



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FRANCISCO EILTON SOUSA LOPES

**ESTUDO DE OSMOTINAS E TAUMATINAS VEGETAIS PARA A PROSPECÇÃO
DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

FORTALEZA

2018

FRANCISCO EILTON SOUSA LOPES

ESTUDO DE OSMOTINAS E TAUMATINAS VEGETAIS PARA A PROSPECÇÃO
DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Cléverson Diniz
Teixeira de Freitas

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L852 Lopes, Francisco Eilton Sousa.
 Estudo de osmotinas e taumatinas vegetais para a prospecção de peptídeos antimicrobianos : Prospecção de agentes antimicrobianos / Francisco Eilton Sousa Lopes. – 2018.
 77 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.
 Orientação: Profa. Dra. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas.
1. Candida albicans. 2. Osmotina. 3. Taumatina. 4. Peptídeo antimicrobiano. 5. Fitopatógenos. I. Título.

CDD 572

FRANCISCO EILTON SOUSA LOPES

ESTUDO DE OSMOTINAS E TAUMATINAS VEGETAIS PARA A PROSPECÇÃO
DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Cléverson Diniz
Teixeira de Freitas

Aprovada em: 02 /03/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas
Laboratório de Biotecnologia de Proteases Vegetais

Prof. Dr. Hermogenes David de Oliveira
Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas

Dra. Helen Paula Silva da Costa
Laboratório de Toxinas e Proteínas Tóxicas de Plantas

“À todos aqueles que morreram pelo conhecimento.”

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas**, pela disponibilidade, pela paciência, dedicação propiciada durante toda a orientação e por sua excelência na pesquisa científica e amor a ciência, que nos influencia a seguir a carreira de professor/pesquisador.

Ao **Prof. Dr. Márcio Viana Ramos**, por me acolher em seu laboratório e, principalmente, por todos os ensinamentos, em todas as esferas sociais. Estes momentos de grande aprendizado possuíam cunho científico e filosófico.

Ao **Dr. Pedro Filho Noronha de Sousa** pela orientação no desenho dos peptídeos sintéticos.

À **Dra. Helen Paula Silva da costa**, pela orientação nas análises das atividades biológicas, estudos de mecanismos de ação e por aceitar participar da minha banca de defesa de mestrado.

Aos outros membros da banca de defesa: **prof. Dr. Hermogenes David de Oliveira, prof. Dr. Márcio Viana Ramos e a profa. Dr. Ana Cristina Monteiro Moreira** por aceitarem participar da defesa de dissertação.

A todos os **amigos** dos laboratórios de plantas laticíferas e biotecnologia de proteases vegetais, por todo o auxílio nos experimentos, principalmente na etapa inicial deste trabalho.

À professora Dra. **Maria Regiane Araújo Soares** da UFPI pela excelência no ensino e pesquisa e pela confiança na minha capacidade em continuar os estudos na pós-graduação.

À professora Dra. **Elisângela Cláudia Alves de Oliverira** (UFPI) pela excelência didática que simplesmente influencia-nos a seguir em frente como professores.

À minha família pelo apoio e amizade, em especial a minha avó Alzira Ribeiro de Sousa, a qual dedico esta dissertação.

*“Sou quem sou porque somos todos um”
(filosofia africana Ubutu)*

RESUMO

Proteínas semelhantes a osmotina e taumatina (OLPs e TLPs) têm sido relacionadas à defesa de planta porque são induzidas em resposta a diferentes estresses bióticos e abióticos. No presente trabalho, várias OLPs e TLPs foram prospectadas para identificação de peptídeos antimicrobianos por análises de bioinformática, os quais foram sintetizados, caracterizados e suas atividades e mecanismos de ação testados contra alguns fungos fitopatogênicos, bactérias e leveduras. Quatro peptídeos foram selecionados considerando alguns parâmetros químicos (GDCKATSC, CPRALKVPGGCN, IVGQCPAKLKA e CAADIVGQCPAKLK). Os ensaios antimicrobianos mostraram que os peptídeos não conseguiram inibir o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos e não afetaram o crescimento celular bacteriano. Atividade biológica significativa foi encontrada apenas para dois peptídeos (CPRALKVPGGCN e CAADIVGQCPAKLK) contra *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os ensaios de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura mostraram que o peptídeo CAADIVGQCPAKLK não alterou a integridade da membrana da levedura. No entanto, foi capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e apoptose. A análise de docking molecular mostrou que o peptídeo CAADIVGQCPAKLK interagiu com uma energia de ligação muito baixa com um receptor da membrana plasmática específico de *C. albicans* e *S. cerevisiae*, o qual tem sido descrito por promover a indução da apoptose. Os resultados indicam que o peptídeo CAADIVGQCPAKLK pode ser um bom candidato para o desenvolvimento de um agente antimicrobiano específico contra o patógeno *C. albicans*.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Osmotina. Taumatina. Peptídeo antimicrobiano. Fitopatógenos. Leveduras

ABSTRACT

Osmotin- and thaumatin-like proteins (OLPs and TLPs) have been related to plant defense because they are induced in response to different biotic and abiotic stresses. In the present work, several OLPs and TLPs were prospected to the identification of antimicrobial peptides by bioinformatic analyses, which were further synthesized, characterized, and their activities and action mechanisms assayed against some phytopathogenic fungi, bacteria and yeasts. Four peptides were selected considering some chemical parameters (GDCKATSC, CPRALKVPGGCN, IVGQCCKLKA, and CAADIVGQCCKLK). Antimicrobial assays showed that the peptides were not able to inhibit the mycelia growth of phytopathogenic fungi as well as they did not affect the bacterial cell growth. Significant biological activity was found only for two peptides (CPRALKVPGGCN and CAADIVGQCCKLK) against *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Fluorescence and scanning electron microscopy assays demonstrated the peptide CAADIVGQCCKLK did not alter yeast membrane integrity. However, it was able to induce the production of reactive oxygen species and apoptosis. Molecular docking analysis showed that the peptide CAADIVGQCCKLK interacted with a very low binding affinity energy with a specific plasma membrane receptor of *C. albicans* and *S. cerevisiae*, which have been described to promote the induction of apoptosis. The results indicate that peptide CAADIVGQCCKLK can be a good candidate for the development of a specific antimicrobial agent against the pathogen *C. albicans*.

Keyword: *Candida albicans*. Osmotin. Thaumatin. Antimicrobial peptide. Phytopathogens. Yeast

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Alinhamento das sequências proteicas entre Osmotinas e proteínas semelhantes a taumatina 40
- Figura 2 - Árvore filogenética das proteínas pertencentes aos grupos das osmotinas e taumatinas gerada através do *Clustal Omega* 42
- Figura 3 - Visualização tridimensional dos peptídeos antimicrobianos preditos pelo banco de dados *C-PamP* e sua localização nas suas respectivas proteínas. 46
- Figura 4 - Determinação da pureza dos peptídeos sintéticos por cromatografia líquida de fase reversa de alta performance e espectrometria de massa (*MALD-TOF*) 48
- Figura 5 - Efeito dos peptídeos sintéticos sobre os fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotricum acutatum*, *Colletotricum gloeosporioides* e *Alternaria solani* 51
- Figura 6 - Efeito dos peptídeos sintéticos sobre *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* 52
- Figura 7 - Atividade inibitória do crescimento celular bacteriano induzida pelos peptídeos 53
- Figura 8 - Integridade da membrana celular de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* 54
- Figura 9 - Integridade da superfície celular de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* avaliada por microscopia eletrônica de varredura 56
- Figura 10 - Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* pelo método de fluorescência DCFDA 57
- Figura 11 - *Indução de apoptose* em células de *Candida albicans* avaliadas pelo ensaio colorimétrico TUNEL 58
- Figura 12 - Gráfico de Ramachandran dos modelos tridimensionais 60
- Figura 13 - Sobreposição dos modelos tridimensionais dos receptores PHO36 gerados pelo *SWISS-MODEL* e os template 5LXG e 3WXV 61

Figura 14 - Docking de interação molecular entre o peptídeo 4 e a região 62 extracelular do receptor PHO36 de *Saccharomyces cerevisiae* e seu homólogo em *Candida albicans*

Figura 15 - Interação do peptídeo 3 (IVGQCPAKLKA) com o receptor 63 PHO36 em *S. cerevisiae* e *C. albicans*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação das proteínas relacionadas à patogênese (PR)	21
Tabela 2 -	Proteínas osmotina-like e taumatina-like com atividade antifúngica	38
Tabela 3 -	Propriedades químicas das proteínas osmotinas e taumatinas	39
Tabela 4 -	Matrix de similaridade entre as sequências protéicas gerada pelo servidor Clustal Omega	43
Tabela 5 -	Parâmetros químicos dos 4 peptídeos incluindo massa predita e experimental	47
Tabela 6 -	Resíduos de interação entre PHO36 e PEP4	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BLAST	Do inglês: Basic Local Alignment Search tool
DMSO	Dimetilsulfóxido
DCFDA	2'-7'-dichlorofluorescein diacetate
kDa	Kilodalton (1000 Da)
IP	Do inglês: Iodide Propidium
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OLP	Osmotin-like protein
PBS	Do inglês: Phosphate Buffered Saline
TLP	Thaumatococcus-like protein
TDT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
YPD	Do inglês: Yeast Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Defesa vegetal.....	15
1.2	Proteínas relacionadas a patogênese (PR proteínas).....	19
1.2.1	<i>Proteínas PR5</i>	22
1.2.2	<i>Osmotinas</i>	23
1.3	Peptídeos antimicrobianos.....	24
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	Objetivos gerais.....	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	Busca nos bancos de dados por proteínas taumatinas e osmotinas com atividade antifúngica.....	29
4.2	Predição, caracterização, seleção e síntese de peptídeos antifúngicos.....	30
4.3	Atividade antimicrobiana.....	31
4.4	Análise estatística.....	31
4.5	Atividade antifúngica.....	31
4.5.1	<i>Inibição da germinação de esporos</i>	31
4.5.2	<i>Inibição do crescimento vegetativo</i>	32
4.5.3	<i>Inibição do crescimento celular de Candida albicans e Sacchromyces cerevisiae</i>	32
4.6	Atividade antibacteriana.....	33
4.7	Avaliação do mecanismo de ação.....	33
4.7.1	<i>Integridade da membrana celular</i>	33
4.7.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	34
4.7.3	<i>Detecção de ROS e indução de apoptose</i>	34
4.8	Ensaio de bioinformática.....	35
4.8.1	<i>Identificação do receptor PHO36 em Candida albicans</i>	35

4.8.2	<i>Modelagem molecular</i>	35
4.8.3	<i>Docking molecular</i>	36
5	RESULTADOS	37
5.1	Predição e síntese dos peptídeos sintéticos	37
5.2	Análise antimicrobiana	51
5.3	Ensaio de bioinformática	59
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE A- FONTES FINANCIADORAS	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 Defesa Vegetal

As plantas, assim como outros organismos, estão expostos a estresses ambientais. Devido a estas pressões bióticas e abióticas, são capazes de ativar vários mecanismos de defesa, como síntese de proteínas de respostas sistêmicas, reações de hipersensibilidade, além da produção de peptídeos antimicrobianos (TIFFIN; MOELLER, 2016). Estes mecanismos de defesa surgem devido a padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) provenientes de bactérias, vírus, fungos e insetos. Dentre as proteínas de defesa, podemos destacar as osmotinas, que pertencem ao grupo de proteínas relacionadas à patogênese - PR-5 (FREITAS, *et al.*, 2011).

Como relatado anteriormente, esta exposição das plantas à pragas ou patógenos ocasionam mudanças fisiológicas ou bioquímicas, refletindo em seu desenvolvimento. Não obstante, os fatores abióticos, como temperatura excessiva, estresse hídrico e salino, deficiência de nutrientes e radiação ultravioleta, entre outros, também podem influenciar diretamente na susceptibilidade das plantas a diferentes doenças. Portanto, para a sobrevivência das plantas, diferentes mecanismos evolutivos propiciaram o desenvolvimento de respostas contra as mais variadas adversidades bióticas e abióticas (DOS SANTOS SOARES, 2007).

Plantas adquiriram o reconhecimento de padrões moleculares conservados de patógenos através de receptores de reconhecimento de padrões localizados na superfície celular (BERENS, *et al.*, 2017). Assim, como um mecanismo de resposta, as plantas mudam a constituição de seus componentes moleculares. Muitas dessas alterações estão relacionadas com a defesa (DOS SANTOS SOARES, 2007).

Por outro lado, a pesquisa sobre defesa vegetal assume um sentido bem mais abrangente a partir do momento em que a resistência a patógenos é muito complexa, possuindo ação conjunta de diversos fatores e não se restringindo a apenas um componente isolado. Existem dois tipos de mecanismos de defesa: defesas constitutivas ou pré-existentes e as induzidas (DOS SANTOS SOARES, 2007). Componentes como tricomas, lignina, espinhos e domácias são estruturas físicas que dificultam o acesso de patógenos e, assim como compostos químicos presentes na planta, perfazem a defesa constitutiva. Por outro lado, a defesa induzida abrange

qualquer mudança fisiológica, estrutural ou química resultante do ataque de patógenos, ou seja, há uma ativação dos mecanismos de defesa ocasionado pelo reconhecimento do invasor (PREZOTO, 2016).

Algumas defesas constitutivas podem ter um aumento considerável após o ataque de patógenos invasores. Desde que não ocasione um enorme gasto de energia para a planta, isto poderá ser um fator de relevância na defesa do vegetal. Após a detecção de patógenos invasores, as plantas induzem a ativação de vários mecanismos de defesa, que incluem a produção de substâncias tóxicas, entre elas metabólitos secundários e proteínas relacionadas a patogênese. Por outro lado, a indução destes mecanismos ocorre com o gasto excessivo de nutrientes e energia, que poderiam ser utilizados para o desenvolvimento natural da planta (CHEN, 2008).

Entre as espécies vegetais, os mecanismos de defesa são muito complexos e variados, por que diferentes espécies crescem em diferentes ambientes. No que se refere ao ataque de patógenos, dentro da mesma espécie podem ocorrer diferentes tipos de ataques, pois irá depender de qual tipo de tecido e qual estágio de desenvolvimento da planta está ocorrendo a agressão (FERREIRA, *et al.*, 2007).

Devido ao grande número de organismos que atacam plantas, podemos ter a idéia da complexidade e diversidade de mecanismos de defesa existentes nas plantas contra esses invasores. Em plantas que sofreram ataques foram caracterizadas como moléculas defensivas: metabólitos secundários, inibidores de enzimas digestivas, proteases, lectinas e aminoácidos não proteicos (CHEN, 2008).

Hoje existem vários modelos para explicar a base da resistência das plantas contra invasores. O reconhecimento de agentes patogênicos pode ser mediado de forma específica entre uma planta e espécies patogênicas ou em uma interação gene para gene entre uma cultivar de planta particular e uma espécie de patógeno. Neste caso, o alto grau de especificidade indica coevolução (MITHOFER, 2008). Assim, é conhecido que a resistência a doenças ocorre com uma interação tipo receptor/ligante, ou seja, a imunidade das plantas depende da percepção de alguns sinais químicos peculiares: os elicitores.

Os elicitores são moléculas ou agentes de origem biótica ou abiótica capazes de induzir qualquer resposta de defesa nas plantas. Existem vários tipos de elicitores, tais como: oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos, ácidos graxos e outros. Esta enorme variedade mostra que não existe uma estrutura geral química que determine a atividade de um elicitor (SCHWAN-ESTRADA, 2000). Elicitores podem

estar presentes nos agentes patogênicos ou são gerados durante a invasão de patógenos pelas plantas (DANGL; JONES, 2001).

Como discutido anteriormente, plantas realizam o reconhecimento de lesões e ataques de patógenos, assim como herbívoros, através do reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano endógeno (DAMPs), padrões moleculares associados a herbívoros (HAMPs) e de padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs) (DURAN-FLORES, 2016). Portanto, para proteger-se e defender-se de invasores microbianos ou para iniciar o programa de simbiose, as plantas precisam detectar a presença de um micróbio. Desta forma, os (MAMPs) podem ser identificados pelos receptores de reconhecimento de padrões, denominados (PRRs). Em geral, MAMPs são moléculas que estão presentes nos micróbios, são cruciais para o funcionamento da célula microbiana e estão expostos, sendo, dessa maneira, acessíveis para os PRR da planta (FESEL, 2016).

Mesmo que os HAMPs indiquem a presença de um agressor específico, neste caso, um herbívoro, a aplicação de DAMPs, HAMPs ou MAMPs, com frequência, ativa respostas gerais na célula. A despolarização da membrana, influxos de íons de cálcio, estresse oxidativo, ativação da MAPKinase, sinalização octadecanóide no nível molecular, expressão de inibidores da digestão, modificações da parede celular e outras defesas gerais no nível fenotípico constituem respostas gerais (DURAN-FLORES, 2016; ACEVEDO, 2015). Vale ressaltar que um dos MAMPs bacterianos bem caracterizados é a flagelina, um componente do flagelo que atua como um elicitador proteico de respostas de defesa (FELIX *et al.*, 1999). Outros componentes a serem considerados são constituintes da parede celular como lipopolissacarídeos e peptidoglicano.

Por outro lado, a maioria dos estudos sobre elicitores derivados de fungos estão focados na quitina. Mesmo que a quitina represente apenas uma percentagem bastante baixa da massa total da parede celular, este polímero estimula uma forte resposta na planta. Na maioria dos fungos, o polissacarídeo da parede celular mais abundante é o β -glucano, um elicitador bem caracterizado em sistemas de fungos-animais, mas também em sistemas de plantas-oomicetos (FESEL, 2016; ERBS, 2003; GUST, 2007; BOWMAN, 2006; BROWN, 2001).

A parede celular funciona como uma barreira estrutural. Todavia, essa parede celular pode ser violada por enzimas líticas segregadas por organismos patogênicos e também por danos mecânicos, gerando assim, moléculas que

funcionam como elicitores endógenos ou DAMPs. Funcionando como sinais de perigo para ativar a resposta imune, os DAMPs, no geral, aparecem no apoplasto e, de forma semelhante aos MAMPs, servem como sinais de risco, ativando, assim, a resposta imune (DE LORENZO, 2011). Enzimas que degradam a parede celular da planta demonstram serem importantes para patógenos fúngicos que não possuem estrutura especializadas de penetração (DE LORENZO, 2011). O estudo da parede celular torna-se relevante porque é a primeira barreira contra o ataque de agentes patogênicos, e sua degradação torna-se um passo crucial para a patogênese.

De forma diferente das plantas, nos animais, a ausência de lesão ou infecção faz com que os DAMPs desempenhem importantes papéis intracelulares. Porém, quando os DAMPs são liberados após o dano celular ou o estresse celular, estas moléculas ativam células imunes inatas e recrutam e ativam células apresentadoras de antígenos envolvidas na defesa do hospedeiro, assim como na reparação de tecidos (KATO, 2015).

