluição seriada horizontalmente, retirando 100 µL dos poços da coluna 2 e passando para a coluna 3, e assim sucessivamente até a coluna 11. Os 100 µL restantes nos poços da coluna 11 foram descartados.

Á segunda microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640 em todos os poços das colunas 2 a 11, nas fileiras de B a H. Nos poços da fileira A das colunas de 2 a 11 foi adicionado 200 µL de meio RPMI 1640, e após, foi retirado o volume referente a solução do antifúngico para que nos poços dessa fileira houvesse uma concentração com três concentrações acima da CIM. Após o preparo dos poços da fileira A das colunas de 2 a 11 da microplaca de 96 poços, foi feita uma diluição seriada verticalmente, retirando 100 µL dos poços da fileira A e passando para a fileira B, e assim sucessivamente até a fileira H. Foram descartados os 100 µL restantes nos poços da fileira H. Após o preparo, as duas placas foram armazenadas.

Em seguida, o inóculo fúngico foi diluído em solução salina 0,9% na concentração de $2,5 \times 10^6$ UFC/mL e reservado. E uma terceira placa, foram adicionados nos poços da microplaca da fileira A a H das colunas 2 a 11 o volume de 50 µL de meio RPMI 1640 com a amostra (primeira microplaca preparada). Após isso, foi adicionado, com uma micropipeta multicanal, nos poços da microplaca da fileira A a H das colunas 2 a 11 o volume de 50 µL de meio RPMI 1640 com o antifúngico (segunda

microplaca preparada). Adicionados a amostra e o antifúngico, foi então adicionado 100 µL da suspensão fúngica preparado na concentração de $2,5 \times 10^6$ UFC/mL. Nos poços da coluna 1 foram adicionados 200 µL de meio RPMI 1640 para controle de esterilidade do meio. Nos poços da coluna 12 foram adicionados 200 µL da suspensão fúngica para controle do crescimento fúngico. A microplaca foi vedada e incubada a 37 °C por 24 h – 48 h.

Após o período de incubação, através de leitura visual, foi determinada a CIM como aquela em que a amostra foi capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico, ou seja, o meio que estivesse contido no poço deveria ser translúcido. Foram efetuados os devidos cálculos usando a seguinte fórmula para determinação do sinergismo do ICTI, onde CIF é a Concentração inibitória fracionada:

$$\sum CIF = CIF_{(amostra)} + CIF_{(antifúngico)}$$

$$\sum CIF = \frac{CIM_{(amostra\ na\ combinação)}}{CIM_{(amostra\ individual)}} + \frac{CIM_{(antifúngico\ na\ combinação)}}{CIM_{(antifúngico\ individual)}}$$

$$\text{onde se } \sum CIF \begin{cases} \leq 0,5 = \textit{sinérgico} \\ > 0,5 \textit{ e } \leq 1 = \textit{aditivo} \\ > 1 \textit{ e } \leq 4 = \textit{indiferente} \end{cases}$$

E se $\sum CIF$ for > 4 , temos que a atividade é antagonista

4.7.2.4 Efeito sobre a inibição do biofilme fúngico

Foi utilizada microplaca de 96 poços, estéril, de fundo chato e com tampa. Foram distribuídos 100 µL de solução salina 0,9% estéril contendo inóculo fúngico na concentração $2,5 \times 10^6$ UFC/mL, com subsequente incubação a 37 °C por 2 h para pré-adesão do biofilme. Em seguida, a solução foi aspirada cuidadosamente, e foram distribuídos na primeira coluna em duplicata 100 µL de BHI 1% glicose como controle de crescimento, e nas colunas subsequentes, os compostos em concentração de 1X e

10X o CIM, e em seguida, o antifúngico anfotericina B também nas concentrações de 1X e 10X o CIM. A placa foi então incubada a 37 °C por 24-48 h.

Após os tratamentos, o sobrenadante foi retirado e as células não aderidas removidas por lavagem utilizando 100 µL de solução salina 0,9% estéril. O biofilme foi desprendido dos poços utilizando uma micropipeta de 100 µL para permitir a dissociação das células. Um volume de 50 µL da suspensão celular foi aspirado dos poços, transferido para um tubo contendo 450 µL de solução salina 0,9% estéril e submetido a agitação. Diluições em série foram realizadas e 50µL de cada suspensão foram plaqueadas em meio de cultura Ágar Sabouraud. A porcentagem de sobrevivência (UFC – unidade formadora de colônias) foi determinada com base na sobrevivência comparativa de biofilmes não tratados (Costa-Orlandi et al., 2017).

4.7.2.5 Atividade de erradicação do biofilme maduro

Foi utilizada microplaca de 96 poços, estéril, de fundo chato e com tampa. Foram distribuídos 100 µL de solução BHI 1% glicose contendo inóculo fúngico na concentração $2,5 \times 10^6$ UFC/mL, com subsequente incubação a 37 °C por 24-48 h para formação do biofilme. Em seguida, a solução foi aspirada cuidadosamente, e foram distribuídos na primeira coluna em duplicata 100 µL de BHI com 1% glicose como controle de crescimento, e nas colunas subsequentes, o ICTI em concentração de 1X e 10X CIM, e em seguida, o antifúngico anfotericina B também nas concentrações de 1X e 10X CIM. A placa foi então incubada a 37 °C por 24-48 h.

Após os tratamentos, o sobrenadante foi retirado e as células não aderidas removidas por lavagem utilizando 100 µL de solução salina 0,9% estéril. O biofilme foi desprendido dos poços utilizando uma micropipeta de 100µL para permitir a dissociação das células. Um volume de 50 µL contendo a suspensão celular foi aspirado dos poços, transferido para um tubo contendo 450 µL de salina 0.9% e submetido a agitação. Diluições em série foram realizadas e 50 µL de cada suspensão foram plaqueados em meio de cultura apropriado. A porcentagem de sobrevivência (UFC) foi determinada com base na sobrevivência comparativa de biofilmes não tratados (Sardi et al., 2017).

4.7.2.6 Análise por microscopia de fluorescência

Foi utilizada microplaca de 24 poços, estéril, de fundo chato e com tampa, contendo lamínula removível no interior dos poços. Foram distribuídos 500 µL de solução BHI com 1% glicose contendo inóculo fúngico na concentração $2,5 \times 10^6$ UFC/mL, com subsequente incubação a 37 °C por 24-48 h para formação do biofilme. Em seguida, a solução foi aspirada cuidadosamente, e foram distribuídos na primeira coluna em duplicata 500 µL de BHI 1% glicose como controle de crescimento, na segunda coluna 500 µL dos compostos em concentração de 1X e 10X CIM, e em seguida, na terceira coluna 500 µL do antifúngico anfotericina B também nas concentrações de 1X e 10X CIM. A placa foi então incubada a 37 °C por 24-48 h. Após os tratamentos, o sobrenadante foi retirado e as células não aderidas removidas por lavagem utilizando 100 µL de solução salina 0,9% estéril.

Live/DEAD BacLight™ (*Molecular probes - Life technologies*) foi utilizado como controle, e o preparo seguiu as instruções do fabricante. O Corante SYTO9 é responsável pela coloração das células viáveis, sua leitura é obtida através da excitação a 490 nm e emissão a 520 nm. Já o Iodeto de Propídio (IP) é responsável pela coloração das células não viáveis, e sua leitura é obtida através da excitação a 490 nm e emissão a 635 nm.

Um volume de 3 µL de SYTO9 e 3 µL de IP foram adicionados a 3 mL de solução salina 0,9%. Volumes de 500 µL dessa solução foram adicionados aos poços da microplaca, e a mesma foi incubada a 37 °C por 10 min sob baixa incidência de luz. Após aspirar sobrenadante, a lamínula retirada do poço da microplaca, o excesso de corante foi lavado em solução salina 0,9%. A lamínula então foi posicionada sob lâmina e levada ao microscópio Leica DM 2000 LED, equipado com câmera Leica DFC 7000 T. As imagens foram feitas com filtro dos corantes específicos e coletadas no software LAS V4.12.

4.7.2.7 Mecanismo de ação

4.7.2.7.1 Ensaio de ligação ao sorbitol

O teste realizado foi adaptado dos ensaios de Frost *et al.* (1995), utilizando-se meio com e sem sorbitol (controle), na tentativa de descobrir possíveis mecanismos envolvidos nas propriedades antifúngicas do composto testado.

Sorbitol (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil), um protetor osmótico usado para estabilização dos protoplastos das leveduras, foi utilizado. Se o mecanismo de ação do ICTI envolver danos na parede celular fúngica, o sorbitol exógeno adicionado impede a ligação do ICTI a parede celular fúngica. Como consequência, a CIM tende a aumentar na presença do sorbitol exógeno.

Este ensaio compara os valores da CIM dos compostos frente as cepas na ausência e presença de sorbitol a 0,8 M.

A determinação da CIM dos compostos frente às cepas na presença do sorbitol foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando placas de microdiluição de 96 poços, conforme já descrito anteriormente. Neste caso, foi utilizado o meio líquido previamente adicionado de sorbitol (PM= 182,17 g/mol), a 0,8 M como suporte osmótico. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C e a leitura realizada com 2 e 7 dias. Este ensaio foi realizado em duplicata e o resultado expresso pela média dos resultados.

4.7.2.7.2 Ensaio de ligação ao ergosterol

Para determinar se o inibidor se liga a esteróis da membrana fúngica, a CIM do ICTI para as cepas foi determinada com e sem a adição de ergosterol ao meio. Se o mecanismo de ação do ICTI envolver danos na membrana por interação com ergosterol, as micelas formadas pelo ergosterol exógeno adicionado se ligarão ao ICTI, impedindo a ligação do inibidor com o ergosterol da membrana fúngica. Como consequência, a CIM tende a aumentar na presença do ergosterol exógeno. Caso a CIM permaneça inalterada na presença de ergosterol exógeno, sugere-se que o inibidor não atue por ligação ao ergosterol da membrana.

