

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE COTILÉDONES DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana*
SOBRE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

BARBARA MASIEIRO CUNHA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2023

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE COTILÉDONES DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana*
SOBRE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

BARBARA MASIEIRO CUNHA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da UENF como parte
das exigências para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kátia Valevski Sales Fernandes

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UNF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora

C972

Cunha, Barbara Masieiro.

Atividade antifúngica de cotilédones de sementes de *Clitoria fairchildiana* sobre leveduras do gênero *Candida* / Barbara Masieiro Cunha. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

72 f.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2023.

Orientadora: Katia Valevski Sales Fernandes.

Coorientadora: Maria Aparecida Aride Bertoncelli.

1. *Clitoria fairchildiana*. 2. Proteínas. 3. Sementes. 4. *Candida*. 5. Antifúngicos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

BARBARA MASIEIRO CUNHA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE COTILÉDONES DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana*
SOBRE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2023.

Comissão Examinadora:



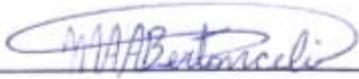
Prof.ª Dr.ª Kátia Valevski Sales Fernandes - UENF (orientadora)



Prof.ª Dr.ª Ana Eliza Zeraik - UENF



Prof.ª Dr.ª Érica de Oliveira Mello - UENF



Dr.ª Maria Aparecida Aride Bertoneceli - UENF (coorientadora)



Prof. Dr. Umberto Zottich - UFRR

DEDICATÓRIA

*À minha amada mãe, minha maior inspiração,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde, sabedoria e por me conduzir na busca por meus objetivos. Sem Ele nada sou. À minha mãe, Regina Célia Masieiro, meu maior exemplo, orgulho e inspiração, por todo esforço destinado à minha formação moral e profissional. Ao meu irmão, Carlos Muryllo Masieiro, cúmplice, conselheiro e amigo, por todo o apoio na busca de meus ideais.

Agradeço à professora Dr.^a Kátia Fernandes, por ser um exemplo de cientista, pela orientação paciente, por todo estímulo, atenção e por todos os ensinamentos durante esta jornada. À Maria Aparecida Bertonceli, pela co-orientação desde a Iniciação Científica, por todo tempo, suporte, cuidado e atenção dedicados a mim durante esta trajetória. À professora Dr.^a Valdirene Gomes pela colaboração, por todas as contribuições e dúvidas esclarecidas durante o processo de pesquisa. À Larissa Resende, pela amizade, por todo apoio, incentivo e paciência. Por não hesitar em me ajudar, mesmo nas situações mais complexas. Ao professor Dr. Vanildo Silveira e ao seu aluno, Dr. Caio Correa, pela colaboração, por toda paciência e força de vontade em me auxiliar.

Agradeço à Arielle Bessiati, Amanda Machado e Marcela Rezende, pela amizade, por todo apoio e incentivo durante esta jornada, tornando-a mais leve.

Agradeço às professoras Dr.^a Érica Mello, Dr.^a Ana Eliza Zeraik e ao professor Dr. Umberto Zottich, por aceitarem fazer parte da banca examinadora e contribuírem para o enriquecimento deste trabalho.

Agradeço aos colegas, professores e técnicos do LQFPP e do LFBM, pela boa vontade em me auxiliar em tudo que precisei.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo suporte proporcionado e pela oportunidade de capacitação acadêmica competente.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xErro! Indicador não definido.
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. Introdução.....	15
1.1 Resistência antimicrobiana.....	15
1.1.1 Antifúngicos sistêmicos.....	16
1.2 Leveduras do gênero <i>Candida</i>.....	17
1.2.1 Mecanismos de resistência de leveduras do gênero <i>Candida</i>.....	18
1.3 Proteínas de sementes com potencial biotecnológico.....	19
1.4 <i>Clitoria fairchildiana</i>.....	21
1.4.1 Potencial biotecnológico de sementes de <i>Clitoria</i>.....	21
2. Objetivos.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. Material e Métodos.....	23
3.1 Materiais Biológicos.....	23
3.1.1 Sementes de <i>Clitoria fairchildiana</i> R.A. (Fabaceae).....	23
3.1.2 Obtenção das leveduras.....	23
3.2 Extração proteica de sementes de <i>Clitoria faichildiana</i>.....	23
3.3 Dosagem de proteínas.....	24
3.4 Visualização proteica por SDS-PAGE.....	24
3.4.1 Preparo das amostras e condições de corrida.....	25
3.4.2 Revelação das bandas proteicas utilizando Azul de Coomassie.....	25
3.4.3 Revelação das bandas proteicas utilizando nitrato de prata.....	25
3.5 Ensaio de inibição do crescimento fúngico.....	26
3.6 Western Blotting.....	26
3.6 Cromatografia de exclusão molecular.....	27
3.8 Visualização do perfil cromatográfico por CCDA.....	27
3.9 Análise de frações proteicas por espectrometria de massas.....	28
3.9.1 Preparo das amostras proteicas.....	28
3.9.2 Análise por espectrometria de massas.....	29
3.9.3 Bioinformática e análises estatísticas.....	30
3.10 Ensaio de determinação de permeabilização de membranas fúngicas.....	31

3.11 Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio intracelular	31
3.12 Métodos de análises estatísticas.....	31
4. Resultados	32
4.1 Fracionamento proteico	32
4.2 Visualização do perfil proteico por SDS-PAGE	32
4.3 Efeito inibitório de diferentes concentrações das frações proteicas de cotilédones de <i>C. fairchildiana</i> sobre leveduras do gênero <i>Candida</i>	33
4.4 Análise por Western Blotting	41
4.5 Isolamento e caracterização das proteínas antifúngicas.....	41
4.6 Efeito inibitório de diferentes concentrações das frações cromatográficas de F4 sobre leveduras do gênero <i>Candida</i>	43
4.7 Efeito de F4P1 sobre a permeabilidade de membranas das células de leveduras do gênero <i>Candida</i>	49
4.8 Efeito de F4P1 sobre níveis endógenos de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células de leveduras.....	51
4.9 Análise das frações F4P2 e F4P3 por espectrometria de massas.....	53
5. Discussão.....	56
6. Conclusões.....	61
7. Referências Bibliográficas.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visualização eletroforética do perfil proteico das frações extraídas dos cotilédones das sementes de <i>C. fairchildiana</i> em gel de SDS-PAGE 12%.....	33
Figura 2: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero <i>Candida</i> pela fração 1 (F1) extraída dos cotilédones das sementes de <i>C. fairchildiana</i>	34
Figura 4: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero <i>Candida</i> pela fração 2 (F2) extraída dos cotilédones das sementes de <i>C. fairchildiana</i>	36
Figura 5: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero <i>Candida</i> pela fração 3 (F3) extraída dos cotilédones das sementes de <i>C. fairchildiana</i>	37
Figura 6: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero <i>Candida</i> pela fração 4 (F4) extraída dos cotilédones das sementes de <i>C. fairchildiana</i>	38
Figura 7: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero <i>Candida</i> pela fração 5 (F5) de cotilédones das sementes de <i>C. fairchildiana</i>	39
Figura 8: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero <i>Candida</i> pela fração 6 (F6) extraída dos cotilédones das sementes de <i>C. fairchildiana</i>	40
Figura 9: Western blotting da fração 4 (F4) anteriormente demonstrada como potencial antifúngico. AI e BI – gel espelho.....	41
Figura 10: Cromatografia de exclusão molecular da fração 4 (F4), em coluna de Sephadex G-50.....	42
Figura 11: Perfis proteico (A) e de metabólitos secundários (B) dos picos da fração 4 (F4)....	43
Figura 12: Análise da inibição do crescimento de leveduras do gênero <i>Candida</i> expostas a diferentes concentrações de F4/P1 (pico 1 da fração 4) por 24 h.....	44
Figura 13: Análise da inibição do crescimento de leveduras do gênero <i>Candida</i> expostas a diferentes concentrações de F4/P2 (pico 2 da fração 4) por 24h.....	46

- Figura 14:** Análise da inibição do crescimento de leveduras do gênero *Candida* expostas a diferentes concentrações de F4/P3 (pico 2 da fração 4) por 24 h. CN - controle negativo.....48
- Figura 15:** Análise de permeabilização de membrana por microscopia de fluorescência das leveduras *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*.....50
- Figura 16:** Análise de estresse oxidativo por microscopia de fluorescência para detecção do aumento endógeno de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) nas leveduras *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação dos peptídeos obtidos de F4P2 por massas, através de alinhamento de aminoácidos, utilizando o software no BLAST.....	54
Tabela 2: Identificação dos peptídeos obtidos de F4P3 por massas, através de alinhamento de aminoácidos, utilizando o software no BLAST.....	55

ABREVIATURAS

AmB	anfotericina B
AMPs	do inglês, antimicrobial peptides
BCA	do inglês, bicinconic acid
CCDA	cromatografia de camada delgada analítica
DIC	do inglês, differential interference contrast
GOF	ganho de função
IC50	do inglês, inhibitory concentration that diminishes a specified response to 50%
kDa	quilodaltons
LTPs	do inglês, lipid transfer proteins
MIC	do inglês, minimum inhibitory concentration
PBS	do inglês, phosphate-buffered saline
RAM	resistência antimicrobiana
RIPs	do inglês, ribosome inactivating proteins
RMN	ressonância magnética nuclear
ROS	do inglês, reactive oxygen species
SDS	dodecil sulfato de sódio TEMED N, N", N"', N''''-tetrametiletlenodiamino

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência fúngica às drogas usadas para o controle desses microrganismos, a chamada Resistência Antimicrobiana (RAM), é uma ameaça global para a saúde, pois fúngicas estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade. Há pois necessidade constante de uso de novos agentes antifúngicos. A planta alvo de nosso estudo, *Clitoria fairchildiana*, é uma leguminosa nativa da região Amazônica, não domesticada, sem relatos na literatura acerca da refratariedade das sementes desta espécie à predação. Nosso grupo de pesquisa vem investigando a espécie, buscando moléculas proteicas e não-proteicas, com potencial biotecnológico. No presente trabalho, as proteínas das sementes foram fracionadas em albuminas (F1), globulinas (F2), kafirinas (F3), glutelinas (F4), kafirinas com ligações cruzadas (F5) e glutelinas com ligações cruzadas (F6). As frações proteicas foram quantificadas e visualizadas por SDS-PAGE. O seu potencial antifúngico de inibição do crescimento das leveduras *C. albicans*, *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* e *C. mogi*, foi avaliado em diferentes concentrações (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A fração proteica F4 mostrou-se potencialmente mais tóxica às leveduras de importância médica do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* e *C. mogi*), quando comparada às outras, na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A F4 foi sub-fracionada em Sephadex G-50, onde foram obtidos 3 picos (F4P1, F4P2, e F4P3), que foram posteriormente testados sobre *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*, em concentrações de 1, 3, 6, 12, 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os picos se mostraram tóxicos para as três espécies, em especial F4P2 e F4P3, que provocaram acima de 98% de inibição sobre as três leveduras desde a menor concentração testada. A F4P1, a única onde os bioensaios permitiram a recuperação de células fúngicas viáveis após o tratamento, não causou alterações na permeabilidade das membranas das células fúngicas. Pelo fato de encontrarem-se, aparentemente, bastante isolados, de acordo com visualização por eletroforese em gel de poliacrilamida, e também por conta de seu alto potencial tóxico sobre as leveduras testadas, os picos F4P2 e F4P3, da fração F4, foram analisados por espectrometria de massas. Os resultados obtidos mostram que tais frações não se encontram totalmente isoladas, mas que aparentemente reúnem uma mistura de proteínas de reconhecidas atividades antifúngicas, como vicilinas, defensinas, LTPs e hidrolases.

Palavras chave: *Candida*, *Clitoria fairchildiana*, Leveduras, Proteínas, Antifúngico

ABSTRACT

According to OMS, fungal resistance to drugs used to control these microorganisms, the so-called Antimicrobial Resistance (AMR), is a global threat to health, as fungi are associated with high rates of morbidity and mortality. There is therefore a constant need for the use of new antifungal agents. The target plant of our study, *Clitoria fairchildiana*, is a legume native to the Amazon region, not domesticated, with no reports in the literature about the refractoriness of seeds of this species to predation. Our research group has been investigating the species, looking for protein and non-protein emissions with biotechnological potential. In the present work, seed proteins were fractionated into albumins (F1), globulins (F2), kaphyrins (F3), glutelins (F4), cross-linked kaphyrins (F5) and cross-linked glutelins (F6). Protein fractions were quantified and visualized by SDS-PAGE. Its antifungal potential against the growth of *C. albicans*, *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* and *C. mogi* yeasts was evaluated at different concentrations (25, 50, 75 and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). The protein produced F4 proved to be potentially more toxic to yeasts of medical importance of the genus *Candida* (*C. albicans*, *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* and *C. mogi*), when unexpected to others, in concentration of 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The F4 was sub-fractionated in Sephadex G-50, where 3 peaks were obtained (F4P1, F4P2, and F4P3), which were later tested on *C. albicans*, *C. buinensis* and *C. parapsilosis*, in concentrations of 1, 3, 6, 12, 25 and 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The peaks felt toxic for the three species, especially F4P2 and F4P3, which caused over 98% of pass over the three yeasts from the lowest concentration. F4P1, the only one where bioassays allowed the recovery of viable fungal cells after treatment, causing no changes in the permeability of fungal cell membranes. Due to the fact that they are apparently quite isolated, according to visualization by electrophoresis in polyacrylamide gel, and also due to their high toxic potential on fermented yeasts, the F4P2 and F4P3 peaks, from the F4 collection, were analyzed by mass spectrometry. The results obtained show that such fractions are not fully understood, but that they apparently gather a mixture of proteins with recognized antifungal activities, such as vicilins, defensins, LTPs and hydrolases.

Key words: *Candida*, *Clitoria fairchildiana*, Yeasts, Proteins, Antifungal

1. Introdução

1.1 Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana (RAM) representa uma grande ameaça à saúde humana em todo o mundo, e agora é considerada como uma questão crítica de saúde. Ela ocorre por conta de microrganismos - incluindo bactérias, fungos, vírus e parasitas - que sofrem alterações quando expostos a antimicrobianos. Organismos resistentes às drogas convencionais não se limitam mais apenas a ambientes hospitalares, mas agora são frequentemente identificados em ambientes comunitários, sugerindo que reservatórios de microrganismos resistentes a antibióticos e fungicidas estão presentes fora do hospital (Murray et al., 2022; Munita et al., 2016).

O fenômeno de resistência antimicrobiana tornou-se um grande desafio clínico e esta tem sido atribuída ao uso extensivo e muitas vezes desnecessário de antimicrobianos que impulsionam a seletividade e a resposta evolutiva dos microrganismos. Além disso, a falta de investimento no desenvolvimento de novos medicamentos pela indústria farmacêutica também não contribui muito para o confronto desse problema (Michael et al., 2014; Ventola, 2015). A RAM é considerada uma grande ameaça civilizatória e em 2014 foi reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como um desafio mundial. Estima-se que 10 milhões de mortes serão creditadas anualmente a essa causa até 2050 (Silva et al., 2020).

A pandemia de COVID-19 propiciou o aumento de casos de resistência antimicrobiana devido ao aumento do uso indiscriminado de antibióticos como a azitromicina (Rawson et al., 2020). Foi, desta forma, criado um contexto de caos hospitalar, que promoveu no Brasil condições ideais para a emergência da *Candida auris*, microrganismo intitulado de “superfungo”, devido às altas taxas de mortalidade associadas à infecção da corrente sanguínea, bem como à sua multirresistência a diversos antifúngicos. Este patógeno oportunista foi relatado pela primeira vez no Japão, em 2009, em um caso de otomicose (Sato et al., 2009). A partir de então, há relatos de infecções causadas pela levedura em todos os continentes, com exceção da Antártica, sendo considerada tanto como agente causador de infecções invasivas, como espécie colonizadora (Lockhart et al., 2017; Lone e Ahmad, 2019; Chow et al., 2020). O primeiro caso no Brasil foi relatado em 2020 na cidade de Salvador, onde o fungo foi isolado como colonizador de dois pacientes hospitalizados após contraírem o coronavírus 2019. Em janeiro de 2023, foi relatado o terceiro e maior surto no país de pacientes colonizados por *Candida auris* (De Melo et al., 2023). Este cenário torna-se preocupante por conta da rapidez com que algumas cepas desta levedura desenvolvem resistência aos principais medicamentos utilizados para tratar infecções por *Candida*, como

fluconazol, anfotericina B e equinocandinas (Almeida et al., 2021; Rizvi et al., 2021; De Melo et al., 2023).

O alarmante cenário de resistência antimicrobiana aos fármacos convencionais disponíveis comercialmente torna a busca por novas opções terapêuticas uma necessidade. A redefinição de medicamentos surgiu recentemente como uma abordagem alternativa e importante para identificar rapidamente moléculas eficazes e combinações de medicamentos para combater microrganismos resistentes a medicamentos, envolvendo a produção de compostos com menores custos e tempo de desenvolvimento, utilizando tecnologias de produção diversificadas (Cheng et al., 2019).

1.1.1 Antifúngicos sistêmicos

O aumento dos casos de infecções fúngicas invasivas, bem como as opções terapêuticas limitadas para combatê-las, configura-se em uma situação alarmante. Os antifúngicos utilizados atualmente são úteis e apresentam excelente atividade *in vitro*. Entretanto, perdem a eficácia após algum tempo de uso por conta do desenvolvimento de resistência por parte dos fungos (Quiles-Merelo & Garcia-Rodriguez, 2021).

Estima-se que as infecções fúngicas invasivas estejam associadas a 1,5 milhão de mortes a cada ano e a maioria das micoses invasivas são causadas por fungos dos gêneros *Candida* e *Aspergillus* (Pianalto & Alspaugh, 2016). O arsenal terapêutico contra estas infecções é muito limitado. Existem quatro famílias de alternativas terapêuticas disponíveis e que podem ser administradas por via oral ou intravenosa, que são os polienos, azólicos, equinocandinas e análogos de pirimidina (Quiles-Merelo & Garcia-Rodriguez, 2021).

Os polienos são uma classe de macrólidos que apresentam cadeias insaturadas com baixa biodisponibilidade através do trato digestivo e com baixa solubilidade em água. Atuam através da ligação aos esteróis da membrana fúngica, principalmente o ergosterol. Isso faz com que se formem canais na membrana plasmática das células fúngicas, fazendo com que estas percam o conteúdo citoplasmático, ocasionando a morte celular. Esta família apresenta três moléculas utilizadas no tratamento de micoses, sendo elas a nistatina, a natamicina e a anfotericina B (AmB), sendo esta última altamente ativa contra os gêneros *Cryptococcus* e *Candida* (Robbins et al., 2016).

Os azóis são moléculas sintéticas que apresentam um anel heterocíclico ligado a uma cadeia alifática com um grupo fenil. Existem duas famílias de azóis, separadas de acordo com os átomos de nitrogênio contidos no anel azólico: imidazóis, que possuem dois átomos de nitrogênio (clotrimazol, cetoconazol e miconazol) e triazóis, com três átomos (fluconazol,

itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol). Sua ação se dá através do bloqueio da síntese de ergosterol, a partir da inibição da enzima C14- α esterol demetilase, fazendo com que ocorra acúmulo de esteróis tóxicos que degradam a integridade da membrana celular e inibem o crescimento da célula fúngica. Os imidazóis apresentam boa atividade sobre leveduras endêmicas e fungos dimórficos (Schmalreck et al., 2012; Snelders et al., 2008).

As equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos que inibem a ação da enzima 1,3- β -D-glucana sintase, responsável pela síntese de 1,3- β -D-glucana, polissacarídeo essencial presente na parede celular de muitas espécies fúngicas. Isso causa o enfraquecimento da parede celular, promovendo instabilidade osmótica na célula e sua morte. São drogas fungicidas contra *Candida*. Atualmente, há três equinocandinas aprovadas para uso clínico: caspofungina, micafungina e anidulafungina (Espinel-Ingroff, 1998; Arendrup, 2013).