Em uma pesquisa realizada por Shilmiller (2005), um peptídeo de 18 aminoácidos chamado *systemin* demonstrou possuir as características típicas dos DAMPs. *Systemin* desencadeia uma resposta de defesa em plantas de tomate semelhantes às induzidas por ferimentos mecânicos (SHILMILLER, 2005). Outro trabalho, sugere que um peptídeo de 23 aminoácidos (ATPep1) atua como um DAMP. Este peptídeo foi isolado de *Arabidopsis* e induz a alcalinização em culturas de células de *Arabidopsis*, amplificando as respostas geradas por PAMPs (HUFFAKER, 2007).

Na mesma linha de raciocínio, Cheng (2013) afirma que HAMPs ativam reações de defesa e podem incluir substâncias presentes nas secreções orais de insetos. Proteínas como glicose oxidase, fosfatase alcalina, volicitina e pectinase na saliva do pulgão foram identificados como possíveis HAMPs. Os HAMPs são detectados como sinais químicos durante a alimentação dos herbívoros. Segundo Truitt, *et al.*, (2004), uma proteína de membrana plasmática que se liga à volicitina foi identificada como PRR provável em milho.

1.2. Proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas)

Uma disputa crescente pode ser observada na interação existente entre planta-patógeno e pode ser comparada a um tipo de batalha em que as armas são proteínas sintetizadas por ambos os organismos (FERREIRA *et al.*, 2007). As proteínas utilizadas como armas gradualmente evoluíram devido as pressões existentes entre os organismos. O resultado desta “guerra” tem como resultado a resistência ocasionada muitas vezes por mutações gradativas. Uma compreensão detalhada dos eventos moleculares que ocorrem durante uma interação planta-patógeno será um objetivo essencial para o controle de doenças no futuro (FERREIRA *et al.*, 2007).

Como relatado anteriormente, existe uma ampla gama de mecanismos de resistências que as plantas exibem podendo ser agrupados em constitutíveis e induzíveis. Estes mecanismos podem variar e podem ser denominados de morfológicos ou químicos e podem está envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio (DOS SANTOS SOARES, 2007). Na mesma linha de raciocínio, a maioria desses mecanismos atua de maneira defensiva exibindo um papel passivo. Todavia, alguns destes mecanismos de defesa são altamente ativos contra agentes patogênicos, usando como principais alvos a parede celular e a membrana plasmática. Estes mecanismos de defesa envolvem proteínas de respostas sistêmicas e hipersensibilidade (TIFFIN; MOELLER, 2016), surgindo devido à exposição a agentes como bactérias, vírus, fungos e insetos (FREITAS, *et al.*, 2011).

Dentre estas proteínas que são induzidas por estresses bióticos e abióticos podemos destacar as proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas). Geralmente, o hospedeiro torna-se resistente ao ataque patogênico subsequente. É sabido que as PR-proteínas podem migrar para regiões distantes da infecção, desta forma, as plantas podem impedir a disseminação do patógeno (LINTHORST; VAN LOON, 1991).

As proteínas relacionadas a patogênese constituem uma classe de proteínas relativamente nova e também incluem algumas famílias de peptídeos. Estes peptídeos estão relacionados a patogênese e podem ser classificados em inibidores de proteinases pertencentes a família PR-6, tioninas pertencentes a família PR-13, defensinas pertencentes a família PR-12 e também proteínas responsáveis pela transferência de lipídeos (SELS *et al.*, 2008).

As PR proteínas são classificadas em 17 famílias e são numeradas de acordo com a ordem de descobrimento, assim como pela atividade biológica (tabela 1). A indução da maioria destas proteínas ocorre através da ação dos compostos de sinalização como etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico. Mesmo possuindo um importante papel na defesa vegetal, quando são expressas em plantas transgênicas, elas são eficazes em reduzir várias doenças (VAN LOON; REP; PIETERSE; 2006).

É conhecido que as PR proteínas, em alguns casos, possuem atividade anticongelante (DALEN, *et al.*, 2015) e são induzidas durante ferimento e estresse (FREITAS, *et al.*, 2011). Todavia, um número bastante elevado de proteínas PR-like em frutas e vegetais podem em alguns casos provocar alergia na espécie humana (HOFFMANN-SOMMERGRUBER, 2002).

Tabela 01. Classificação das proteínas relacionadas à patogênese (PR).

Família	Membro	Tamanho (kDa)	Propriedades
PR-1	Tabaco PR-1a	15	Antifúngica
PR-2	Tabaco PR-2	30	β -1,3-Glucanase
PR-3	Tabaco P,Q	25-30	Quitinase (classe I,II, IV,V,VI,VII)
PR-4	Tabaco R	15-20	Quitinase (classe I,II)
PR-5	Tabaco S	25	Taumatina-like
PR-6	Inibidor I de tomate	8	Inibidor de protease
PR-7	Tomate 69	75	Endoproteinase
PR-8	Quitinase de pepino	28	Quitinase tipo 3
PR-9	Tabaco	35	Peroxidase
PR-10	Salsa PR-1	17	Ribonuclease-like
PR-11	Quitinase tipo V	40	Quitinase tipo I
PR-12	Ps-AFP 3 Rabanete	5	Defensina
PR-13	THIS2-1 Arabidopsis	5	Tioninas
PR-14	Cevada TLP4	9	Proteínas transferidoras de lipídios
PR-15	Cevada OxOLP (germina)	20	Oxidase Oxalato
PR-16	Cevada OxOLP	20	Oxidase-like oxalate
PR-17	Tabaco PRp27	27	Desconhecida

Fonte: SELS, *et al.* (2008) e SINGH, *et al.*, (2013).

1.2.1 Proteínas PR-5

Como relatado anteriormente, em resposta à invasão de patógenos fúngicos e bacterianos, assim como outros tipos de sinais, as plantas acumulam uma série de proteínas envolvidas na defesa. As proteínas relacionadas à patogênese são agrupadas em famílias com base na estrutura primária, características sorológicas e enzimáticas e atividades biológicas (MIN, *et al.*, 2004).

As proteínas relacionadas à patogênese da família PR-5 desempenham papéis cruciais no sistema de defesa da planta. As proteínas da família PR-5 também são chamadas de proteínas de tipo taumatina (TLPs) devido similaridade de seqüência com a proteína taumatina, que é encontrada no fruto de *Thaumatococcus danielli*. As TLPs são polipeptídeos de cerca de 200 resíduos de aminoácidos (WEL e LOEVE, 1972; VELAZHAHAN *et al.*, 1999) e várias proteínas PR-5 mostram atividade antifúngica *in vitro*, no entanto, a função fisiológica exata das proteínas PR-5 ainda não foi explorada, por que algumas não apresentam tal atividade (GUO, *et al.*, 2016).

Vários membros do grupo PR-5 do tabaco e outras espécies de plantas mostraram atividade *in vitro* significativa de inibição do crescimento de hifas ou a germinação de esporos de várias espécies de fungos (WOLOSHUK *et al.*, 1991; KOIWA *et al.*, 1997) provavelmente por um mecanismo de permeabilização da membrana.

AP24, uma proteína de 24 kDa ocasiona a lise de esporângios e inibição de crescimento de *Phytophthora infestans*. Esta proteína foi purificada a partir de plantas de tabaco inoculadas com o vírus do mosaico do tabaco (MIN, *et al.*, 2004). Desta forma, a AP24 de tabaco, como a AP24 de tomate ocasionaram lise de esporângios em concentrações superiores a 40 nM e inibiram severamente o crescimento de hifas em concentrações maiores que 400 nM (WOLOSHUK, *et al.*, 1991).

As PR proteínas, tais como osmotina, zeamatina e taumatina, mostram atividades antifúngicas, antimicrobianas e antivirais e são comparáveis entre si (ULLAH, *et al.*, 2017). Alguns trabalhos mostraram que a inibição do crescimento fúngico por osmotina e zeamantina está interligada à permeabilização da membrana, assim como a dissipação do potencial de membrana (RAMOS, *et al.*, 2015). Estas proteínas estão presentes em frutas, sementes e no látex, onde desempenham atividade antifúngica (NARASIMHAN *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2011).

1.2.2 Osmotinas

As osmotinas, ou proteínas similares à proteína taumatina, são proteínas vegetais que pertencem à família 5 das proteínas relacionadas à patogênese, uma família de proteínas de defesa de plantas contra patógenos, também capazes de induzir apoptose em leveduras (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Essas proteínas foram originalmente identificadas em culturas celulares de tabaco adaptadas à salinidade. Alguns trabalhos evidenciam o papel das osmotinas na proteção da planta contra patógenos, por inibir o crescimento de fungos através da formação de poros na membrana plasmática (ABAD et al., 1996; NARASIMHAN *et al.*, 2001).

Vale ressaltar, que a estrutura tridimensional das osmotinas é composta principalmente por três domínios. O domínio I forma a estrutura principal destas proteínas. Se sabe que o domínio I é composto por 11 folhas beta formando uma estrutura similar a um sanduíche onde seis folhas betas antiparalelas interagem com outras cinco folhas betas. Este domínio é estabilizado por três pontes dissulfeto. O domínio II é constituído basicamente por uma α -hélice estabilizada por três pontes dissulfeto. O domínio III é compreendido por um longo loop e uma folha beta antiparalela, sendo estabilizado por duas pontes dissulfeto (GHOSH; CHAKRABARTI, 2008). Os mesmos autores detectaram proteínas do tipo osmotina no látex de *Plumeria rubra*, com anticorpos policlonais produzidos contra a osmotina de látex de *C. procera* (CpOsm), por *ELISA*, *Dot Blot*, *Western Blot* e confirmadas por *MS/MS*.

Vale destacar que a osmotina também pode induzir fosforilação via AMP em miócitos de mamíferos através de receptores de adiponectina (homólogo do receptor PHO36). Estas observações experimentais sugerem que a osmotina é capaz de se ligar ao receptor da adiponectina em um ambiente celular humano, através da ativação do mesmo caminho de sinalização da adiponectina. Em leveduras, a osmotina se liga ao receptor PHO36 ocasionando a morte celular programada (NARASHIMAN *et al.*, 2005). A atividade da osmotina foi estudada em modelos *in vitro* e *in vivo* por TRIVEDI *et al.*, (2012).

1.3 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são pequenas moléculas peptídicas (7-100 aminoácidos), que propiciam em alguns organismos unicelulares, vantagem a competir com outros seres vivos que compartilham seu nicho biológico. É conhecido que AMPs fazem também parte do sistema imunológico de organismos multicelulares (AGEITOS *et al.*, 2016). Assim, essas moléculas representam armas biológicas que evoluíram ao longo de milhões de anos como resultado de uma crescente corrida para a sobrevivência entre os organismos. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) representam um grande grupo de compostos endógenos amplamente distribuídos (KOSIKOWSKA; LESNER, 2016). AMPs tornaram-se modelo para a descoberta de novos fármacos antimicrobianos que poderiam responder ao crescente problema da resistência a antibióticos por bactérias e fungos patogênicos.

Devido ao seu amplo espectro de atividade antibiótica, bem como propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, todos os AMPs compartilham características comuns, como um tamanho pequeno, carga líquida positiva e caráter hidrofóbico, dentro de uma estrutura linear ou cíclica. AMPs podem inibir o crescimento ou apresentar efeito bactericida em concentrações muito baixas (μM), algumas vezes por mecanismos não específicos. Além disso, os AMPs podem matar bactérias resistentes aos antibióticos, incluindo micróbios insidiosos, como *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (AGEITOS *et al.*, 2016; HASSAN *et al.*, 2012).

Os AMPs podem ser prospectados a partir de sequências de qualquer proteína por meio do uso de ferramentas de bioinformática. Posteriormente, utiliza-se a técnica de modelagem comparativa ou por homologia, que compreende 4 etapas principais: identificação e seleção de moldes a partir de proteínas homólogas, alinhamento da sequência alvo com o molde, construção e refinamento de modelos e validação dos mesmos (BISHOP *et al.*, 2008). Na área de modelagem molecular, o *docking* possui uma importância excepcional na predição da orientação preferida de uma molécula, em relação à outra, para formar um complexo estável que pode resultar em atividade específica (BHATTACHARJEE *et al.*, 2017).

O *docking* molecular tenta prever a posição, orientação e conformação nativas de uma pequena molécula-ligante com um sítio de ligação dentro de uma macromolécula alvo, fornecendo a compreensão básica das interações que estão

ocorrendo entre o ligante e seu receptor. Outra técnica bastante utilizada é a simulação de dinâmica molecular, que é um dos vários extensos protocolos para o cálculo de propriedades físicas de moléculas biológicas, especialmente proteínas, que auxilia na predição das propriedades essenciais de interesse biológico (KUMAR; SURESH; PRIYA, 2015; ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Estudos têm apontado que osmotinas e taumatinas são proteínas capazes de inibir o crescimento de variados agentes patogênicos. Uma pesquisa com 31 isolados, representando 18 gêneros de fungos, indicou que a sensibilidade pode ser determinada ao nível de gênero, quando a osmotina induziu a lise e germinação de esporos em alguns gêneros e outros não. A inibição do crescimento em algumas espécies foi correlacionada com a capacidade da osmotina em dissipar o gradiente de pH da membrana dos fungos ou alterar sua permeabilidade (ABAD, 1996; FREITAS, 2011). Vale ressaltar que neste mesmo estudo, células de *Tricoderma longibrachiatum* foram insensíveis à osmotina após plasmólise, ou seja, os dados sugerem que a parede celular pode ser um componente do mecanismo pelo qual osmotina permeabiliza a membrana plasmática e mata as células fúngicas (HIGUCHI, 2016). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a osmotina se liga ao receptor PHO36 na membrana plasmática, induzindo a apoptose.

A apoptose ocorre através de uma via de sinalização RAS2 ativada pela interação da osmotina ao receptor PHO36 que é codificado pelo gene ORE20. PHO36 é uma proteína ainda não cristalizada de 317 aminoácidos (36,3 kDa), que se prevê conter sete domínios transmembranas (NARASIMHAN, 2016; GOURLAY, 2006). O gene ORE20 (para resistência a osmotina), corresponde ao locus de YOL002c/PHO36 e codifica uma proteína não caracterizada de 317 aminoácidos (36,3 kDa) (PHO36), que se prevê conter sete domínios que atravessam a membrana de *Sacharomices cerevisiae* (*Saccharomyces Genome Database*), sendo este um aspecto característico dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (NARASIMHAN, 2016).

Apesar da descoberta da proteína osmotina ser recente, há pouco mais de três décadas (SINGH *et al.*, 1987), suas aplicações ainda são limitadas. Seja pela baixa disponibilidade da proteína purificada ou pela dificuldade de obtenção de osmotina recombinante expressa devido à sua toxicidade ou a propriedades físicas intrínsecas a molécula (VIKTOROVA *et al.*, 2012). Além desses fatores, a osmotina purificada pode apresentar baixa solubilidade em água (0,6 mg/mL), o que torna seu processo de renaturação ainda mais complexo (CAMPOS *et al.*, 2008).

Atualmente, há uma enorme disponibilidade de antimicóticos, porém, é observável, que o tratamento de pacientes com infecções fúngicas sistêmicas ainda seja um desafio considerável. Portanto, é urgente o desenvolvimento de novos

fármacos antifúngicos. Como relatado na literatura, candidatos antifúngicos promissores são novos peptídeos antimicrobianos isolados de proteínas vegetais (DE BRUCKER, 2016), evidenciando, assim, a importância do uso de metodologias teórico-computacionais e do desenho *in silico* de sequências peptídicas curtas.

Há talgum tempo, se sabe que o processo de descoberta de antibióticos foi profundamente alterado pela adoção de métodos computacionais. Estes métodos corroboram na prospecção de novas moléculas com maior rapidez, além de custos mais baixos. A concepção de fármacos *in silico* consiste num conjunto de ferramentas que ajudam a tomar decisões racionais nas diferentes etapas do processo. Dentre as diferentes ferramentas disponíveis, destaca-se a modelagem comparativa, o *docking* molecular, o design de ligantes baseados em fragmentos e a dinâmica molecular (ZOETE; GROSDIDIER E MICHIELIN, 2009).

Se a sequência de aminoácidos contém informação suficiente para especificar a estrutura tridimensional de proteínas, é possível o desenvolvimento de um algoritmo capaz de prever a estrutura de uma proteína a partir de sua sequência de aminoácidos. Como consequência, surgiram alguns métodos de bioinformática como a modelagem computacional que realiza a predição da estrutura secundária, reconhecimento de padrão de enovelamento e modelagem por homologia, observando que a abordagem *in silico* minimiza os gastos com reagentes e proteases, tornando-se um método de baixo custo na pesquisa inicial em desenvolvimento de fármacos (LESK, 2008).

O trabalho se justifica, a partir do momento em que a escassez de dados moleculares a cerca de interações entre ligante e receptor, principalmente entre osmotina e PHO36, certamente esconde um grande potencial biotecnológico e farmacológico. Assim, estudos de modelagem computacional e *docking* molecular tomam um caminho considerável para demonstrar determinantes de interação molecular das osmotinas e peptídeos sintéticos com o receptor PHO36 de *Sacharomices cerevisiae* e, desta forma, fomentar a descoberta e aplicação de novos peptídeos antimicrobianos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo a predição, caracterização, síntese e análise da atividade biológica de peptídeos antimicrobianos obtidos a partir das seqüências de osmotinas e taumatinas, já reconhecidas por sua atividade contra fungos.

3.2 Objetivos específicos

- Obter sequências de osmotinas e taumatinas que apresentem atividade antifúngica em bancos de dados;
- Realizar a predição de peptídeos de acordo com alguns parâmetros, tais como taxa total de hidrofobicidade, índice de Boman e carga líquida total;
- Sintetizar peptídeos para realizar posteriores ensaios biológicos e avaliar o efeito deletério dos peptídeos sintéticos sobre esporos e sobre o crescimento vegetativo dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotricum acutatum*, *Colletotricum gloeosporioides* e *Alternaria solani*;
- Avaliar o efeito deletério dos peptídeos sintéticos sobre bactérias de interesse clínico;
- Analisar o mecanismo de ação dos peptídeos;
- Verificar as alterações morfológicas nas espécies de leveduras estudadas neste trabalho através da microscopia eletrônica de varredura;
- Encontrar possível homólogo do receptor PHO36 no gênero *Candida*;
- Analisar a interação do peptídeo com os receptores por meio de docking molecular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Busca nos bancos de dados por proteínas taumatinas e osmotinas com atividade antifúngica

As sequências das proteínas antifúngicas de taumatinas e de osmotinas foram obtidas por uma busca extensiva nas bases de dados *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>) e *PDB* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). As sequências das osmotinas e taumatinas foram selecionadas levando em consideração a quantidade de resíduos de aminoácidos (acima de 170 resíduos) e a atividade antifúngica já descrita na literatura. A taumatina é uma proteína sem atividade antifúngica purificada de *Thaumatococcus daniellii* (WEL; LOEVE, 1972; IYENGAR, 1979) e foi usada como controle negativo pois a atividade antifúngica não foi associada a esta proteína (KOIWA, 1999). As sequências das proteínas foram alinhadas utilizando banco de dados *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Com a finalidade de conhecer relações evolutivas das proteínas encontradas foi gerada uma árvore filogenética das sequências proteicas também utilizando o programa *Clustal Omega*. As sequências das proteínas maduras foram usadas para calcular suas propriedades químicas. O número de resíduos de aminoácidos, a predição do ponto isoelétrico teórico (PI) e massa molecular teórica foram previstos pelas ferramentas *ExpASy* (<http://web.expasy.org/>). As pontes dissulfeto foram previstas usando *CYS_REC-softberry* (<http://www.softberry.com>).