O ergosterol foi preparado no momento da execução do teste, onde primeiramente foi pulverizado (com auxílio de cadinho de porcelana e um pistilo previamente esterilizados) e dissolvidos em DMSO (não mais que 10% do volume final) e Tween 80 a 1%, de acordo com o volume e concentração desejada (400 µg/mL). A emulsão formada foi então homogeneizada e diluída com o meio de cultura líquido.

A determinação da CIM foi realizada por microdiluição, utilizando microplacas de 96 poços, com fundo chato e tampa. O meio de cultura RPMI-1640 foi utilizado na ausência e na presença de 400 µg/mL de ergosterol. Por fim, foi realizado o mesmo procedimento com a anfotericina B, cuja interação com ergosterol já é conhecida, para servir como uma droga controle. As placas foram seladas e incubadas a 35 °C por 24-48 h para ser realizada a leitura. Este ensaio foi realizado em duplicata (Sardi et al., 2017).

4.8 Ensaio *In vivo*

4.8.1 Avaliação da Toxicidade Aguda *in vivo* em *Galleria mellonella*

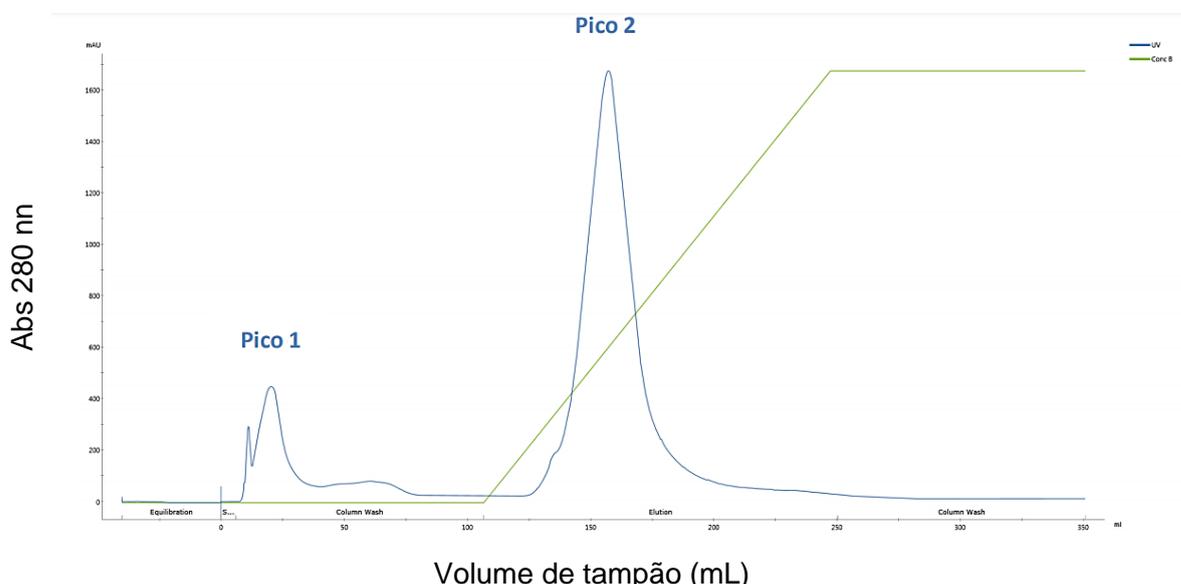
A toxicidade aguda do ICTI foi determinada em modelo *in vivo* usando larvas de *Galleria mellonella*. Nesse ensaio, oito larvas (n=8) de *G. mellonella* foram selecionadas para cada grupo pesando entre 200 e 300 mg. Foram administrados na hemocele de cada larva através da penúltima pró-pata esquerda com uma seringa de Hamilton 10 µL do ICTI e anfotericina B nas concentrações de 1 e 10 vezes o CIM. Nas larvas controle foram administrados 10 µL de salina 0,9%. As larvas foram incubadas em temperatura ambiente e sua sobrevivência registrada em intervalos de tempo por 72h.

5. RESULTADOS

5.1 Purificação do ICTI

O material obtido, denominado extrato bruto (EB), teve seu conteúdo proteico quantificado em 0,29 mg/mL. Uma massa de 300 mg de EB foi dissolvida em 7 mL de tampão de equilíbrio e aplicada em coluna de troca iônica HiPrep™ DEAE FF 16/10 (Cytiva), acoplada em cromatógrafo AKTA pure (Cytiva). O EB foi separado em dois picos, o primeiro obtido durante a etapa de lavagem e outro eluído no gradiente com NaCl (Figura 8).

Figura 8 - Purificação do ICTI. Cromatograma do EB de *I. cylindrica* separado em coluna HiPrep™ DEAE FF 16/10 (Cytiva). Pico 1 referente a material adsorvido durante etapa de lavagem da coluna e Pico 2 referente a material eluído (ICTI). Eixo Y referente a leitura da absorbância e Eixo X referente ao volume de tampão passado na coluna.

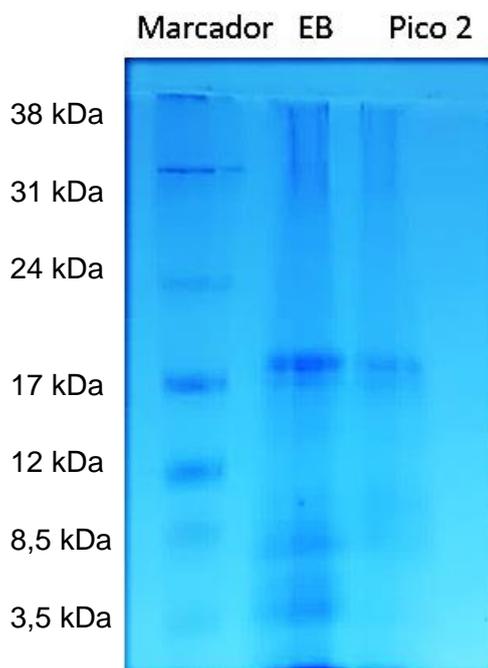


5.2 Eletroforese SDS-PAGE 15%

O EB e o Pico 2 da coluna HiPrep™ DEAE FF 16/10 foram analisados em SDS-PAGE 15%, a fim de acompanhar o processo de purificação do inibidor (Figura 9). Foram observadas três bandas majoritárias no EB, e uma única no Pico 2. A primeira banda, entre os marcadores de 17 e 24 kDa, aparece no EB e no Pico 2. As bandas

que aparecem entre os marcadores de 3,5 e 8,5 kDa estão presentes apenas no EB. Como Calderon et al. (2010) determinaram que o ICTI era um inibidor com peso molecular de aproximadamente 20 kDa, foi utilizado o Pico 2 nos demais ensaios.

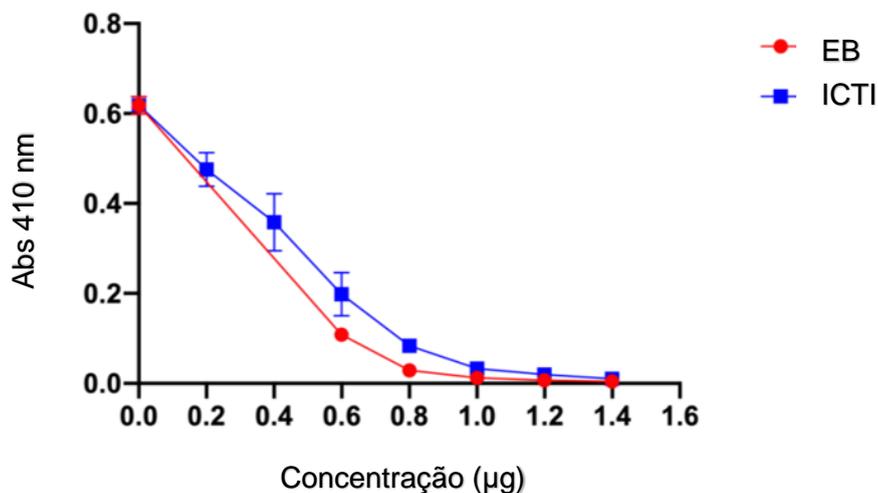
Figura 9 - Perfil de SDS-PAGE 15%. EB e ICTI, material obtido da coluna cromatográfica HiPrep™ DEAE FF 16/10. Nos marcadores (GE Healthcare), pode-se observar as bandas referentes aos pesos utilizados. Na coluna do EB, pode-se observar uma banda predominante de aproximadamente 20 kDa, e algumas bandas menores de 8,5 kDa e 3,5 kDa. Já no Pico 2, apenas uma banda está em evidência, de aproximadamente 20 kDa (ICTI).



5.3 Atividade inibitória frente a enzima tripsina

O EB e o ICTI foram analisados em relação a atividade de inibição frente a enzima tripsina. Na Figura 10 pode-se observar que ambas as amostras apresentaram inibição de maneira dose-dependente, alcançando 100% de inibição a partir da concentração de 1 µg.

Figura 10 - Ensaio de inibição da tripsina bovina. Amostras EB e ICTI (0 - 1,4 μ g). O ensaio ocorreu durante 30 min utilizando o substrato BAPNA a 1 mM, e tripsina (0,25 mg/mL). Eixo Y referente a leitura da absorbância e Eixo X referente as concentrações utilizadas de EB e ICTI.



5.4 Ensaios *in vitro*

5.4.1 Determinação CIM bactericida

Foi avaliada a atividade bactericida do ICTI frente a cepas patogênicas de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. saprophyticus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *S. entérica*). Foram testadas concentrações que variaram de 10 mM a 1 mM. Em nenhuma das concentrações utilizadas, o ICTI surtiu efeito significativo frente as cepas bacterianas, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) Bactericida. Atividade bactericida do ICTI frente as cepas *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *E. coli* e *S. enterica*.