E por fim, como exemplo de análogos de pirimidina temos a 5-fluorocitosina, que atua interferindo na síntese de DNA e RNA de fungos. Em razão de seus efeitos adversos e pelas altas taxas de desenvolvimento de resistência, sua utilização clínica tem sido limitada (Quiles-Merelo & Garcia-Rodriguez, 2021).

1.2 Leveduras do gênero *Candida*

Desde o tempo de Hipócrates, infecções por *Candida* têm sido observadas em pacientes debilitados. Atualmente, sabe-se que o gênero *Candida* é composto por aproximadamente 200 espécies, e aproximadamente 10 são responsáveis por infecções no homem, causadoras de micoses superficiais ou invasivas (Serracarbassa et al., 2003).

Espécies do gênero *Candida* são leveduras que possuem a forma de micélio e hifa, mantendo na maioria das vezes a morfologia de hifas e exibindo característica de pseudomicélio em certos ambientes nutricionais (Silva et al., 2002). São hospedeiras oportunistas, envolvidas em infecções superficiais e sistêmicas; são fungos diploides, trimórficos e residem em equilíbrio com a microbiota e o sistema imune do hospedeiro do ser humano (Heinz et al., 2004). Existem como um comensal na cavidade oral, intestinal ou trato genital da maioria dos indivíduos, retraído pela microbiota local, por barreiras epiteliais e defesas imunológicas. Porém, sua perturbação pode levar ao crescimento fúngico desordenado e ao conseqüente desenvolvimento de infecções nas mucosas, como candidíase orofaríngea ou vulvovaginal, e pacientes com imunidade comprometida são suscetíveis ao espalhamento destas como infecções sistêmicas, que podem ser fatais (d'Enfert et al., 2020).

O espectro da doença da candidíase invasiva varia de crônica minimamente sintomática à sepsse fulminante, com mortalidade associada superior a 70% (Pappas et al., 2018). A eficácia do tratamento antifúngico é comprometida pela toxicidade limitada das drogas e desenvolvimento da resistência pelos fungos. Além disso, o crescente número de pacientes mais velhos, o contínuo surgimento de cepas clinicamente agressivas, e a tolerância a medicamentos antifúngicos existentes elevaram a propagação da infecção, justificando a busca por terapias eficazes (Shahina et al., 2022).

Candida albicans é a espécie mais comum do gênero e continua sendo o principal agente etiológico da candidíase, entretanto a prevalência desses organismos varia consideravelmente a depender da localização geográfica (Romo et al., 2017). A espécie *Candida auris* tem se tornado uma grande preocupação de saúde pública, por conta de sua propensão à resistência a medicamentos, modo e ritmo de transmissão, taxa de letalidade e a possibilidade de que fatores biológicos e epidemiológicos possam aumentar o surgimento mundial de infecções por este patógeno (Kordalewska & Perlin, 2019). Espécies como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* são também, atualmente, frequentemente identificadas como patógenos humanos, sendo igualmente consideradas um risco à saúde humana (Silva et al., 2012; Shahina et al., 2022). São alvos específicos de nosso trabalho as espécies *C. albicans*, *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* e *C. mogi*.

1.2.1 Mecanismos de resistência de leveduras do gênero *Candida*

A resistência antifúngica envolve mecanismos moleculares e pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é uma característica fenotípica de determinada espécie que lhe confere a resistência inata antes mesmo da exposição ao antifúngico. Já a resistência adquirida ocorre em microrganismos que desenvolvem mutações após serem expostos ao antifúngico e que os fazem sobreviver; posteriormente, por consequente processo de seleção natural, proliferam e transmitem à sua progênie o genótipo da resistência (Vieira & Santos, 2016).

Fatores de transcrição mutantes auxiliam com a formação de resistência microbiológica aos antifúngicos. A falta de recombinação sexual leva à aquisição de resistência aos tratamentos convencionais por meio da plasticidade do genoma em *Candida* e do aumento de taxas de mutação e de recombinações mitóticas (Ford et al., 2015).

A anfotericina B atua como fungicida pela ligação ao ergosterol, que é formado a partir de um precursor, o lanosterol, através de vários esteróis intermediários. Esta biossíntese envolve etapas enzimáticas codificadas por ERG6, ERG11, ERG24, ERG25, ERG26, ERG27,

ERG2, ERG3, ERG5 e ERG4, em ordem sequencial. Mutações combinadas que ocorrem em ERG11 e em ERG3 ou em ERG5 e mutações únicas em ERG6 ou em ERG2 foram associadas à depleção de ergosterol e resistência à anfotericina B em *Candida* (Arendrup & Patterson, 2017; Martel et al., 2010).

A resistência à equinocandina só foi ligada de forma convincente a um mecanismo molecular, ou seja, a mutações em 2 regiões de hot spot do gene alvo *FKS1* (sequências AA de tipo selvagem para *C. albicans* hot spot 1: FLTLSLRDP e hot spot 2: DWIRRYTL) ou, no caso de *C. glabrata*, também em *FKS2* (hot spot 1 de sequências AA de tipo selvagem: FLILSLRDP e hot spot 2: DWIRRYTL) Na grande maioria dos casos apenas uma única mutação é responsável, embora em casos raros várias alterações sejam encontradas (Arendrup & Patterson, 2017; Arendrup et al., 2012).

Mutações de ganho de função (GOF) no gene de transcrição *UPC2*, que regula a expressão de *ERG11*, induz à concentração supranumerária de *ERG11p*, que é uma enzima intracelular alvo dos azóis, envolvida na biossíntese de ergosterol. Como consequência, a atividade azólica torna-se insuficiente (Dunkel et al., 2008). Além disso, as bombas de efluxo contribuem para a resistência a azóis em *Candida* (Sanglard et al., 2016).

A flucitosina é ativamente transportada para dentro da célula fúngica pela permease (codificada por *FCY2*). Em seguida, é convertida em 5-fluorouracil ou em 5-fluorouridina monofosfato pelas enzimas citosina desaminase ou uracil fosforibosiltransferase, codificadas pelos genes *FCY1* e *FUR1*, respectivamente. Essas novas formas passam a atuar inibindo a transcrição, a replicação do DNA e a síntese de proteínas. A resistência a esse fungicida surge rapidamente se usado como monoterapia e tem sido atribuída a mutações nos genes *FCY2*, *FCY1* e *FUR1* (Costa et al., 2015).

1.3 Proteínas de sementes com potencial biotecnológico

As sementes de plantas apresentam ricas reservas proteicas, sendo muitas destas sementes utilizadas na alimentação de animais e do próprio ser humano. Muitas sementes também apresentam proteínas tóxicas ou antinutricionais, que contribuem para a sua defesa contra patógenos e predadores. Já são conhecidas famílias de proteínas tóxicas, como as lectinas, as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), inibidores de proteases, inibidores de α -amilases, dentre outras (Sales et al., 2000). Algumas proteínas de reserva também desempenham função antimicrobiana, como as vicilinas (Macedo et al., 1993).

Lectinas são proteínas presentes em sementes e raízes de leguminosas capazes de se ligarem especificamente a determinados açúcares nas cadeias laterais de glicoproteínas.

São proteínas multifuncionais e estão amplamente distribuídas pela natureza (Peumans & Van Damme, 1998). Lectinas extraídas de sementes de *Dioclea reflexa* e de *Canavalia brasiliensis* apresentaram diminuição da viabilidade e induziram alterações morfológicas sobre culturas celulares de glioma das linhagens C6 de ratos. Além disso, demonstraram a capacidade de inibir a migração celular e sobrevivência clonogênica (Wolin et al., 2017).

Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs) são N-glicosilases de rRNA com capacidade de inibir a síntese proteica a partir da remoção de uma adenina específica do RNA ribossômico. Além disso, atuam na defesa de plantas contra herbivoria (Peumans et al., 2001).

Inibidores de proteases são importantes enzimas com funções na regulação da proteólise em diversos organismos e em plantas, apresentando importantes estratégias de defesa contra predadores e patógenos (Zhang et al., 2008). São geralmente identificados por sua atividade inibitória contra enzimas que estão disponíveis no mercado. Entre elas, as mais comuns são a tripsina e a quimiotripsina (Rawlings et al., 2004).

Inibidores de alfa-amilase vegetal possuem grande potencial para projetar resistência de plantas contra pragas. Sua função principal é reduzir a capacidade de organismos que as consomem de hidrolisarem o amido proveniente dos alimentos ingeridos, pois sua estrutura tridimensional é capaz de se ligar ao substrato, fazendo com que a quebra das ligações glicosídicas ocorra através de grupos catalíticos específicos (Franco et al., 2002; Karray et al., 2022).

Já as vicilinas, consideradas proteínas de reserva de leguminosas, também são conhecidas como globulinas de armazenamento 7S. São proteínas de cadeia simples sem pontes dissulfeto e se agregam para formar trímeros de subunidades com massas moleculares variáveis entre 45-53 kDa (Sales et al., 2000). Estudos identificaram vicilinas com potencial de interferência no desenvolvimento de insetos. O isolamento de vicilinas de sementes resistentes e susceptíveis a *C. maculatus* e a incorporação destas em sementes artificiais mostrou que as globulinas 7S purificadas foram responsáveis por pelo menos parte dos efeitos prejudiciais observados em sementes resistentes, ligando-se fortemente à quitina detectada na matriz peritrófica que reveste a superfície do intestino médio do inseto (Macedo et al., 1993; Uchôa et al.; 2009; Bard et al.; 2014).

Além das famílias de proteínas aqui descritas, há também o grupo dos peptídeos antimicrobianos (Peters et al., 2010). Peptídeos antimicrobianos, também conhecidos como AMPs, são moléculas presentes na resposta imune inata de organismos animais e vegetais, que apresentam baixa massa molecular e atividade inibitória sobre o crescimento de bactérias, fungos e vírus. Em animais, parte da imunidade inata do sistema imunológico é constituída por peptídeos antimicrobianos (Harwig et al., 1996). Em plantas, estes peptídeos

compõem um sistema de defesa semelhante à imunidade inata dos animais, protegendo-as do ataque de patógenos e pragas (Gallo *et al.*, 2002).

1.4 *Clitoria fairchildiana*

Clitoria fairchildiana, vulgarmente conhecida como sombreiro, faveiro ou palheteira, espécie não domesticada, da família Fabaceae – Papilionoidae, é uma árvore leguminosa presente no Brasil, nativa da região amazônica, ocorrendo principalmente na Floresta Ombrófila Densa, em formações secundárias, utilizada em programas de arborização urbana e rural nas regiões sul e sudeste do país (Ducke, 1949; Lorenzi, 1992) e recomendada para recuperação de áreas degradada, pois é capaz de atuar como adubo verde (Silva & Carvalho, 2008). Apresenta nítida preferência por solos férteis e úmidos. Possui porte arbóreo, de copa volumosa e produtora de flores atrovioláceas que se derivam em frutos deiscentes e de coloração marrom (Ducke, 1949; Lorenzi, 1992). Produz sementes orbiculares e plano-convexas, exalbuminosas, revestidas por tegumentos castanho-esverdeados. O hilo tem forma elíptica, homocromo e possui tamanho pequeno em relação à semente. Possui cotilédones livres como principais órgãos de reserva, de coloração verde, maciços e plano-convexos e o embrião é invaginado; desta forma, a anatomia destas sementes segue o padrão da maioria das leguminosas (Silva & Môro, 2008).

1.4.1 Potencial biotecnológico de sementes de *Clitoria*

Há descrições na literatura de moléculas tipicamente relacionadas com a habilidade de defesa de plantas contra predadores, isoladas e caracterizadas de sementes do gênero *Clitoria* e demonstradas como ativas contra pestes e pragas de relevância econômica.

Dentre estas, um inibidor de proteases (tripsina e quimotripsina) de sementes de *C. fairchildiana* exibiu efeitos antinutricionais sobre a larva de *Anagasta kuehniella*, reduzindo a atividade de proteases intestinais do tipo tripsina em 76% (Dantzger *et al.*, 2015). De sementes dessa mesma espécie, outro inibidor de tripsina, de 13 kDa, foi capaz de reduzir em 87,93% a atividade de enzimas digestivas de larvas de 4º instar de *Aedes aegypti* (Oliveira *et al.*, 2015).

Foi relatada também a existência de uma proteína altamente básica de sementes de *C. ternatea*, designada "finotina". Esta mostrou um amplo e potente efeito inibitório para fungos patogênicos de plantas (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Lasioidiplodia theobromae*, *Pyricularia grisea*, *Bipolaris oryzae* e *Colletotrichum gloeosporioides*), potencial para inibir o patógeno bacteriano *Xanthomonas*

axonopodis e também potentes propriedades inibitórias sobre os bruquídeos do feijão comum, *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus* (Segenet et al., 2004).

Relatou-se também a purificação de uma lectina, nomeada de CFAL, de sementes de *C. fairchildiana*, purificada por cromatografia em coluna de troca iônica e identificada em gel de eletroforese, apresentando duas bandas com aproximadamente 100 e 116 kDa que apresentou atividade anti-inflamatória e capaz de aglutinar eritrócitos de coelho (Leite et al., 2012).

Composto do metabolismo secundário, como o rotenoide 1-desoxiclitoriacetal de *C. fairchildiana*, isolado das sementes por meio de diferentes técnicas cromatográficas e identificado através da análise de dados de ressonância nuclear magnética, também foi descrito como exercendo atividade antifúngica sobre leveduras do gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (Santos et al., 2018).

Nosso grupo de pesquisa também isolou uma proteína relacionada a vicilina (Cfvic) dos cotilédones e compostos do metabolismo secundário do tipo rotenoides (Bertonceli et al., 2022; Bertonceli et al., 2022) de sementes de *C. fairchildiana* que apresentaram potencial inibitório contra os insetos *Callosobruchus maculatus* e *Aedes aegypti*, respectivamente.

O potencial biotecnológico de sementes de *Clitoria* é também reforçado através do depósito da patente BR102014028528A2, que descreve um inibidor de proteinase do tipo bowman-birk, isolado a partir do extrato das sementes de *Clitoria fairchildiana*, denominado CFPI, que apresenta atividade inibitória para insetos lepidópteros e atividade inseticida para *Anagasta kuehniella*, possuindo desta forma, aplicação comercial como inseticida natural. Além disso, não apresentou toxicidade para células humanas sadias (Macedo & Dantzger, 2014).

Por conta de tais resultados, bem como da ausência relatos de pragas e predadores naturais de sementes de *Clitoria fairchildiana*, acreditamos haver um grande arsenal químico de defesas nestas sementes, como proteínas com potenciais antimicrobianos, o que as torna de grande interesse biotecnológico em benefício à sociedade.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo central a avaliação do potencial antifúngico de proteínas extraídas de cotilédones de sementes de *Clitoria fairchildiana* sobre leveduras do gênero *Candida*.

2.2 Objetivos Específicos

- Testar o efeito inibitório de frações proteicas dos cotilédones de sementes de *C. fairchildiana*, extraídas com base em suas solubilidades diferenciadas em diversos solventes, sobre leveduras do gênero *Candida*;
- Isolar e caracterizar proteínas com ação antimicrobiana sobre tais leveduras;
- Investigar os mecanismos de ação da molécula fungicida em questão sobre leveduras do gênero *Candida*, de importância farmacêutica.

3. Material e Métodos

3.1 Materiais Biológicos

3.1.1 Sementes de *Clitoria fairchildiana* R.A. (Fabaceae)

As sementes de *Clitoria fairchildiana* foram coletadas no campus da UENF – Campos dos Goytacazes / RJ, durante o mês de julho, período em que elas são dispersas. Em seguida, foram mantidas na estufa a 28 °C durante 24 horas a fim de garantir melhores condições de armazenamento.

3.1.2 Obtenção das leveduras

As leveduras *Candida albicans* (CE022), *Candida buinensis* (4674), *Candida tropicalis* (CE017), *Candida parapsilosis* (CE002), *Candida pelliculosa* (3974) e *Candida mogi* (3982), utilizadas nesta pesquisa foram cultivadas em meio de cultura Ágar Sabouraud (1% peptona, 2% glicose, 1,7% ágar-ágar) (MERCK) e conservadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ.

3.2 Extração proteica de sementes de *Clitoria fairchildiana*

O fracionamento das proteínas oriundas dos cotilédones de sementes de *Clitoria fairchildiana* foi realizado de acordo com o método citado por Luo et al. (2014) e modificado por Bertoneceli et al. (2022).

Primeiramente, sementes quiescentes foram descascadas, para posteriormente serem utilizados seus cotilédones, que foram macerados, utilizando almofariz e pistilo, até a

obtenção de uma farinha fina. Foram utilizados 130 gramas de farinha de cotilédones e 1300 mL de cada solvente utilizado para a extração (razão 1:10 m/v).

Inicialmente, a farinha de cotilédones foi suspensa em H₂O destilada, sob agitação, durante 30 minutos. A suspensão resultante foi centrifugada a 5.000 x g por 40 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante, reservado. Essa etapa foi repetida com o sedimento obtido e a fração solúvel final resultante, reunida à primeira, consiste nas **albuminas** (fração 1). O sedimento das etapas de centrifugação anteriores foi extraído com NaCl 0,5 M durante 60 minutos e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores (a fração solúvel resultante são as **globulinas** (fração 2). O sedimento obtido desta nova etapa de centrifugação foi extraído em 2-propanol a 60% (v/v) durante 4 horas e então centrifugado, como já descrito. O sobrenadante obtido consiste na fração **kafirina** (fração 3). O sedimento obtido foi extraído em tampão borato 0,1 M, pH 10,8, durante 4 horas e a fração solúvel resultante foram as **glutelinas** (fração 4). Em seguida, o sedimento obtido foi extraído em 2-propanol a 60% com 1% de β-mercaptoetanol durante 4 horas e a fração solúvel resultante foram as **kafirinas com ligações cruzadas** (fração 5). E, por fim, o sedimento restante foi extraído em tampão borato 0,1 M, pH 10,8, contendo 1% de β-mercaptoetanol e 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), durante 18 horas e a fração solúvel resultante foram as **glutelinas com ligações cruzadas** (fração 6). Todas as frações reservadas foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C.

3.3 Dosagem de proteínas

Para determinação da concentração de proteínas das amostras extraídas, foi utilizado o método do ácido bicinconínico (BCA), descrito por SMITH et al. (1985). Utilizou-se albumina sérica bovina para construção da curva padrão. As leituras foram feitas no espectrofotômetro modelo Thermo Plate – TP Reader, a 540 nm.

3.4 Visualização proteica por SDS-PAGE

As frações proteicas extraídas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), conforme o método descrito por Laemmli (1970). O gel final foi composto por um gel separador e um gel concentrador. Foram utilizadas placas de vidro 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 1,0 mm.

3.4.1 Preparo das amostras e condições de corrida

Foram utilizados 50 microgramas de cada amostra misturadas a 15 microlitros de tampão de amostra (glicerol 12%, SDS 4%, β -mercaptoetanol 1%, Tris-HCL 50 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol 1%), aquecidas a 100 °C durante 5 minutos e posteriormente aplicadas nas raias do gel. A corrida eletroforética foi realizada a, aproximadamente, 100 V e transcorreu por cerca de 2 horas. Para estimar a massa molecular das proteínas, foi utilizado o marcador de peso molecular estável a temperatura ambiente BLUeye Prestained Protein Ladder, da marca Sigma, composto das seguintes massas moleculares de proteínas: 5.6, 10.5, 14.5, 21.1, 30.1, 41.9, 54, 70.3, 92, 132, 175 e 235 kDa.

3.4.2 Revelação das bandas proteicas utilizando Azul de Coomassie

Após a corrida, o sistema de gel foi desmontado e o gel colocado em um recipiente contendo a solução de coloração com azul brilhante de Coomassie R-250 por, aproximadamente 2 horas. Após a coloração, foi transferido para uma solução descorante de metanol 40% e ácido acético 10%, até que fosse possível a visualização das bandas proteicas. Posteriormente foi fotografado e armazenado em ácido acético 1%.