4.2 Predição, caracterização, seleção e síntese de peptídeos antifúngicos

O servidor on-line *C-Pamp* (NIARCHOU et al., 2013) foi utilizado para analisar e projetar peptídeos antimicrobianos das quinze seqüências obtidas. Entre todas as proteínas analisadas por *C-pamP* (<http://bioserver-2.bioacademy.gr/Bioserver/C-PAmP/>), oito foram capazes de produzir peptídeos, onde foram extraídos cento e dez peptídeos com até quinze aminoácidos. Foram selecionados quatro peptídeos considerando algumas características químicas, tais como taxa total de hidrofobicidade (> 37%), carga líquida total (HANCOCK, 1999) (presença de aminoácidos carregados positivamente), índice de Boman e índice de probabilidade (0,99) *C-pamP*, que permitem a predição da melhor interação entre os peptídeos sintéticos e a membrana celular microbiana. Algumas características químicas dos peptídeos, tais como massa molecular, pI, hidrofobicidade e carga líquida total foram determinadas usando ferramentas *ExpPASy* (<http://web.expasy.org/>). O alinhamento desses quatro peptídeos sintéticos com suas seqüências de proteínas de origem foi feito usando o banco de dados *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A qualidade estereoquímica dos modelos previstos foi avaliada pela análise do *plot* de *Ramachandran*. A localização dos peptídeos na estrutura tridimensional das proteínas foi visualizada usando o *PyMol Molecular Graphics System* em simulação *cartoon*. Após a predição, os quatro peptídeos foram sintetizados pelo grupo *Genone Corporation* (<http://www.genone.com.br/>). A pureza de todos os peptídeos foi realizada por cromatografia em fase reversa (HPLC) e espectrometria de massas *MALDI-TOF*.

4.3 Atividade antimicrobiana

Todos os microorganismos (exceção do gênero *Candida*) utilizados neste trabalho foram obtidos do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Brasil. Foram preparadas diferentes concentrações dos peptídeos sintéticos (62,5 μM , 31,2 μM , 15,6 μM , 7,8 μM e 3,9 μM) em DMSO 5%, contendo NaCl 0,15 M e filtradas através de membranas 0,22 μM (*Millipore*). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos no mínimo três vezes.

4.4 Análise estatística

Para o teste de atividade antimicrobiana, as diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas a partir da análise de variância ANOVA *two-way*, seguidos pelos testes posteriores de *Bonferroni*. As análises estatísticas foram realizadas usando o software *GraphPad Prism* versão 5. Os valores de P abaixo de 0,05 foram considerados significativos.

4.5 Atividade antifúngica

4.5.1 Inibição da germinação de esporos

Os esporos dos fungos fitopatogênicos (*Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*) foram quantificados em uma câmara *Neubauer* como descrito por Freitas *et al.*, (2011). Como descrito acima, diferentes concentrações dos peptídeos sintéticos foram preparadas em NaCl 0,15M contendo DMSO 5% e filtradas através de membranas de 0,22 μM (*Millipore*). Depois, foram misturados 10 μL de uma suspensão de esporos (2×10^5 células por mL^{-1} em água) com 10 μL de peptídeos sintéticos e incubados em placas estéreis reticuladas com polietileno. A germinação dos esporos foi observada usando um microscópio de luz após um período de 24 h a 27 °C.

4.5.2 Inibição do crescimento vegetativo

O teste de inibição do crescimento vegetativo dos fungos fitopatogênicos (*Fusarium oxysporum*, *Colletotricum acutatum*, *Colletotricum gloeosporioides* e *Alternaria solani*) foi realizado de acordo com Broekaert *et al.* (1990). Adicionou-se 10 µL de uma suspensão de esporos ($2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) em microplacas de 96 poços contendo 90 µL de caldo de levedura *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) (5% v/v) e, após 16 h a 27°C, 100 µL de uma solução contendo os peptídeos sintéticos foram adicionados. O crescimento fúngico foi monitorado por 48 h, leituras realizadas a cada 12h e a turbidimetria foi medida a 620 nm usando um leitor automatizado de microplacas (*ELx800 Absorbance Microplate Reader, BioTek Customer Care*).

4.5.3 Inibição do crescimento dos fungos *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*

Os fungos *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (isolado clínico) foram obtidos da coleção de cultura do Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes - LAPERE, Departamento de Patologia e Medicina Legal, UFC. *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, Departamento de Biologia, UFC. Os ensaios contra *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* foram avaliados utilizando o método de microdiluição de caldo descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com algumas modificações. Inóculos ($0,5\text{-}2,5 \times 10^3 \text{ CFU por mL}$) foram preparados a partir de culturas de 1 dia de idade cultivadas em agar *Sabouraud* a 30°C no meio caldo *Sabouraud*. Os peptídeos sintéticos foram preparados em concentrações variadas descritas anteriormente e dissolvidos em NaCl 0,15 M (controle negativo) contendo 5% de DMSO. Em seguida, adicionou-se 100 µL de suspensão de leveduras ($0,5\text{-}2,5 \times 10^3 \text{ CFU por mL}$) em placas planas de 96 poços com 50 µL de meio de caldo *Sabouraud*. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e o crescimento das células de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* foi monitorado a 620 nm utilizando um leitor automatizado de microplacas (*Epoch, BioTek*).

4.6 Atividade antibacteriana

Bactérias gram-positiva (*Bacillus subtilis*-ATCC 6633 e *Staphylococcus aureus*-ATCC 25923) e bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*-ATCC 13048, *Klebsiella pneumoniae*-ATCC 10031, *Enterobacter aerogenes*-ATCC 13048 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028) foram cultivadas anteriormente em meio de agar nutritivo, transferidas para o caldo *Mueller-Hinton* e incubadas a 37°C durante 18-24 h. Depois, foram utilizadas suspensões de células (O.D 620 nm = 0,08 e 0,1), contendo $10^5 \times 10^6$ UFC por mL, nos ensaios. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços adicionando 100 µL da suspensão celular e 100 µL de peptídeos sintéticos em diferentes concentrações como descritas anteriormente.

4.7 Avaliação do mecanismo de ação

4.7.1 Integridade da membrana celular

A permeabilização da membrana celular foi medida por absorção de iodeto de propídio (Regente *et al.*, 2014). *Candida albicans* e células de *Saccharomyces cerevisiae* ($0,5-2,5 \times 10^3$ CFU / ml) foram incubadas na presença de PEP 4 (62,5 µM), ou em DMSO 5% em NaCl 0,15M (controle negativo) durante 24 horas a 30°C, para avaliar o efeito sobre a integridade da membrana celular. A suspensão de células tratadas foi centrifugada a 2000 x g, durante 5 *min* à temperatura ambiente. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi homogeneizado em 100 µL de tampão de fosfato de sódio (PBS) 50 mM, pH 7,5. O processo foi repetido por 3 vezes para lavar a amostra de resíduos e meio de cultura. Após a terceira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspense em 30 µL de tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 e, 2 µL de iodeto de propídio foi adicionado para atingir a concentração final de 1 µM. A mistura reacional foi incubada a 25°C durante 30 min. Uma solução de 5% de DMSO em 0,15 M NaCl foi utilizada como controle negativo. A absorção de iodeto de propídio foi observada por microscopia de fluorescência (Sistema de Microscopia *Olympus*, comprimento de onda de excitação 400-500 nm, comprimento de onda de emissão 600-700 nm).

4.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A integridade da membrana celular de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* também foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Após a incubação com peptídeos sintéticos, os micro-organismos foram fixados a 4°C durante a noite na solução de Karnovsky, que é constituída por 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão de fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 (KARNOVSKY, 1965). Após a fixação e lavagens consecutivas no mesmo tampão fixador, as amostras foram desidratadas em séries de álcool etílico (10, 30, 50, 70, 90 e 100%, durante 10-30 min em cada etapa). As amostras foram secas usando hexametildisilazano (HDMS) e afixadas em lamínulas previamente tratados com poli-L-lisina. As amostras foram metalizadas com ouro e analisadas em *Quanta Inspect-50 EIF Scanning Electron Microscope*, utilizando um detector de elétrons secundário e aceleração de 20 a 25 kV.

4.7.3 Detecção de ROS e indução de apoptose

A produção de espécies de reativas de oxigênio foi detectada de acordo com Dikalov e Harrison *et al.*, (2014). As células de *C. albicans* e *S. cerevisiae* ($0,5-2,5 \times 10^3$ CFU por mL) foram incubadas na presença dos peptídeos sintéticos durante 24 h a 30°C. As suspensões de células tratadas foram centrifugadas a 2.000 x g durante 5 min a 25°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi homogeneizado em 100 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5. O processo foi repetido por 3 vezes para lavar amostra residual e meio de cultura restante. Após a terceira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em 30 µL de tampão de fosfato de sódio 50 mM. Depois disso, adicionou-se 10 µl de diacetato de 2,7-diclorofluoresceína 10 µM (DCFH-DA) à cultura, durante 10 min a 30°C. Em seguida, a suspensão celular tratada foi lavada como acima e observada sob microscópio de fluorescência (*Olympus System BX 60*, comprimento de onda de excitação máximo, 504 nm, comprimento de onda máximo de emissão, 529 nm). As células de *C. albicans* tratadas com os peptídeos sintéticos foram submetidas ao método de desoxinucleotídeo transferase (TdT) mediado por TUNEL para avaliar a fragmentação do DNA. O teste TUNEL foi realizado usando o kit da promega *DeadEnd Colorimetric TUNEL System* com pequenas modificações.

4.8 Ensaios de bioinformática

4.8.1 Identificação do receptor PHO36 no genoma *Candida albicans*

O gene que codifica o homólogo do receptor PHO36 de *Saccharomyces cerevisiae* em *Candida albicans* foi recuperado da base de dados NCBI (Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através de um *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997). A anotação do gene e o cDNA foram obtidos manualmente comparando a sequência identificada com o cDNA de PHO36 anotado no *GenBank* (NCBI) usando *BLASTn*. O DNA genômico deduzido foi traduzido em sequências de aminoácidos utilizando a ferramenta de tradução no servidor web *ExpPASy* (<http://web.expasy.org/translate>) e, em seguida, verificou-se contra as proteínas de *Candida albicans* disponíveis no *GenBank* usando a ferramenta *BLASTp*.

4.8.2 Modelagem molecular

O modelo tridimensional da cadeia A do receptor de PHO36 de *S. cerevisiae* (código UniProt: IZH2, estirpe ATCC 204508 / S288c) foi realizado por uma modelagem comparativa utilizando como estruturas molde a cadeia A dos cristais revisados do receptor de adiponectina (Código PDB: 5LXG e 5LWY). O programa de modelagem por homologia *GalaxyWEB* sever (<http://galaxy.seoklab.org/>) e *SWISS-MODEL* (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) foram utilizados para gerar os modelos. Foi utilizado o programa *Macromolecular X-Ray Crystallography Software* para ajustar os ângulos *Phi* e *Psi* dos modelos estruturais. Após o ajuste dos ângulos dos modelos o programa *GalaxyWEB* refiner (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) e o *ModRefiner* (<https://zhaglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>) algoritmo de refinamento de estrutura de proteína em nível atômico foram usados para minimizar a energia dos modelos.

4.8.3 Docking molecular

Estudos de docking molecular entre o peptídeo sintético (ligante) e os receptores de membrana plasmática de *C. albicans* e *S. cerevisiae* foram realizados usando os servidores de encaixe proteína-proteína *ClusPro* 2.0 (KOZAKOV, 2017; COMEAU, 2004), *AutoDockVina* (TROTT; OLSON, 2010) e *HADDOCK2.2* Web Servidor (VAN ZUNDERT *et al.*, 2016). *AutoDockVina* tem campo de força para múltiplos ligantes e o *ClusPro* é um servidor específico para realizar interação molecular proteína-proteína.

O servidor web *HADDOCK* é aplicado para avaliar a interação entre proteína-proteína, proteína-ácido nucleico, proteína-oligossacarídeo e complexos proteína-pequena molécula (DE VRIES 2010). O peptídeo IVGQCPAKLKA foi utilizado como um tipo de controle negativo porque não apresentou atividade antifúngica. *PDBsum* foi usado para analisar os conteúdos gerais de cada estrutura 3D das moléculas, fornecendo diagramas esquemáticos de interações entre os receptores e ligantes (LAKKOWSKI, 2001). O software *PyMOL* foi usado para visualizar a estrutura molecular dos modelos.

5 RESULTADOS

5.1 Predição e síntese dos peptídeos sintéticos

Apenas catorze proteínas semelhantes a taumatina e osmotina depositadas nos bancos de dados Uniprot e PDB foram descritas com atividade antifúngica (Tabela 2). Essas proteínas foram purificadas de diferentes plantas, incluindo *Nicotiana tabacum*, *Calotropis procera*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Vitis cinerea* e *Musa acuminata*, e foram ativas contra vários microorganismos.

As proteínas foram caracterizadas de acordo com os seguintes parâmetros (Tabela 3): ponto isoelétrico, número de resíduos de aminoácidos, quantidade de resíduos de cisteínas e massa molecular. Os dados demonstram que as proteínas pertencem as classes de proteínas OLPs e TLPs, pois apresentam massa molecular cerca de 15-24 kDa, 10 a 16 resíduos de cisteínas, envolvidos em 5 a 8 pontes dissulfetos e se apresentam como monômeros (SING *et al.*, 2013).

Tabela 02 Proteínas osmotinas e taumatinas com atividade antifúngica disponíveis nos bancos de dados.

Código UniProt	Proteína	Planta de origem	Fungo fitopatogênico	Outro patógeno	Referências
P14170	Osmotin	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Phytophthora infestans</i> ^c	-	WOLOSHUK et al. (1991)
P25871	Osmotin-like protein	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Neurospora crassa</i> ^b ; <i>Trichoderma reesei</i> ^b ; <i>Cochliobolus miyabeanus</i> ^b ; <i>Fusarium oxysporum</i> ^c ; <i>Alternaria solani</i> ^b	<i>Candida albicans</i>	KOIWA et al. (1997)
A0A0A6ZJV0	Osmotin-like	<i>Ocimum basilicum</i>	-	<i>Candida albicans</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Pichia pastoris</i>	RATHER et al. (2015)
A0A067XG70	Osmotin	<i>Galotropis procera</i>	<i>Fusarium solani</i> ^b	-	MORENO et al. (1991)
Q9FSG7	Thaumatina-like	<i>Malus domestica</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> ^c ; <i>Penicillium expansum</i> ^b ;	-	KREBITZ et al. (2003)
P13867	Thaumatina-like	<i>Zea mays</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> ^c ; <i>Alternaria solani</i> ^b	-	HUYNH; BORGMEYER (1992)
Q9SMH2	Thaumatina-like	<i>Castanea sativa</i>	<i>Thichoderma viride</i> ^b ; <i>Fusarium solani</i> ^c	-	GARCIA-CASADO et al., (2000)
P12670	Protein NP24	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Phomo betae</i> ^b ; <i>Verticillium dahlia</i> ^b	-	PRESSEY (1997)
P33679	Zeamatin	<i>Zea mays</i>	<i>Trichoderma reesei</i> ^b ; <i>Alternaria solani</i> ^b ; <i>Neurospora crassa</i> ^b	<i>Candida albicans</i>	MALEHORN et al. (1994)
Q8S4P7	Thaumatina-like	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Microdochium nivale</i> ^c	-	KUWABARA et al. (2002)
D3WOX5	Thaumatina-like	<i>Vitis cinerea var</i>	<i>Armillaria mellea</i> ^c	-	PERAZZOLLI et al. (2010)
O22322	Ripening-associated	<i>Musa acuminata</i>	<i>Verticillium albo-atrum</i> ^c	-	LEONE et al. (2006)
A0A0A0YL24	Permatin	<i>Avena nuda</i>	<i>Trametes sp.</i> ^b ; <i>Trichoderma spp.</i> ^b ; <i>Chaetomium sp.</i> ^b	-	SHI et al. (2011)
D9IZY9	Pathogenesis-related Proteins	<i>Zea mays</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> ^b	-	LIU et al. (2011)
*P02883	Thaumatina	<i>Thaumatococcus daniellii</i>	-	-	WEL; LOEVE (1972)

Fungos fitopatogênicos: ^aBiotróficos; ^bNecrotrofos e ^cHemibiotróficos.

*Primeira proteína taumatina descrita e não possui atividade antifúngica

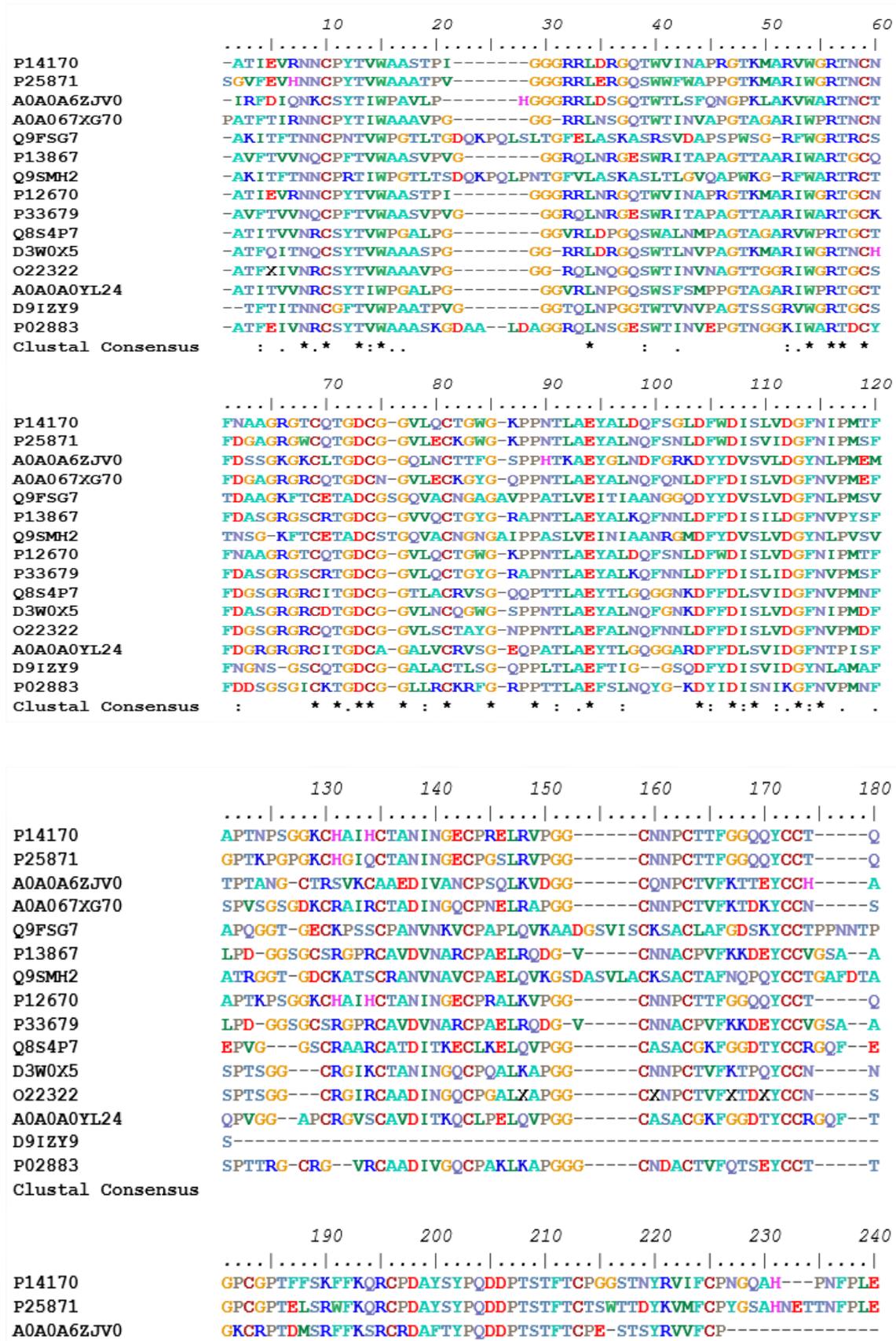
Tabela 03 Propriedades químicas das proteínas da tabela 2.