Bactérias	CIM
<i>S. aureus</i>	> 10 mM
<i>S. saprophyticus</i>	> 10 mM
<i>E. coli</i>	> 10 mM
<i>S. enterica</i>	> 10 mM

5.4.2

5.4.3 Inibição do biofilme bacteriano

A tabela 2 apresenta a atividade inibitória do ICTI frente a biofilmes bacterianos. Na análise visual e leitura de absorbâncias, a amostra não apresentou atividade significativa contra o biofilme testado na concentração utilizada de 10 mM. Em todos os poços da microplaca que continham ICTI, foi observado crescimento normal de biofilme.

Tabela 2: Determinação da atividade antibiofilme de *Inga cylindrica* frente as cepas *S. aureus* 80958 e *S. epidermidis* 35984

Cepa	Concentração utilizada	Atividade
<i>S. aureus</i> 80958	10 mM	0%
<i>S. epidermidis</i> 35984	10 mM	0%

5.4.4 Determinação da CIM e CFM

Dentre as diversas espécies de leveduras testadas, as que apresentaram melhores CIM e CFM em relação ao ICTI foram *C. gattii* AFLP4, *C. albicans* 90028, *C. glabrata* 90030 e *C. guilliermondii* 6260 (tabela 3). Nas 4 cepas, o CIM e CFM foi de 32,11 μ M. Foram selecionadas as cepas *C. gattii* AFLP4 e *C. albicans* 90028 para dar continuidade aos demais ensaios envolvendo a atividade fungicida do inibidor, por conta da maior relevância farmacêutica das duas cepas.

Tabela 3 - CIM e CFM de EB e ICTI frente as leveduras patogênicas.

Cepa	ICTI (μM)	
	CIM	CFM
<i>C. gattii</i> AFLP4	32,11	32,11
<i>C. albicans</i> 5314	256,87	256,87
<i>C. albicans</i> 90028	32,11	32,11
<i>C. parapsilosis</i> 22019	>513,74	>513,74
<i>C. glabrata</i> 90030	32,11	32,11
<i>C. guilliermondii</i> 6260	32,11	32,11
<i>C. krusei</i> 6258	>513,74	>513,74
<i>C. tropicalis</i> 750	>513,74	>513,74

5.4.5 Sinergismo pelo método Checkboard

Foi avaliado o potencial sinérgico do ICTI associado ao antifúngico comercial Anfotericina B. Para uma amostra ser considerada sinérgica, o valor da soma da CIF da amostra com a CIF do antifúngico deve ser inferior a 0,5 (Tabela 4). Nas duas cepas avaliadas, a associação do ICTI com a Anfotericina B apresentou valores inferiores a 0,5. Isso demonstra que o ICTI exerce um papel sinérgico que potencializa sua ação fungicida e a ação fungicida do antifúngico quando associados.

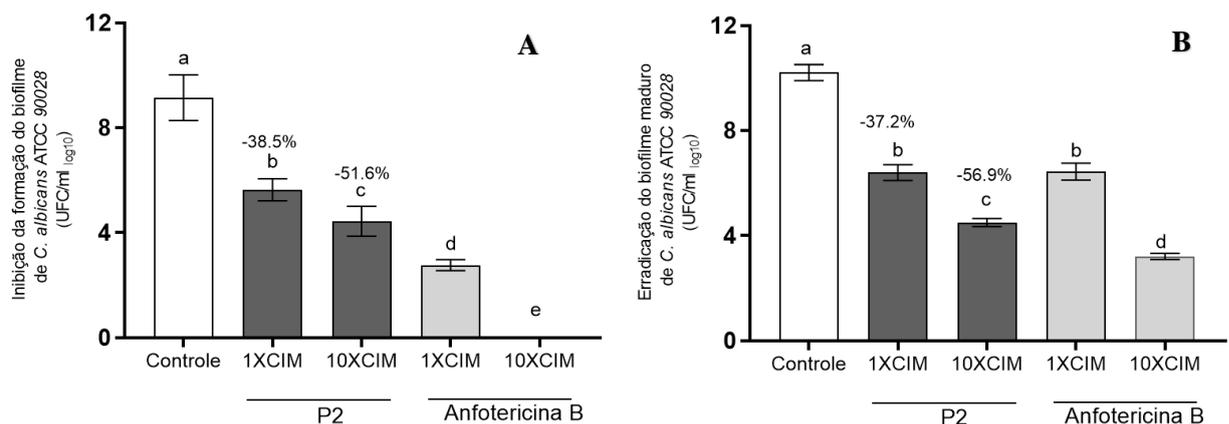
Tabela 4 – Efeito sinérgico do ICTI associado a Anfotericina B frente as leveduras patogênicas.

Microrganismos	Combinação	CIM individual		CIM combinação		Σ CIF	Atividade
		A	B	A	B		
ICTI (a)							
<i>C. albicans</i> 90028	+	32,11 µM	0,54 µM	0,06 µM	0,135 µM	0,251	Sinérgico
	Anfotericina B						
(b)							
ICTI (a)							
<i>C. gattii</i> AFLP4	+	32,11 µM	1,08 µM	8,02 µM	0,06 µM	0,299	Sinérgico
	Anfotericina B						
(b)							

5.4.6 Inibição e erradicação do biofilme fúngico

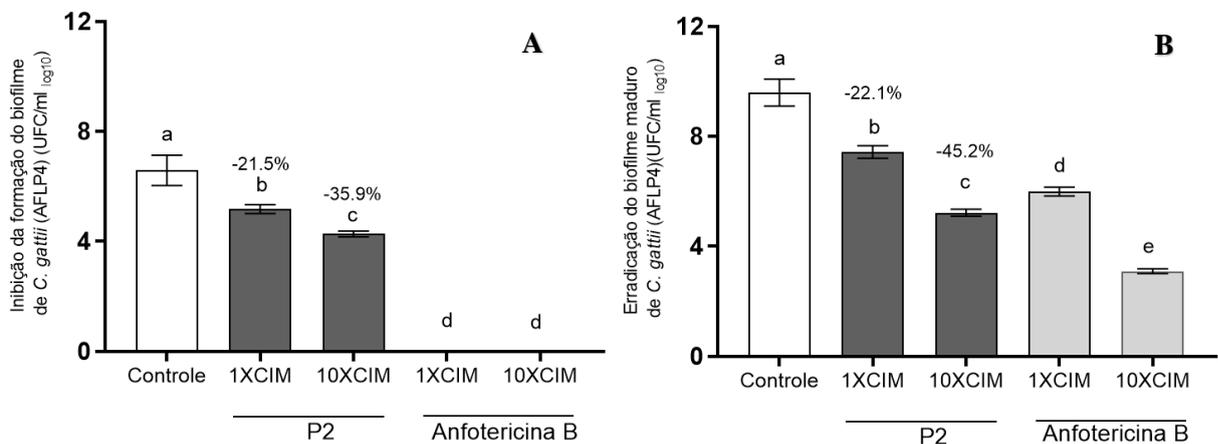
Os ensaios de inibição e erradicação do biofilme fúngico foram realizados com as cepas *C. albicans* 90028 e *C. gatti* AFLP4. O ICTI inibiu a formação de biofilme em *C. albicans* em 38,5% e 51,6%, nas concentrações de 1X e 10X CIM, respectivamente. Na erradicação, essa porcentagem ficou em 37,2% e 56,9%, resultados semelhantes ao do antifúngico comercial Anfotericina B (Figura 11).

Figura 11: Avaliação da inibição e erradicação de biofilme maduro de *C. albicans* 90028 pelo ICTI. (A) Inibição de biofilme de *C. albicans* 90028 pelo ICTI em concentrações de 1 e 10 vezes o CIM do ICTI comparado a inibição de 1 e 10 vezes o CIM do antifúngico anfotericina B. (B) Erradicação do biofilme maduro de *C. albicans* 90028 pelo ICTI em concentrações de 1 e 10 vezes o CIM do ICTI comparado a inibição de 1 e 10 vezes o CIM do antifúngico anfotericina B



Na avaliação da influência sob biofilmes de *C. gattii*, o ICTI inibiu a formação de biofilme em 21,5% e 35,9%, nas concentrações de 1X e 10X CIM, respectivamente. Na erradicação, essa porcentagem ficou em 22,1% e 45,2% (Figura 12). Com isso, foi definido uma maior susceptibilidade da espécie de *C. albicans* na presença do inibidor do que na espécie de *C. gattii*.

Figura 12: Avaliação da inibição e erradicação de biofilme maduro de *C. gattii* AFLP4 pelo ICTI. (A) Inibição de biofilme de *C. gattii* AFLP4 pelo ICTI em concentrações de 1 e 10 vezes o CIM comparado a inibição de 1 e 10 vezes o CIM do antifúngico Anfotericina B. (B) Erradicação do biofilme maduro de *C. gattii* AFLP4 pelo ICTI em concentrações de 1 e 10 vezes o CIM comparado a erradicação de 1 e 10 vezes o CIM do antifúngico Anfotericina B.