3.4.3 Revelação das bandas proteicas utilizando nitrato de prata

Para visualização das bandas proteicas do perfil cromatográfico, foi utilizado o método de precipitação com nitrato de prata (Morrissey, 1981). Ao final da corrida, o gel foi retirado das placas e incubado por 40 minutos na solução 1 (10 % de ácido acético, 4 % de etanol). Após este período, o gel foi lavado por 5 minutos em água ultrapura e, em seguida, incubado por 20 minutos na solução 2 (25 % de glutaraldeído). Posteriormente, foi lavado duas vezes por 10 minutos em água ultrapura e incubado na solução 3 (60 % de etanol) por 20 minutos. Após esse tempo, foi incubado por 20 minutos na solução 4 (20 % de etanol, 1 % de nitrato de prata, 30 % de hidróxido de amônio e 40 % de NaOH), preparada antes do uso, sob agitação, e mantido ao abrigo da luz. Em seguida, o gel foi lavado duas vezes por 10 minutos na solução 3 e incubado na solução 5 (20 % de etanol, 37 % de formaldeído, 5,75 mM de ácido cítrico) até obter a visualização das bandas proteicas. A coloração foi interrompida utilizando uma solução de fixação (10 % de ácido acético, 0,5 mL de glicerol), por 10 minutos. Em seguida, o gel foi fotografado e armazenado em ácido acético 1%.

3.5 Ensaio de inibição do crescimento fúngico

Células das leveduras *C. albicans*, *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* e *C. mogi* foram transferidas dos estoques mantidos na geladeira e repicadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud (1% peptona, 2% glicose, 1,7% ágar-ágar) da marca Merck. As células foram mantidas por 24 horas a 30 °C. Logo após, com o auxílio de uma alça de platina, colônias de células foram retiradas das placas e adicionadas a 10 mL de meio de cultura contendo caldo Sabouraud, para a quantificação das mesmas em câmara de Neubauer utilizando um microscópio óptico.

Em seguida, foram realizados os ensaios utilizando células das seis diferentes espécies do gênero *Candida* (1×10^4 células), tratadas com as seis diferentes frações extraídas dos cotilédones das sementes de *C. fairchildiana* em quatro diferentes concentrações ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), tendo como volume final 200 μL em cada poço, em placas de cultura de células (96 poços), posteriormente incubadas a temperatura ambiente por um período de 24 horas. A determinação da absorvância foi realizada após 24 horas em um "leitor de ELISA" a 620 nm (Broekaert *et al.*, 1990).

Outros ensaios idênticos foram realizados, excetuando-se pelo fato de que foram utilizadas as frações cromatográficas nas concentrações de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e foram utilizadas apenas três leveduras: *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*. Foram realizadas leituras de absorvância a cada 6 horas durante 24 horas. Após isso, foi realizada uma análise das células em um microscópio óptico Axioplan, versão 4.0, para verificação da integridade da estrutura celular.

3.6 Western Blotting

A fim de identificar a presença de proteínas já conhecidas na literatura com potencial antimicrobiano, a fração com maior potencial tóxico foi submetida a separação eletroforética em gel de poliacrilamida, nas mesmas condições descritas acima, seguida de transferência proteica para membrana de nitrocelulose, por Western blotting (Towbin *et al.*, 1979). Foram feitos quatro géis semelhantes, dois para coloração e dois para transferência a membranas, sendo que cada membrana foi incubada com um anticorpo diferente.

De forma mais detalhada, após o término da eletroforese, os géis não corados foram transferidos para membranas de nitrocelulose embebidas em tampão de transferência glicina 182 mM e Tris 25 mM e metanol 20%, durante 20 minutos. Os sanduíches foram montados em sistema semi-seco na seguinte ordem: 5 pedaços de papel filtro com dimensões de 8,5x10 cm, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida, 5 pedaços de papel filtro nas mesmas dimensões, para cada um dos géis. O sistema foi fechado e a transferência ocorreu por 2 horas em uma voltagem de 20 V. Em seguida, as membranas de nitrocelulose foram coradas

com Ponceau 0,1% para verificar o sucesso da transferência (Salinovich & Montelaro, 1986) e depois foram lavadas por 1 hora em trocas repetidas com tampão bloqueador (PBS, 2% de leite em pó desnatado, tween 20 – 0,05%). Após, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários; uma destas membranas foi incubada com o anticorpo anti-vicilina produzido em coelho e diluído em tampão bloqueador (1:1000); e a outra membrana incubada com o anticorpo anti-LTP produzido em coelho e também diluído com tampão bloqueador (1:1000). As membranas permaneceram em overnight a 4 °C durante o processo de incubação.

Após o tempo determinado, as membranas foram lavadas 10 vezes em tampão PBS a cada 5 minutos e sob agitação. Em seguida, foi incubado o anticorpo secundário anti-IgG de coelho 28 complexado com peroxidase em diluição de 1:1000 em tampão bloqueador, por 2 horas a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente 10 vezes em tampão PBS a cada 5 minutos e sob agitação. A reação em cada membrana foi revelada utilizando solução composta por 10 mg de DAB (diaminobenzidina), diluídos em uma solução composta por 400 µL de tampão Tris-HCl 2 M (pH 7,5), 600 µL de imidazol 0,1 M, 8 mL de água destilada e 10 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que foi colocada em cada membrana imediatamente no momento da revelação e deixada em contato com cada membrana até o aparecimento das bandas. Por fim, a reação foi parada lavando cada membrana com água destilada.

3.6 Cromatografia de exclusão molecular

A fração proteica que apresentou maior toxicidade às células fúngicas, segundo os resultados dos ensaios antifúngicos, foi submetida a processo posterior de fracionamento por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-50. Utilizou-se como eluente o tampão borato 0,1 M, pH 10,8. Foram aplicados 50 mg de amostra diluídos em 1500 µL de tampão borato e coletados 800 µL em tubos a cada 2 minutos, em um total de 100 tubos. Após a corrida, foi realizada a leitura de absorvância das amostras coletadas sob comprimento de onda de 280 nm, em espectrofotômetro Shimadzu 19 (Dantzger et al., 2015). Os picos obtidos foram dialisados exaustivamente contra água e liofilizados antes de analisados eletroforeticamente por SDS – PAGE.

3.8 Visualização do perfil cromatográfico por CCDA

Utilizou-se a técnica de Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA) para análise do perfil cromatográfico. A técnica permite constatar se há a presença de metabólitos secundários nas amostras. Para isso, cromatofolhas de alumínio com gel de sílica (TLC sílica

gel 60 F254 aluminium sheets, MERCK®) foram cortadas com 5 cm de altura e largura adequada para a quantidade de amostras aplicadas (2 cm).

As amostras provenientes da cromatografia de exclusão molecular foram solubilizadas com diclorometano (CH_2Cl_2) aplicadas na base inferior com espaçamento de 0,5 cm entre as amostras e extremidades horizontais, e 1 cm das extremidades verticais. Após saturação da cuba com solução de diclorometano:metanol (98:02), as placas foram inseridas para eluição dos compostos por meio da fase móvel.

Por fim, após a eluição, foi realizada a revelação física das cromatofolhas, por meio da exposição à luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm. Além disto, foi realizada a revelação química das cromatofolhas, utilizando solução de vanilina sulfúrica 2% (revelador químico geral) e AlCl_3 (revelador de compostos fenólicos). O método de revelação térmica em placa aquecedora foi utilizado para ambos os reveladores (Passos et al., 2019).

3.9 Análise de frações proteicas por espectrometria de massas

3.9.1 Preparo das amostras proteicas

Antes de iniciar a digestão das proteínas com tripsina, 50 μg de proteínas foram ressuspendidas em solução de ureia 7 M e tiourea 2 M. A digestão proteica foi realizada utilizando a metodologia de filtro auxiliar (FASP - *filter-aided sample preparation*), descrita por Wiśniewski et al. (2009), com pequenas modificações. Antes do início da digestão, foi realizado um teste de integridade dos filtros (Hernandez-Valladares et al., 2016).

Após o teste, as 50 μg de proteínas de cada pico foram adicionadas a um filtro Microcon-30 kDa (Lipecka et al., 2016), lavado com 200 μL 50 mM de bicarbonato de amônio (solução A) e centrifugado a 10.000 g por 15 min a 25 °C (todas as centrifugações nesta etapa foram realizadas nesta condição). Esta lavagem foi repetida mais uma vez para remoção completa da ureia antes da redução das proteínas. Posteriormente, foi adicionado 100 μL 50 mM DTT refrigerada feita em solução A, agitada e incubada por 20 min a 60 °C (1 min agitando e 4 min parado, a 650 rpm). Após esta etapa, foi adicionado 200 μL de 8 M ureia e 50 mM de bicarbonato de amônio (solução B) e centrifugado por 15 min. Para alquilação das proteínas, 100 μL de 50 mM de iodoacetamida refrigerado, preparado em solução B, foram adicionados, a amostra foi agitada e incubada por 20 min a 25 °C na ausência de luz (1 min agitando e 19 min parado, a 650 rpm). Posteriormente, foram feitas duas lavagens com 200 μL de solução B e as amostras foram centrifugadas por 15 min. Por fim, foi feita mais uma lavagem com

solução A. Nesta última lavagem centrifugou-se até que permanecesse aproximadamente 50 μL de amostra.

Para digestão proteica, foram adicionados 25 μL de 0,2% (v/v) RapiGest (Waters, Milford, CT, USA) e uma solução de tripsina (25 μL de 40 ng/ μL , V5111, Promega, Madison, WI, USA), numa razão de 1:50 tripsina:amostra. A mistura foi agitada gentilmente e incubada por 16 h a 37 °C (1 min agitando e 4 min parado, a 650 rpm). Para eluição dos peptídeos, o filtro foi transferido para um novo microtubo e centrifugado por 10 min. Foram adicionados 50 μL de solução A e a solução foi centrifugada por 15 min. Esta lavagem foi refeita duas vezes. Para precipitação do RapiGest e inibição da tripsina, foram adicionados 5 μL de ácido trifluoroacético 15% (TFA, Sigma-Aldrich); a mistura foi agitada gentilmente e incubada por 30 min a 37 °C. Então, as amostras foram centrifugadas por 15 min, e os sobrenadantes foram coletados e secos a vácuo. Os peptídeos foram resuspendidos em 100 μL de solução contendo 95 % de água, 5 % acetonitrila e 0,1% ácido fórmico. Os peptídeos resultantes foram quantificados utilizando um NanoDrop 2000c espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific) utilizando leituras a A_{205} nm para injeção proporcional à concentração da amostra, injetando 2,5 μg de proteínas.

3.9.2 Análise por espectrometria de massas

Foi utilizado um nanoAcquity UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro de massas Synapt G2-Si HDMS (Waters) com uma fonte de ionização com eletropulverização (ESI)-MS/MS. As misturas peptídicas foram separadas por cromatografia líquida em coluna trap C18 nanoAcquity UPLC de 5 μm (180 μm \times 20 mm), seguida por carregamento em coluna analítica nanoAcquity HSS T3 1,8 μm (75 μm \times 150 mm), a um fluxo de 400 nL min^{-1} e a uma temperatura de 45 °C.

O gradiente binário foi constituído de água ultrapura MS mais ácido fórmico a 0,1% como fase móvel A, e de acetonitrila mais ácido fórmico a 0,1% como fase móvel B para realizar a eluição dos peptídeos. O gradiente de eluição foi iniciado a 5% B, aumentando para 40% até 91,12 min e de 40% de B para 99% até 95,12 min, sendo mantida até 99,12 min, diminuindo então para 5% de B até 101,12 min e mantido 5% B até o final da injeção a 117,00 min.

As configurações do instrumento foram baseadas em modo para aquisição independente de dados (DIA) aprimorada por espectrometria de mobilidade iônica (Distler et al., 2016) (IMS). Resumidamente, a espectrometria de massas foi realizada em modo positivo e modo resolução (modo V), 35.000 FWHM, com mobilidade iônica. A separação da mobilidade iônica (HDMSE) usou uma rampa de velocidade da onda IMS começando com

800 m.s⁻¹ terminando com 500 m.s⁻¹; fluxo de hélio e de gás IMS de 180 e 90 mL.min⁻¹, respectivamente. A energia de transferência de colisão variou de 25 V para 55 V em modo de alta energia; a voltagem do cone e capilares foram de 30 V e 2800 V, respectivamente. Usou-se um nano fluxo de gás de 0,5 bar e gás de purga de 150 L.h⁻¹. A temperatura da fonte foi configurada para 100 °C. Para os parâmetros de tempo de voo dos íons (TOF), o tempo de varredura foi definido em 0,5 segundos no modo contínuo e a faixa de massa foi de 50 a 2000 Da. O fibrinopeptídeo B [Glu1] de humano a 100 fmol.µL⁻¹ foi usado como um calibrante externo. A aquisição da massa do calibrante externo foi realizada a cada 30 segundos. A aquisição do espectro de massa foi realizada pelo software MassLynx v.4.0 (Waters).

3.9.3 Bioinformática e análises estatísticas

As condições de processamento espectral e de busca no banco de dados para identificação foram realizadas utilizando o software ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v.3.02 (Waters). A identificação de proteína foi realizada usando o banco de dados do gênero *Clitoria spp* buscado no *National Center for Biotechnology Information – NCBI (Taxonomy ID = 43365*, acessado em 20 de janeiro de 2023). A análise HDMSE seguiu os parâmetros: Apex3D de 150 contagens para limiar de baixa energia; 50 contagens para limiar de energia elevada; 750 contagens para o limiar de intensidade; uma clivagem perdida; mínimo de íons fragmentos por peptídeo igual a três; mínimo de íons fragmentos por proteína igual a sete; mínimo de peptídeos por proteína igual a dois; modificações fixas em carbamidometil (C) e modificações variáveis de oxidação (M) e fosforilação (STY); taxa de falsa descoberta (FDR) <0,01%; tolerância automática a peptídeos e fragmentos.

A análise de quantificação foi realizada usando o software ISOQuant v.1. 7 (Distler et al., 2014). Os parâmetros utilizados foram: peptídeo e proteína FDR <0,01%; comprimento de sequência com pelo menos seis resíduos de aminoácidos; e pontuação mínima igual a seis peptídeos. O software realizou a quantificação relativa das proteínas com base no método TOP3. As abundâncias de peptídeos compartilhados foram redistribuídas para as respectivas proteínas atribuídas, seguidas pela quantificação baseada em TOP3 com base nas abundâncias relativas de peptídeos atribuídos de forma exclusiva (Distler et al., 2014).

Os dados obtidos foram analisados usando o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (National Center for Biotechnology Information), e os parâmetros de busca selecionados foram o banco de dados UniProtKB / Swiss-Prot e o organismo Leguminosae (taxid 3803).

3.10 Ensaio de determinação de permeabilização de membranas fúngicas

A permeabilização da membrana das células das leveduras tratadas com as frações obtidas em cromatografia de exclusão molecular foi avaliada utilizando a sonda fluorescente SYTOX® Green, conforme metodologia descrita por Thevissen et al. (1999).

Após 24 horas da realização do ensaio de células fúngicas incubadas com as frações proteicas, alíquotas de 96 µL de células foram incubadas ao abrigo da luz por 15 min com o corante fluorescente SYTOX® Green (Thermo Fisher Scientific), a uma concentração final de 0,2 µM, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. As células do controle foram incubadas apenas com o corante SYTOX® Green nas mesmas condições. E para controle positivo, submetemos células controle incubadas com a sonda fluorescente ao aquecimento a 90 °C por 30 segundos, em banho seco. Em seguida, as células foram analisadas em microscópio óptico Axio Zeiss, Imager, A,2 e as imagens, analisadas pelo 21 software Axiovision, versão 4.0. O microscópio é equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 - 490nm e emissão de 500nm).

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

Após ensaio de inibição do crescimento, as células das leveduras crescidas na presença e ausência das frações obtidas após cromatografia de exclusão molecular, foram incubadas com 20 µM da sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H2DCFDA) (Sigma-Aldrich), para avaliar aumentos níveis endógenos de espécies reativas de oxigênio (ROS), segundo metodologia descrita por Mello et al. (2011). O tratamento controle positivo foi feito com as células do fungo crescidas na ausência das frações e incubadas com 300 µM de peróxido de hidrogênio por 15 minutos antes da adição da sonda H2DCFDA. Todo o procedimento foi feito ao abrigo da luz, por 2 h em temperatura ambiente. As células teste e controle foram analisadas no microscópio óptico Axio Zeiss, Imager, A,2, equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 – 490 nm e emissão de 500 nm).

3.12 Métodos de análises estatísticas

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Tukey, realizados para determinar diferenças entre tratamentos e concentrações. Os testes levaram em consideração a comparação de médias entre controle e tratamentos ao nível de rigor em 5 % ($p < 0,05$) e apontaram diferenças significativas. Todas

as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows).

4. Resultados

4.1 Fracionamento proteico

A partir da extração proteica dos cotilédones de sementes de *Clitoria faichildiana* foram obtidas as frações: F1 (albúminas), F2 (globulinas), F3 (kafirinas), F4 (glutelinas), F5 (kafirinas com ligações cruzadas) e F6 (glutelinas com ligações cruzadas). Todas as frações foram quantificadas pelo método de quantificação proteica do ácido bicinonínico (BCA).

4.2 Visualização do perfil proteico por SDS-PAGE

As diferentes frações proteicas foram visualizadas em gel de poliacrilamida corado com azul de Coomassie. Na Figura 2, observam-se duas bandas majoritárias de aproximadamente 42 e 57 kDa, presentes em quase todas as frações. Além disso, observa-se um perfil relativamente distinto entre as frações. Também foi possível verificar o aparecimento de poucas bandas nas frações F3 e F5. E por fim, a presença de uma banda de baixa massa molecular, em torno de 8 kDa em todas as frações, com exceção da fração kafirínica (F3).

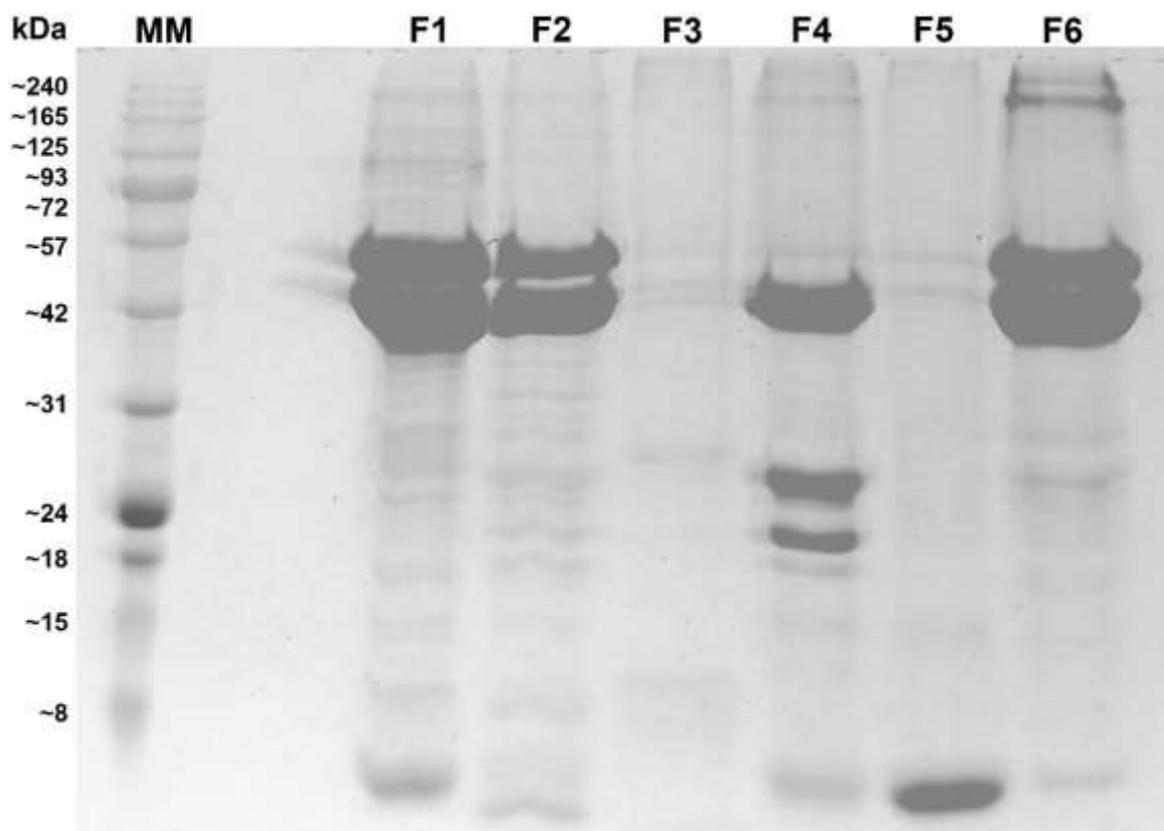


Figura 1: Visualização eletroforética do perfil proteico das frações extraídas dos cotilédones das sementes de *C. fairchildiana* em gel de SDS-PAGE 12%. MM - marcadores de massa molecular de 8 a 240 kDa. Gel corado com Coomassie Brilliant Blue.