UniProt (N° de acesso)	N° de AA**	pI**	Massa molecular (Da)	N° de Resíduos de cisteína	N° de Pontes de dissulfeto
P14170	225	7.93	24285.24	16	8
P25871	230	6.39	25184.18	16	8
A0A0A6ZJV0	203	8.32	22408.26	16	8
A0A067XG70	206	8.23	22358.99	16	8
Q9FSG7	222	4.72	23210.91	16	8
P13867	206	8.16	22074.71	16	8
Q9SMH2	221	8.46	23467.45	16	8
P12670	226	8.33	24224.32	16	8
P33679	206	8.16	22057.78	16	8
Q8S4P7	203	7.91	21408.12	16	8
D3W0X5	219	7.91	23728.44	16	8
O22322	193	5.07	17476.42	13	6
A0A0A0YL24	204	8.16	21532.35	16	8
D9IZY9	174	4.87	15144.70	10	5
*P02883	207	8.46	22204.04	16	8

** A sequência madura das proteínas foi utilizada. O número de resíduos de aminoácidos foi calculado usando a ferramenta *ProtParam* da *ExpASY*. O pI e a massa molecular foram previstos pela ferramenta *Compute pI / Mw* e as pontes dissulfeto foram previstas usando o *CYS_REC-softberry*.

Verificou-se no alinhamento de sequências (figura 1) e na árvore filogenética das proteínas osmotinas e taumatinas (figura 2), realizados pelo *Clustal Omega*, que existem algumas regiões conservadas oriundas de relações funcionais, estruturais ou evolucionárias entre as osmotinas e taumatinas. Assim, regiões conservadas entre sequências protéicas das proteínas podem ser utilizadas para desenhar peptídeos com atividade antimicrobiana. Todavia, neste trabalho utilizamos outros parâmetros para predição de peptídeos antimicrobianos.

Figura 01. Alinhamento das seqüências protéicas das osmotinas e taumatinas da tabela 2.



```

                190      200      210      220      230      240
P14170      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GPCGPTFFSKFFKQRCPDAYSYPQDDPTSTFTCPGGSTNYRVIFCPNGQAH---PNFPLE
P25871      GPCGPTELSRWFKQRCPDAYSYPQDDPTSTFTCTSWTTDYKVMFCPYGSAHNETTNFPLE
A0A0A6ZJV0  GKCRPTDMSRFFKSRCRDAFTYPQDDPTSTFTCPE-STSYRVVFCP-----

```

```

A0A067XG70  GSCGPTTYSRFFKERCDAYSYPKDDPTSTFTCPGSG-TNYRVIFCPPG-----
Q9FSG7      ETCPPTEYSEIFEKQCPQAYSAYDDKNSTFTCSGG-PDYVITFCP-----
P13867      NNCHPTNYSRYFKGQCPDAYSYPKDDATSTFTCPAG-TNYKVVFCP-----
Q9SMH2      RTCPATKYSRIFFKQCPDAYSAYDDSTSTFTCSGA-PDYVITFCP-----
P12670      GPCGPTELSKFFKRCPCDAYSYPQDDPTSTFTCPGGSTNYRVVFCPNGVAD---PNFPLE
P33679      NDCHPTNYSRYFKGQCPDAYSYPKDDATSTFTCPAG-TNYKVVFCP-----
Q8S4P7      HNCPPNYSKFFKRCPCDAYSYPKDDQTSFTFCPAG-TNYQIVLCP-----
D3W0X5      IKCGPTDYSRFFKRCPCDAYSYPQDDPTSTFTCPGG-TNYRVVFCPRGSSNNIFPLEMYG
O22322      GSCSPTDYSRFF-----
A0A0A0YL24  DNCPPTYYSKFFKSKCPDAYSYPKDDQTSFTCPGSG-TNYQMVLCPE-----
D9IZY9      --CSTGVRLVCTDSGCPDAYHHPNDVKTHACGGN---SNYQVTFCP-----
P02883      GKCGPTEYSRFFKRLCPDAFSYVLDKPT-TVTCPG-SSNYRVTFCP-----
Clustal Consensus  * .

```

```

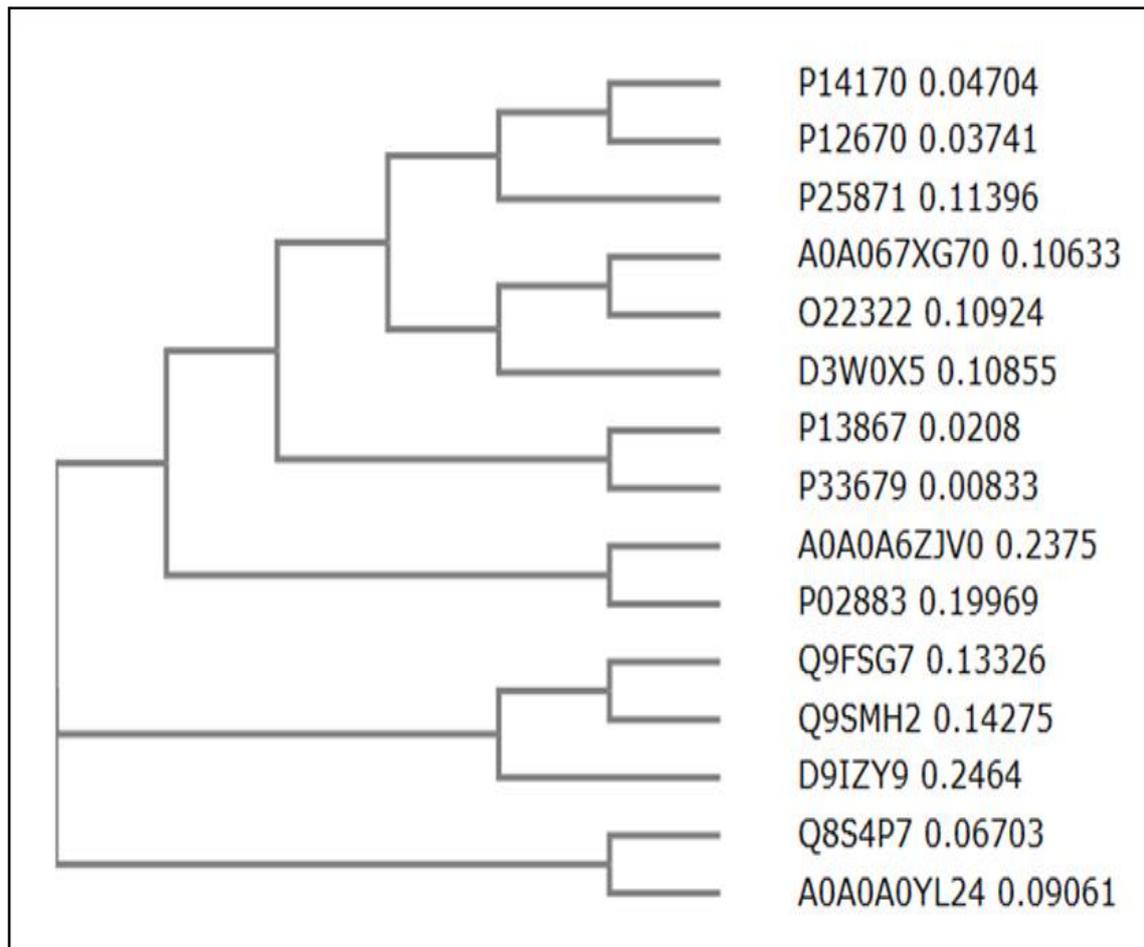
                250
P14170      ....|....|
MPGSDEVAK-
P25871      MPTSTHEVAK
A0A0A6ZJV0  -----
A0A067XG70  -----
Q9FSG7      -----
P13867      -----
Q9SMH2      -----
P12670      MPASTDEVAK
P33679      -----
Q8S4P7      -----
D3W0X5      SDSEE-----
O22322      -----
A0A0A0YL24  -----
D9IZY9      -----
P02883      -----
Clustal Consensus

```

Fonte: Alinhamento realizado pelo *software Clustal omega* e imagem gerada pelo *bioedit*.

Assim, estes dados em conjunto com a matrix de similaridade (Tabela 4) confirmam que as catorze seqüências de proteínas encontradas são similares entre si, apresentando regiões conservadas, e, por isso, possuem acentuada semelhança com a taumatina original, que foi identificada em *Thaumatococcus daniellii*.

Figura 02. Árvore filogenética das proteínas pertencentes aos grupos das osmotinas e taumatinas geradas pelo Clustal Omega.



Fonte: Árvore gerada através do *Clustal Omega*.

Tabela 04. Matrix de similaridade (%) entre as sequências proteicas gerada pelo servidor *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Código UniProt	P14170	P25871	A0A0A6ZJV0	A0A067XZ70	Q9FSG7	P13867	Q9FSMH2	P12670	P33679	Q8S4P7	D3WOX5	O22322	A0A0A0YL24	D9IZY9	PO2883
P14170	100.00	77.33	54.46	72.20	46.04	60.10	44.28	91.56	61.58	57.50	71.23	61.68	53.23	51.35	53.73
P25871	77.33	100.00	53.47	68.93	43.56	60.10	40.80	79.65	61.58	54.50	69.41	63.47	54.73	50.00	55.22
A0A0A6ZJV0	54.46	53.47	100.00	57.21	37.81	50.50	41.00	53.96	50.99	50.50	63.00	53.29	48.76	45.58	56.28
A0A067XG70	72.20	68.93	57.21	100.00	40.80	64.36	42.00	71.71	65.84	61.00	76.24	78.44	60.20	53.06	62.50
Q9FSG7	46.04	43.56	37.81	40.80	100.00	42.44	72.40	46.53	42.93	45.05	43.72	38.55	44.33	43.54	40.20
P13867	60.10	60.10	50.50	64.36	42.44	100.00	42.65	61.58	97.09	59.11	63.50	64.07	56.37	50.00	54.77
Q9FSMH2	44.28	40.80	41.00	42.00	72.40	42.65	100.00	42.79	42.65	44.28	43.94	37.58	43.07	39.73	38.42
P12670	91.56	79.65	53.96	71.71	46.53	61.58	42.79	100.00	63.05	57.50	72.15	64.67	54.73	52.03	55.72
P33679	61.58	61.58	50.99	65.84	42.93	97.09	42.65	63.05	100.00	60.10	65.00	65.87	56.86	52.03	56.28
Q8S4P7	57.50	54.50	50.50	61.00	45.05	59.11	44.28	57.50	60.10	100.00	60.50	59.28	84.24	54.79	54.04
D3WOX5	71.23	69.41	63.00	76.24	43.72	63.50	43.94	72.15	65.00	60.50	100.00	77.25	57.00	54.11	65.00
O22322	61.68	63.47	53.29	78.44	38.55	64.07	37.58	64.67	65.87	59.28	77.25	100.00	56.29	60.87	68.67
A0A0A0YL24	53.23	54.73	48.76	60.20	44.33	56.37	43.07	54.73	56.86	84.24	57.00	56.29	100.00	50.68	52.02
D9IZY9	51.35	50.00	45.58	53.06	43.54	50.00	39.73	52.03	52.03	54.79	54.11	60.87	50.68	100.00	52.74
*PO2883	53.73	55.22	56.28	62.50	40.20	54.77	38.42	55.72	56.28	54.04	65.00	68.67	52.02	52.74	100.00

Posteriormente, estas catorze proteínas foram analisadas pelo servidor *C-PamP* e somente oito sequências de proteínas conseguiram produzir peptídeos antimicrobianos (acima de 10 mil peptídeos com probabilidade de possuir atividade antimicrobiana). Após uma seleção extensiva foram selecionados apenas quatro peptídeos do interior destas proteínas.

Os peptídeos foram selecionados considerando alguns parâmetros químicos, como taxa total de hidrofobicidade, carga líquida total (presença de aminoácidos carregados positivamente), baixo peso molecular, índice de Boman e *score* de probabilidade *C-PamP* (acima de 0,99), que permitem realizar a previsão da melhor interação entre os peptídeos sintéticos e a membrana celular microbiana (Tabela 05).

Dentre os quatro peptídeos selecionados, dois pertencem à sequência da taumatina I de *Thaumatococcus daniellii* (CAADIVGQCPAKLK e IVGQCPAKLKA), que não tem atividade antifúngica comprovada na literatura. A ausência da atividade da taumatina pode estar relacionada com o menor potencial eletronegativo encontrado na fenda desta proteína quando comparado com proteínas similares (MIN, 2004). Dois outros peptídeos pertencem à sequências das proteínas osmostinas de *Castanea sativa* (GDCKATSC) e *Solanum lycopersicum*, respectivamente (CPRALKVPGGCN).

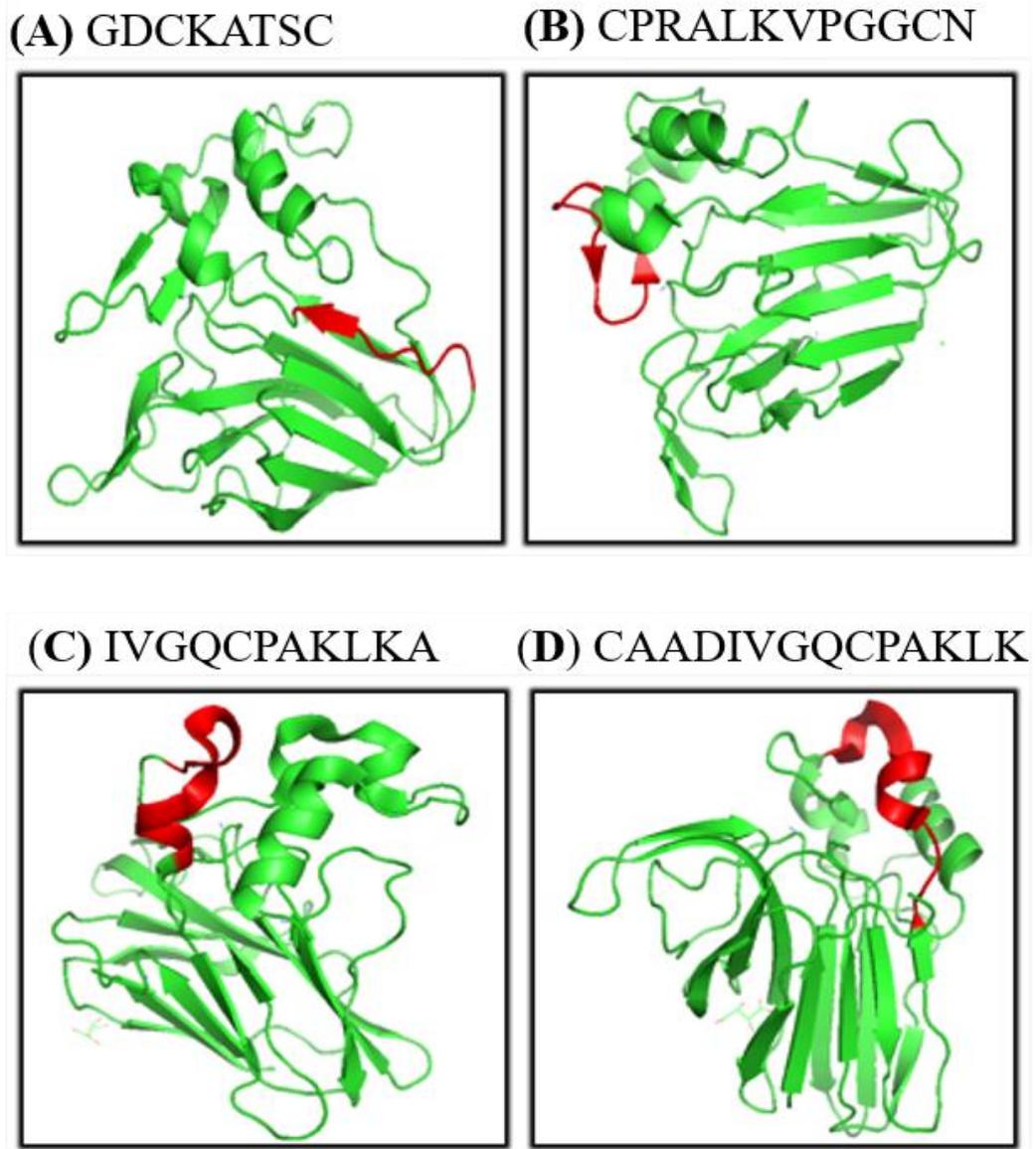
A Figura 3 mostra os quatro peptídeos preditos pelo *C-PAmP* localizados na estrutura tridimensional de suas respectivas proteínas de origem usando o programa de visualização *Pymol*. É importante notar, que os peptídeos estão dispostos na superfície das proteínas, indicando que encontram-se em uma região favorável das proteínas para interagir com outras moléculas.

Table 05. Parâmetros químicos dos quatro peptídeos selecionados neste estudo.

UniProt (código de acesso)	C-pamp (código)	Sequência de AA	Nº de resí- duos	C-pamp (probabilida -de)	Taxa de hidrofobicidade	Carga	Índice de Boman	pl	Massa predita	Massa experim ental*
Q9SMH2	345	G D C K A T S C	8	0.9932	62%	+1	0.29	5.82	783.87	783.64
P12670	1955	C P R A L K V P G G C N	12	0.9962	41%	+2	0.99	8.96	1214.47	1214.39
P02883	331	I V G Q C P A K L K A	11	0.9957	54%	+2	0.28	9.31	1127.41	1127.37
P02883	651	C A A D I V G Q C P A K L K	14	0.9952	57%	+1	0.18	8.05	1416.72	1416.56

* A massa experimental foi determinada por espectrometria de massas.