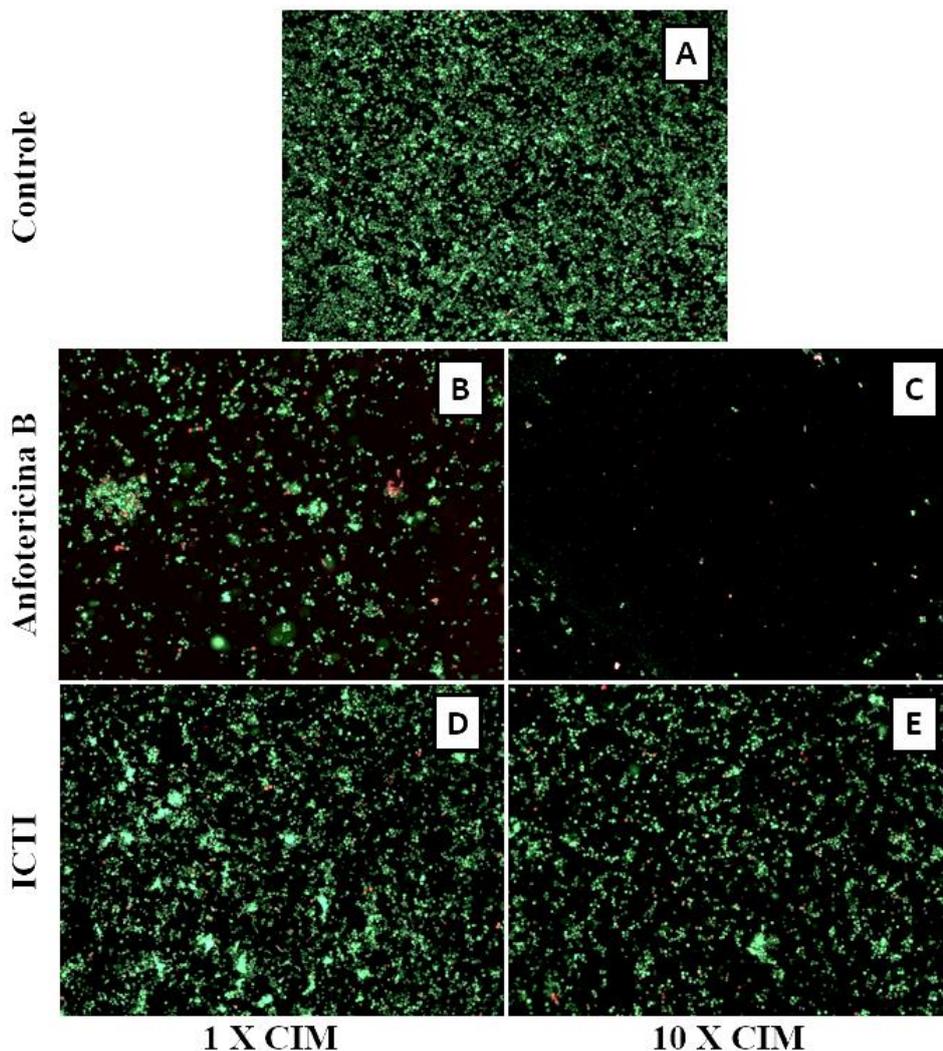


5.4.7 Microscopia de fluorescência

As imagens obtidas da microscopia de fluorescência (Figuras 13, 14, 15 e 16) foram imagens representativas do ensaio de viabilidade dos biofilmes, obtidos com o plaqueamento dos biofilmes.

Na figura 13, observar-se que o biofilme controle de *C. albicans* possui uma imagem verde homogênea, sugerindo plena viabilidade. O tratamento com ICTI e Anfotericina B mostram que houve uma inibição do desenvolvimento do biofilme, com 10 X o CIM da anfotericina inibindo praticamente 100% das células viáveis, e 10 X o CIM do ICTI reduzindo parcialmente (51%) a espessura do biofilme.

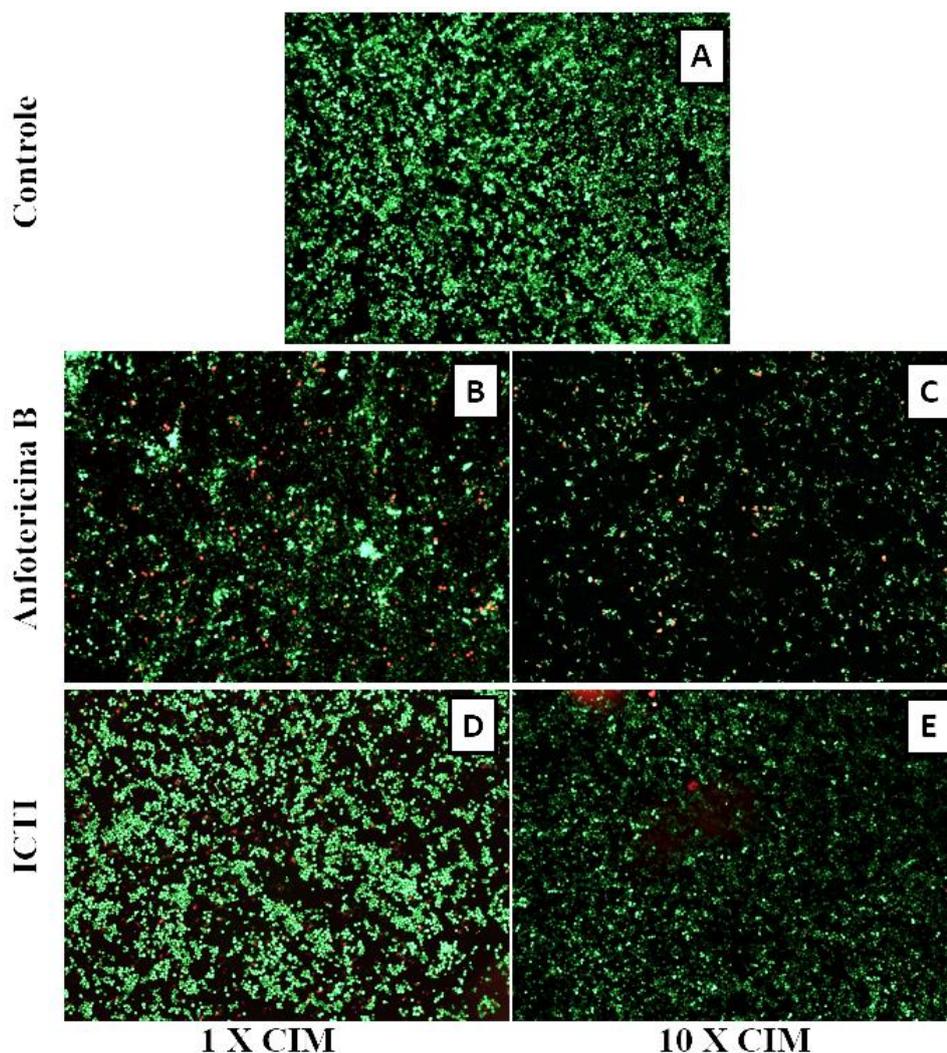
Figura 13 - Microscopia de fluorescência da inibição da formação do biofilme de *C. albicans* 90028. (A) Controle de crescimento do biofilme de *C. albicans* 90028. (B) Efeito da Anfotericina B na concentração de 1X CIM sob inibição do biofilme de *C. albicans* 90028. (C) Efeito da Anfotericina B na concentração de 10X CIM sob inibição do biofilme de *C. albicans* 90028. (D) Efeito do ICTI na concentração de 1X CIM sob inibição do biofilme de *C. albicans* 90028. (E) Efeito do ICTI na concentração de 10X CIM sob inibição do biofilme de *C. albicans* 90028. Aumento de 200 X. Células viáveis coradas em verde e não viáveis coradas em vermelho.



Na figura 14, observar-se que o controle do biofilme maduro de *C. albicans* possui uma imagem verde homogênea, sugerindo plena viabilidade. Aqui, pode-se observar um aumento na densidade do biofilme em relação ao controle da figura 14, aumento esse decorrido do maior tempo de formação disponível para o desenvolvimento do biofilme. O tratamento com ICTI e Anfotericina B mostram que houve uma erradicação parcial do biofilme, com 10 X o CIM da anfotericina

apresentando uma redução de aproximadamente 70% das células viáveis, e 10 X o CIM do ICTI reduzindo 60% do biofilme.

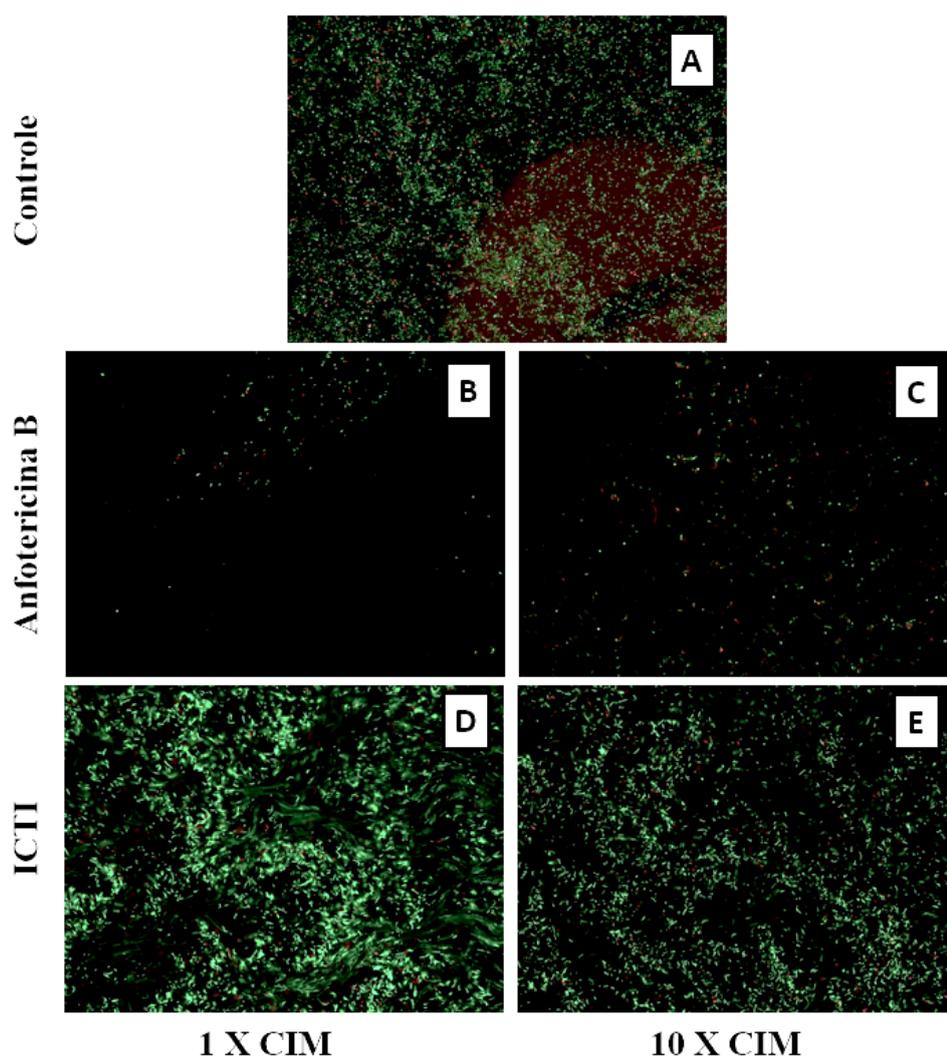
Figura 14 - - Microscopia de fluorescência da erradicação do biofilme pré formado de *C. albicans* 90028. (A) Controle de crescimento do biofilme de *C. albicans* 90028. (B) Efeito da Anfotericina B na concentração de 1X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. albicans* 90028. (C) Efeito da Anfotericina B na concentração de 10X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. albicans* 90028. (D) Efeito do ICTI na concentração de 1X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. albicans* 90028. (E) Efeito do ICTI na concentração de 10X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. albicans* 90028. Aumento de 200 X. Células viáveis coradas em verde e não viáveis coradas em vermelho.