4.3 Efeito inibitório de diferentes concentrações das frações proteicas de cotilédones de *C. fairchildiana* sobre leveduras do gênero *Candida*

As seis frações extraídas da farinha dos cotilédones de *C. fairchildiana*, após serem dosadas e visualizadas eletroforéticamente por SDS-PAGE, foram testadas quanto à sua toxicidade sobre células de leveduras do gênero *Candida*, sendo elas *C. albicans*, *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* e *C. mogi*. Foram testadas 4 concentrações diferentes: 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína, em um período de 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicada, havendo, posteriormente, repetição de todos.

Observam-se na Figura 3 os resultados de inibição obtidos da fração 1 (albuminas). Nota-se que esta fração inibiu significativamente as células de *C. buinensis* em todas as concentrações testadas, havendo 48,4% de inibição na concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 58,8% na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 80,92% na concentração de 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 83,34% na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sobre células de *C. tropicalis*, apenas a concentração de 100

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi efetiva, inibindo 32,35% das células, e sobre as células de *C. parapsilosis*, inibição efetiva foi vista a partir da concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde houve inibição de 39,18%, na concentração de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de 52,23%, e na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de 50,17%.

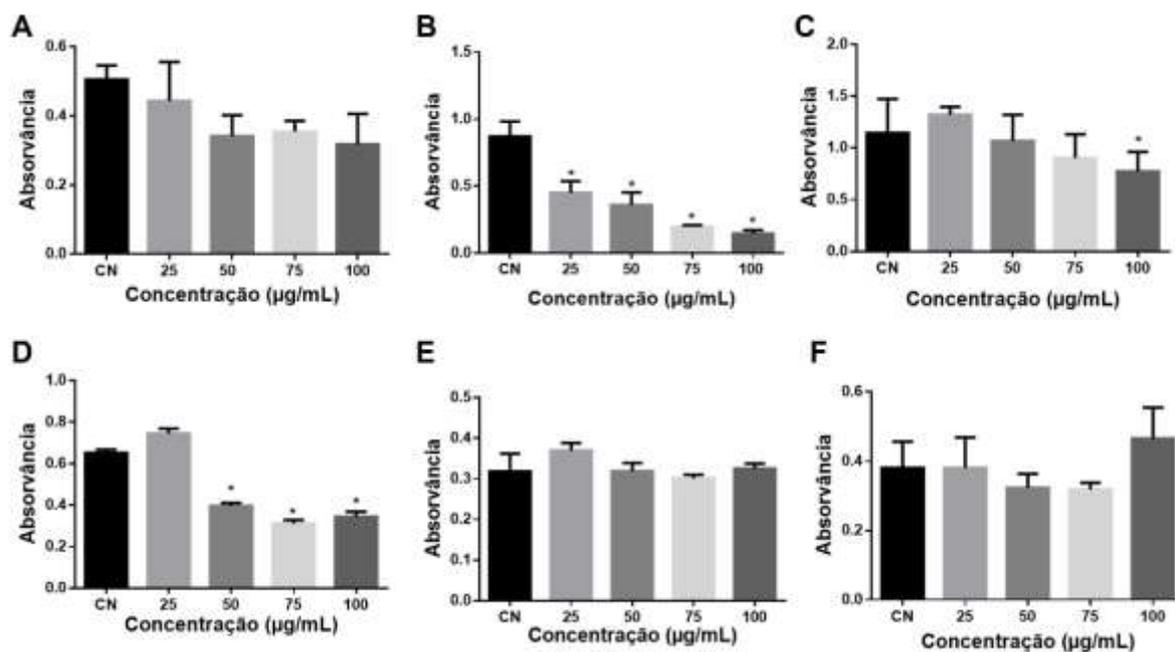


Figura 2: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero *Candida* pela fração 1 (F1) extraída dos cotilédones das sementes de *C. fairchildiana*. CN - controle negativo. Concentrações testadas: 25, 50, 75 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A – *Candida albicans*. B – *Candida buinensis*. C – *Candida tropicalis*. D – *Candida parapsilosis*. E – *Candida pelliculosa*. F – *Candida mogi*. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão.

Já a Fração 2 (F2), das albuminas, como pode ser observado na Figura 4, apresentou inibição significativa sobre todas as diferentes células de leveduras testadas, sobretudo contra *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. mogi*, onde observa-se efeito de dose dependência, ou seja, quanto maior a concentração de F2, maior foi a inibição das células. Sobre as células de *C. albicans*, observou-se inibição de 37,81% na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 45,53% na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 31,64% na concentração de 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não havendo inibição significativa na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o que mostra que não há efeito dose-dependente desta fração sobre esta levedura. Já sobre *C. buinensis*, houve 44,35% de inibição na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 61,57% de inibição na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nas concentrações de 50 e 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não ocorreu inibição significativa. As células de *C. tropicalis* tratadas com F2 apresentaram efeito de dose dependência, como relatado anteriormente. Houve 22,57% de inibição na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 41,56% na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 46,35% na concentração de 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 56,58% na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Sobre as células de *C. pelliculosa*, houve inibição em todas as concentrações, porém não foi observado efeito de dose dependente. Na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ocorreu inibição de 56,14%, 39,72% na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 44,83% na concentração de 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e, por fim, 79,37% de inibição na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Sobre as células de *C. mogi* observou-se efeito dose-dependente, porém não houve inibição nas concentrações de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na concentração de 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ocorreu inibição de 57,44% e na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, inibição de 67,2%.

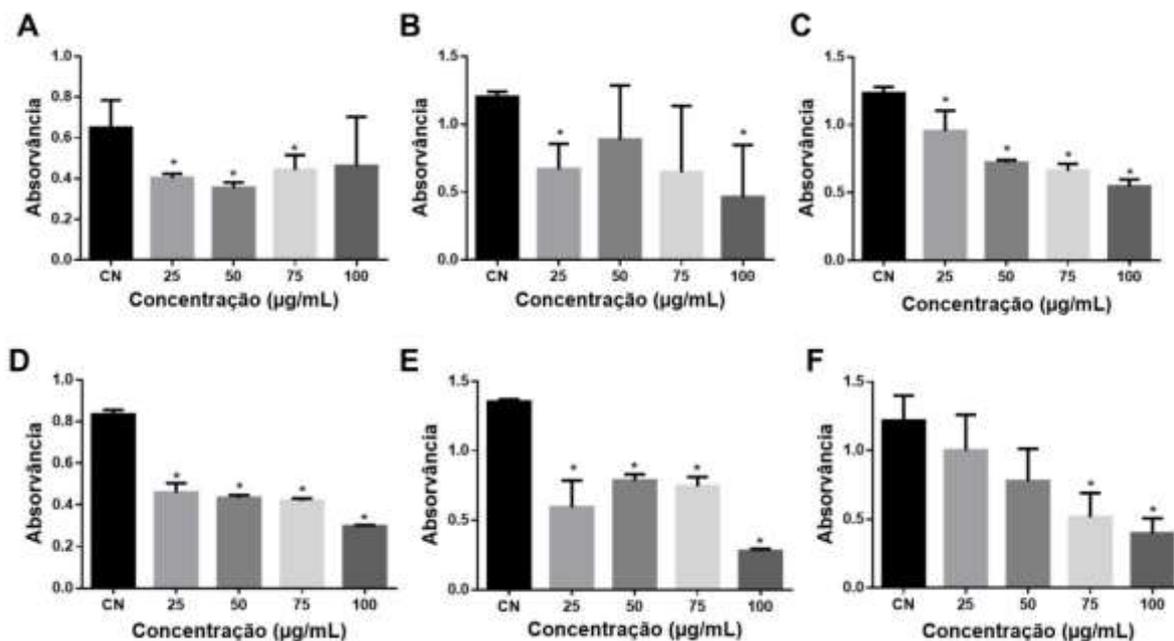


Figura 3: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero *Candida* pela fração 2 (F2) extraída dos cotilédones das sementes de *C. fairchildiana*. CN - controle negativo. Concentrações testadas: 25, 50, 75 e 100 µg.mL⁻¹. A – *Candida albicans*. B – *Candida buinensis*. C – *Candida tropicalis*. D – *Candida parapsilosis*. E – *Candida pelliculosa*. F – *Candida mogi*. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas (p>0,05) pelo teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão.

Em nenhuma das espécies tratadas com a fração kafirínica (F3) houve inibição de crescimento celular significativa (Figura 5).

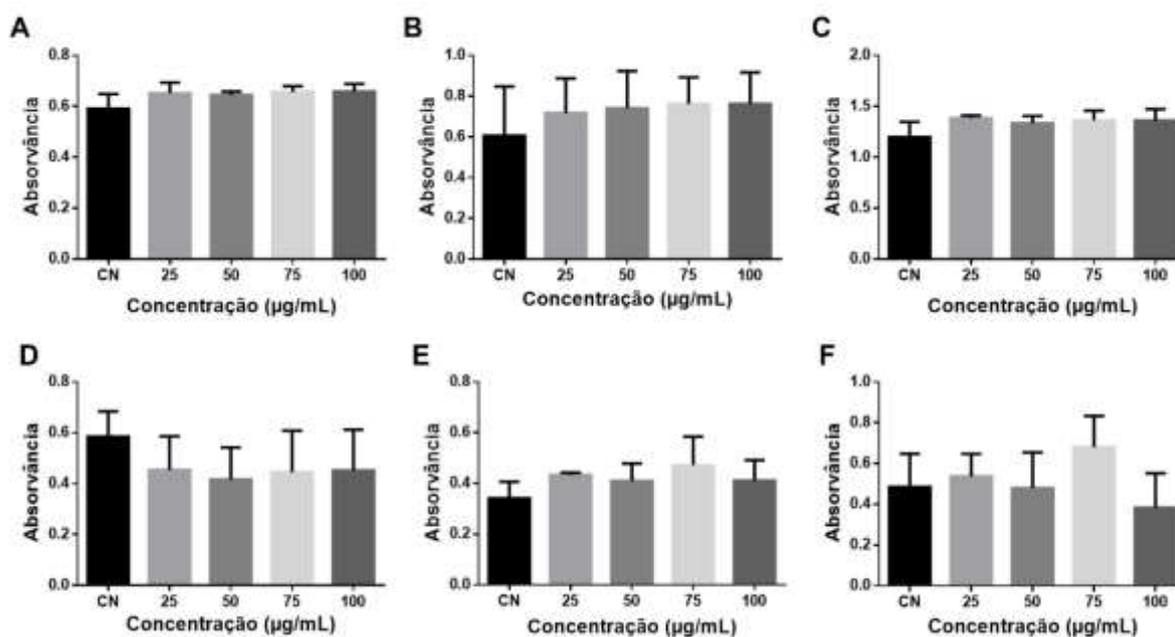


Figura 4: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero *Candida* pela fração 3 (F3) extraída dos cotilédones das sementes de *C. fairchildiana*. CN - controle negativo. Concentrações testadas: 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A – *Candida albicans*. B – *Candida buinensis*. C – *Candida tropicalis*. D – *Candida parapsilosis*. E – *Candida pelliculosa*. F – *Candida mogi*. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão.

A fração glutelínica (F4) provocou inibição de crescimento em todas as leveduras. Na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ observa-se grande taxa de inibição, especialmente sobre as leveduras *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*. Observa-se também o efeito dose-dependente sobre as células tratadas das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*. A Figura 6 apresenta os dados descritos acima. Sobre as células de *C. albicans*, F4 provocou inibição em todas as concentrações testadas. Ocorreu 26,65% de inibição no tratamento com 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 77,37%, com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 89,41%, com 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 93,26%, com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As células de *C. buinensis* tratadas com F4 foram inibidas a partir da concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, onde houve 95,46% de inibição. Na concentração de 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ocorreu 97,32% e na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 96,7% de inibição. O tratamento de F4 sobre as células de *C. tropicalis* acarretou inibição a partir da concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, onde houve 52,87% de inibição. Na concentração de 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a inibição foi de 76,96% e na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 89,01%. As células de *C. parapsilosis* foram inibidas em 41,36% na concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em 89,10%, com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em 93,24%, com 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e em 89,10%, com

100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As células de *C. pelliculosa* foram inibidas a partir da concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, onde ocorreu 68,49% de inibição. Na concentração de 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ocorreu inibição de 91,41% e na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ houve 76,51% de inibição. Por fim, as células de *C. mogi* sofreram inibição em todas as concentrações testadas, sendo de 36,37% na concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 77,5%, com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 90,55%, com 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 83,28%, com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

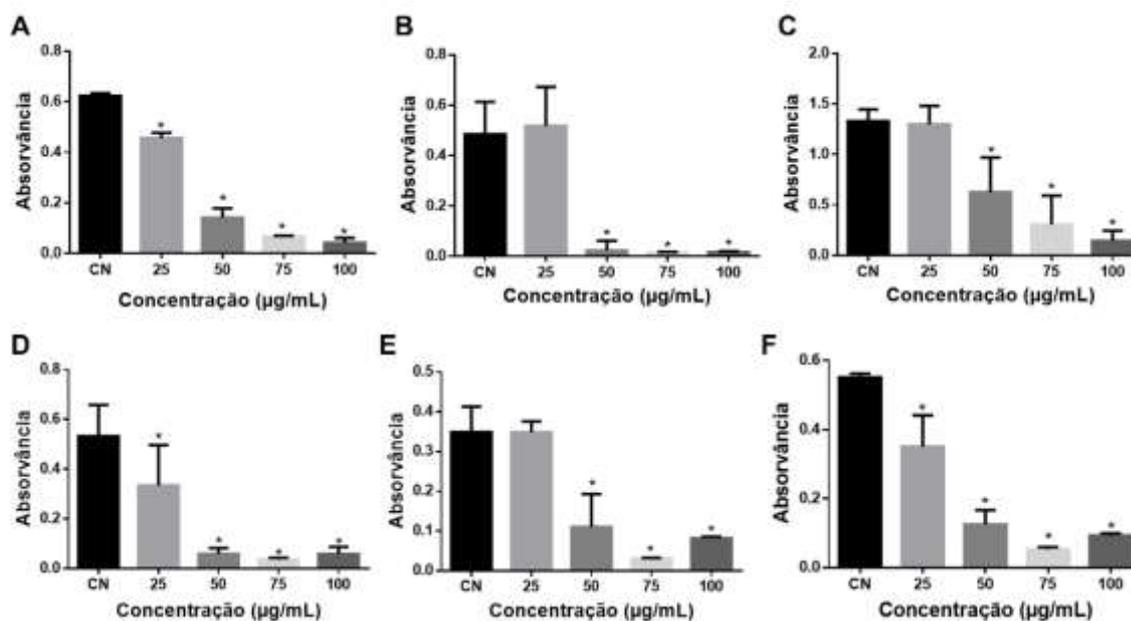


Figura 5: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero *Candida* pela fração 4 (F4) extraída dos cotilédones das sementes de *C. fairchildiana*. CN - controle negativo. Concentrações testadas: 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A – *Candida albicans*. B – *Candida buinensis*. C – *Candida tropicalis*. D – *Candida parapsilosis*. E – *Candida pelliculosa*. F – *Candida mogi*. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão.

A fração 5 (F5), das kafirinas com ligações cruzadas, promoveu a inibição de todas as células tratadas, porém em diferentes concentrações, como mostra a Figura 7. Houve inibição de crescimento de *C. albicans* de 29,85 e 33,72%, nas concentrações de 75 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Já para *C. buinensis*, F5 provocou inibição dose-dependente, a partir do tratamento com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, onde ocorreu 49,94% de inibição, com 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 74,47% de inibição e com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 87,8% de inibição. O crescimento de *C. tropicalis* foi inibido com todas as concentrações testadas; 55,13%, com 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 75,63%, com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 70,35%, com 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e 79,11%, com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Na concentração de 100

$\mu\text{g/mL}$, foi observada inibição de 42,15% sobre as células de *C. parapsilosis*. Já para *C. pelliculosa*, apenas na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ de F5 houve inibição de 33,15%. E, por fim, sobre a levedura *C. mogi*, houve inibição significativa em todas as concentrações; a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, inibição de 57,97%; a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 35,59%; a 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 69,09%; e a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 67,46%.

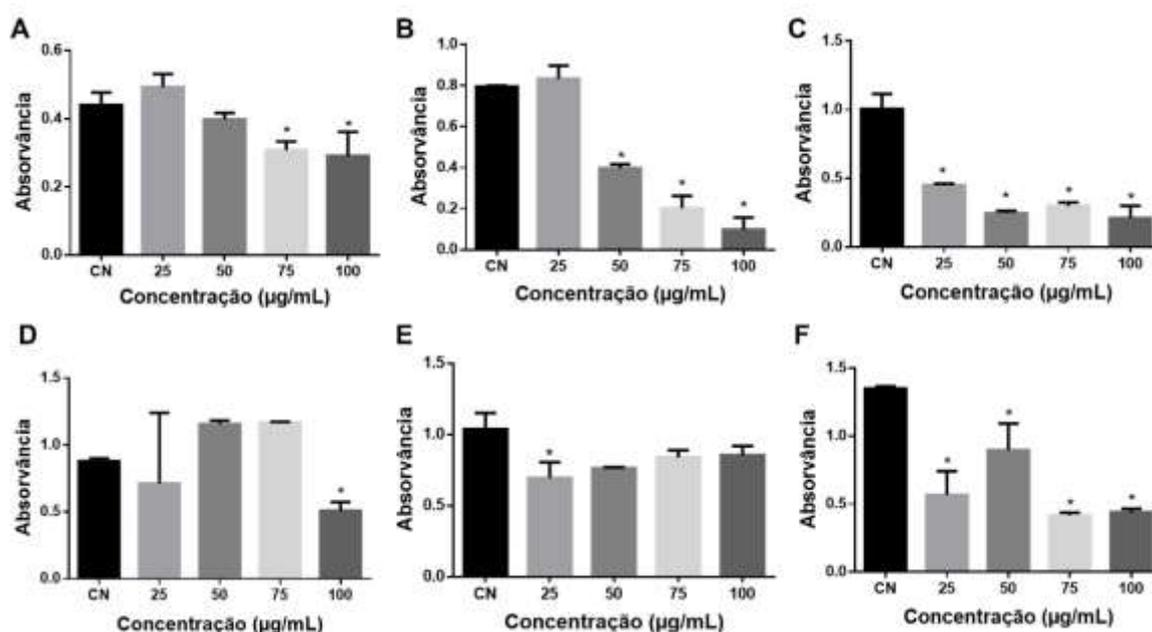


Figura 6: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero *Candida* pela fração 5 (F5) de cotilédones das sementes de *C. fairchildiana*. CN - controle negativo. Concentrações testadas: 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A – *Candida albicans*. B – *Candida buinensis*. C – *Candida tropicalis*. D – *Candida parapsilosis*. E – *Candida pelliculosa*. F – *Candida mogi*. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão.