Figura 03. Visualização dos peptídeos antimicrobianos (em vermelho) preditos pelo banco de dados *C-PamP* em suas respectivas proteínas.

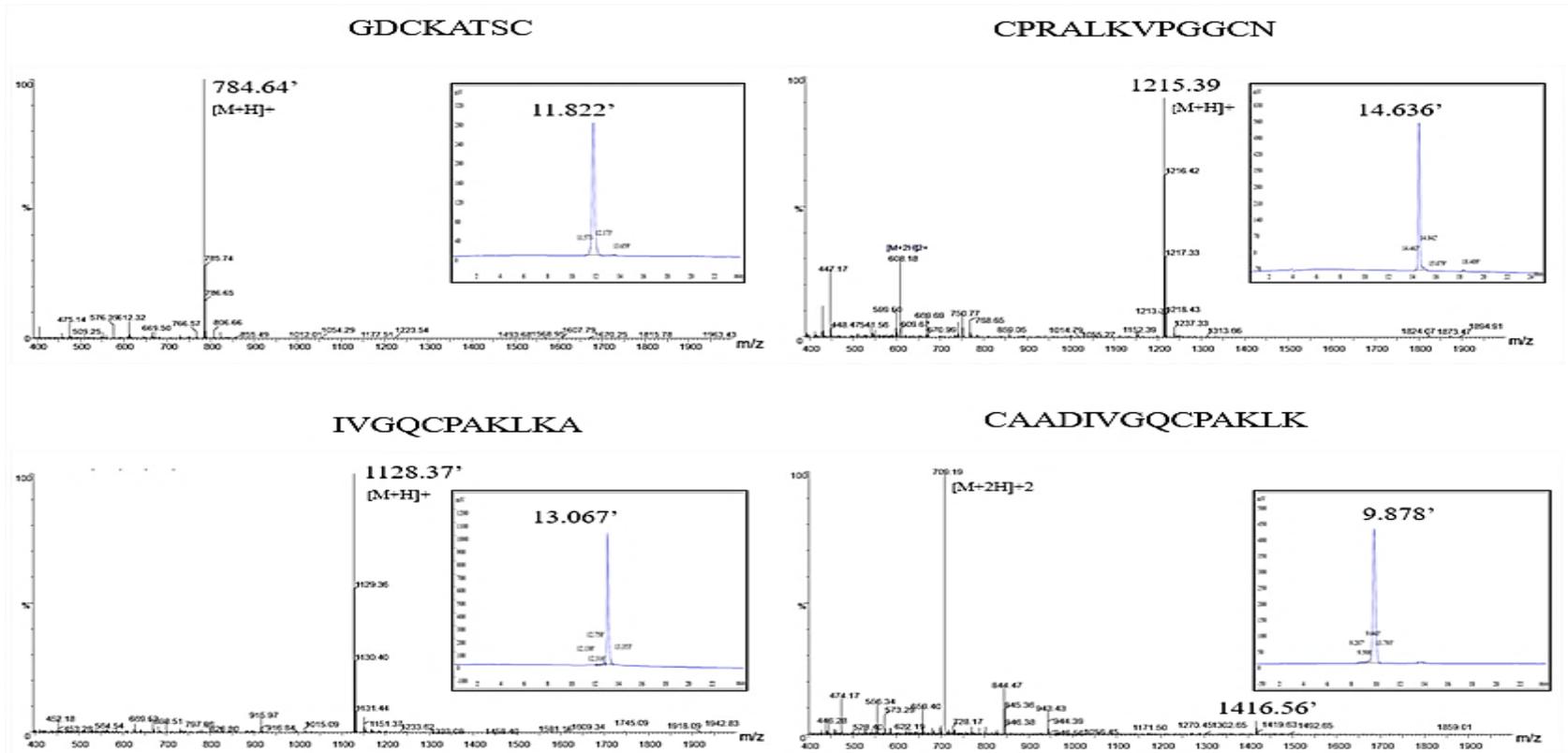


Fonte: elaborada pelo autor. (A) taumatina-like de *Castanea sativa* (Q9SMH2); (B) Osmotina-like de *Solanum lycopersicum* (P12670) e (C,D) taumatina de *Thaumatooccus daniellii* (P02883).

Após a predição, os peptídeos foram sintetizados. A determinação da pureza dos peptídeos identificados como PEP1, PEP2, PEP3 e PEP4 foi determinada por cromatografia líquida de fase reversa de alto desempenho (figura 4). Os cromatogramas demonstraram a ocorrência de apenas um único pico e que houve um grau de pureza bastante satisfatório, que foi estimada em > 95%.

A pureza, massa molecular e a sequência dos peptídeos também foram determinadas por espectrometria de massas (Figura 4). A massa molecular experimental gerada pela *Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS)* foi compatível com a massa molecular e sequência prevista pela ferramenta *ExPASy-Compute PI / Mw tool* (Tabela 5).

Figura 04. Determinação da pureza dos peptídeos sintéticos por cromatografia líquida de fase reversa de alta performance (inserida) e espectrometria de massa (MALDI-TOF).

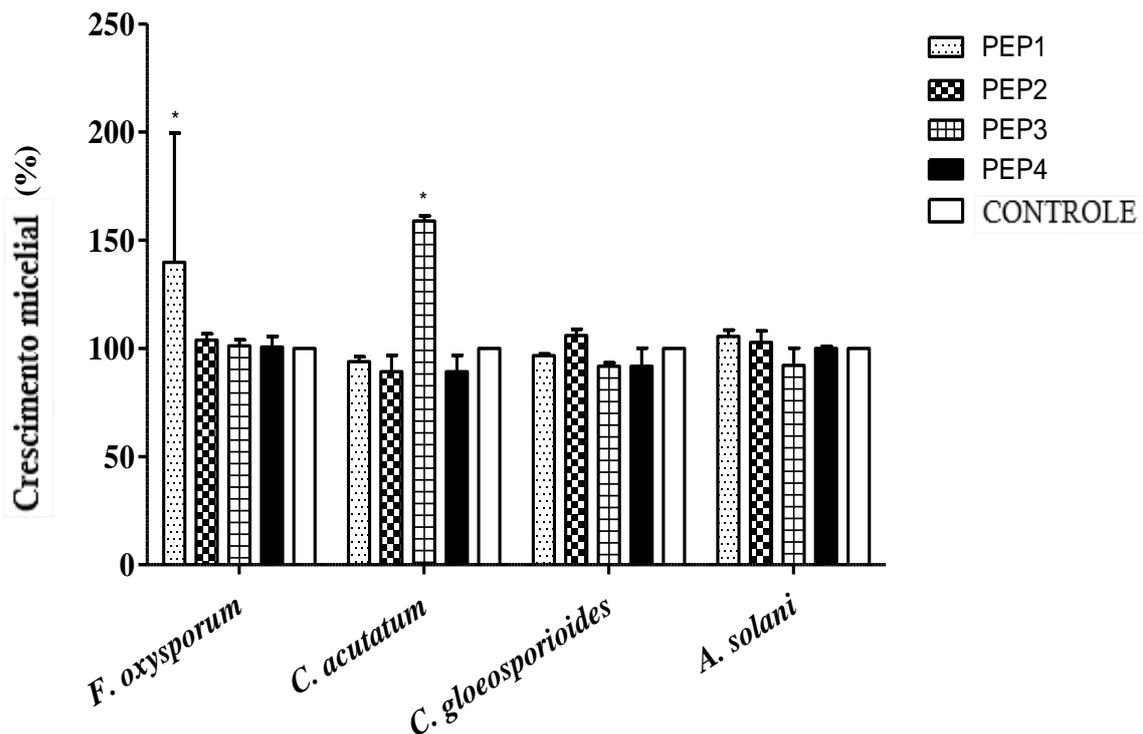


Fonte: elaborada pelo autor.

5.2 Análise antimicrobiana

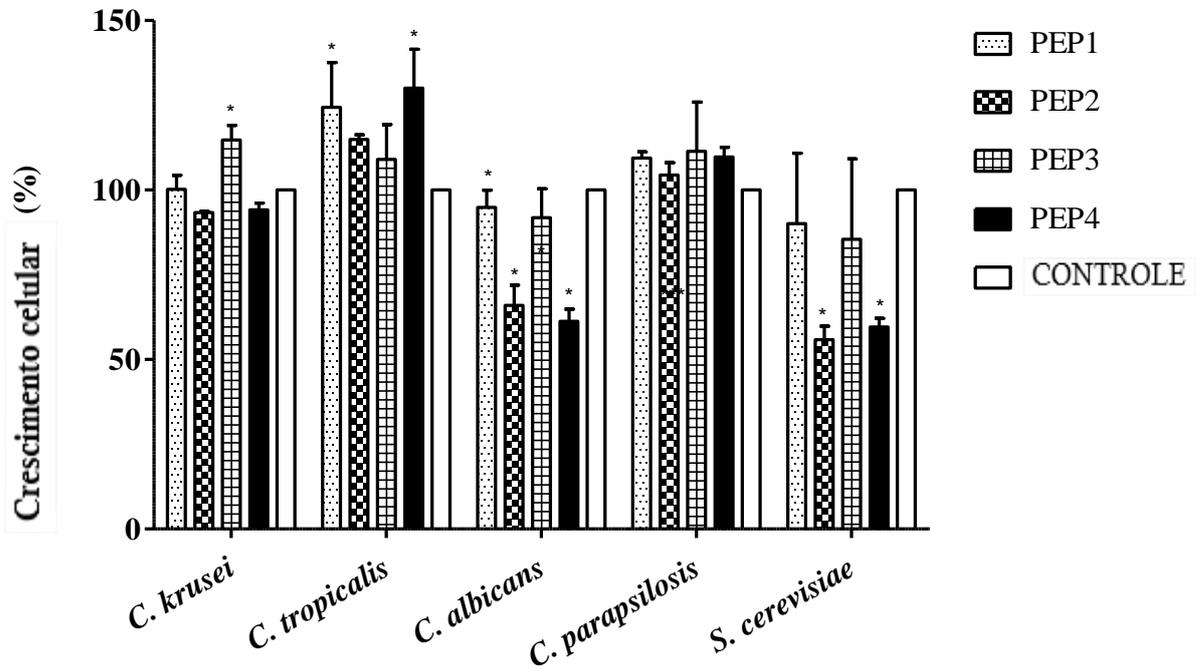
Os testes antimicrobianos mostraram que os peptídeos na concentração de 62,5 μM não conseguiram inibir o crescimento micelial dos fungos *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *A. solani* e *C. acutatum* (Figura 5). Atividade biológica significativa foi encontrada em PEP4 (CAADIVGQCPAKLK) e PEP2 (CPRALKVPGGCN) contra *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (figura 6). Na concentração de 62,5 μM , os peptídeos selecionados não inibiram o crescimento celular bacteriano de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. enterica* e *E. aerogenes* (figura 7).

Figura 05. Efeito dos peptídeos sintéticos PEP1, PEP2, PEP3 e PEP4 sobre os fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotricum acutatum*, *Colletotricum gloeosporioides* e *Alternaria solani*.



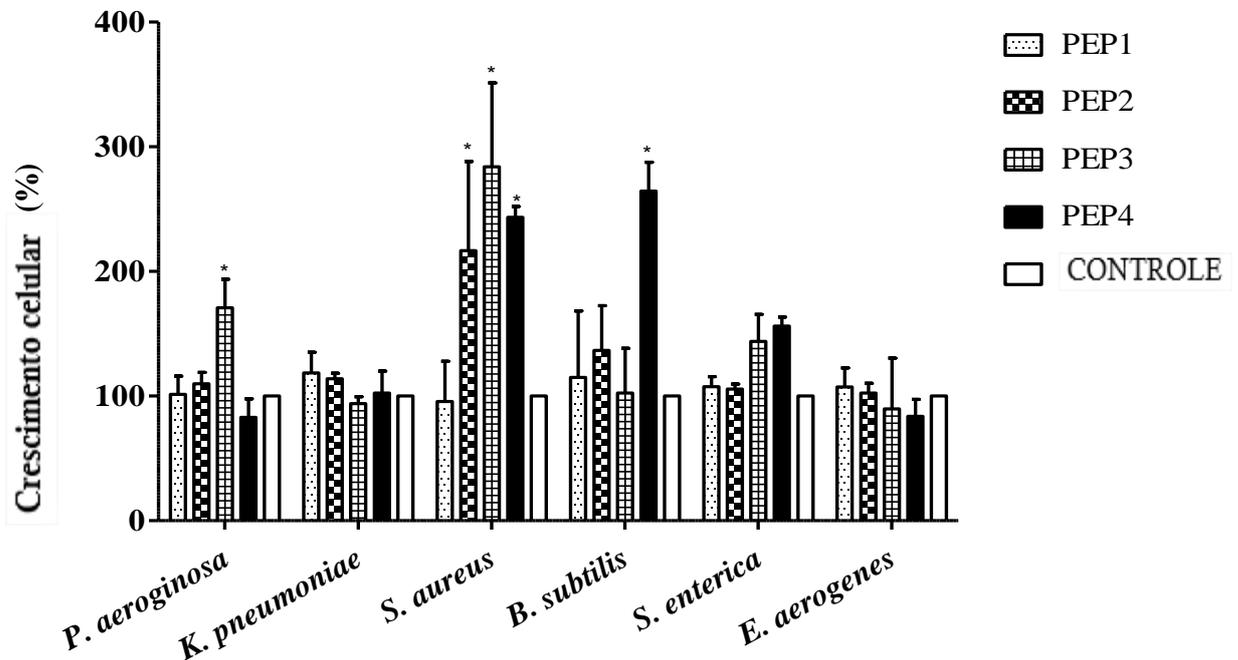
Fonte: Elaborada pelo autor. Análise estatística foi realizada usando ANOVA e o teste de Bonferroni posttests foi utilizado para a suscetibilidade antifúngica testada nos experimentos. *Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

Figura 06. Efeito dos peptídeos sintéticos PEP1, PEP2, PEP3 e PEP4 sobre *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Análise estatística foi realizada usando ANOVA e o teste de Bonferroni posttests foi utilizado para a suscetibilidade antifúngica testada nos experimentos. *Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

Figura 07. Atividade inibitória do crescimento celular bacteriano induzida pelos peptídeos PEP1, PEP2, PEP3, e PEP4.

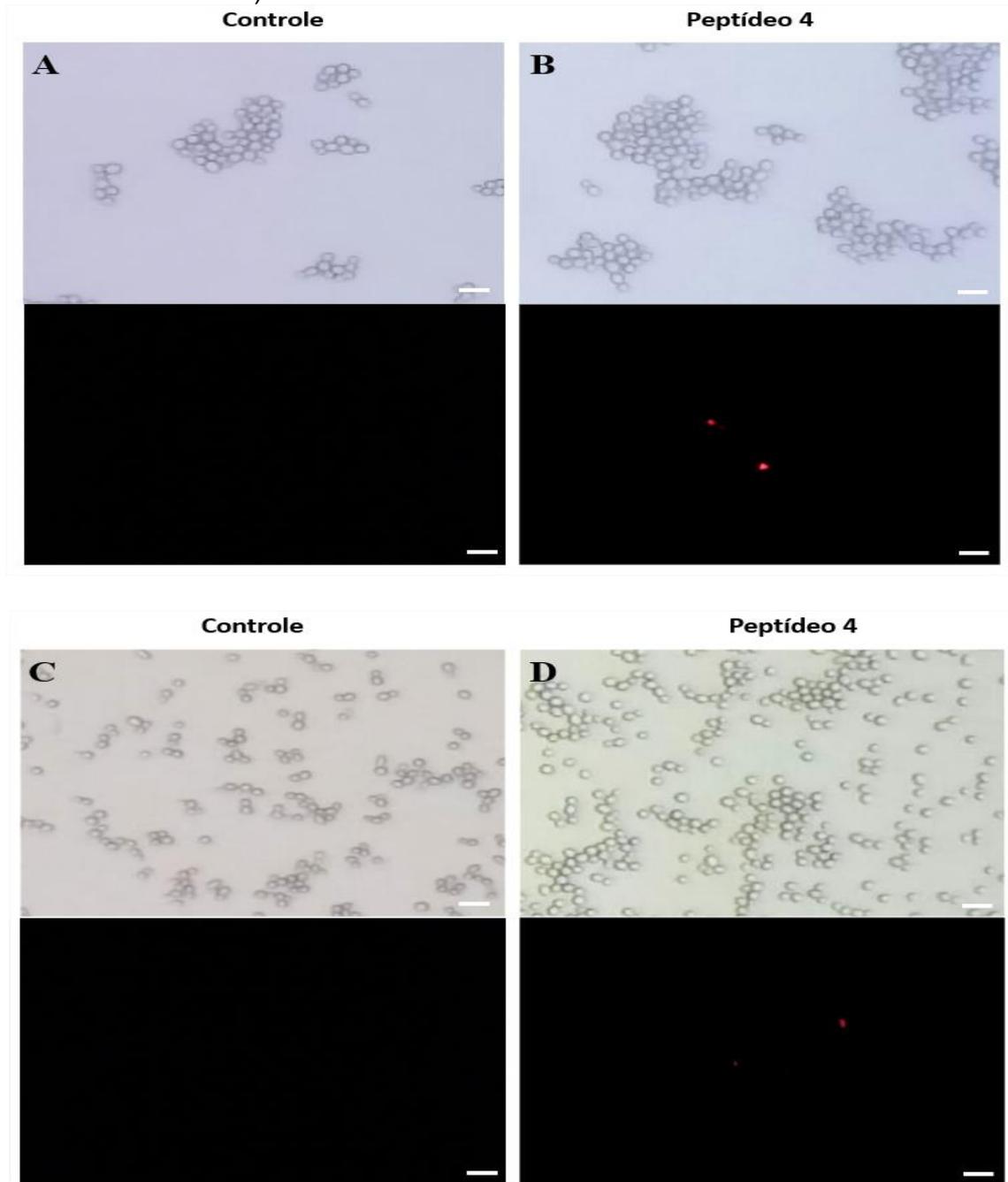


Fonte: Elaborada pelo autor. Análise estatística foi realizada usando ANOVA e o teste de Bonferroni posttests foi utilizado para a suscetibilidade antibacteriana testada nos experimentos. *Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

O peptídeo 4 (CAADIVGQCPAKLK) foi derivado da sequência de taumatina *Thaumatococcus daniellii*, que não possui atividade antifúngica descrita na literatura. Este é o primeiro relato de um peptídeo antifúngico derivado da sequência da taumatina de *Thaumatococcus daniellii*. Como a atividade antifúngica foi semelhante entre os peptídeos PEP4 (CAADIVGQCPAKLK) e PEP2 (CPRALKVPGGCN) contra *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (figura 6), o primeiro peptídeo foi escolhido para os ensaios posteriores de mecanismo de ação por apresentar maior potencial de inibição.