Na figura 15, observar-se que o biofilme controle de *C. gattii* possui uma imagem verde homogênea, sugerindo plena viabilidade. O tratamento com ICTI e Anfotericina B mostram que houve uma inibição do desenvolvimento do biofilme, com 10 X o CIM

da anfotericina inibindo praticamente 100% das células viáveis, e 10 X o CIM do ICTI reduzindo parcialmente (36%) o biofilme.

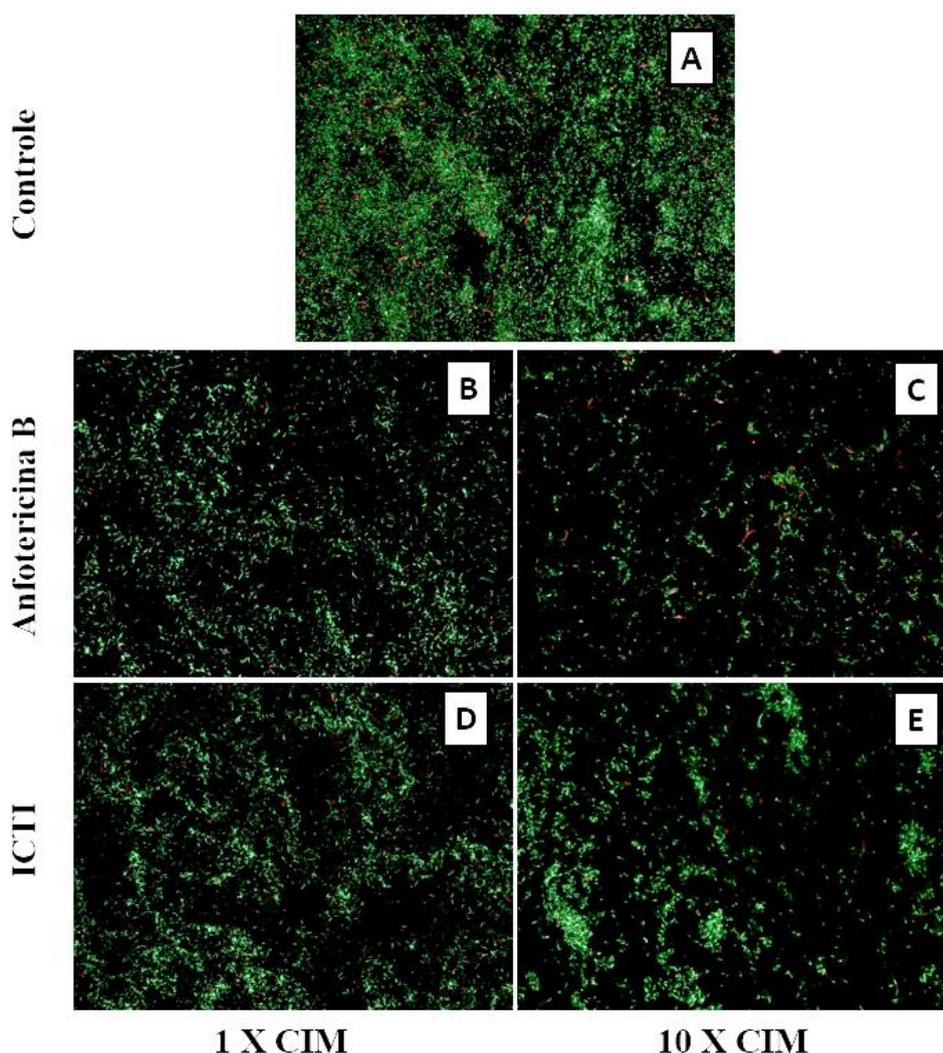
Figura 15 – Microscopia de fluorescência da inibição da formação do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (A) Controle de crescimento do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (B) Efeito da Anfotericina B na concentração de 1X CIM sob inibição do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (C) Efeito da Anfotericina B na concentração de 10X CIM sob inibição do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (D) Efeito do ICTI na concentração de 1X CIM sob inibição do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (E) Efeito do ICTI na concentração de 10X CIM sob inibição do biofilme de *C. gattii* AFLP4. Aumento de 200 X. Células viáveis coradas em verde e não viáveis coradas em vermelho.



Por fim, na figura 16 observar-se que o controle do biofilme maduro de *C. gattii* possui uma imagem verde homogênea, sugerindo plena viabilidade. Aqui, pode-se observar também, como no controle da figura 16, um aumento na densidade do biofilme, decorrido do maior tempo de formação disponível para o desenvolvimento do

biofilme. O tratamento com ICTI e Anfotericina B mostram que houve uma erradicação parcial do biofilme, com 10 X o CIM da anfotericina apresentando uma redução de aproximadamente 60% das células viáveis, e 10 X o CIM do ICTI reduzindo 45% do biofilme.

Figura 16 - Microscopia de fluorescência da erradicação do biofilme pré formado de *C. gattii* AFLP4. (A) Controle de crescimento do biofilme de *C. gattii* AFLP4. (B) Efeito da Anfotericina B na concentração de 1X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. gattii* AFLP4. (C) Efeito da Anfotericina B na concentração de 10X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. gattii* AFLP4. (D) Efeito do ICTI na concentração de 1X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. gattii* AFLP4. (E) Efeito do ICTI na concentração de 10X CIM na erradicação do biofilme pré formado de *C. gattii* AFLP4. Aumento de 200 X. Células viáveis coradas em verde e não viáveis coradas em vermelho.



5.4.8 Mecanismo de ação do inibidor sobre leveduras

5.4.8.1 Ensaio de ligação ao sorbitol

O sorbitol atua como um protetor osmótico. Valores maiores de CIM observados em meios com adição de sorbitol quando comparado com o meio na ausência de sorbitol (meio padrão) implica a parede celular como um dos possíveis alvos do ICTI. Como pode ser observado na Tabela 4, os valores de CIM se mantiveram inalterados, o que indica que o ICTI pode não estar atuando diretamente sobre a parede celular fúngica.

Tabela 5 - Efeito do sorbitol (0,8M) sobre a atividade antifúngica do ICTI em *C. albicans* e *C. gattii*.

Sorbitol	<i>C. albicans</i> 90028		<i>C. gattii</i> AFLP4	
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
ICTI - CIM	32,11 µM	32,11 µM	32,11 µM	32,11 µM

5.4.8.2 Ensaio de ligação ao ergosterol

A adição exógena de ergosterol aumentou os valores de CIM em comparação aos ensaios realizados sem a adição deste esterol. Estes resultados sugerem que o mecanismo do ICTI é atuando no ergosterol presente na membrana celular fúngica, assim como os polienos.

Tabela 6 – Efeito do ergosterol exógeno (400 µg/ml) na atividade antifúngica de ICTI em *C. albicans* 90028 e *C. gattii* AFLP4.

Ergosterol	<i>C. albicans</i> 90028		<i>C. gattii</i> AFLP4	
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
CIM ICTI	>513,74	32,11 µM	>513,74	32,11 µM

5.5 Ensaios *In vivo*

5.5.1 Toxicidade aguda *in vivo* em *Galleria mellonella*

A toxicidade do ICTI foi analisada utilizando o modelo invertebrado de *G. mellonella*. As concentrações de 1X e 10X o CIM do ICTI e da Anfotericina B foram utilizadas no ensaio, assim como solução salina 0,9%. A tabela 7 apresenta a quantidade de larvas mortas durante o experimento. Nos tempos observados, não houveram mortes de larvas tratadas com ICTI em nenhuma das duas concentrações. Já nas larvas tratadas com Anfotericina B, houveram 3 mortes no total, todas no tratamento de 10X o CIM (2 mortes no tempo 12 h e 1 morte no tempo 24 h).

Tabela 7 – Número de larvas de *Galleria mellonella* mortas no intervalo de 0h a 72h tratadas com ICTI, Anfotericina B e Salina 0,9% (n=8).

Tempo (h)	ICTI 1X CIM	ICTI 10X CIM	Anfotericina B 1X CIM	Anfotericina B 10X CIM	Salina 0,9%
0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	2	0
24	0	0	0	1	0
36	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0

6 DISCUSSÃO

Calderon et al. (2010) determinou que o ICTI é uma proteína com massa molecular de 19.465,19 Da. A eletroforese demonstrou que no pico 2 havia uma única banda de aproximadamente 20 kDa, o que aponta que o ICTI foi isolado.