Por fim, o tratamento com F6 provocou inibição de crescimento celular sobre todas as espécies tratadas e nas quatro diferentes concentrações, com exceção de *C. mogi*, onde não houve inibição significativa na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8). Sobre *C. albicans*, o efeito inibitório de F6 na concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi 32,14%; de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 39,03%; de 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 50,16%; e de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 59,57%, reafirmando o que foi relatado acima, o efeito dose-dependente. As células de *C. buinensis* sofreram inibição em 32,82% na concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 51,5% na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 62,92% na concentração de 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e de 67,82% na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, apresentando também efeito de dose dependência. Para *C. tropicalis* também houve efeito dependente da

dose, onde $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ causaram a inibição de 20,98% das células, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 39,87%, $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 53,62% e a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 57,89%. As células de *C. parapsilosis* foram inibidas em 40,86% na concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de F6, em 53,24%, com $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em 51,7%, com $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e em 46,34% com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. *C. pelliculosa* sofreu inibição em todas as concentrações testadas, sendo de 30,62%, com $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 47,02%, com $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 53,36%, com $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 36,78%, com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. *C. mogi* sofreu inibição de 23,86%, com $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de 32,51%, com $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e de 32,32% com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

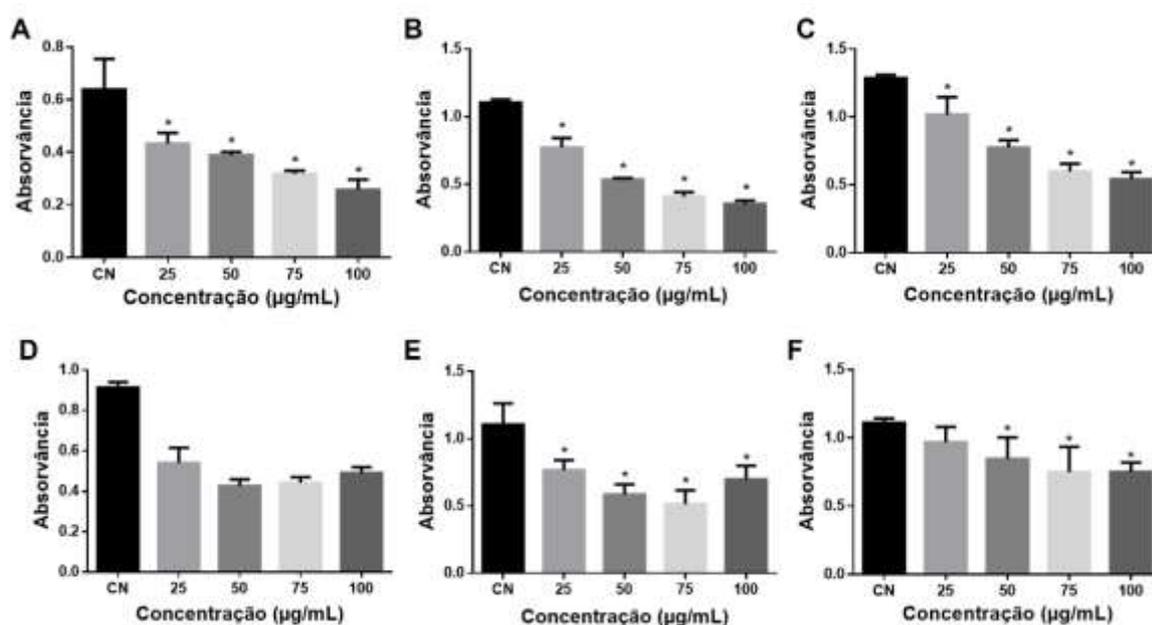


Figura 7: Inibição do crescimento das células de leveduras do gênero *Candida* pela fração 6 (F6) extraída dos cotilédones das sementes de *C. fairchildiana*. CN - controle negativo. Concentrações testadas: 25, 50, 75 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A – *Candida albicans*. B – *Candida buinensis*. C – *Candida tropicalis*. D – *Candida parapsilosis*. E – *Candida pelliculosa*. F – *Candida mogi*. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão.

Após a realização destes ensaios, foi realizada uma comparação de porcentagem de inibição entre as seis diferentes frações e percebeu-se que F4 apresentou maior potencial inibitório, especialmente sobre as leveduras *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*. Por conta disso, a fração 4 foi submetida à análise por Western Blotting visando a identificação de proteínas já conhecidas na literatura com potencial antimicrobiano e, posteriormente, à cromatografia de exclusão molecular visando seu posterior fracionamento a fim de separar e futuramente identificar a proteína tóxica presente nesta fração.

4.4 Análise por Western Blotting

A fração F4 foi submetida à análise por Western blotting a fim de detectar possíveis proteínas com potencial tóxico já descritas na literatura, utilizando para isso anticorpos específicos anti-vicilina e anti-LTP. Pelo menos duas bandas proteicas, de Mr aproximadas a 40 e 25 kDa, foram reconhecidas pelo anticorpo anti-LTP (Figura 9AII) e uma banda de Mr aproximada a 60 kDa foi reconhecida pelo anticorpo anti-vicilina (Figura 9BII).

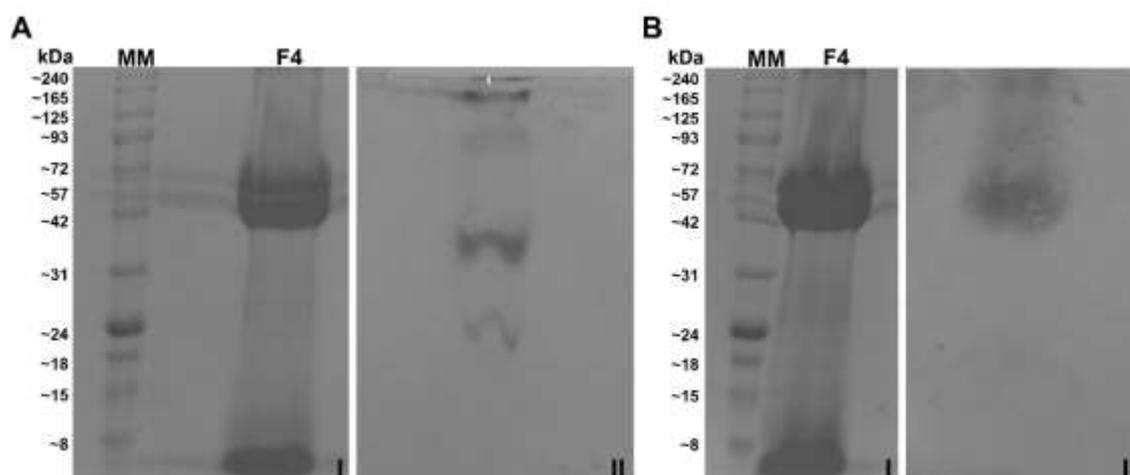


Figura 8: Western blotting da fração 4 (F4) anteriormente demonstrada como potencial antifúngico. AI e BI – gel espelho. MM, marcador de massa molecular de 8 a 240 kDa. Gel corado com Coomassie Brilliant Blue. AII – Western blotting com anticorpo anti-LTP. BII - Western blotting com anticorpo anti-vicilina.

4.5 Isolamento e caracterização das proteínas antifúngicas

Uma vez identificada a fração proteica com maior toxicidade sobre as leveduras, prosseguiu-se o processo de fracionamento da fração F4 para purificação e isolamento da(s) proteína(s) responsável(is) pela atividade antifúngica. A fração 4 foi submetida a cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-50. Na figura 10, podem ser observados três picos oriundos desta separação cromatográfica, denominados F4P1, F4P2 e F4P3, respectivamente.

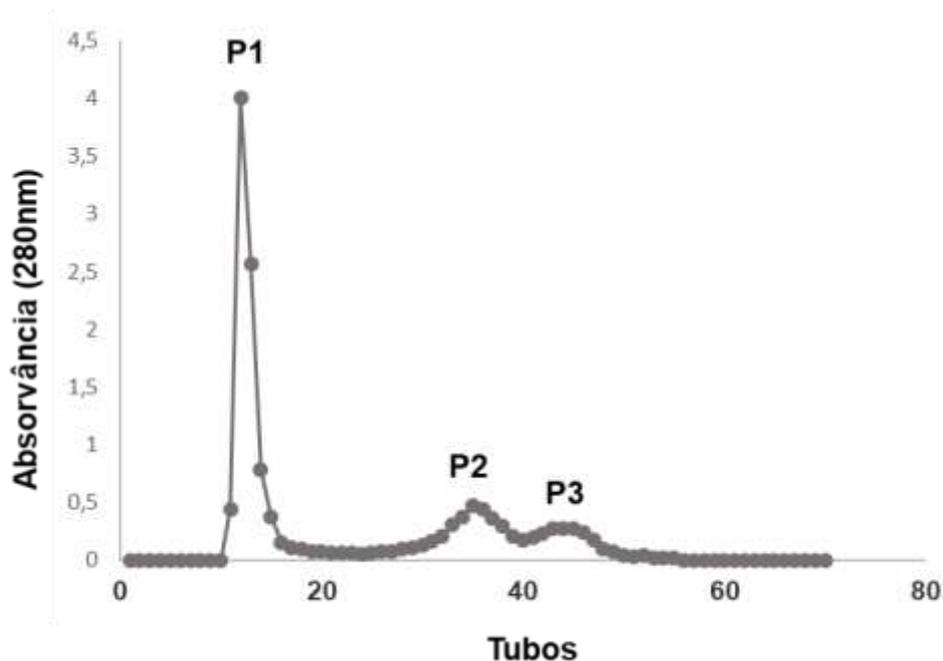


Figura 9: Cromatografia de exclusão molecular da fração 4 (F4), em coluna de Sephadex G-50. Utilizou-se como eluente tampão borato, pH 10,8.

Os picos obtidos nesta cromatografia acima relatada foram avaliados por eletroforese em gel de poliácridamida SDS-PAGE (Figura 11A), juntamente com F4. Não foi possível observar as bandas proteicas realizando a coloração com azul brilhante de Coomassie. Por conta disso, foi realizada a revelação com nitrato de prata. Em F4P2 e em F4P3, observou-se uma banda nítida de M_r abaixo de 8 kDa e uma outra zona de coloração próxima a 50-55 kDa.

A fim de constatar se há a presença de metabólitos secundários nas amostras F4P1, F4P2 e F4P3, foi utilizada a técnica de Cromatografia de Camada Delgada Analítica (CCDA). A figura 11B mostra o perfil dos compostos presentes nestas amostras. Após a revelação física das cromatofolhas, por meio de exposição à luz ultravioleta (UV), nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm, foi possível observar manchas que foram marcadas em lápis (setas brancas). Quando realizada a revelação química, utilizando solução de vanilina sulfúrica 2% e $AlCl_3$, respectivamente, não se obteve a coloração, o que evidenciou a inexistência de metabólitos secundários nas amostras. Para confirmar tal resultado da inexistência de metabólitos secundários, as amostras foram enviadas para análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). No perfil de hidrogênio do RMN foram observados apenas os sinais do solvente piridina e sinais em proporções muito menores que não indicam a presença de compostos de metabolismo secundário na amostra F4P2. F4P1 e F4P3 não foram analisados por RMN por não haver amostra suficiente.

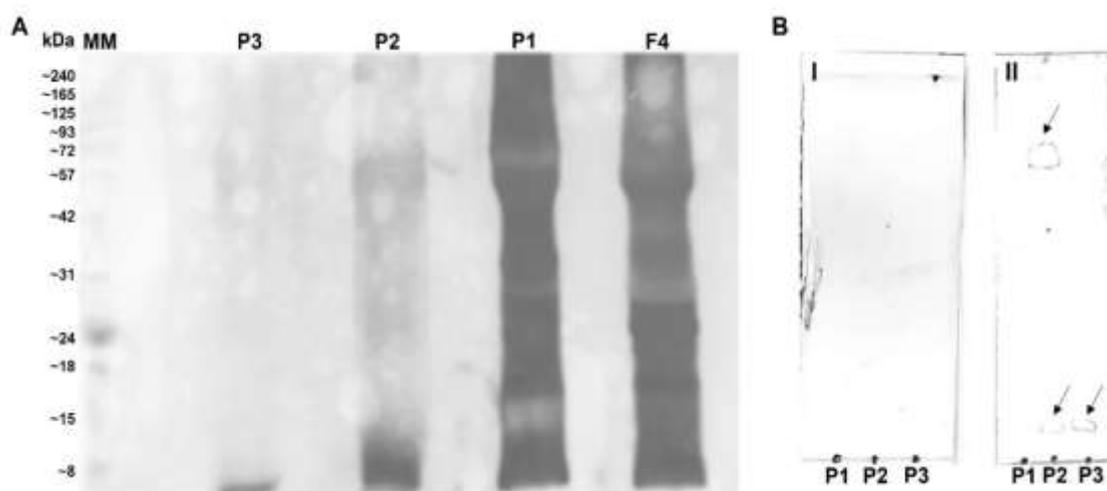


Figura 10: Perfis proteico (A) e de metabólitos secundários (B) dos picos da fração 4 (F4). A - Visualização eletroforética da fração 4 (F4) e seus picos cromatográficos (P1, P2 e P3). MM, marcador de massa molecular. Gel revelado com nitrato de prata. B – Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) dos picos P1, P2 e P3 da fração 4, em cromatofolhas de alumínio com gel de sílica e fase móvel diclorometano:metanol (98:02). I - Revelado com solução de vanilina sulfúrica 2% (revelador químico geral). II - Revelado com solução AlCl_3 (revelador de compostos fenólicos). Setas brancas indicam marcações observadas na revelação física (luz ultravioleta) das cromatofolhas, no comprimento de onda de 365 nm.

4.6 Efeito inibitório de diferentes concentrações das frações cromatográficas de F4 sobre leveduras do gênero *Candida*

Os picos obtidos da cromatografia de exclusão foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir as leveduras *Candida albicans*, *Candida buinensis* e *Candida parapsilosis*. Foram testadas as concentrações 1, 3, 6, 12, 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Todos os três picos provocaram inibição sobre as três leveduras testadas.

Na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, F4P1 inibiu acima de 98% todas as três leveduras testadas, como pode ser observado nas Figuras 12A, 12 B e 12C, que mostra a densidade das células tratadas em diferentes concentrações em relação ao controle. Nas imagens de microscopia óptica (Figuras 12AI, 12BII e 12CIII) não foi possível visualizar células no tratamento de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o que sugere que esta é a concentração mínima inibitória (MIC) – a mais baixa concentração de um produto químico responsável por limitar o crescimento visível de um microrganismo – desta fração para as leveduras *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosi*.

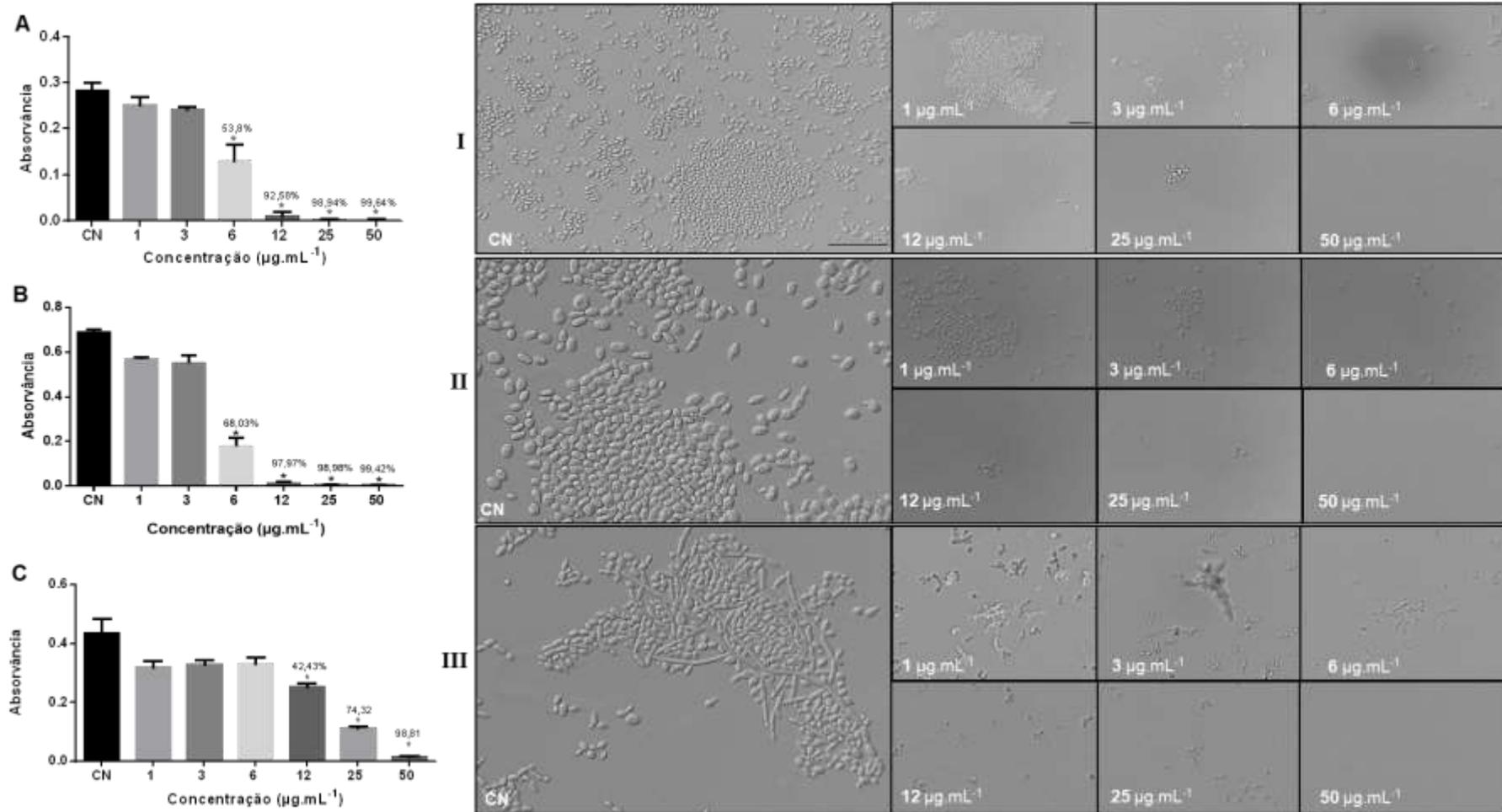


Figura 11: Inibição do crescimento de leveduras do gênero *Candida* expostas a diferentes concentrações de F4P1 (pico 1 da fração 4) por 24 h. CN - controle negativo. Painéis: A – *Candida albicans*, B – *Candida buinensis* e C – *Candida parapsilosis*. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão. Painéis I, II e III – Imagens de microscopia ótica de alíquotas dos ensaios mostrados em A, B e C. Barra de escala = 1 mm.

As três leveduras foram fortemente afetadas quando tratadas com F4P2, havendo drástica redução em sua densidade populacional (Figura 13). Observa-se que ocorreu 100% de inibição no tratamento com $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre células de *C. albicans* (Figura 13A), porém, pelas imagens de microscopia (Figura 13AI) percebe-se que não foi possível observar células em nenhuma concentração testada, nem mesmo na mais baixa concentração, de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que sugere, a partir das concentrações testadas, que $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ é a MIC para esta levedura.

A partir do tratamento utilizando $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de F4P2, as células de *C. buinensis* tiveram 100% de inibição pelos dados de absorvância (Figura 13B). Entretanto, pelas imagens de microscopia, apenas nos tratamentos utilizando as concentrações $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi possível visualizar células (Figura 13BII). A partir da concentração de $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não se observaram mais células, o que sugere que esta é a MIC para esta levedura.

No tratamento sobre as células de *C. parapsilosis*, é possível observar pelos dados de absorvância que a partir da concentração de $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ há 100% de inibição (Figura 13C), porém, em nenhuma das concentrações testadas foi possível visualizar células por microscopia, sugerindo uma MIC para esta levedura de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 13CIII).