A integridade da membrana, avaliada pelo teste de iodeto de propídio, não foi afetada pelo peptídeo CAADIVGQCPAKLK. Observou-se (figura 8), que as poucas células suscetíveis ao iodeto de propídio pode ser indicativo da morte delas durante os experimentos, mas isso representou menos de 1% de todas as células.

Figura 08. Integridade da membrana celular de *Candida albicans* (A, B) e *Saccharomyces cerevisiae* (C, D) depois da incubação com o peptídeo sintético (CAADIVGQCPLK).

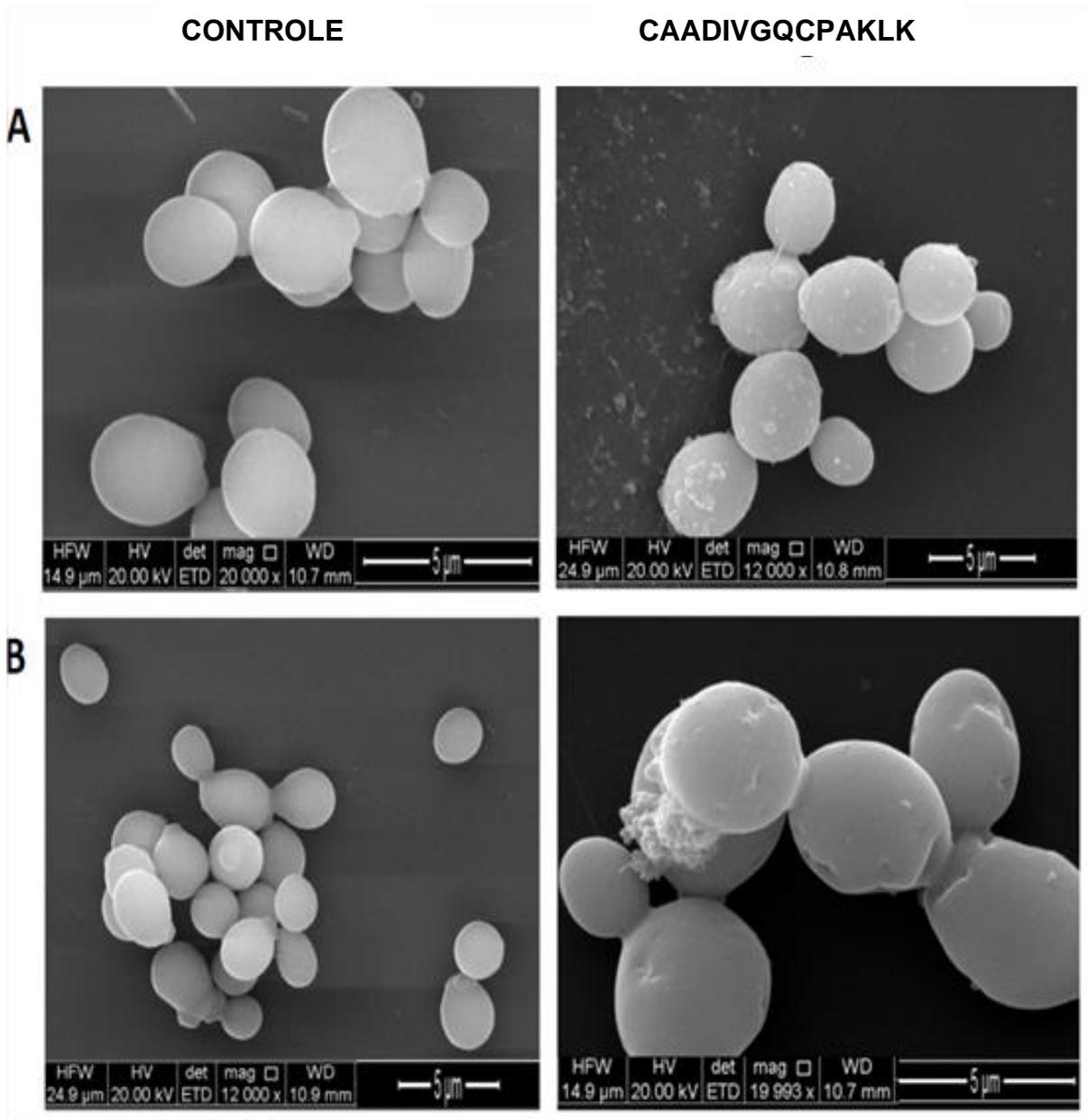


Fonte: elaborada pelo autor. A integridade foi examinada usando o fluoróforo iodeto de propídio (fluorescência em vermelho). Peptídeo (62.5 μ M) foi incubado com cada levedura por 24 h à 37° C. Controle: 0.15 M NaCl contendo 5% DMSO. Barra: 10 μ m.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) evidenciou que as células estavam intactas após a incubação com o peptídeo CAADIVGQCPAKLK, confirmando os ensaios de iodeto de propídio. Como pode ser visto na Figura 9, as células de *C. albicans* tratadas mostraram uma superfície celular homogênea e lisa semelhante às células não tratadas com a amostra. Da mesma forma, células de *S. cerevisiae* também apresentaram superfície homogênea.

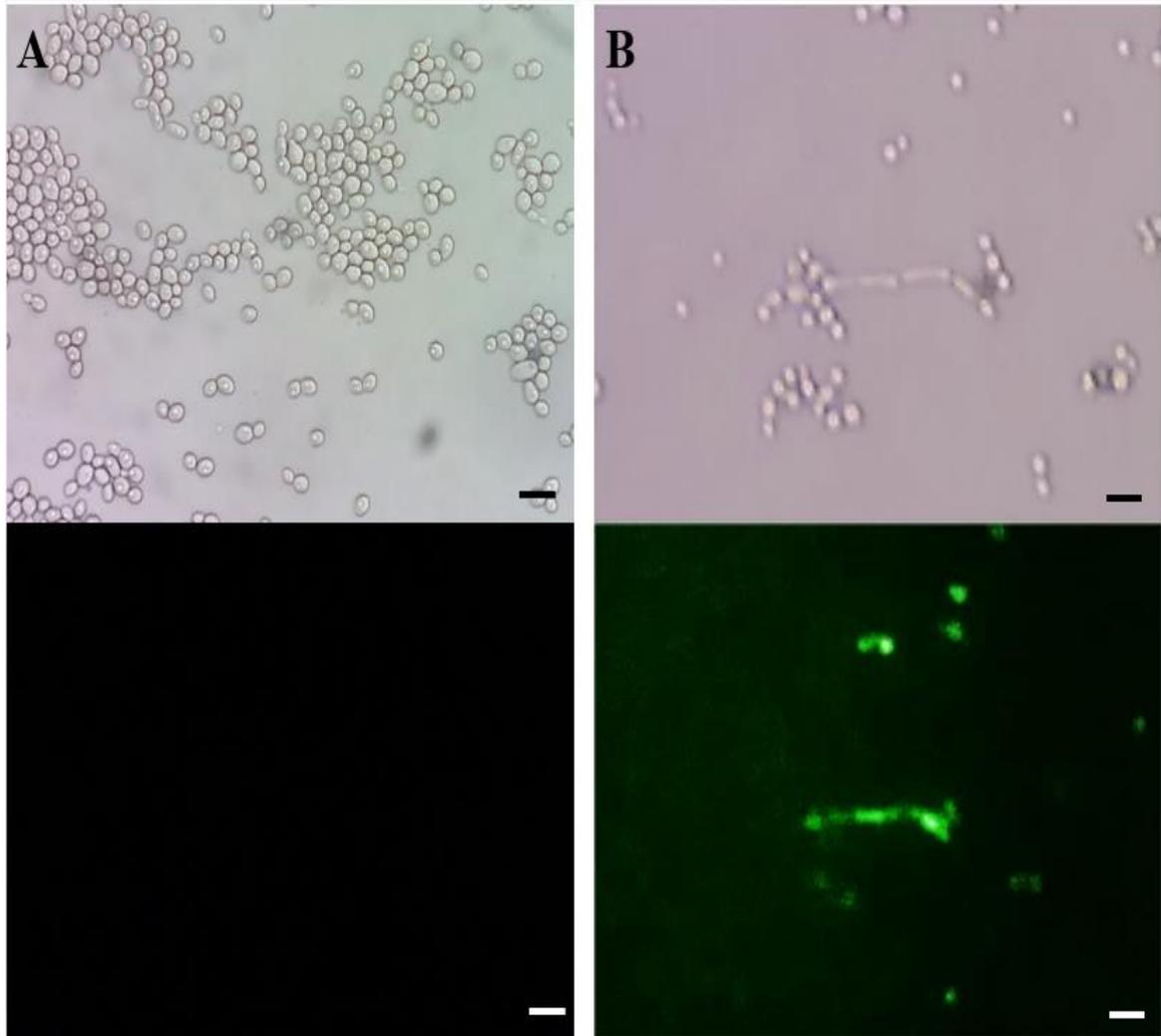
A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada usando DCFDA e indicou que nas células incubadas com o peptídeo CAADIVGQCPAKLK a produção de ROS foi induzida (Figura 10). De acordo com LI (2011), o composto difunde para as células, onde é hidrolisado em 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF₂H) por esterases e se acumula em células viáveis. A Figura 10b mostra que o nível de ROS aumentou consideravelmente em células de *Candida albicans* tratadas com peptídeo em comparação com as células não tratadas.

Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura da superfície celular de *Candida albicans* (A) e *Saccharomyces cerevisiae* (B).



Fonte: dados do próprio autor. Integridade avaliada por microscopia eletrônica de varredura depois da incubação com peptídeo sintético PEP 4 (CAADIVGQCPAKLK). Peptídeo (62,5 μM) foi incubado com cada levedura por 24 h à 37°C. Controle: NaCl 0.15 M contendo 5% de DMSO.

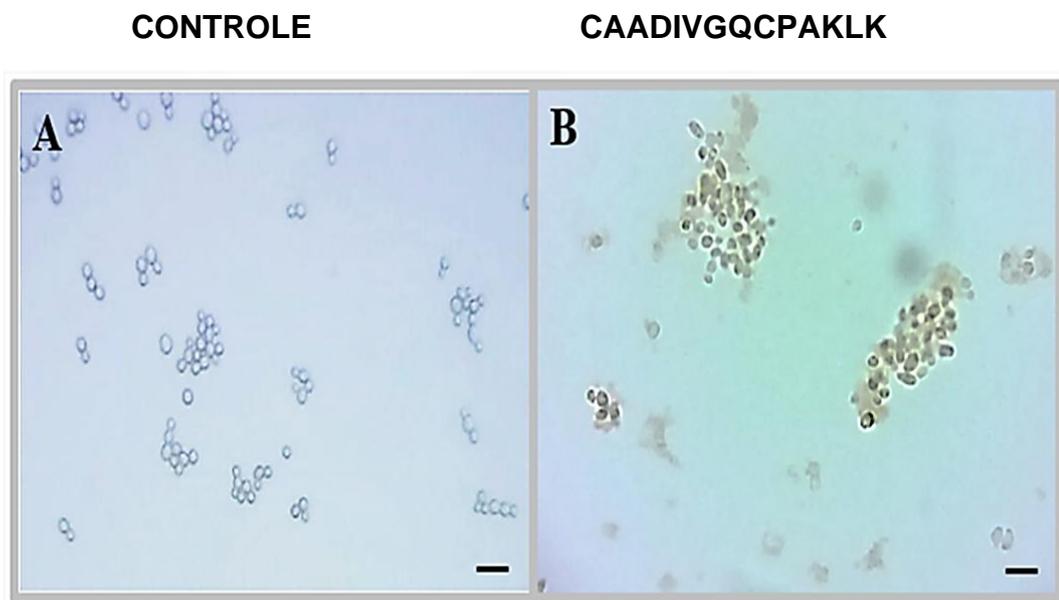
Figura 10. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de *Candida albicans*, usando o método de fluorescência DCFDA. Controle: 0.15 M NaCl contendo 5% DMSO (A) e peptídeo 4 incubado com células de *Candida* (B).



Fonte: dados do próprio autor. Peptídeos (62,5 μ M) foram incubados com as leveduras por 24 h à 37 °C. Controle: NaCl 0.15 M contendo 5% DMSO. Barra: 10 μ m.

Os ensaios TUNEL também foram realizados para confirmar se a indução da produção de ROS poderia induzir a apoptose e conseqüentemente a morte celular de *Candida albicans* (figura 11). Assim, células de *C. albicans* tratadas com peptídeo CAADIVGQCPAKLK apresentaram uma coloração escura indicando que ocorreu a indução de apoptose, quando comparada com as células controle.

Figura 11. Detecção de apoptose em células de *Candida albicans* tratadas com o peptídeo CAADIVGQCPAKLK, avaliadas pelo ensaio colorimétrico TUNEL.



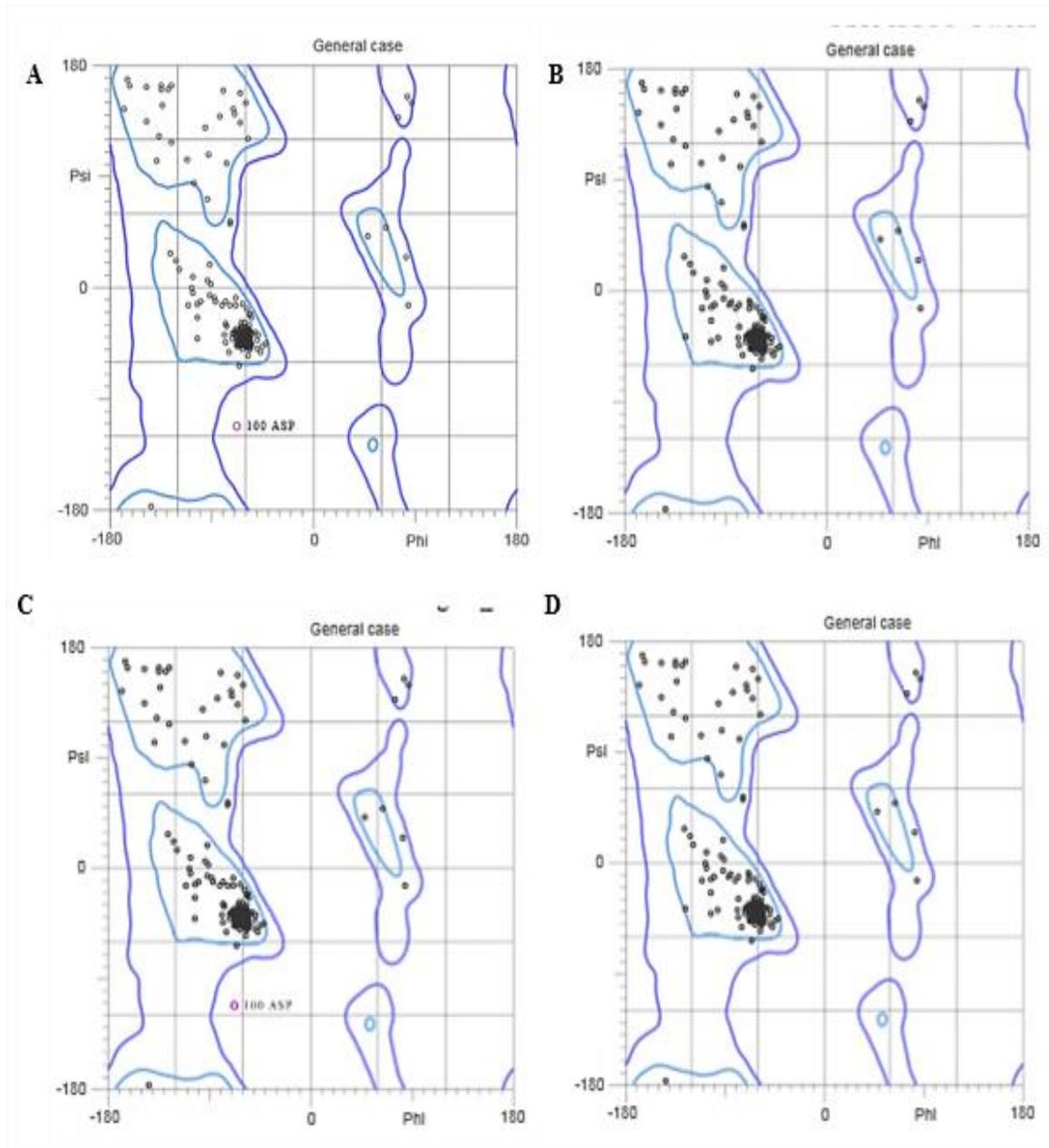
Fonte: elaborada pelo autor. Peptídeos na concentração de 62.5 µM foi incubado com a levedura por 24 h à 37 °C. Controle: NaCl 0.15 M contendo 5% DMSO. Barra: 10 µm.

5.3 Ensaios de bioinformática

Os resultados da anotação gênica mostraram duas regiões gênicas do genoma de *Candida albicans* correspondente ao receptor PHO36 (cromossomos 1 e 6). As sequências genômicas dos cromossomos 1 e 6 traduzidas em aminoácidos pela ferramenta do servidor *ExPASy* mostraram duas seqüências de proteínas com 324 e 616 aminoácidos, respectivamente. A sequência protéica com 324 aminoácidos foi escolhida para realizar ensaios posteriores (modelagem molecular e docking molecular) por corresponder ao homólogo do receptor PHO36 pela quantidade de aminoácidos, peso molecular e por 99% de identidade com o receptor de *Candida albicans* PAQR.