As espécies vegetais da subfamília Mimosoideae contêm IPs formados por duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto, diferindo de outros inibidores de cadeia única do tipo Kunitz, das subfamílias Caesalpinoideae e Papilonoideae (Macedo et al., 2007). Entretanto, assim como ICTI, outros IPs encontrados em sementes do gênero *Inga* também apresentaram única cadeia polipeptídica. Em 2007, Macedo et al. isolaram o ILTI, inibidor de tripsina de sementes de *I. laurina*. Os autores utilizaram a coluna de troca iônica DEAE-Sepharose no processo de purificação. A SDS-PAGE mostrou que ILTI apresenta uma massa molecular de aproximadamente 20 kDa, sob condições de redução com DTT, indicando a presença de uma cadeia polipeptídica. Bezerra et al. (2016) isolaram um inibidor de tripsina de sementes de *Inga vera*, IVTI. Em seu trabalho, o autor utilizou no processo de purificação a coluna de troca iônica DEAE-Sepharose. Após análise em SDS-PAGE, o autor constatou que o IVTI também possuía cadeia única, com massa molecular de 20 kDa.

Nesse aspecto, ILTI, ICTI e IVTI são semelhantes ao inibidor de tripsina de sementes de *Dimorphandra mollis* (DmTI) (Macedo et al., 2000; Mello et al., 2001), que pertence à família Mimosoideae, mas que também possui apenas uma cadeia polipeptídica. Outro inibidor apresentado com cadeia única é o EATI, inibidor de tripsina de *Entada acaccifolia*. Oliveira et al. (2012) mostraram que EATI possui uma massa molar relativa de 20 kDa sob condições não redutoras, composto por uma única cadeia polipeptídica. Apesar de menos frequente, os IPs podem ser formados por uma cadeia polipeptídica. Oliva et al. (2010) trazem em seu trabalho de revisão, exemplos que os inibidores Kunitz com um número variado de ligações polipeptídicas e ligações dissulfeto (nenhuma, uma ou duas ligações). Essas informações nos dão embasamento para inserir o ICTI como um IP do tipo Kunitz.

Macedo et al. (2003), apresentaram um inibidor de sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.), que mostrou que o inibidor consistia em uma única cadeia polipeptídica 20 kDa. Guimarães et al. (2015) apresentaram o PpyTI, um inibidor de tripsina de *Poincianella pyramidalis* com massa molecular de 19 kDa. Já o EtTI, inibidor de tripsina de *Enterolobium timbouva*, isolado por Oliveira et al. (2018), em condições

reduzidas apresentou 2 cadeias polipeptídicas, uma cadeia principal e uma cadeia secundária, unidas por ligações dissulfeto.

Algumas moléculas vegetais, como defensinas, IPs e peptídeos antimicrobianos (PAM), possuem atividades antifúngicas (Bezerra et al., 2016; Dib et al., 2019). Como mostrado na tabela 3, o ICTI apresentou CIM de 32,11 μM sobre o crescimento de 4 cepas de leveduras: *C. gattii* AFLP4, *C. albicans* 90028, *C. glabrata* 90030 e *C. guilliermondii* 6260. Convertendo essa concentração para mg/mL, tem-se um CIM de 0,625mg/mL. Essa conversão é necessária, pois alguns trabalhos publicados com inibidores não trabalham nas concentrações de μM , dificultando a discussão e comparação dos dados.

Bezerra et al. (2016) testaram o IVTI contra a levedura *C. buinensis*. Os autores demonstraram atividade inibitória, causando uma inibição do crescimento de 38% desta levedura a 0,125 mg/mL. Macedo et al. (2016) testaram os efeitos do ILTI no crescimento de diferentes espécies de leveduras. O autor observou a inibição completa de *C. tropicalis* na concentração de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em relação a *C. buinensis*, a inibição completa do crescimento foi observada apenas na concentração de ILTI de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ILTI inibiu 9 e 12% do crescimento de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, respectivamente. Ensaio de fluorescência demonstraram que ILTI aumentou os níveis de ROS nas células de levedura.

Oliveira et al. (2018) apresentaram os efeitos fungicidas do EtTI frente *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*. Os autores determinaram o IC_{50} para *C. albicans* de 11,66 μM , para *C. buinensis* de 16,36 μM e, para *C. tropicalis*, o IC_{50} de 21,63 μM . Entre as leveduras estudadas, *C. albicans* foi a mais sensível ao EtTI, assim como o ICTI quando testado em *Candida* spp (CIM de 32,2 μM).

Dib et al. (2019) avaliaram o potencial antifúngico de outro inibidor do gênero *Inga*, o inibidor de tripsina de *Inga edulis* (IETI). IETI teve seu efeito avaliado contra três cepas distintas: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. buinensis*. Das três espécies, *C. buinensis* foi a mais sensível ao IETI, demonstrando inibições de 51%, 81% e 87% para 200, 300 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IETI, respectivamente. O IC_{50} do IETI para *C. tropicalis* e *C. buinensis* foi de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, não surtindo efeito significativo frente a *C. albicans*. A sonda *Sytox green* foi utilizada para analisar os efeitos do IETI sobre a integridade da membrana fúngica. Os autores constataram que o inibidor foi capaz de afetar a integridade estrutural da membrana plasmática de *C. buinensis*. No IC_{50} , o tratamento com IETI causou alterações graves na morfologia e na distribuição de *C. buinensis* e *C. tropicalis*,

como desorganização citoplasmática. Sobre a falta de atividade do IETI contra *C. albicans*, os autores apontam que a diferença da atividade antifúngica do IETI é inicialmente mediada por interações específicas na superfície da membrana. Quando testado contra *Cryptococcus* ssp., IETI, ao oposto do ICTI, não foi capaz de controlar o crescimento da levedura.

O ICTI apresentou inibição às leveduras planctônicas de *C. gattii*, com CIM 32,2 μ M, inibindo a formação de biofilme em 21,5% e 35,9%, nas concentrações de 1X e 10X CIM. A erradicação do biofilme maduro foi de 22,1% e 45,2% nas mesmas condições. Com isso, pode-se indicar que a atividade do ICTI frente a *C. gattii* se limita a ação do ICTI apenas frente as células plânctônicas da levedura, não surtindo efeito frente a formação de biofilme. Tais resultados trazem uma ação de caráter inovador de IPs contra leveduras de *C. gattii*, uma vez que a busca na literatura não apresentou resultados de inibidores de peptidase contra células plânctônicas e/ou biofilme.

Os IPs podem desencadear apoptose em leveduras, bloqueando algumas serinopeptidases importantes, como metacaspases e mediador nuclear de apoptose (Nma111p) (Carmona-Gutierrez et al., 2010). Metacaspases são ortólogos de caspases de mamíferos com especificidade para clivagem dos aminoácidos básicos Arg e Lys. Esses resíduos são comumente encontrados em locais reativos de inibidores Kunitz. Alternativamente, a inibição de mediadores de apoptose, serinopeptidases também envolvidas na apoptose de leveduras, pode estar envolvida no mecanismo de ação dos IPs (Dib et al., 2019). Araújo et al. (2019), ao analisarem o efeito fungicida do inibidor de tripsina de *Cassia leiandra* Benth (CITI), observaram que CITI aumentou a permeabilidade da membrana celular de *C. albicans*. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou a presença de poros na parede celular e extravazamento do conteúdo citoplasmático. Além disso, o CITI induziu superprodução de ROS e degradação do material genético de *C. albicans*. O CITI a 2,1 μ M inibiu em 34,30% a formação de biofilmes de *C. albicans*, e diminuiu em 38,58% a biomassa de biofilmes maduros pré-formados. ICTI diminuiu a biomassa de biofilme maduros de *C. albicans* em cerca de 37% a 32,2 μ M, demonstrando um efeito reduzido frente a biofilme de *C. albicans* em relação a CITI.

Com o aumento na resistência antimicrobiana, aumentou-se a busca por alternativas que potencializem o efeito dos fármacos. Estratégias como a investigação de compostos com potencial antifúngico, a fim de ampliar o arsenal terapêutico das

doenças, e a associação de drogas com sinergismo farmacológico tem sido aplicada (Tonon et al., 2016; Araujo, 2019). A sinergia antimicrobiana baseia-se no princípio de que, em combinação com outras drogas, a formulação pode aumentar a eficácia, reduzir a toxicidade, diminuir os efeitos colaterais adversos, aumentar a biodisponibilidade, diminuir a dose, reduzir as concentrações dos antifúngicos e o desenvolvimento da resistência antimicrobiana (Tonon et al., 2016; Araujo, 2019).

O ICTI em associação com a anfotericina B se mostrou sinérgico quando administrado em *C. albicans* 90028 e em *C. gattii* AFLP4. Quando combinado a anfotericina B, as CIM do ICTI e do antifúngico foram reduzidas, mostrando que, em associação, menores quantidades de ambos compostos poderiam ser utilizados em possível tratamento. Tonon (2016) mostrou que a combinação de óleo essencial de *Coriandrum sativum* associado a anfotericina B obteve efeitos sinérgicos para *C. albicans* e aditivos para *C. tropicalis*. A busca na literatura por efeitos sinérgicos de IPs associados a antifúngicos não resultou em nenhum trabalho, mostrando o caráter inovador deste resultado.

Como apresentado nas tabelas 1 e 2, o ICTI não inibiu o crescimento bacteriano. Nossos resultados corroboram os apontados por Bezerra et al. (2016) e Macedo et al. (2016) onde os inibidores de tripsina IVTI e ILIT apresentaram papel antifúngico, sem atividade contra as cepas bacterianas testadas.

Sabe-se que o ergosterol mantém a função e integridade celular (Silva et al., 2020). Os derivados poliênicos, como o antifúngico anfotericina B, ligam-se ao ergosterol presente na membrana celular fúngica, onde interferem na permeabilidade e nas funções de transporte. Sua propriedade mais importante é sua capacidade de formar poros ou canais transmembranares que resultam no aumento da permeabilidade celular da membrana fúngica, causando alterações graves no equilíbrio iônico e, por conseguinte, em uma grande perda de uma variedade de pequenas moléculas e eletrólitos do meio intracelular, em especial a perda de K^+ intracelular, que altera a homeostase do micro-organismo (Leite et al., 2015).