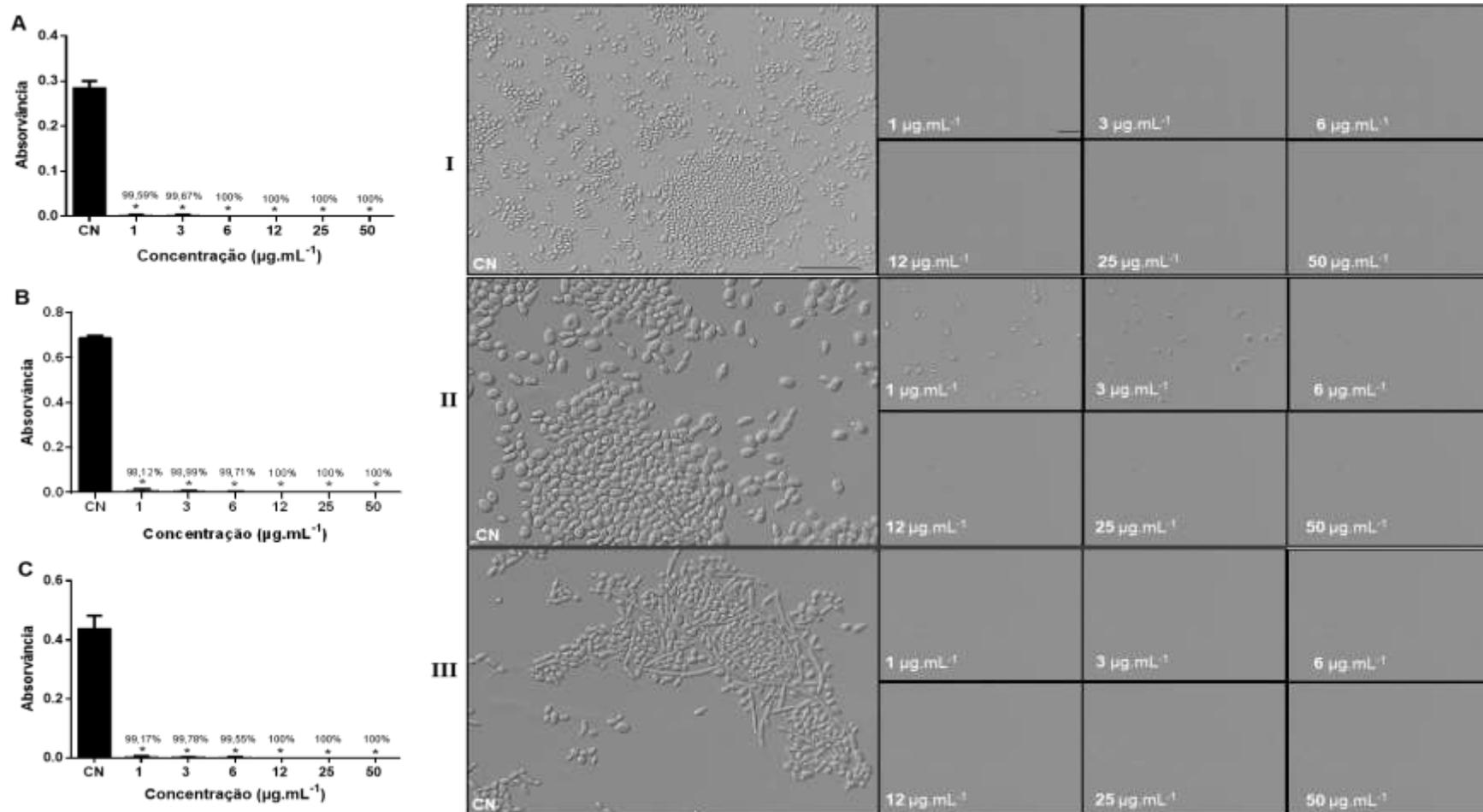


Figura 12: Inibição do crescimento de leveduras do gênero *Candida* expostas a diferentes concentrações de F4P2 (pico 2 da fração 4) por 24 h. CN - controle negativo. Painéis: A - *Candida albicans*, B – *Candida buinensis* e C – *Candida parapsilosis*. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão. Painéis I, II e III – Imagens de microscopia ótica de alíquotas dos ensaios mostrados em A, B e C. Barra de escala = 1 mm.

Os tratamentos realizados com F4P3 (Figura 14) apresentaram 100% de inibição já na concentração de $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre as três leveduras testadas. Entretanto, pelas imagens de microscopia, observa-se que *C. albicans* apresentou células apenas nas concentrações de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 14AI), onde, de acordo com os dados de densidade, ocorreu 98,34% e 98,62% de inibição (Figura 14A), respectivamente, sugerindo que a MIC para esta célula seja de $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$. De acordo também com as imagens de microscopia, não foram visualizadas células em nenhuma das concentrações testadas sobre *C. buinensis* (Figura 14BII), podendo-se supor que $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ seja a MIC para esta célula. Já sobre *C. parapsilosis*, foi possível visualizar células apenas nos tratamentos com as concentrações $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 14CIII), o que sugere que a MIC para esta célula seja de $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As frações F4P2 e F4P3, em suma, já nas primeiras 6 e 12 horas de incubação com as células das três espécies de leveduras, em todas as concentrações testadas, inibiram em 100% o crescimento dos fungos. Foram realizados testes em diferentes concentrações na tentativa de se observar algum crescimento mediante dose resposta. Entretanto, como se pode observar, na menor concentração possível testada, F4P2 e F4P3 inibiram drasticamente as células fúngicas testadas. Isso dificultou a identificação do IC_{50} das amostras, porém reforça o alto potencial tóxico das frações.

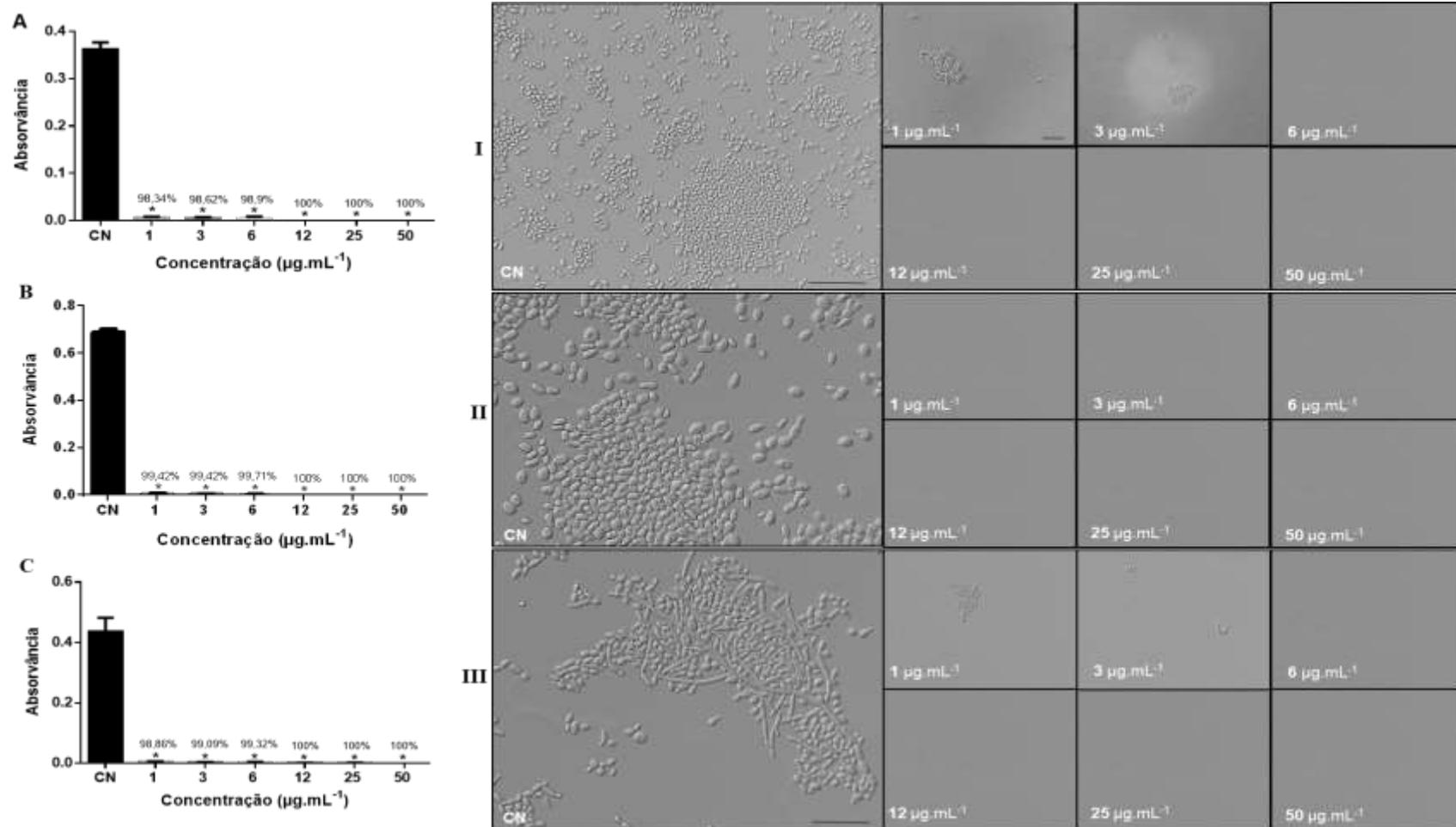


Figura 13: Inibição do crescimento de leveduras do gênero *Candida* expostas a diferentes concentrações de F4P3 (pico 2 da fração 4) por 24 h. CN - controle negativo. Painéis: A - *Candida albicans*, B – *Candida buinensis* e C – *Candida parapsilosis*. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. As barras representam o desvio padrão. Painéis I, II e III – Imagens de microscopia ótica de alíquotas dos ensaios mostrados em A, B e C. Barra de escala = 1 mm.

4.7 Efeito de F4P1 sobre a permeabilidade de membranas das células de leveduras do gênero *Candida*

Para investigar o possível mecanismo de ação inibitória da fração F4P1 sobre o o crescimento das leveduras, alíquotas das células tratadas com $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de células controle foram incubadas com o corante SYTOX® Green e visualizadas em microscópio óptico.

Na Figura 15 é possível observar que as diferentes células tratadas com F4P1 não apresentaram marcação fluorescente, sugerindo que tais células não sofreram alterações na permeabilidade de suas membranas.

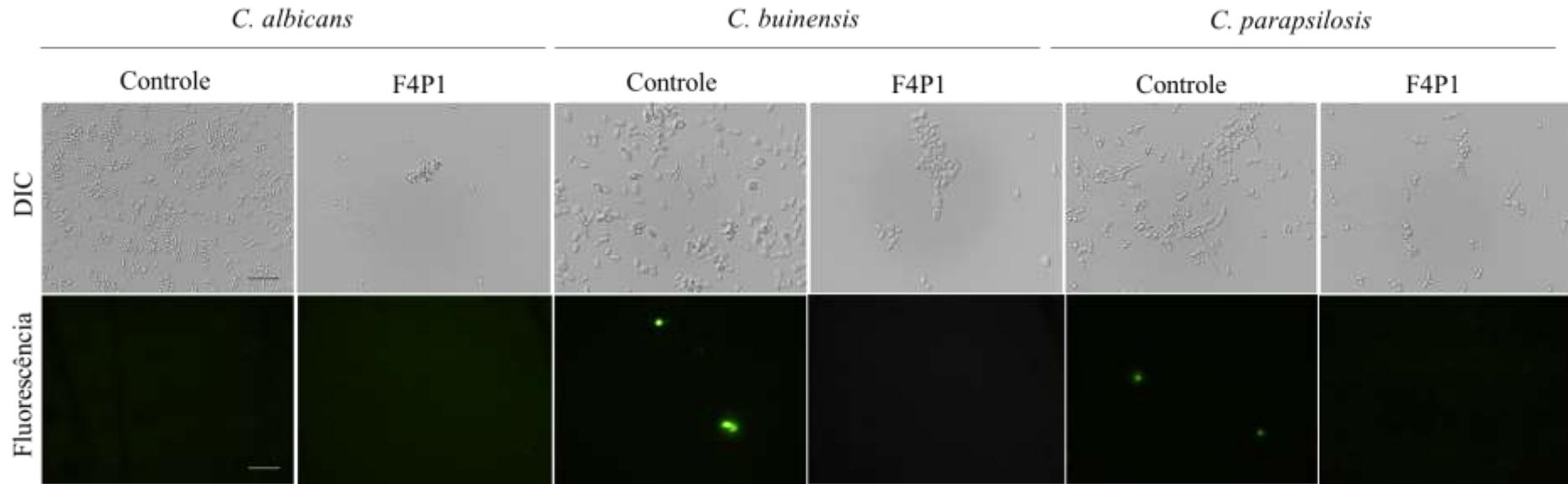


Figura 14: Efeito de F4P1 sobre a permeabilidade de membranas celulares das leveduras *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*, por microscopia de fluorescência. Tratamento com F4P1: $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por 24 horas. O corante SYTOX® Green (marcador de ácido nucleico) foi adicionado nas células controle e tratadas. DIC, contraste de interferência diferencial. Barras = $20 \mu\text{m}$.

4.8 Efeito de F4P1 sobre níveis endógenos de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células de leveduras

Para verificar se a fração F4P1 altera os níveis endógenos de ROS nas células das leveduras estudadas, foi utilizada a sonda H2DCFDA. Na Figura 16 é possível verificar uma discreta marcação fluorescente nas células de *C. buinensis* tratadas com F4P1, indicando a possibilidade de estar havendo aumento da produção endógena de ROS nessas células. Entretanto, não é possível afirmar isso por conta da baixa intensidade de marcação do corante nestas células.

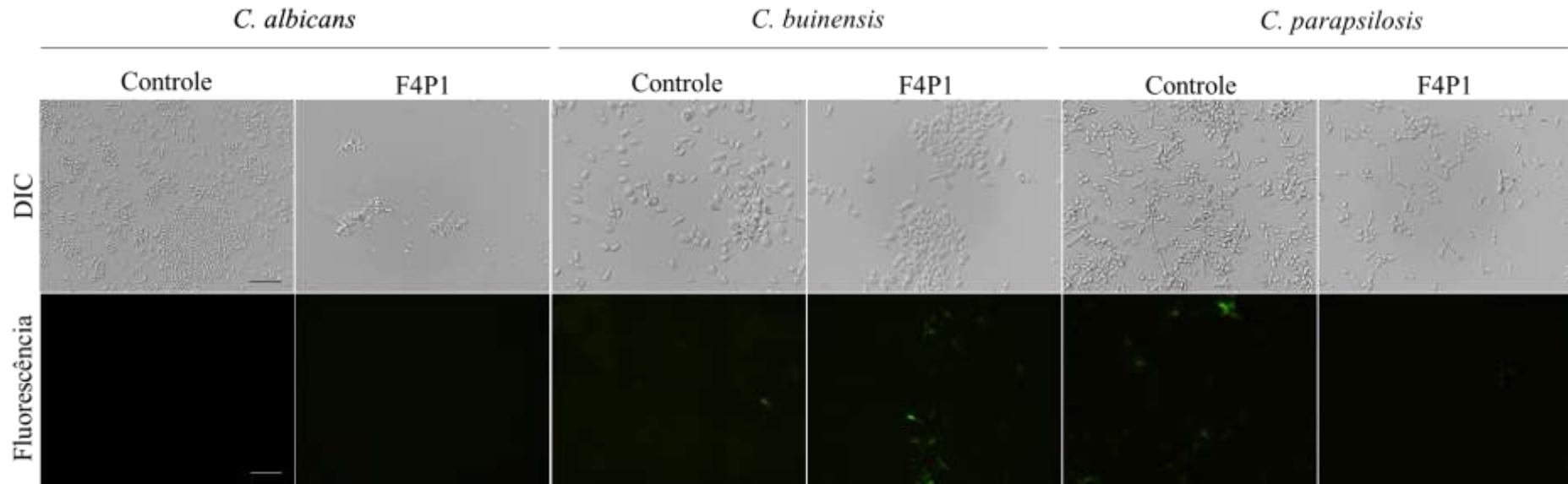


Figura 15: Efeito de F4P1 sobre os níveis endógenos de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) nas leveduras *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis* por microscopia de fluorescência. Tratamento com F4P1: $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 horas. O marcador 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate foi adicionado nas células controle e tratadas. DIC - contraste de interferência diferencial. Barras = $20 \mu\text{m}$.

4.9 Análise das frações F4P2 e F4P3 por espectrometria de massas

Pelo fato de encontrarem-se, aparentemente, bastante isolados, de acordo com visualização por eletroforese em gel de poliacrilamida, e também por conta de seu alto potencial tóxico sobre as leveduras testadas, os picos F4P2 e F4P3, da fração F4, foram analisados por espectrometria de massas.

As Tabelas 1 e 2 mostram os dados relativos aos peptídeos provenientes da hidrólise por tripsina das frações F4P2 (04 peptídeos) e F4P3 (03 peptídeos).

Tabela 1: Identificação dos peptídeos obtidos de F4P2 por massas, através de alinhamento de aminoácidos, utilizando o software no BLAST.

Nº	Razão m/z	Peptídeos de F4P2	Intensidade da amostra	Alinhamento	Cobertura %	% Ident.	Espécies	E value	Acesso
1	950.48	CGVNLPYK	41379	LTP	100%	87,50%	<i>Lens culinaris</i>	0.003	A0AT33.1
					100%	87,50%	<i>Vigna radiata</i>	0.003	P83434.1
					100%	75%	<i>Cicer arietinum</i>	0.13	Q23758.1
2	1064.66	LAIPVНКPGR	231140	β-conglicinina 2	100%	100%	<i>Glycine max</i>	8e-06	P0DO15.1
3	1103.58	FGLVYVDYK	29413	Vicianina hidrolase	100%	66,67%	<i>Vicia sativa</i>	0.020	A2SY66.1
4	1357.72	GAIIFGDAPNNLR	64398	Globulina 7S	100%	92,31%	<i>Glycine max</i>	4e-08	P13917.2

Tabela 2: Identificação dos peptídeos obtidos de F4P3 por massas, através de alinhamento de aminoácidos, utilizando o software no BLAST

N ^o	Razão m/z	Peptídeos de F4P3	Intensidade da amostra	Alinhamento	Cobertura	% Ident.	Espécies	E valor	Acesso
1	3393.80	MEKKSIALGLCFLFLVLFVALVVQTEAK	226529	Defensina-simile	100%	86,21%	<i>Vigna unguiculata</i>	2e-14	XP_027927204.1
				Defensina	100%	82,76%	<i>Clitoria ternatea</i>	4e-13	AFD28578.1
2	1641.61	GPCFTTGSCDDHCK	64356	Defensina-simile	100%	100%	<i>Vigna unguiculata</i>	4e-11	P18646.1
3	1064.66	LAIPVНКPGR	172799	β-conglicinina	100%	100%	<i>Glycine max</i>	8e-06	P0DO15.1

5. Discussão

As infecções fúngicas aumentaram nas últimas décadas e as opções terapêuticas para tratá-las são limitadas. A Organização Mundial da Saúde estima que a resistência antimicrobiana causará 10 milhões de mortes até 2050 (Giono et al., 2020). O aumento de espécies com resistência primária ou secundária a fármacos antifúngicos gera, constantemente, a necessidade de se desenvolverem novas formulações ou recorrer a alternativas como a combinação de fármacos (Quiles-Melero & García-Rodríguez, 2021). Por conta disso, é crescente o interesse pela busca de novos compostos antimicrobianos naturais com potencial de controlar agentes patogênicos.

Por serem organismos sésseis, as plantas estão expostas constantemente a diversos tipos de agressões bióticas e abióticas, como os ataques de muitos organismos fitopatogênicos. Para enfrentar o estresse e garantir a sua sobrevivência em condições desfavoráveis, sofreram adaptações evolutivas e desenvolveram mecanismos de defesa contra tais situações como, por exemplo, a síntese de proteínas tóxicas, como as lectinas, as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), inibidores de proteases, inibidores de α -amilases, peptídeos antimicrobianos, defensinas, ureases, arcelinas e toxinas formadoras de poros (Castro; Fontes, 2005; Dang & Van Damme, 2015). As atividades e mecanismos de ação destas moléculas têm despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo e sugere-se que muitas delas podem ser uma alternativa aos métodos convencionais no combate de infecções fúngicas e antimicrobianas em geral.