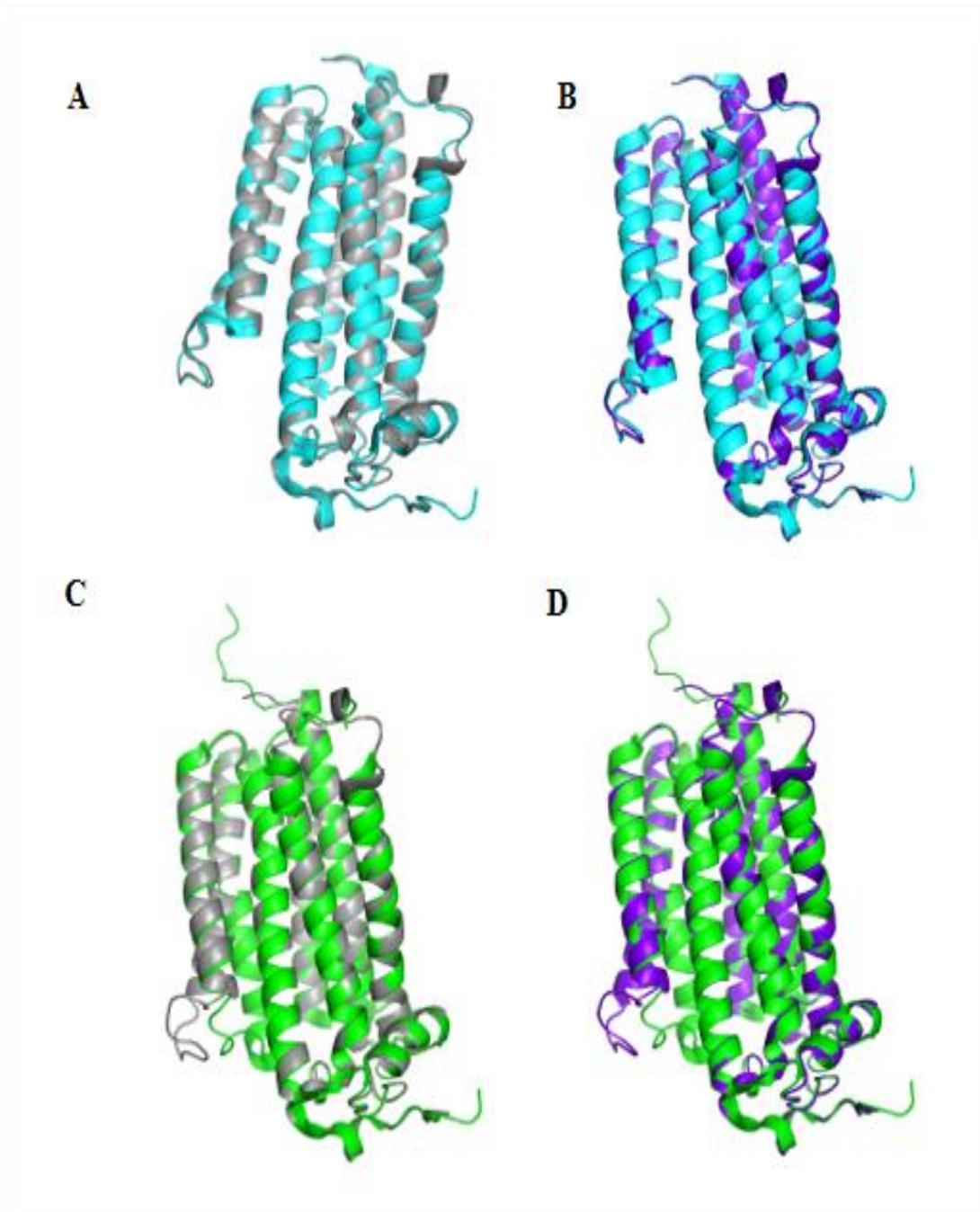
A modelagem molecular dos receptores foi realizada utilizando os servidores *GalaxyWEB* e *SWISS-MODEL*. Os *templates* 5LXG e 3WXV, que correspondem aos cristais do receptor de adiponectina foram selecionados. Os modelos gerados foram validados pelo servidor *MolProbity* para verificar a localização dos resíduos de aminoácidos no *plot* de *Ramachandran*. A partir do modelo gerado pelo servidor *GalaxyWEB*, 4 resíduos estavam fora da região permitida. No entanto, o modelo gerado pelo *SWISS-MODEL* apresentou apenas 2 resíduos (asparagina e prolina), fora da região permitida (figura 12). Portanto, o modelo gerado pelo servidor *Swiss-Model* foi escolhido para executar ensaios de docking molecular. Os resíduos fora das regiões permitidas tiveram os seus ângulos ajustados usando o programa de cristalografia *WinCoot*. A figura 13 demonstra a similaridade existente entre os modelos refinados de PHO36 e os cristais de adipor1 (figura 13).

Figura 12. Gráfico de *Ramachandran* dos modelos tridimensionais dos receptores PHO36.



Fonte: elaborada pelo autor. Gráficos antes do ajuste dos ângulos (esquerda) e depois do ajuste (direita) obtidos das sequências dos receptores de *S. cerevisiae* (A,B) e seu homólogo em *C. albicans* (C,D).

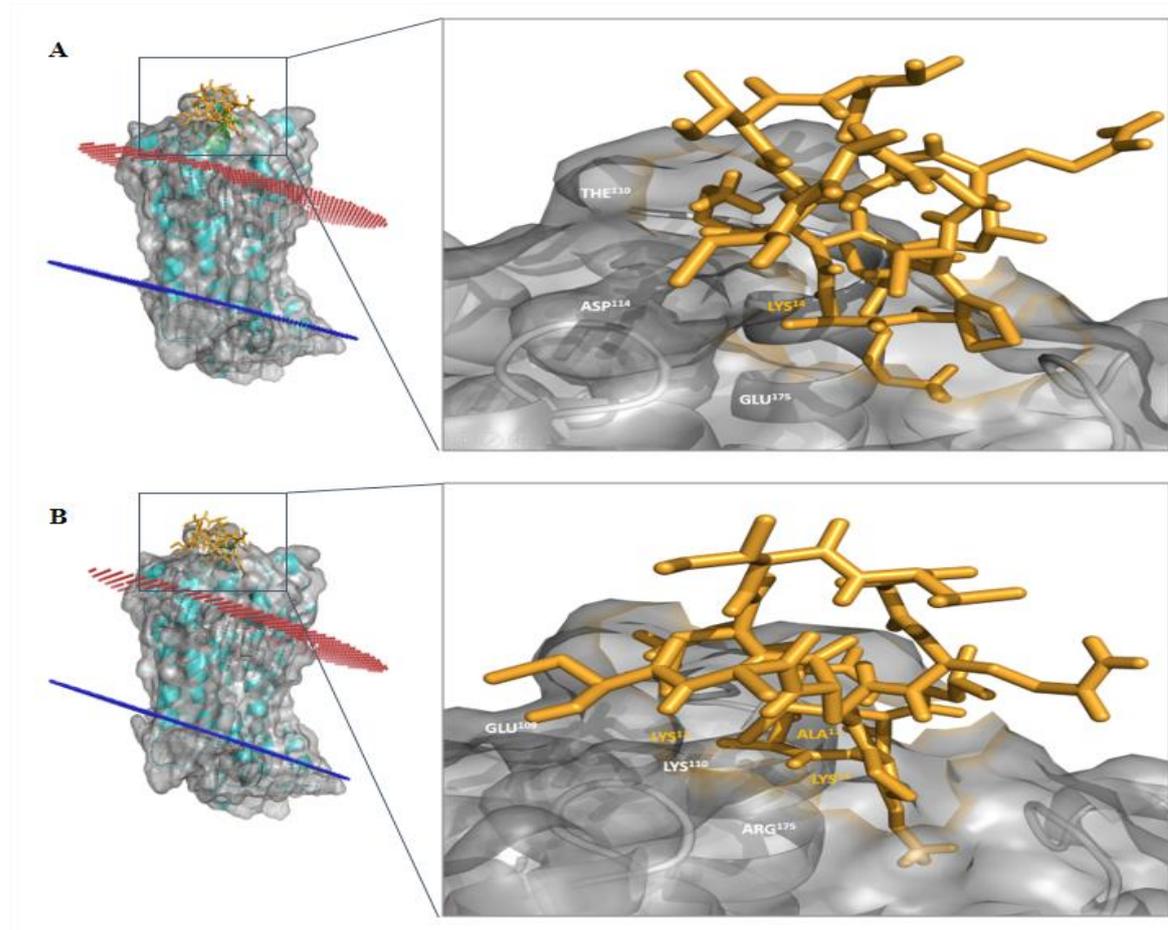
Figura 13. Sobreposição dos modelos tridimensionais dos receptores PHO36 gerados pelo *SWISS-MODEL* e os template 5LXG e 3WXV.



Fonte: dados do próprio autor. Sobreposição dos modelos foi realizada pelo *pymol*. 5LXG e PHO36 (A); 5LXG e PHO36/homólogo (B); 3WXV e PHO36 (C) e 3WXV e PHO36/homólogo (D).

O Servidor *Web ClusPro 2.0* e *HADDOCK 2.2* apresentaram local de regiões de interação similares em ambos os receptores (figura 14). A energia de *van der waals* ($-21,1 \pm 1,9$), *energia eletrostática* ($-123,5 \pm 25,5$), *energia de desolvatação* ($-34,2 \pm 4,4$) e *Z-score* de $-1,2$, mostraram que PEP4 (CAADIVGQC PAK LK) interage positivamente com o receptor de *S. cerevisiae* PHO36. PEP4 liga-se ao receptor PHO36 de *C. albicans* com energia de *van der waals* ($-32,6 \pm 4,1$), energia eletrostática ($-118,0 \pm 28,6$), energia de desolvatação ($-15,4 \pm 9,9$) e *Z-score* ($-0,5$) de forma semelhante.

Figura 14. Docking de interação molecular entre o peptídeo CAADIVGQC PAK LK (laranja) e a região extracelular do receptor PHO36 de *Saccharomyces cerevisiae* (A,B) e seu homólogo em *Candida albicans* (C,D) (representação em superfície).

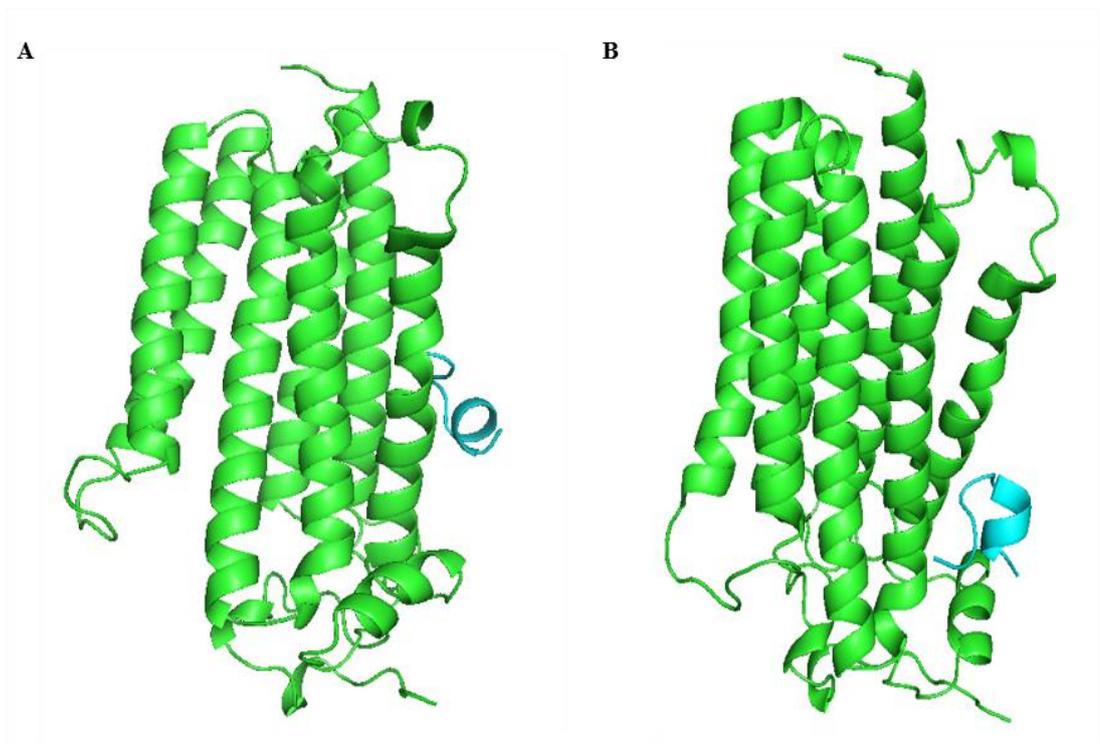


Fonte: elaborada pelo autor. O ensaio de docking molecular foi realizado utilizando o servidores *ClusPro* e *Haddock 2.0*. Em destaque resíduos expostos dos receptores (cinza) e PEP4 (laranja) que participam da formação de pontes de hidrogênio e pontes salinas.

Os ensaios de docking molecular mostraram que o peptídeo CAADIVGQCPAKLK interage fortemente com PHO36 (44 interações com o receptor em *S. cerevisiae* e 51 em *C. albicans*). PEP4 liga-se ao receptor PHO36 em *S. cerevisiae* por 3 ligações de hidrogênio e 1 ponte de sal. Da mesma forma, ele se liga ao receptor PHO36 em *C. albicans* através de 4 ligações de hidrogênio e 1 ponte de sal (tabela 6), e por isto, possui uma interação bem mais forte.

Como relatado anteriormente, o servidor *ClusPro 2.0* e *HADDOCK 2.2* apresentaram região de interação similar em ambos os receptores. No entanto, para o nosso sistema proteína-peptídeo, o programa *AutoDockVina* não foi eficaz, uma vez que, mesmo especificando uma grade que envolvia toda a região extracelular, PEP 4 interagiu com a região do receptor localizada na bicamada fosfolipídica. Mesmo após o balanceamento dos coeficientes hidrofóbicos, eletrostáticos e VEC + Elec, o PEP3 (IVGQCPAKLKA) não interagiu com a região extracelular dos receptores (figura 15).

Figura 15. Interação do peptídeo 3 (IVGQCPAKLKA) com o receptor PHO36 em *S. cerevisiae* (A) e *C. albicans* (B).



Fonte: dados do próprio autor. Docking de interação molecular realizado pelo *ClusPro 2.0*. Imagens geradas pelo programa Pymol.

Tabela 06. Resíduos de interação que formam pontes de hidrogênio e pontes salinas (negrito) entre PHO36 e PEP4 em *S. cerevisiae* e *C. Albicans*.

PHO36 em <i>S. cerevisiae</i>		CAADIVGQCPAKLK		
<i>Resíduo</i>	<i>Nome do átomo</i>	<i>Resíduo</i>	<i>Nome do átomo</i>	<i>Distancia (Å)</i>
THR 110	OG1	LYS 14	NZ	2.80
ASP 114	OD2	LYS 14	NZ	2.87
GLU 175	O	LYS 14	NZ	3.24
ASP 114	OD1	LYS 14	OD1	2.87
PHO36 em <i>C. albicans</i>		CAADIVGQCPAKLK		
<i>Resíduo</i>	<i>Nome do átomo</i>	<i>Resíduo</i>	<i>Nome do átomo</i>	<i>Distancia</i>
GLU 109	OE2	LYS 14	NZ	2.64
LYS 110	NZ	ALA 11	O	2.66
ARG 175	NZ	LYS 14	O	2.88
LYS 110	NH1	LYS 12	O	2.95
GLU 109	OE1	LYS 14	NZ	2.64

Fonte: elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A disseminação de patógenos resistentes como algumas espécies de fungos e bactérias tornou-se uma preocupação crescente para a saúde pública global e para a agricultura. Recentemente, foram procurados substitutos eficientes para combater infecções causadas por esses microorganismos (LIRA *et al.*, 2013). Atualmente, há uma ampla gama de medicamentos antifúngicos e antibacterianos disponíveis, no entanto, o tratamento de pacientes com infecções fúngicas e bacterianas ainda é um enorme desafio (DE BRUCKER, 2016). Também existe uma grande demanda por novos agentes antimicrobianos, devido à crescente resistência destes microrganismos contra os produtos sintéticos.

Diversos trabalhos evidenciam que OLPs e TLPs são proteínas capazes de inibir o crescimento de vários agentes patogênicos *in vitro* (HE *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2015; RAMOS *et al.*, 2015; MONTEIRO, 2003). Outros estudos destacam-se ao comprovar que essas proteínas podem ser utilizadas para melhorar a resistência das culturas, atuando como agentes contra fitopatógenos e na preservação de alimentos na indústria (VIKTOROVA, 2017a; VIKTOROVA *et al.*, 2012b).

Viktorova *et al.* (2012) apresentaram uma árvore filogenética com 40 sequências de aminoácidos que codificam a proteína osmotina de diferentes espécies de plantas. Existem 4 grandes *clusters* baseados em suas similaridades nas sequências de aminoácidos, e a análise de seus sítios ativos mostra que 14 membros compartilham exatamente o mesmo sítio ativo composto pela sequência CTQGPCGPT. Um segundo grupo de osmotinas que contém 3 membros da ordem *Brassicales*, partilham também sequências de aminoácidos semelhantes e, além disso, o mesmo sítio ativo composto por CTNGQGSCSDT.

Em um estudo realizado por Miele, Costantine e Colonna (2011), os autores demonstraram que uma região estrutural da osmotina de tabaco, representada por um peptídeo de nove aminoácidos (CTQGPCGPT), era capaz de mimetizar efeitos do hormônio adiponectina, homólogo do receptor PHO36. Uma osmotina-like do cacau (TcOsm1) mostrou atividade antifúngica contra *Pichia pastoris* e contra o mais importante patógeno do cacau, *Moniliophthora perniciosa* (FALCÃO *et al.*, 2016). Conforme relatado na literatura (DA CUNHA 2017; MANDAL *et al.*, 2013; DELATTIN, 2017), candidatos antifúngicos promissores são novos peptídeos antimicrobianos

isolados de proteínas vegetais que induzem a morte celular programada (apoptose) (DE BRUCKER, 2016; AERTS, *et al.*, 2007; HIGUCHI, *et al.*, 2016).

A abordagem inicial *in silico* para obter peptídeos antimicrobianos (GUPTA *et al.*, 2013) a partir de seqüências proteicas minimiza o gasto com reagentes e proteases, tornando-se um método eficiente e econômico para prever a seqüência de AMPs e permitindo otimizar os recursos. Existem várias bases de dados que prevêm peptídeos antimicrobianos como APD3 (WANG; LI; WANG, 2015), CAMP (THOMAS *et al.*, 2009), AntiBP2 (LATA; MISHRA; RAGHAVA, 2010) e outros.

Dessa forma, a predição estrutural de uma proteína por métodos computacionais, a determinação de sítios funcionais, docking e ensaios de dinâmica molecular, realizados *in silico*, são extremamente importantes para proporcionar uma melhor definição das famílias as quais pertencem tais moléculas, para a compreensão de seu mecanismo de ação, buscando sempre alta especificidade e baixa toxicidade (DA SILVA, 2007). A análise da região com maior probabilidade de ter atividade antimicrobiana foi realizada utilizando a base de dados APD3 (WANG; LI; WANG, 2015) e C-PamP (NIARCHOU, *et al.*, 2013).

O banco de dados de predição de peptídeos antimicrobianos C-PAmP calcula os AMPs de proteínas vegetais, exibindo possíveis regiões da proteína com maior probabilidade de possuir seqüências com potencial antimicrobiano. Esta base de dados contém 15.174.905 peptídeos entre 5-100 aminoácidos de comprimento e os peptídeos antimicrobianos são derivados de 33.877 proteínas de 2.112 espécies de plantas (NIARCHOU *et al.*, 2013).

Os peptídeos antibacterianos preditos *in silico* (Colossomin-C e Colossomin-D) inibiram o crescimento celular de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* a uma concentração de 5 µg/mL (LIRA *et al.*, 2013). Pesquisas recentes (FARKAS, 2017) mostraram que os peptídeos antimicrobianos (NCR247 e NCR335) derivados do genoma *Medicago truncatula* aumentam a permeabilidade da membrana celular em *Salmonella enterica* (MIC = 32 e 16 µM) e *L. monocytogenes* (MIC = 128 e 32 µM).