A anfotericina B possui ação seletiva, ligando-se avidamente às membranas dos fungos, mas não às bacterianas. A base da especificidade é a grande afeição do fármaco pelo ergosterol, principal esterol da membrana fúngica, ausente nas células bacterianas e de animais superiores, onde o colesterol é o principal esterol. A molécula de ergosterol possui estrutura tridimensional cilíndrica, ao contrário do colesterol, que tem uma forma sigmoide. Essa diferença conformacional é provavelmente suficiente para explicar a

maior afinidade de ligação da anfotericina B sobre o ergosterol comparando ao colesterol (Leite et al., 2015). Como o ICTI teve seu CIM aumentado na adição de ergosterol livre, tanto de *C. albicans*, quanto de *C. gattii*, podemos apontar que o ICTI tenha o ergosterol como alvo em sua atividade antifúngica. Esse resultado aproxima o efeito antimicrobiano do ICTI aos derivados poliênicos, como o antifúngico anfotericina B, que não surte efeito contra bactérias, e têm o ergosterol como principal alvo.

Tão importante quanto o desenvolvimento de um novo fármaco, é a avaliação da toxicidade do mesmo frente as células saudáveis do organismo a ser tratado. Os camundongos são modelos animais predominantes usados para pesquisa de toxicidade envolvendo leveduras patogênicas. Entretanto, estes são difíceis de usar em estudo de larga escala devido ao número limitado de descendentes produzidos e excessivo custo experimental (Vicentin, 2019). Os modelos de organismos não mamíferos são alternativas viáveis para estudar a virulência de fungos e eficácia de drogas (Scorzoni, 2012). Logo, vários modelos invertebrados têm sido utilizados nas pesquisas. Um dos que mais vem se destacando é o de *Galleria mellonella* (traça de cera) (Vicentin, 2019), invertebrado que possui sistema imunológico semelhante ao sistema imune inato de mamíferos (Marcelino, 2018).

O modelo *G. mellonella* tem sido utilizado como uma alternativa não onerosa, de fácil manipulação, com possibilidade de reprodução em larga escala, rapidez na execução dos ensaios (Singulani, 2017), que é capaz de gerar dados confiáveis e reprodutíveis que refletem quase que exatamente aqueles obtidos empregando mamíferos (Marcelino, 2018). As larvas podem ser incubadas à temperatura variando entre 25 a 37 °C, possibilitando simular o habitat natural do microrganismo e em condições de infecção nos mamíferos (Scorzoni, 2012; Singulani, 2017; Marcelino, 2018). Seu emprego pode reduzir o uso de mamíferos durante as avaliações pré-clínicas, bem como os custos no desenvolvimento de medicamentos (Marcelino, 2018).

A administração de ICTI em *G. mellonella* não resultou em mortes nas concentrações de 1X e 10X o CIM (tabela 7). A busca na literatura não resultou em trabalhos analisando a toxicidade de inibidores frente a *G. mellonella*. Assim, este trabalho foi pioneiro na utilização do modelo de *G. mellonella* para avaliar a segurança de inibidores de peptidase utilizados como potenciais antifúngicos.

7 CONCLUSÃO

O ICTI é uma proteína constituída por uma única cadeia polipeptídica e apresenta atividade inibitória específica para a tripsina. O ICTI não possui atividade bactericida. Entretanto, apresentou atividade contra *C. albicans* 90028 e *C. gattii* AFLP4. A combinação de ICTI com anfotericina B apresentou efeito sinérgico. O ICTI também foi capaz de afetar a viabilidade de biofilmes fúngicos. O ICTI inibiu a formação do biofilme de *C. albicans* 90028 e *C. gattii* AFLP4, bem como promoveu a erradicação parcial de formas maduras de biofilme, assim como os demais antimicrobianos comerciais. Com base nos resultados obtidos, sugerimos que a atividade antifúngica do ICTI envolva a ligação ao ergosterol presente na membrana celular fúngica. Essa ação específica também é observada nos antifúngicos poliênicos, como a anfotericina B. Dada a capacidade do ICTI se ligar ao ergosterol, danos na membrana ocorrem, promovendo o extravasamento do conteúdo intracelular, como demonstrado pelos resultados deste trabalho. Por fim, o ICTI não se mostrou tóxico quando administrado no modelo *G. mellonella*, o que suporta ensaios futuros em outros modelos animais.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, N. M.; DIAS, L. P.; COSTA, H. P.; SOUSA, D. O.; VASCONCELOS, I. M.; DE MORAIS, G. A.; OLIVEIRA, J. T. 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 (BBA)-Biomembranes**, v. 1861, n. 11, p. 183032, 2019.

ARAUJO, G. S. **Efeito Antifúngico De Antraquinonas Contra Cryptococcus Neoformans In Vitro: Detecção De Sinergismo Entre Barbaloina E Anfotericina B**. 2019. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2019

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**, v. 113, p. 933-943, 2018.

BEZERRA, C. S.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; MACHADO, O. L. T.; DE MELLO, G. S. V.; DA ROCHA PITTA, M. G.; DE MELO RÊGO, M. J. B.; MACEDO, M. L. R. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: a multifunctional Kunitz inhibitor. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 6, p. 792-803, 2016.

BORBA, M. R. **Resistência a antimicrobianos criticamente importantes à saúde humana em populações bacterianas de animais de produção criados no Brasil, 2008 a 2017**. 2018. Dissertação (Mestrado) - Curso de Especialização em Saúde Pública. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAI, X.; XIE, X.; FU, N.; WANG, S. Physico-chemical and antifungal properties of a trypsin inhibitor from the roots of *Pseudostellaria heterophylla*. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2388, 2018.

CALDERON, L. A.; ALMEIDA FILHO, H. A.; TELES, R. C.; MEDRANO, F. J.; BLOCH JR, C.; SANTORO, M. M.; FREITAS, S. M. Purification and structural stability of a trypsin inhibitor from Amazon *Inga cylindrica* [Vell.] Mart. seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 73-79, 2010.

CARAMORI, S. S.; SOUZA, A. A.; FERNANDES, K. F. Caracterização bioquímica de frutos de *Inga alba* (Sw.) Willd. e *Inga cylindrica* Mart (Fabaceae). **Revista Saúde e Ambiente**, v. 9, n. 2, p. 16-23, 2009.

CARNEIRO, F. C.; WEBER, S. S.; SILVA, O. N.; JACOBOWSKI, A. C.; RAMADA, M. H. S.; MACEDO, M. L. R.; FRANCO, O. L.; PARACHIN, N. S. Recombinant *Inga laurina* Trypsin Inhibitor (ILTI) Production in *Komagataella phaffii* Confirms Its Potential Anti-Biofilm Effect and Reveals an Anti-Tumoral Activity. **Microorganisms**, v.6, n. 2, 2018.

CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; BOEKHOUT, T.; HAGEN, F.; KLAASSEN, C. H.; MEIS, J. F. Temperate climate niche for *Cryptococcus gattii* in Northern Europe. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 172, 2012.

CHOWDHARY, A., PRAKASH, A., RANDHAWA, H. S., KATHURIA, S., HAGEN, F., KLAASSEN, C. H., & MEIS, J. F. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii*, genotype AFLP5, from India and a global review. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 222-228, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Protocol M27-A3. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of Yeast**. 4th ed. Pennsylvania: NCCLS, 70p. 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Protocol M7-A6. Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility testing of bacteria**. 2nd ed. Pennsylvania: NCCLS, 70p. Substitui a Norma M7-A5. Vol. 20 No. 2. 2003.

COELHO, M. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 406-414, 2007.

COLARES, L. F.; SANTOS NETO, A. R.; CORDEIRO, I. H.; CASTRO, S. B. R. D.; VERLY, R. M.; ALVES, C. C. D. S.; CARLI, A. D. P. Detection of protease inhibitors in seeds of *Punica granatum*. **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 270-274, 2017.

COSTA-ORLANDI, C. B.; SARDI, J. C.; PITANGUI, N. S.; DE OLIVEIRA, H. C.; SCORZONI, L.; GALEANE, M. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 22, 2017.

CUPERTINO, V. M. L. Prevalência de genes de resistência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de animais de produção. 2016.

DANTZGER, M.; VASCONCELOS, I. M.; SCORSATO, V.; APARICIO, R., MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Bowman–Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. **Phytochemistry**, v. 118, p. 224-235, 2015.

DE OLIVEIRA, D. M., FORDE, B. M., KIDD, T. J., HARRIS, P. N., SCHEMBRI, M. A., BEATSON, S. A., WALKER, M. J. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 3, p. e00181-19, 2020.

DE SOUZA, D. D.; BRANDÃO-COSTA, R. M. P.; ALBUQUERQUE, W. W. C.; PORTO, A. L. F. Partial purification and characterization of a trypsin inhibitor isolated from *Adenantha pavonina* L. seeds. **South African journal of botany**, v. 104, p. 30-34, 2016.

DIB, H. X.; DE OLIVEIRA, D. G. L.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; TAVEIRA, G. B.; DE OLIVEIRA MELLO, E.; VERBISK, N. V.; MACEDO, M. L. R. Biochemical characterization of a Kunitz inhibitor from *Inga edulis* seeds with antifungal activity against *Candida* spp. **Archives of microbiology**, v. 201, n. 2, p. 223-233, 2019.

EMERI, F. T. D. A. S. D.; ROSALEN, P. L.; PAGANINI, E. R.; GARCIA, M. A. R.; NAZARE, A. C.; LAZARINI, J. G.; SARDI, J. D. C. O. Antimicrobial activity of nitrochalcone and pentyl caffeate against hospital pathogens results in decreased microbial adhesion and biofilm formation. **Biofouling**, v. 35, n. 2, p. 129-142, 2019.

ESPINO, M.; SOLARI, M.; DE LOS ÁNGELES FERNÁNDEZ, M.; BOITEUX, J.; GÓMEZ, M. R.; SILVA, M. F. NADES-mediated folk plant extracts as novel antifungal agents against *Candida albicans*. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 167, p. 15-20, 2019.

FROST, D. J; BRANDT, K. D., CUGIER, D; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.48, n.4, p. 306-310, Apr. 1995.