Nos últimos anos, um número crescente de proteínas e peptídeos isolados e purificados de plantas têm demonstrado ampla atividade antimicrobiana (Nawrot et al., 2014; Holaskova et al., 2015; Ribeiro et al., 2022). Especificamente em relação à espécie *Clitoria fairchildiana*, trabalhos têm descrito o alto potencial biotecnológico identificado em suas sementes (Leite et al., 2012; Oliveira et al., 2015; Santos et al., 2018; Bertonceli et al., 2022a; Bertonceli et al., 2022b). Bertonceli et al. (2022a) observou ação inseticida contra o inseto bruquídeo *C. maculatus* de seis diferentes classes proteicas, extraídas dos cotilédones das sementes de *C. fairchildiana*. No presente trabalho, avaliamos o potencial antifúngico destas mesmas seis diferentes classes de proteínas, tendo como alvo leveduras do gênero *Candida*, das espécies *C. albicans*, *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* e *C. mogii*. *C. albicans*, em relação às leveduras utilizadas neste trabalho, é a espécie mais associada a quadros patológicos relacionados a infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos. Esta espécie é naturalmente sensível a uma gama de antifúngicos, entretanto casos de resistência têm sido associados ao uso prolongado de azólicos. A cepa *C. tropicalis*

constitui um agente oportunista em casos de neoplasias, sendo sua frequência maior em leucemias e menor em tumores sólidos. Em países da América Latina, principalmente no Brasil, esta espécie é extremamente frequente (Colombo & Guimarães, 2003). A distribuição das espécies de leveduras do gênero *Candida* é um desafio significativo e há uma considerável variabilidade geográfica na prevalência de espécies patogênicas. Cada espécie de *Candida* apresenta suas próprias características únicas com relação ao tropismo do tecido, propensão para causar virulência invasiva por doença e suscetibilidade antifúngica (Zhang et al. 2020).

Com exceção da fração F3, todas as frações testadas apresentaram efeito inibitório sobre pelo menos uma das leveduras testadas (Figuras 3 a 8). Embora F3 não tenha apresentado ação antifúngica, no trabalho descrito por Bertoneceli et al. (2022a), esta foi a fração que apresentou maior ação inseticida. A fração glutelínica F4 foi a que apresentou maior efeito inibitório sobre as leveduras, sobretudo sobre *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*, na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Esta concentração é muito inferior à utilizada por Santos et al. (2018), que observou efeito inibitório de rotenóides extraídos de sementes de *C. fairchildiana* sobre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* em concentrações entre 700 e 1050 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Por conta disso, decidimos seguir adiante com a purificação desta fração por cromatografia de exclusão molecular em busca do isolamento de moléculas bioativas.

A cromatografia de exclusão molecular é utilizada por pesquisadores para a purificação de proteínas e separação conforme tamanho e foi também utilizada por Dantzger et al. (2015) para purificar um inibidor de proteinase de sementes de *Clitoria fairchildiana*. A partir da fração F4, três frações foram obtidas por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-50. Essas frações foram denominadas F4P1, F4P2 e F4P3 (Figura 10) e foram observadas em gel de poliacrilamida coradas com nitrato de prata (Figura 11A). Em F4P2 e em F4P3, observou-se uma banda nítida de Mr abaixo de 8 kDa e uma outra zona de coloração próxima a 50-55 kDa. Todas as frações obtidas foram testadas em um ensaio antifúngico inicial com as leveduras *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis* utilizando 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de amostra.

Assim, observamos que as frações de interesse na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram capazes de inibir significativamente o crescimento das espécies de *Candida*, sendo que F4P1 foi capaz de inibir cerca de 98% (Figura 12 A, B, C) e F4P2 (Figura 13 A, B, C) e F4P3 (Figura 14 A, B, C) inibiram 100% do crescimento celular. Por conta disso, realizamos os ensaios antifúngicos em concentrações inferiores na tentativa de identificar o IC_{50} de cada fração para poder investigar os possíveis mecanismos de ação. As frações F4P2 e F4P3 foram potencialmente eficazes sobre as três diferentes leveduras desde a menor

concentração testada, com MIC entre 1 e 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Santos et al. (2020) descreveu os efeitos de uma lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) no crescimento e sobrevivência de espécies de *Candida*, onde WSMoL inibiu o crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* com MIC de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já Taveira et al. (2022) determinou as atividades anti-*Candida* e antimicobacteriana na presença do peptídeo bioinspirado Ca Def2.1_{G27-K44}, que apresentou atividade inibitória sobre *C. albicans*, *C. buinensis*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* com valores de MIC variando de 25 a 50 μM .

Por conta do alto potencial inibitório de F4P2 e F4P3, não foi possível obter células viáveis para realizar ensaios de mecanismo de ação. Portanto, a partir dos resultados obtidos, apenas a fração F4P1, na concentração de 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi avaliada quanto à sua capacidade de permeabilizar membranas fúngicas (Figura 15). Este ensaio é realizado utilizando o corante fluorescente SYTOX Green, que só passa por membranas estruturalmente comprometidas e fluoresce quando se liga a ácidos nucleicos. A fração F4P1 não causou permeabilização nas membranas das células de *C. albicans*, *C. buinensis* e nem de *C. parapsilosis*. Klimpel et al. (2018) e Li et al. (2018) obtiveram resultados semelhantes ao observar a baixa capacidade de penetração de agentes antimicrobianos em membranas de microrganismos patogênicos, apoiando a hipótese da existência de outros alvos intracelulares para ação peptídica.

Foi investigada também a capacidade de F4P1 induzir o aumento da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*, tratadas com 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 16). Nas condições avaliadas, foi possível verificar uma discreta marcação fluorescente nas células de *C. buinensis*, indicando a possibilidade de estar havendo aumento da produção endógena de ROS nessas células. Entretanto, não é possível afirmar isso por conta da baixa intensidade de marcação do corante nestas células.

Dado ao avanço do processo de isolamento, bem como à atividade antifúngica promissora das frações F4P2 e F4P3, estas foram submetidas à análise por espectrometria de massas. Foram gerados, após a hidrólise por tripsina, 04 peptídeos na fração F4P2 e 03 peptídeos na fração F4P3 com sequências reconhecíveis em bancos de dados. Os peptídeos de F4P2 se alinharam às proteínas LTP, β -conglucina 1, Vicianina hidrolase e Globulina 7S. Já os peptídeos de F4P3 se alinharam à Defensina e β -conglucina 2. Esses resultados confirmam os resultados obtidos a partir da análise da fração F4 por Western blotting, que mostrou duas bandas proteicas, de Mr aproximadas a 40 e 25 kDa, reconhecidas pelo anticorpo anti-LTP (Figura 9AII) e uma banda de Mr aproximada a 60 kDa, reconhecida pelo anticorpo anti-vicilina (Figura 9BII).

Por conta de não se encontrarem totalmente isoladas, não se sabe qual proteína contida nestas frações apresenta potencial antifúngico. Serão necessárias novas estratégias de purificação proteica. Entretanto, diversos trabalhos relatam atividade antimicrobiana de algumas classes das proteínas identificadas acima.

Proteínas de transferência de lipídios (LTPs) são pequenas proteínas ricas em cisteína que desempenham várias funções no crescimento e desenvolvimento da planta, incluindo formação de cera de cutina, adesão do tubo polínico, expansão celular, desenvolvimento de sementes, germinação e adaptação às mudanças nas condições ambientais. Muitas LTPs inibem o crescimento de fungos ou bactérias e atuam como reguladores positivos na resistência a doenças em plantas (Gao et al., 2022). Zottich et al. (2011) identificou um peptídeo de 9 kDa isolado das sementes de *Coffea canephora*, denominado Cc-LTP1 que apresentou homologia com LTPs isoladas de diferentes plantas e que exibiu forte atividade antifúngica sobre *C. albicans* e também promoveu alterações morfológicas, incluindo formação de pseudo-hifas em *C. tropicalis*. Cruz et al. (2010) isolou um peptídeo também de tamanho próximo a 9 kDa de *Capsicum annuum* que apresentou homologia com LTP e foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrium lindemuthianum*, e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*; além disso, inibiu a acidificação do meio estimulada por glicose por células de levedura de *S. cerevisiae* e causou várias alterações morfológicas em *P. membranifaciens*.

Globulinas 7S são proteínas de reserva de sementes e a β -conglícinina é a principal proteína de estocagem, do tipo globulina 7S, de cotilédones de sementes de soja (Hayshi et al., 2009). Entretanto, para além de uma função simples de estoque de aminoácidos, muitos trabalhos têm relatado a ação antimicrobiana destas proteínas. Abdel-Shafi et al. (2019) descreveu atividade antibacteriana de globulinas 7S e 11S isoladas de sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), sobre *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* com valores de MICs de 100, 200, 100, 10, 100, 50 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Atallah et al. (2015) descreveu que a β -conglícinina da soja e as glicoproteínas p22 do peixe-gato possuem atividade antifúngica significativa sobre *Pseudoperonospora cubensis*. Osman et al. (2016) identificou uma fração de proteína de soja contendo principalmente β -conglícinina e glicinina que inibiu significativamente o crescimento in vitro de *Penicillium digitatum* em uma concentração de 50 mg/L. Bard et al. (2014) isolaram uma fração denominada H4 extraída de sementes de *C. baccatum*, rica em peptídeos que revelaram homologia com vicilinas. H4 exibiu forte atividade antifúngica sobre *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus* e também

promoveu alterações morfológicas nas leveduras, incluindo a formação de pseudo-hifas. Marcus et al. (2008) descreveram três sequências peptídicas identificadas na região hidrofílica próxima ao N-terminal de proteínas vicilinas-símile de sementes de *Macadamia integrifolia* e *Theobroma cacao*, que exibiriam atividade antimicrobiana. Ribeiro et al. (2007) isolaram uma fração proteica identificada por P1 cuja sequência N-terminal dos aminoácidos revelou homologia à vicilinas. Foi observado efeito antifúngico de P1 sobre o crescimento do fungo patogênico *Fusarium oxysporum*.

As defensas vegetais são peptídeos ricos em cisteína que possuem atividade biológica em uma ampla gama de organismos. Sua atividade é dirigida principalmente sobre fungos, mas também foram relatadas ações bactericidas e inseticidas (Vriens et al., 2014; Kovaleva et al., 2020). Wong et al. (2003) purificou um peptídeo antifúngico cuja sequência N-terminal se assemelhava aos peptídeos relacionados à defensina. O peptídeo exerceu atividade antifúngica sobre as espécies *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola*, com IC₅₀ de 2 µM e 10 µM, respectivamente. Aguiaras et al. (2021) identificou uma proteína de baixa massa molecular, denominada Cc Def3, extraída de *Capsicum chinense* que apresentou similaridade com AMPs de defensas vegetais e apresentou atividade antifúngica a 200 µg.mL⁻¹ sobre as leveduras *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*. Kamli et al. (2022) investigou a atividade candidida de um peptídeo defensina-like (D-lp1) contra vinte e cinco cepas clínicas de *C. auris*. Os valores de MIC e concentração fungicida mínima (CFM) variaram de 0,047-0,78 mg/mL e 0,095-1,56 mg/mL, respectivamente. D-lp1 em concentrações sub-inibitórias potencialmente anulou a formação de biofilmes e biofilmes maduros de 24 horas.

Na fração F4P2, obtida no presente trabalho, foi identificada um peptídeo homólogo à enzima vicianina hidrolase de *Vicia sativa* (*Vicia angustifolia*). Esta é uma glicosidade cianogênica incomum que hidrolisa um glicosídeo dissacarídeo acumulado nestas sementes, a vicianina [mandelonitrila β-vicianosídeo (6-O-α-L-arabinopiranosil-β-D-glucopiranosídeo)], em mandelonitrila e em um dissacarídeo, a vicianose. Ahn et al. (2007) purificaram esta enzima, denominada por eles de VH, usando cromatografias em DEAE-, CM- e Con A-Sepharose, e a massa molecular da VH purificada foi estimada em 56 kDa. A proteína VH consiste em um polipeptídeo de 509 aminoácidos contendo um peptídeo sinal de secreção putativo e compartilha cerca de 50% de identidade com vários tipos de beta-glicosidases de plantas, incluindo beta-primeverosidase de folha de chá e hidrolase de furcatina, e é classificada na família 1 das glicosil hidrolases.

Em relação à análise por Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) dos picos P1, P2 e P3 da fração 4 (Figuras 11BI e BII) para verificar a possibilidade da existência

de metabólitos secundários nas amostras, acreditamos que as marcas observadas na figura 11BII (setas pretas) podem tratar-se de proteínas que foram carregadas pela CCDA uma vez que são solúveis na fase móvel, os aminoácidos mais apolares migram para a parte superior da placa e os mais polares ficam no início (parte inferior) da placa. Para confirmar nossa hipótese precisaríamos fazer a revelação química da cromatofolha com o revelador de aminoácidos ninidrina, mas não tínhamos esse revelador no momento. Estas marcações podem estar associadas aos peptídeos identificados nas amostras por espectrometria de massas. Para reforçar esta hipótese, Amalendu (2013) descreve a possibilidade de revelação da placa de sílica e visualização dos aminoácidos utilizando o revelador de aminoácidos ninidrina, um reagente que produz cor púrpura com todos os aminoácidos, exceto prolina e hidroxiprolina.

6. Conclusões

- Com exceção da fração F3 (kafirinas), todas as frações proteicas apresentaram efeito inibitório sobre pelo menos uma levedura testada do gênero *Candida*, indicando haver nos cotilédones de sementes de *Clitoria fairchildiana* um alto potencial de controle para leveduras deste gênero.
- A fração F4 (globulinas) apresentou maior toxicidade para as espécies de *Candida*, sobretudo *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*, principalmente a partir do tratamento com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
- Os três picos obtidos da fração F4 (F4P1, F4P2 e F4P3) a partir de cromatografia de exclusão molecular causaram inibição significativa sobre *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*. Em F4P2 e em F4P3, observou-se uma banda nítida de Mr abaixo de 8 kDa e uma outra zona de coloração próxima a 50-55 kDa.
- F4P2 e F4P3 apresentam alto potencial de toxicidade sobre as leveduras *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*, provocando forte inibição desde a menor concentração testada (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).
- Em nenhum dos picos obtidos de F4 observou-se a presença de metabólitos secundários, sugerindo que o potencial antifúngico destas amostras é proveniente de proteínas.

- Os três picos obtidos a partir de F4 não se encontram isolados. Em F4P2 foram identificados cinco peptídeos, que tiveram alinhamento com LTP, Fitocromo B, β -conglícinina 2, β -conglícinina 1, Vicianina hidrolase e Globulina 7S. Já em F4P3 foram identificados três peptídeos, que se alinharam a Defensina-simile e β -conglícinina 2.

7. Referências Bibliográficas

1. Abdel-Shafi, S.; Al-Mohammadi A. R.; Osman, A.; Enan, G.; Abdel-Hameid, S.; Sitothy, M. Characterization and antibacterial activity of 7S and 11S globulins isolated from Cowpea Seed Protein. *Molecules*, 19, 24, 2019. doi: 10.3390/molecules24061082
2. Aguiéiras, M. C. L.; Resende, L. M.; Souza, T. A. M.; Nagano, C. S.; Chaves, R. P.; Taveira, G. B.; Carvalho, A. O.; Rodrigues, R.; Gomes, V. M.; Mello, E. O. Potent Anti-Candida Fraction Isolated from *Capsicum chinense* Fruits Contains an Antimicrobial Peptide That is Similar to Plant Defensin and is Able to Inhibit the Activity of Different α -Amylase Enzymes. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 13, 3, 862-872, 2021. doi: 10.1007/s12602-020-09739-3
3. Ahn, Y. O.; Saino, H.; Mizutani, M.; Shimizu, B.; Sakata, K. Vicianin hydrolase is a novel cyanogenic beta-glycosidase specific to beta-vicianoside (6-O-alpha-L-arabinopyranosyl-beta-D-glucopyranoside) in seeds of *Vicia augustifolia*. *Plant Cell Physiol*, 48, 10, 938-47, 2007. doi: 10.1093/pcp/pcm065
4. Arendrup, M. C.; Perlin, D. S.; Jensen, R. H.; Howard, S. J.; Goodwin, J.; Hope, W. Differential in vivo activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* isolates with and without FKS resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 2435-2442, 2012. doi: 10.1128/AAC.06369-11
5. Arendrup, M. C.; Patterson, T. F. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 216, S445–S451, 2017. doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix131>
6. Atallah, O. O.; Osman, A.; Ali, M. A.; Sitothy, M. Soybean β -conglycinin and catfish cutaneous mucous p22 glycoproteins deteriorate sporangial cell walls of *Pseudoperonospora cubensis* and suppress cucumber downy mildew. *Pest Management Science*, 2021. doi: 10.1002/ps.6375
7. Bard, G. C.; Nascimento, V. V.; Oliveira, A. E. A.; Rodrigues, R.; Da Cunha, M.; Dias, G. B.; Vasconcelos, I. M.; Carvalho, A. O. Gomes, V. M. Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are α -amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 102, 335–343, 2014.
8. Bertoneceli, M. A. A.; Oliveira, A. E. A.; Ferreira, A. T. S.; Perales, J.; Fernandes, K. V. S. A vicilin-like protein extracted from *Clitoria fairchildiana* cotyledons was toxic to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 184, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105129> 4

9. Bertonceli, M. A. A.; Oliveira, A. E. A.; Passos, M. S.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; Lemos, F. J. A.; Martins, B. X.; Façanha, A. R.; Pireda, S.; Da Cunha, M.; Fernandes, K. V. S. Rotenoids from *Clitoria fairchildiana* R. Howard (Fabaceae) seeds affect the cellular metabolism of larvae of *Aedes aegypti* L. (Culicidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 186, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105167>
10. Broekaert, W. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters*, 69, 55–59, 1990.
11. Castro, M. & Fontes, W. Plant Defense and Antimicrobial Peptides. *Protein & Peptide Letters*, 12, 1, 11–16, 2005.
12. Chow, N. A.; Muñoz, J. F.; Gade, L.; Berkow, E. L.; Li, X.; Welsh, R. M.; Forsberg, K.; Lockhart, S. R.; Adam, R.; Alanio, A.; Alastruey-Izquierdo, A.; Althawadi, S.; Araúz, A. B.; Ben-Ami, R.; Bharat, A.; Calvo, B.; Desnos-Ollivier, M.; Escandón, P.; Gardam, D.; Gunturu, R.; Heath, C. H.; Kurzai, O.; Martin, R.; Litvintseva, A. P.; Cuomo, C. A. Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of *Candida auris* Using Population Genomic Analyses. *mBio*, 28, 03364-19, 2020. doi: 10.1128/mBio.03364-19
13. Colombo, A. L. & Guimarães, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 5, 599-607, 2003.
14. Cruz, L. P.; Ribeiro, S. F. F.; Carvalho, A. O.; Vasconcelos, I. M.; Rodrigues, R.; Da Cunha, M.; Gomes, V. M. Isolation and partial characterization of a novel Lipid Transfer Protein (LTP) and antifungal activity of peptides from chilli pepper seeds. *Protein & Peptide Letters*, 17, 3, 311-318, 2010. doi: 10.2174/092986610790780305
15. Dang, L. & Van-Damme, E. J. M. Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, 117, 51-64, 2015. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.05.020
16. Dantzger, M.; Vasconcelos, I. M.; Scorsato, V.; Aparicio, R.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. Bowman – Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. *Phytochemistry*, 118, 224–235, 2015.
17. De Almeida, J. N.; Francisco, E. C.; Hagen, F.; Brandão, I. B.; Pereira, F. M.; Presta, D. P. H.; Costa, M. M. M.; Jordão, R. T. S.; Groot, T.; Colombo, A. L. Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. *Journal of Fungi*, 7, 3, 220, 2021. doi: 10.3390/jof7030220
18. De Melo, C. C.; De Souza, B. R.; Costa, G. L.; Oliveira, M. M. E.; Lima-Neto, R. G. Colonized patients by *Candida auris*: Third and largest outbreak in Brazil and impact of biofilm formation.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 13, 2023. doi: 10.3389/fcimb.2023.1033707