GITLIN-DOMAGALSKA, A.; MACIEJEWSKA, A.; DĘBOWSKI, D. Bowman-Birk inhibitors: Insights into family of multifunctional proteins and peptides with potential therapeutical applications. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 12, p. 421, 2020.

GESSNER, M. O. Ergosterol as a measure of fungal biomass. In: Methods to study litter decomposition. **Springer**, Cham, 2020. p. 247-255.

GOMES, T. A., ELIAS, W. P., SCALETSKY, I. C., GUTH, B. E., RODRIGUES, J. F., PIAZZA, R. M., MARTINEZ, M. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3-30, 2016.

GONÇALVES, A. H. **Mecanismo de ação e toxicidade da anfotericina B no tratamento de micoses**. 2011. Monografia (Especialização) - Curso de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

GUIMARÃES, L. C.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; MARANGONI, S.; DE OLIVEIRA, D. G. L.; MACEDO, M. L. R. Purification and characterization of a Kunitz inhibitor from *Poincianella pyramidalis* with insecticide activity against the Mediterranean flour moth. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 118, p. 1-9, 2015.

HARDING, M.W.; MARQUES, L.L.; HOWARD, R.J.; OLSON, M.E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.

HERWADE, A. P.; KASAR, S. S.; RANE, N. R.; AHMED, S.; MARAS, J. S.; PAWAR, P. K. Characterization of a Bowman–Birk type trypsin inhibitor purified from seeds of *Solanum surattense*. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021.

KANGOGO, M.; BADER, O.; BOGA, H.; WANYOIKE, W.; FOLBA, C.; WORASILCHAI, N.; BII, C. C. Molecular types of *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex from clinical and environmental sources in Nairobi, Kenya. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 665-670, 2015.

KAUR, J.; SINGH, P. K. Trypsin Detection Strategies: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p. 1-19, 2020.

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

LAZAREVIĆ, J.; JANKOVIĆ-TOMANIĆ, M. Dietary and phylogenetic correlates of digestive trypsin activity in insect pests. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 157, n. 2, p. 123-151, 2015.

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.

LIMA, N. M.; SANTOS, V. N. C.; PORTA, L. Quimiodiversidade, bioatividade e quimiosistemática do gênero *Inga* (Fabaceae): uma breve revisão. **Revista Virtual Química**, v. 10, n. 3, p. 459-473, 2018.

LOHSE, M. B.; GULATI, M.; JOHNSON, A. D.; NOBILE, C. J. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19-31, 2018.

MA, Y. X.; WANG, C. Y.; LI, Y. Y.; LI, J.; WAN, Q. Q.; CHEN, J. H.; NIU, L. N. Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. **Advanced Science**, v. 7, n. 1, p. 1901872, 2020.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. D. G. M.; CABRINI, E. C.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1621, n. 2, p. 170-182, 2003.

MACEDO, M.L.R. Purification and characterization of a lectin from *Annona coriacea* seeds. **Protein Pept. Lett.** V.10, p. 165–173, 2003.

MACEDO, M. L. R.; GARCIA, V. A.; FREIRE, M. D. G.; RICHARDSON. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry** 68, 1104–1111, 2007.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. D. G. M.; DA SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 486-498, 2007.

MACEDO, M. L. R.; DURIGAN, R. A.; DA SILVA, D. S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M. D. G. M.; PARRA, J. R. P. *Adenantha pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, v. 73, n. 4, p. 213-231, 2010.

MACIEL, J. F. **Caracterização genotípica e fenotípica de isolados de *Escherichia coli* oriundos de animais de produção**. 2017. Tese (Doutorado) – Curso de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Marina, 2017.

MAESTRALE, C.; MASIA, M.; PINTUS, D.; LOLLAI, S.; KOZEL, T. R.; GATES-HOLLINGSWORTH, M. A.; LIGIOS, C. Genetic and pathological characteristics of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from meningoencephalitis in autochthonous goats and mouflons, Sardinia, Italy. **Veterinary microbiology**, v. 177, n. 3-4, p. 409-413, 2015.

MARCELINO, M. Y. **Desenvolvimento de derivados nitrofuranos antifúngicos para o controle de infecções por *Candida* spp.** 2018. Tese (Doutorado)

- Curso de Microbiologia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Araraquara, 2018.

MARTINEZ, L.R.; FRIES, B.C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. *Current fungal infection reports*, v. 4, n. 4, p. 266-275, 2010. MELLO, M. O., SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. ***Brazilian Journal of Plant Physiology***, v. 14, p. 71-81, 2002.

MUHLIA-ALMAZÁN, A.; SÁNCHEZ-PAZ, A.; GARCÍA-CARREÑO, F. L. Invertebrate trypsins: a review. ***Journal of Comparative Physiology B***, v. 178, n. 6, p. 655-672, 2008.

MULANI, M. S.; KAMBLE, E. E.; KUMKAR, S. N.; TAWRE, M. S.; PARDESI, K. R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. ***Frontiers in microbiology***, v. 10, p. 539, 2019.

NETT, J.; ANDES, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. ***Current opinion in microbiology***, v. 9, n. 4, p. 340-345, 2006. OLIVA, M. L. V.; SILVA, M. C.; SALLAI, R. C.; BRITO, M. V.; SAMPAIO, M. U. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. ***Biochimie***, v. 92, n. 11, p. 1667-1673, 2010.

OLIVEIRA, C. F. R. **Aspectos funcionais e estruturais do inibidor de tripsina de *Entada acaciifolia***. Dissertação (Mestrado) – Curso de Bioquímica. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

OLIVEIRA, C. F. R., MARANGONI, S., & MACEDO, M. L. R.. The trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* seeds affects negatively the development of Mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella*. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 108, p. 74-79, 2014.

OLIVEIRA, C. F.; OLIVEIRA, C. T.; TAVEIRA, G. B.; DE OLIVEIRA MELLO, E.; GOMES, V. M.; MACEDO, M. L. R. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor from *Enterolobium timbouva* with activity against *Candida* species. ***International journal of biological macromolecules***, v. 119, p. 645-653, 2018.

ORSI, A. M. **Capacidade de formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* causadores de mastite bovina**. 2017. Tese (Doutorado) – Curso de Medicina Veterinária. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

PATRIOTA, L. L.; PROCÓPIO, T. F.; DE SOUZA, M. F.; DE OLIVEIRA, A. P. S.; CARVALHO, L. V.; PITTA, M. G.; NAPOLEÃO, T. H. A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 611, 2016.

PEREIRA, Rafael et al. Atividade antifúngica, sinergismo e citotoxicidade do extrato etanólico da casca de *Myroxylon peruiferum* Lf. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 1, 2018.

RAMALHO, S. R. **Purificação e caracterização molecular de um inibidor de peptidase de sementes de *Platypodium elegans* Vogel (FABACEAE) e o seu potencial antimicrobiano**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2016.

RAWLINGS, N. D.; WALLER, M.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D503-D509, 2014.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

SARDI, J. D. C. O.; GULLO, F. P.; FREIRES, I. A.; DE SOUZA PITANGUI, N.; SEGALLA, M. P.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 86, n. 4, p. 387-391, 2016.

SCORZONI, L. **Modelos não convencionais para estudo de interação fungo-hospedeiro e ação antifúngica**. 2012. Tese (Doutorado) Curso de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012

SILVA, D. M.; MENEZES, E. M. N.; SILVA, E. V.; LAMOUNIER, T. A. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of ESKAPE pathogens from the Federal District, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, p. 240-245, 2017.

SILVA, T. C.; DE ÁVILA, R. I.; ZARA, A. L. S. A.; SANTOS, A. S.; ATAÍDES, F.; FREITAS, V. A. Q.; SILVA, M. D. R. R. Punicalagin triggers ergosterol biosynthesis disruption and cell cycle arrest in *Cryptococcus gattii* and Brazilian **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1719-1727, 2020.

SINGULANI, J. L. **Pesquisa de novas terapias e de biomarcadores na paracoccidiodomicose: estudo da atividade antifúngica e toxicidade de galatos de alquila em modelos alternativos e camundongos e identificação de microRNAs circulantes**. 2017. Tese (Doutorado) – Curso de Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2017.

SOUTO, X. M.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. Chymotrypsin-and trypsin-like activities secreted by the multidrug-resistant yeasts forming the *Candida haemulonii* complex. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZIKA, D. F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS** v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

STOTZ, H. U.; KROYMANN, J.; MITCHELL-OLDS, T. Plant-insect interactions. **Current opinion in plant biology**, v. 2, n. 4, p. 268-272, 1999.

SUGIO, A.; DUBREUIL, G.; GIRON, D.; SIMON, J. C. Plant–insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 2, p. 467-478, 2015.

TONON, C. C. **Terpinen-4-ol: estudo do efeito sinérgico/aditivo, adesão em co-cultura e alteração dos fatores de virulência sobre *Candida* spp.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Curso de Odontologia. Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2016.

VALADARES, S. N. S. **Composição química, toxicidade e atividade biológica de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke (Leguminosae)**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2017.

VERSTREPEN, K.J.; KLIS, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular microbiology**, v. 60, n. 1, p. 5-15, 2006.

VICENTIN, M. C. G. **Estudo de peptídeos antimicrobianos contra *Candida albicans* e avaliação da segurança em modelo Zebrafish (*Danio rerio*)**. 2019. Tese (Doutorado) – Curso de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, São Paulo, 2019

XUE, X.; DENG, H.; ZHAO, L.; ZANG, X.; ASUQUO, I. P.; MENG, M.; PAN, I. Cryptococcosis caused by *cryptococcus gattii*: 2 case reports and literature review. **Medicine**, v. 99, n. 50, 2020.

ANEXO

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



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A315278

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

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

Espécie

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

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

Título da Atividade:

**BUSCA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DE ORIGEM NATURAL OU
SINTÉTICA**

Equipe

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

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

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

Situação do Cadastro: **Concluído**

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



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