19. D'Enfert, C.; Kaune, A. K.; Alaban, L. R.; Chakraborty, S.; Cole, N.; Delavy, M.; Kosmala, D.; Marsaux, B.; Fróis-Martins, R.; Morelli, M.; Rosati, D.; Valentine, M.; Xie, Z.; Emritloll, Y.; Warn, P. A.; Bequet, F.; Bougnoux, M. E.; Bornes, S.; Gresnigt, M. S.; Hube, B.; Jacobsen, I. D.; Legrand, M.; Leibundgut-Landmann, S.; Manichanh, C.; Munro, C. A.; Netea, M. G.; Queiroz, K.; Roget, K.; Thomas, V.; Thorat, C.; Abbeele, P.; Walker, A. W.; Brown, A. J. P. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, 45, 3, 1- 55, 2020. doi: 10.1093/femsre/fuaa060
20. Distler, U.; Kuharev, J.; Navarro, P.; Levin, Y.; Schild, H.; Tenzer, S. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nat Methods* 11, 167–170, 2014. doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2767>
21. Distler, U.; Kuharev, J.; Navarro, P.; Tenzer, S. Label-free quantification in ion mobility–enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nat Protoc* 11, 795–812, 2016. doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.042>
22. Ducke, A. As leguminosas da Amazônia Brasileira: notas sobre a flora neotrópica - II. *Instituto Agrônômico Do Norte*, 1, 248, 1949.
23. Dunkel, N; Liu, T. T.; Barker, K. S.; Homayouni, R.; Morschhäuser, J.; Rogers, D. P. A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot Cell*, 7, 1180-90, 2008. doi: 10.1128/EC.00103-08
24. Espinel-Ingroff, A. Comparison of In vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *Journal Clinical Microbiology*, 36, 2950-2956, 1998. doi: 10.1128/JCM.36.10.2950-2956.1998
25. Ford, C. B.; Funt, J. M.; Abbey, D.; Issi, L.; Guiducci, C.; Martinez, D. A.; Delorey, T.; Li, B. Y.; White, T. C.; Cuomo, C.; Rao, R. P.; Berman, J.; Thompson, D. A.; Regev, A. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *eLife*, 3, 2015. doi: 10.7554/eLife.00662
26. Franco, O. L.; Rigden, D. J.; Melo, F. R.; Grossi-De-Sá, M. F. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. *Eur J Biochem.* 269, 2, 397-412, 2002. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02656.x

27. Gallo, R. L.; Murakami, M.; Ohtake, T.; Zaiou, M. Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology: biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110, 6, 823–831, 2002. doi:<https://doi.org/10.1067/mai.2002.129801>
28. Gao, H.; Ma, K.; Ji, G. Pan, L.; Zhou, Q. Lipid transfer proteins involved in plant-pathogen interactions and their molecular mechanisms. *Molecular Plant Pathology*, 23, 1815-1829, 2022. doi: 10.1111/mpp.13264
29. Giono, S. C.; Preciado, J. I. S.; Otero, M. D. R.; López, F. J. T.; Curiel, M. D. A. Antimicrobial resistance its importance and efforts to control it. *Gac Med Mex*, 156, 2, 171-178, 2020. doi: 10.24875/GMM.M20000358
30. Harwig, S. S. L. Intramolecular disulfide bonds enhance the antimicrobial and lytic activities of protegrins at physiological sodium chloride concentrations. *European Journal of Biochemistry*, 240, 2, 352–357, 1996. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0352h.x
31. Hayashi, M.; Kitamura, K.; Harada, K. Genetic mapping of Cgdef gene controlling accumulation of 7S globulin (beta-conglycinin) subunits in soybean seeds. *Journal of Heredity*, 100, 6, 802-806, 2009. doi: 10.1093/jhered/esp046
32. Heinz, E. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 6, 3900–3905, 2004.
33. Hernandez-Valladares, M.; Aasebo, E.; Mjaavatten, O.; Vaudel, M.; Bruserud, O.; Berven, F.; Selheim, F. Reliable FASP-based procedures for optimal quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis on samples from acute myeloid leukemia patients. *Biol Proced Online*, 18, 13, 2016. doi: <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0043-0>
34. Holaskova, E.; Galuszka, P.; Frebort, M. T. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnol Advances*, 1, 33, 1005-23, 2015. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.007
35. Kamli, M. R.; Sabir, J. S. M.; Malik, M. A.; Ahmad, A. Characterization of Defensin-like Protein 1 for Its Anti-Biofilm and Anti-Virulence Properties for the Development of Novel Antifungal Drug against *Candida auris*. *Journal Fungi*, 14, 8, 2022. doi: 10.3390/jof8121298
36. Karray, A.; Alonazi, M.; Jallouli, R.; Alanazi, H.; Bem-Bacha, A. A Proteinaceous Alpha-Amylase Inhibitor from *Moringa Oleifera* Leaf Extract: Purification, Characterization, and Insecticide Effects against *C. maculatus* Insect Larvae. *Molecules*. 30, 4222, 2022. doi: 10.3390/molecules27134222

37. Klimpel, A.; Neundorf, I. Bifunctional peptide hybrids targeting the matrix of mitochondria. *Journal of Controlled Release*, 291, 147-156, 2018.
38. Kordalewska, M.; Perlin, D. S. Identification of Drug Resistant *Candida auris*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2019. doi: 10.3383/fmicb.2019.01918
39. Kovaleva, V.; Bukhteeva, I.; Kit, O. Y.; Nesmelova, I. V. Plant defensins from a structural perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 26, 21, 2020. doi: 10.3390/ijms21255307
40. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680–685, 1970.
41. Leite, J. F. M.; Assreuy, A. M. S.; Mota, M. R. L.; Bringel, P. H. D. S. F.; Lacerda, R. R.; Gomes, V. M.; Cajazeiras, J. B.; Nascimento, K. S.; Pessôa, H. L. F.; Gadelha, C. A. A.; Delatorre, P.; Cavada, B. S.; Santi-Gadelha, T. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. *Molecules*, 17, 3277-3290, 2012. doi:10.3390/molecules17033277
42. Li, Z.; Wang, X.; Teng, D.; Mao, R.; Hao, Y.; Yang, N.; Chen, H.; Wang, X.; Wang, J. Improved antibacterial activity of a marine peptide-N2 against intracellular *Salmonella typhimurium* by conjugating with cell-penetrating peptides bl.Fcin 6/Tat 11. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 145, 263-272, 2018.
43. Lipecka, J.; Chhuon, C.; Bourderioux, M.; Bessard, M. A.; Endert, P.; Edelman, A.; Guerrero, I. C. Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *Proteomics* 16, 13, 1852-1857, 2016.
44. Lockhart, S. R.; Etienne, K. A.; Vallabhaneni, S.; Farooqui, J.; Chowdhary, A.; Govender, N. P. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *C. auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis*, 64, 134-140, 2017. doi: 10.1093/cid/ciw/691
45. Lone, S. A.; Ahmad, A. *Candida auris* - the growing menace to global health. *Mycoses*, 62, 620-637, 2019. doi: 10.1111/myc.12904
46. Lorenzi, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo da plantas nativas do Brasil. *Nova Odessa*, 1, 1, 1992.
47. Luo, Y.; Jin, X.; Hao, Z.; Wang, Q.; Zhu, L.; & He, Y. Effect of sprouting on amino acids , protein solubility and availability in green and white faba bean (*Vicia faba* L.). *Advance Journal of Food Science and Technology*, 6, 130, 531–536, 2014.

48. Macedo, M. L.; Andrade, L. B. S.; Xavier-Filho, J. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105, 89-94, 1993. doi: 10.1016/0742-8413(93)90063-Q
49. Marcus, J. P.; Goulter, K. C.; Manners, J. M. Peptide fragments from plant vicilins expressed in *Escherichia coli* exhibit antimicrobial activity in vitro. *Plant Molecular Biology Reporter*, 26, 75-87, 2008.
50. Martel, C. M.; Parker, J. E.; Bader, O.; Weig, M.; Gross, U.; Warrilow, A. G.; Rolley, N.; Kelly, S. L. Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 11, 4527-33, 2010. doi: 10.1128/AAC.00348-10
51. Mello, E. O.; Ribeiro, S. F.; Carvalho, A. O.; Santos, I. S.; Da Cunha, M.; Santa-Catarina, C.; Gomes, V. M. Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. *Curr Microbiol*. 62, 4, 1209-17, 2011. doi: 10.1007/s00284-010-9847-3
52. Michael, C. A.; Dominey-Howes, D.; Labbate, M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Front Public Health*, 16, 2, 145, 2014. doi: 10.3389/fpubh.2014.00145
53. Morrissey, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem*, 1, 117, 307-10, 1981. doi: 10.1016/0003-2697(81)90783-1
54. Munita, J. M.; Arias, C. A.; Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4, 2016. doi: 10.1128/microbiolspec
55. Murray, C. J. L.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Aguilar, G. R.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 10325, 629-655, 2022. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0
56. Nawrot, R.; Barylski, J.; Nowicki, G.; Broniarczyk, J.; Buchwald, W.; Goździcka-Józefiak, A. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol*, 59, 3, 181-96, 2014. doi: 10.1007/s12223-013-0280-4
57. Oliveira, L. O.; Fernandes, K. V. S.; Souza, D.; Carvalho, A. D. O. A Trypsin inhibitor from *Clitoria fairchildiana* cotyledons is active against digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Protein and Peptide Letters*, 55, 893–902, 2015.
58. Osman, A.; Abbas, E.; Mahgoub, S.; Sitohy, M. Inhibition of *Penicillium digitatum* in vitro and

in postharvest Orange fruit by a soy protein fraction containing mainly β -conglycinin. *Journal of General Plant Pathology*, 2016. doi: 10.1007/s10327-016-0686-3

59. Pappas, P. G.; Lionakis, M. S.; Arendrup, M. C.; Zeichner, L. O.; Kullberg, B. J. Invasive Candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 4, 18026, 2018. doi: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
60. Passos, M. S.; Carvalho, A. R.; Boeno, S. I.; Virgens, L. L. G.; Calixto, S. D.; Ventura, T. L. B.; Lassounskaia, E.; Braz-Filho, R.; Curcino, V. I. J. Terpenoids isolated from *Azadirachta indica* roots and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 29, 40-45, 2019.
61. Peters, B. M.; Shirliff, M. E.; Jabra-Rizk, M. A. Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs? *PLoS Pathog*, 6, 100-1067, 2010. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067>
62. Peumans, W. J.; Hao, Q.; Van-Damme, E. J. M. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15, 9, 1493-1506, 2001.
63. Quiles-Merelo, I. & García-Rodríguez, J. Systemic antifungal drugs. *Revista Iberoamericana de Micología*, 38, 2, 42-46, 2021. doi: 10.1016/j.riam.2021.04.004
64. Pianalto, K. M.; Alspaugh, J. A. New horizons antifungal therapy. *Journal Fungi*, 2, 1-24, 2016.
65. Rawlings, N. D.; Tolle, D. P.; Barret, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemistry Journal*, 378, 705–716, 2004.
66. Rawson, T. M.; Ming, D.; Ahmad, R.; Moore, L. S. P.; Holmes, A. H. Antimicrobial use, drug-resistant infections and COVID-19. *Nature Reviews Microbiol*, 18, 409–410, 2020. doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0395-y>
67. Ribeiro, S. F. F.; Agizzio, A. P.; Machado, O. L. T.; Neves-Ferreira, A. G. C.; Oliveira, M. A.; Fernandes, K. V. S.; Carvalho, A. O.; Perales, J.; Gomes, V. M. A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: partial characterization and antifungal activity. *Scientia Horticulturae*, 111, 4, 399-405, 2007.
68. Ribeiro, M. C.; Gebara, R. S.; Taveira, G. B.; Carvalho, A. O.; Rodrigues, R.; Mello, E. O.; Nagano, C. S.; Chaves, R. P.; Gomes, V. M. Anti-Candida Potential of Peptides from Immature and Ripe Fruits of *Capsicum chinense* Jacq. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 16, 2022. doi: 10.1007/s12602-022-09968-8
69. Robbins, N.; Wright, G. D.; Cowen, L.E. Antifungal drugs: current arsenal and development of new agents. *Microbiol Spectr*, 4, 2016.
70. Romo, J. A.; Pierce, C. G.; Chaturvedi, A. K.; Lazzell, A. L.; McHardy, S. F.; Saville, S. P.; Lopez, R. J. L. Development of Anti-Virulence Approaches for Candidiasis via a Novel Series of Small-Molecule Inhibitors of *Candida albicans* Filamentation. *mBio*, 8, 6, 2017. doi: 10.1128/mBio.01991-17 29

71. Romo, J. A.; Zhang, A.; Cai, H.; Kadosh, D.; Koehler, J. R.; Saville, S. P.; Wang, Y.; Ribot, J. L. L. Global Transcriptomic Analysis of the *Candida albicans* Response to Treatment with a Novel Inhibitor of Filamentation. *M Sphere*, 4, 2019. doi: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00620-19>
72. Sanglard, D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front Med (Lausanne)*, 3, 11, 2016.
73. Sales, M. P.; Gerhardt, I. R.; Grossi-de-Sá, M. F.; Xavier-Filho, J. Do Legume Storage Proteins Play a Role in Defending Seeds against Bruchids?, *Plant Physiology*, 124, 2, 515–522, 2000. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.515>
74. Santos, L. M. M.; Silva, P. M.; Moura, M. C.; Carvalho-Junior, A. R.; Amorim, P. K.; Procópio, T. F.; Coelho, L. C. B. B.; Silva, L. C. N.; Paiva, P. M. G.; Santos, N. D. L.; Napoleão, T. H. Anti-Candida activity of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL). *Journal of Medical Mycology*, 3, 2, 2021. doi: 10.1016/j.mycmed.2020.101074
75. Santos, R. A. F.; David, J. M.; Ferreira, A. S.; Juceni, P. D.; Fontana, R. Antifungal activities of rotenoids from seeds and roots of *Clitoria fairchildiana*. *Revista Fitos*, 12, 83-89, 2018. doi: 10.5935/2446-4775.20180008
76. Satoh, K.; Makimura, K.; Hasumi, Y.; Nishiyama, Y.; Uchida, K.; Yamaguchi, H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol*, 53, 41-44, 2009. doi: 10.1111/j.1348-0421.2008.00083
77. Schmalreck, A. F.; Haase, G.; Blum, G.; Lass-Flörl, C.; Fegeler, W.; Becker, K. Antifungal Susceptibility Testing-AFST Study Group. Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study. *Mycoses*, 55, 3, 124-37, 2012. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02165
78. Segenet, K.; Cardona, C.; Segura, G. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 867–873, 2004.
79. Serracarbassa, P. D.; Dotto, P. Endoftalmite por *Candida albicans*. *Arq. Bras. Oftalmol.* 66, 5, 2003.
80. Shahina, Z.; Molaitabari, A.; Sultana, T.; Dahms, T. E. S. Cinnamon Leaf and Clove Essential Oils Are Potent Inhibitors of *Candida albicans* Virulence Traits. *Microorganisms*, 10, 1989, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101989>
81. Silva, B. M. D. S. & Môro, F. V. Aspectos morfológicos do fruto, da semente e desenvolvimento pós-seminal de faveira (*Clitoria fairchildiana* R. A. Howard. - Fabaceae.

Revista Brasileira de Sementes, 30, 195–201, 2008.

82. Silva, B. S.; Carvalho, N. M. Seed size and water stress effects on seed germination and seedling vigor of faveira (*Clitoria fairchildiana* R.A. Howard. - FABACEAE). *Revista Brasileira de Sementes*, 30, 55-65, 2008. doi: 10.1590/S0101-31222008000100008
83. Silva, R. A.; Oliveira, B. N. L.; Silva, L. P. A.; Oliveira, M. A.; Chaves, G. C. Antimicrobial Resistance: formulation of the response in the global health context. *Original Article*, 607, 2020. doi: 10.1590/0103-1104202012602
84. Silva, S.; Negri, M.; Henriques, M.; Oliveira, R.; Williams, D. W.; Azeredo, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol*, 36, 288-305, 2012. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278
85. Silva, V.; Díaz, M. C. J.; Febré, N. Y. Red De Diagnóstico En Micología Médica. Vigilancia De La Resistencia De Levaduras A Antifúngicos. *Rev. Chil. Infectol*, 19, 2002.
86. Sinhababu, A. Modified Ninhydrin reagent for the detection of amino acids on TLC plates. *Journal of Applied and Natural Science*, 5, 125-127, 2013.
87. Smith, P.; Krohn, R.; Hermanson, G.; Mallia, A.; Gartner, F.; Provenzano, M.; Klenk, D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 1, 76–85, 1985.
88. Snelders, E.; Van der Lee, H. A.; Kuijpers, J.; Rijs, A. J.; Varga, J.; Samson, R. A. Mellado, E.; Donders, A. R.; Melchers, W. J. Verweij, P. E. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*, 11, 5, 2008. doi: 10.1371/journal.pmed.0050219
89. Taveira, G. B.; Mello, E. O.; Simão, T. L. B. V.; Cherene, M. B.; Carvalho, A. O.; Muzitano, M. F.; Lassounskaia, E.; Pireda, S.; Miguel, E. C.; Basso, L. G. M.; Da Cunha, M.; Da Motta, O. V.; Gomes, V. M. A new bioinspired peptide on defensin from *C. annuum* fruits: Antimicrobial activity, mechanisms of action and therapeutical potential, 1866, 11, 2022. doi: 10.1016/j.bbagen.2022.130218
90. Thevissen, K.; Terras, F. R.; Broekaert, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol*. 65, 12, 5451-8, 1999. doi: 10.1128/AEM.65.12.5451-5458.1999.
91. Uchôa, A. F.; Miranda, M. R.; Souza, A. J.; Gomes, V. M.; Fernandes, K. V.; Lemos, F. J.; Oliveira, A. E.; Xavier-Filho, J. Toxicity of hydrolyzed vicilins toward *Callosobruchus maculatus* and phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 17,

8056–8061, 2009.

92. Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40, 4, 277-83, 2015.
93. Vriens, K.; Cammue, B. P.; Thevissem, K. Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. *Molecules*, 14, 12280-303, 2014. Doi: 10.3390/molecules190812280
94. Wiśniewski, J. R.; Zougman, A.; Nagaraj, N.; Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, 6, 5, 359-362, 2009.
95. Wong, J. H.; Ng, T. B. Gymnin, a potent defensin-like antifungal peptide from the Yunnan bean (*Gymnocladus chinensis* Baill). *Peptides*, 24, 7, 963-8, 2003. doi: 10.1016/s0196-9781(03)00192-x
96. Wolin, I. A. V.; Leal, R. B. Avaliação do potencial citotóxico das lectinas leguminosas *Dioclea reflexa* e *Canavalia brasiliensis* em culturas celulares das linhagens C6 (*Rattus norvegicus*) e U87 (*Homo sapiens*). Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.
97. Zhang, Y.; Kouzuma, Y.; Miyaji, T.; Yonekura, M. Purification, characterization, and cDNA cloning of a Bowman-Birk type trypsin inhibitor from *Apios americana* Medikus tubers. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72, 171-178, 2008.
98. Zhang, W.; Song, X.; Wu, H.; Zheng, R. Epidemiology, species distribution, and predictive factors for mortality of candidemia in adult surgical patients. *BMC Infectious Diseases*, 20, 1, 2020.
99. Zottich, U.; Da Cunha, M.; Carvalho, A. O.; Dias, G. B.; Silva, N. C.; Santos, I. S.; Nascimento, V. V.; Miguel, E. C.; Machado, O. L.; Gomes, V. M. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochim Biophys Acta*, 1810, 4, 375-83, 2011. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.1