PEP4 na concentração de 65 µM não inibiu o crescimento bacteriano. No entanto, inibiu o crescimento celular de *S. cerevisiae* e *C. albicans*, demonstrando especificidade para leveduras. Usando uma abordagem *in silico*, dois peptídeos de osmotina de *Theobroma cacao* denominados de Osm-pepA e Osm-pepB mostraram atividade contra *S. cerevisiae* com MIC = 20 µM e MIC = 127 µM, respectivamente, e

inibiu a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *Fusarium sp.* e *Colletotrichum gossypi* (FALCÃO, 2016).

Dois novos peptídeos sintéticos derivados de uma proteína de *Ascomycetes* mostraram sinergia positiva quando combinados contra *P. digitatum* (GARRIGUES, 2017). O peptídeo CAADIVGQCPAKLK na concentração de 65 μ M não inibiu o crescimento vegetativo e a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*.

Os peptídeos CPRALKVPGGCN e CAADIVGQCPAKLK apresentaram atividade contra *C. albicans* e *S. cerevisiae*. O peptídeo CAADIVGQCPAKLK foi selecionado como tendo atividade inibitória mais significativa (aproximadamente 40%) e por isso utilizamos para estudar o mecanismo de ação. Os peptídeos foram preditos seguindo alguns parâmetros, como taxa total de hidrofobicidade, carga líquida total positiva (HANCOCK, 1999), massa molecular baixa, índice de Boman (BOMAN, 2003). Juntos, esses parâmetros prevêm a melhor interação entre o peptídeo e a membrana plasmática microbiana.

Neste contexto, a primeira interação entre o peptídeo e a membrana plasmática microbiana ocorre devido a diferença de cargas; portanto, os peptídeos catiônicos (HANCOCK, 1999) são considerados as melhores moléculas para interagir com a membrana plasmática. Posteriormente, a taxa total de hidrofobicidade é um dos parâmetros mais significativos, pois o peptídeo, ao penetrar a membrana plasmática, forma uma hélice e, logo, precisa ser altamente hidrofóbico. O índice Boman estima o potencial de uma proteína para se ligar a outras proteínas (BOMAN, 2003).

A modelagem por homologia tem um maior grau de confiabilidade quando existe uma relação evolutiva entre a sequência alvo da proteína em análise e as estruturas já armazenadas e disponíveis nos bancos de dados. Adipor1 e PHO36 pertencem a uma família multigênica, possuindo antigas raízes evolutivas com homólogos encontrados em eubactérias. Nos organismos procarióticos, esses genes codificam proteínas similares a hemolisina e em eucariotos codificam proteínas PAQR funcionais com uma ampla gama de especificidades (TANG, 2005).

Através de pesquisas extensas no banco de dados para busca de estruturas resolvidas por difração de raios X (RSCB-PDB *Protein Data Bank*), observou-se que o cristal Adipor1 (homólogo do PHO36) foi revisado (VASILIAUSKAITÉ-BROOKS *et*

al., 2017). Os receptores foram modelados a partir das estruturas dos cristais de Adipor1 (5LXG e 5WXV). Curiosamente, a estrutura do cristal se sobrepõe inteiramente aos modelos gerados pelo *SWISS-MODEL*, especialmente a região extracelular.

Essa sobreposição foi alcançada depois que os ângulos dos modelos foram ajustados pelo *Wincoot* e refinados pelo *GalaxyWEB*. Ambos os complexos (gerados por estudos de docking) foram analisados em termos de energia de interface (Energia de *Van der Waals*, energia eletrostática e energia de solvatação) e interação entre resíduos de superfície. Os resultados das energias de interação e o *score HADDOCK* de $-78,7 \pm 3,1$ para o complexo PEP4 / PHO36 em *S. cerevisiae* e $-50,8 \pm 3,8$ para PEP4 / PHO36 em *C. albicans*, demonstram que PEP4 tem alta afinidade pelo receptor PHO36.

PEP4 liga-se ao receptor PHO36 em *S. cerevisiae* por 3 ligações de hidrogênio e 1 ponte de sal. De forma similar, PEP4 liga-se ao PHO36 de *C. albicans* através de 4 ligações de hidrogênio e 1 ponte de sal demonstrando que os receptores têm uma excelente afinidade para os ligantes. Lys, que é um aminoácido carregado positivamente, foi considerado um resíduo chave na interação do peptídeo CAADIVGQCPAKLK, pois está envolvido na maioria das interações peptídicas deste e de outros trabalhos descritos na literatura (MIELE; COSTATINE e COLONA *et al.*, 2011). Estruturalmente, o CAADIVGQCPAKLK possui dois resíduos de cisteína, mas não possui ponte de dissulfeto, ao contrário do peptídeo de 9 aminoácidos bastante rígido descrito por Miele *et al.*, (2011).

A ligação de PEP4 ao receptor PHO36 (Figura 6) na membrana celular de *Candida albicans* provoca maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e induz a morte celular programada (apoptose). O peptídeo antifúngico de *Raphanus sativus* induz a produção de espécies reativas em células de *Candida albicans* ocasionando a morte celular programada (AERTS *et al.*, 2007). A osmotina NP24 desencadeia morte celular programada dependente da caspase em *S. cerevisiae* (HIGUCHI, 2016).

De acordo com Gourlay (2006), a via de sinalização da apoptose em leveduras é iniciada pela ativação incorreta da via RAS. A ativação incorreta da via pode ser ocasionada pelo tratamento das leveduras com proteínas antifúngicas, por exemplo, osmotina e taumatina, que se ligam aos receptores da família AdipoQ, como PHO36 e Adipor1.

Em leveduras, a morte celular programada pode ocorrer por vários mecanismos diferentes, que deram origem a várias terminologias distintas, como apoptose dependente de caspase, PCP-apoptose, necrose, morte celular autofágica, entre outros (GRUHLKE *et al.*, 2010). A apoptose de levedura foi observada em uma estirpe que continha uma mutação no gene da ATPase CDC48 e que mostra marcadores de morte celular programada observados em eucariontes. Esses marcadores indicam que a célula está em fase final como produção de espécies reativas de oxigênio, fragmentação de DNA e condensação de cromatina (GOURLAY, 2006).

A indução de apoptose por PEP4 foi identificada pelo ensaio TUNEL, que é um teste amplamente utilizado para identificar e quantificar células apoptóticas. O ensaio baseia-se no uso da desoxinucleotidil transferase terminal (TdT), uma enzima que catalisa a ligação de desoxinucleotídeos marcados com um fluorocromo ou outro marcador das extremidades 3'-hidroxila do DNA ao DNA fragmentado.

Não foi encontrada nenhuma identidade entre os peptídeos PEP1, PEP2, PEP3 e PEP4 relatados neste trabalho com outros peptídeos descritos na literatura. Dentre estes peptídeos, dois foram derivados da sequência da taumatina de *Thaumatococcus daniellii*, que não possui atividade antifúngica comprovada na literatura. Este é o primeiro relato na literatura de um peptídeo antifúngico derivado da sequência da taumatina de *Thaumatococcus daniellii*.

Portanto, os resultados indicam que o peptídeo CAADIVGQCCKL por ser facilmente sintetizado e a baixo custo, poderá ser utilizado como candidato futuro para o desenvolvimento de um medicamento antimicrobiano específico contra o patógeno *C. albicans*, que pode causar candidíase oral ou vaginal até infecções sistêmicas graves.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o peptídeo CAADIVGQCPAKLK induziu a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que levaram a morte celular programada (apoptose) em células de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. A morfologia das células de *Candida* e *Saccharomyces* sugere que a superfície celular estava intacta, evidenciando que a inibição ocorreu por meio de interação com receptor não ocasionando danos à parede celular e membrana plasmática.

Os ensaios utilizando Iodeto de Propídio, SEM, DCFDA, TUNEL e ensaios de *docking* molecular sugerem que PEP4 ocasiona a morte celular programada em *S. cerevisiae* e *C. albicans* ao se ligar ao receptor PHO36. Os resultados indicam que osmotinas e taumatinas, assim como peptídeos derivados estudados neste trabalho, são candidatos futuros para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas contra *Candida albicans*. O uso de bancos de dados como o *C-PamP* é essencial para a predição de novos peptídeos antimicrobianos. Portanto, apesar de existir uma ampla disponibilidade de várias classes de medicamentos antifúngicos no mercado mundial, o tratamento de pacientes com infecções fúngicas ainda é um desafio considerável.

REFERÊNCIAS

AGEITOS, J. M. et al. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. **Biochemical pharmacology**, 2016.

AGRAWAL, Anurag A. Induced plant defense: evolution of induction and adaptive phenotypic plasticity. Inducible plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology, and agriculture. **American Phytopathological Society Press**, St. Paul, MN, p. 251-268, 1999.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**. n. 215, p. 403–410, 1990.

AGHAZADEH, Rustam et al. Agrobacterium-mediated Transformation of the *Oryza sativa* Thaumatin-like Protein to Canola (R line Hyola308) for Enhancing Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 201-207, 2017.

ABAD, Laura R. et al. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science**, v. 118, n. 1, p. 11-23, 1996.

ACEVEDO, Flor E. et al. Cues from chewing insects—the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 26, p. 80-86, 2015.

AERTS, An M. et al. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 243-247, 2007.

AHMED NU, et al. Molecular characterization of thaumatin family genes related to stresses in *Brassica rapa*. **SciHortic (Amsterdam)** 152:26–34. doi: 10.1016/j.scienta.2013.01.007. 2013.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of internal medicine**, v. 254, n. 3, p. 197-215, 2003.

BISHOP A,özlem tasta; TAP, de beer; JOUBERT F. Protein homology modelling and its use in South Africa. *S Afr J Sci* 104:2–6. 2008.

BHATTACHARJEE, et al. Molecular modelling, dynamics simulation and characterization of antifungal chitinase from *Sechium edule*. **Gene** 606: 39–46. 2017.

BOWMAN, Shaun M.; FREE, Stephen J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BROWN, Gordon D.; GORDON, Siamon. Immune recognition: a new receptor for β -glucans. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 36-37, 2001.

BIENERT, Stefan et al. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D313-D319, 2016.

BROEKAERT, Willem F. et al. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, n. 1-2, p. 55-59, 1990.

BIASINI, Marco et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W252-W258, 2014.

BERENS, Matthias L. et al. Evolution of hormone signaling networks in plant defense. **Annual review of phytopathology**, v. 55, n. 1, 2017.

COMEAU, Stephen R. et al. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. **Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 45-50, 2004.

CAMPOS, M.D. et al. Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. **Microb. Cell Fact.** 7: 7-17. 2008.

CHEN, Ming-Shun. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. **Insect science**, v. 15, n. 2, p. 101-114, 2008.

CHENG, Xiaoyan; ZHU, Lili; HE, Guangcun. Towards understanding of molecular interactions between rice and the brown planthopper. **Molecular plant**, v. 6, n. 3, p. 621-634, 2013.

CARMONA-GUTIERREZ, D. et al. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. **Cell death and differentiation**, v. 17, n. 5, p. 763, 2010.

DALEN, Lars Sandved et al. Freezing tolerance in Norway spruce, the potential role of pathogenesis-related proteins. **Acta physiologiae plantarum**, v. 37, n. 1, p. 1717, 2015.

DA SILVA, Vinicius B. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, 2007.

DE VRIES, Sjoerd J.; VAN DIJK, Marc; BONVIN, Alexandre MJJ. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. **Nature protocols**, v. 5, n. 5, p. 883, 2010.

DE BRUCKER, Katrijn; CAMMUE, Bruno PA; THEVISSSEN, Karin. Apoptosis-inducing antifungal peptides and proteins. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1527-1532, 2011. Disponível em: <http://www.biochemsoctrans.org/content/39/>. Acessos em 18 de abril de 2016.

DELATTIN, Nicolas et al. Antimicrobial peptides as a strategy to combat fungal biofilms. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 17, n. 5, p. 604-612, 2017.

DA CUNHA, Nicolau B. et al. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. **Drug discovery today**, v. 22, n. 2, p. 234-248, 2017.

DOS SANTOS SOARES, Alexandra Martins; MACHADO, Olga Lima Tavares. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 10, 2007.

DURAN-FLORES, Dalia; HEIL, Martin. Sources of specificity in plant damaged-self recognition. **Current opinion in plant biology**, v. 32, p. 77-87, 2016.

DE LORENZO, Giulia et al. Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). **FEBS letters**, v. 585, n. 11, p. 1521-1528, 2011.

ERBS, Gitte; NEWMAN, Mari-Anne. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 5, p. 421-425, 2003.

FREITAS, Cleverson DT et al. New constitutive latex osmotin-like proteins lacking antifungal activity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 45-52, 2015.

FREITAS, CleversonDiniz Teixeira et al. Osmotin purified from the latex of *Calotropisprocera*: biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 7, p. 738-743, 2011.

FERREIRA, Ricardo B. et al. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 677-700, 2007.

FALCAO, Loeni L. et al. Antimicrobial properties of two novel peptides derived from *Theobroma cacao* osmotin. **Peptides**, v. 79, p. 75-82, 2016.

FARKAS, Attila et al. Comparative analysis of the bacterial membrane disruption effect of two natural plant antimicrobial peptides. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

FESEL, Philipp H.; ZUCCARO, Alga. β -glucan: crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 90, p. 53-60, 2016.

FELIX, Georg et al. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **The Plant Journal**, v. 18, n. 3, p. 265-276, 1999.

FAN, Linlin et al. DRAMP: a comprehensive data repository of antimicrobial peptides. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

GARRIGUES, Sandra et al. Mapping and identification of antifungal peptides in the putative antifungal protein AfpB from the filamentous fungus *Penicillium digitatum*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

GUST, Andrea A. et al. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 44, p. 32338-32348, 2007.

GUPTA, Sudheer et al. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73957, 2013.

GILARDONI, Paola A. et al. *Nicotiana attenuata* LECTIN RECEPTOR KINASE1 suppresses the insect-mediated inhibition of induced defense responses during *Manduca sexta* herbivory. **The Plant Cell**, v. 23, n. 9, p. 3512-3532, 2011.

GRUHLKE, Martin CH et al. Allicin disrupts the cell's electrochemical potential and induces apoptosis in yeast. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 12, p. 1916-1924, 2010.

GAVRIELI, Yael; SHERMAN, Yoav; BEN-SASSON, Shmuel A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **The Journal of cell biology**, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.

GUO, Jun et al. Expression of the LePR5 gene from cherry tomato fruit induced by *Cryptococcus laurentii* and the analysis of LePR5 protein antifungal activity. **Postharvest Biology and Technology**, v. 111, p. 337-344, 2016.

GOURLAY, Campbell W.; DU, Wei; AYSCOUGH, Kathryn R. Apoptosis in yeast—mechanisms and benefits to a unicellular organism. **Molecular microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1515-1521, 2006.

GHOSH, R.; CHAKRABARTI, C. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. **Planta**. 228: 883–890. 2008.

GUST, Andrea A. et al. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 44, p. 32338-32348, 2007.

HANCOCK, Robert EW; CHAPPLE, Daniel S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1317-1323, 1999.

HUFFAKER, Alisa; RYAN, Clarence A. Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 25, p. 10732-10736, 2007.

HIGUCHI, Naoki et al. NP24 induces apoptosis dependent on caspase-like activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 121, n. 6, p. 619-624, 2016.

HE, Rongrong et al. Overexpression of a thaumatin-like protein gene from *Vitis amurensis* improves downy mildew resistance in *Vitis vinifera* grapevine.

Protoplasma, v. 254, n. 4, p. 1579-1589, 2017.

HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. **Biochemical society transactions**, v. 30, n. 6, 2002.

HASSAN, M. et al. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. **Journal of applied microbiology**, v. 113, n. 4, p. 723-736, 2012.

HUFFAKER, Alisa; RYAN, Clarence A. Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 25, p. 10732-10736, 2007.

IYENGAR, Ramanuja B. et al. The complete amino-acid sequence of the sweet protein thaumatin I. **The FEBS Journal**, v. 96, n. 1, p. 193-204, 1979.

KUMAR, S. Anil et al. Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. **Frontiers in plant science**, v. 6, 2015.

KOIWA, Hisashi et al. Crystal structure of tobacco PR-5d protein at 1.8 Å resolution reveals a conserved acidic cleft structure in antifungal thaumatin-like proteins. **Journal of molecular biology**, v. 286, n. 4, p. 1137-1145, 1999.

KOIWA, Hisashi et al. Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein. **Plant and cell physiology**, v. 38, n. 7, p. 783-791, 1997.

KUMAR, R. BARANI; SURESH, M. XAVIER; PRIYA, B. SHANMUGA. Pharmacophore modeling, in silico screening, molecular docking and molecular dynamics approaches for potential alpha-delta bungarotoxin-4 inhibitors Discovery. **Pharmacognosy Magazine**. 11(42): S19-S28. 2015.

KOSIKOWSKA, Paulina; LESNER, Adam. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 26, n. 6, p. 689-702, 2016.

KOZAKOV, Dima et al. The ClusPro web server for protein-proteindocking. **Nature protocols**, v. 12, n. 2, p. 255-278, 2017.

KATO, Jungo; SVENSSON, Camilla I. Chapter Nine-Role of Extracellular Damage-Associated Molecular Pattern Molecules (DAMPs) as Mediators of Persistent Pain.

Progress in molecular biology and translational science, v. 131, p. 251-279, 2015.

LE, Thi Thuy Trang; WILLIAMS, Brett; MUNDREE, Sagadevan. An osmotin from the resurrection plant *Tripogon loliiformis* (TIOsm) confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic rice. **Physiologia Plantarum**, 2017.

LINTHORST, Huub JM; VAN LOON, L. C. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical reviews in plant sciences**, v. 10, n. 2, p. 123-150, 1991.

LI, Dongmei et al. Enzymatic dysfunction of mitochondrial complex I of the *Candida albicans* goa1 mutant is associated with increased reactive oxidants and cell death. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 5, p. 672-682, 2011.

LASKOWSKI, Roman A. PDBsum: summaries and analyses of PDB structures. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 1, p. 221-222, 2001.

LIU, Chun et al. Structure–function relationship of a novel PR-5 protein with antimicrobial activity from soy hulls. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 948-959, 2016.

LATA, Sneha; MISHRA, Nitish K.; RAGHAVA, Gajendra PS. AntiBP2: improved version of antibacterial peptide prediction. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. S19, 2010.

LESK, A.M. Introdução à bioinformática. Artmed, 2008. Porto Alegre, Brazil.

LIRA, Felipe et al. Synthetic peptides antimicrobial activity prediction using decision tree model. **Applied and Environmental Microbiology**, p. AEM. 02804-12, 2013.

MORRIS, J. Karnovsky. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal. cell Biology**, 27 (1965) 1-149.

MANDAL, Santi M. et al. The attack of the phytopathogens and the trumpet solo: identification of a novel plant antifungal peptide with distinct fold and disulfide bond pattern. **Biochimie**, v. 95, n. 10, p. 1939-1948, 2013.

MIELE, Marco; COSTANTINI, Susan; COLONNA, Giovanni. Structural and functional similarities between osmotin from *Nicotiana tabacum* seeds and human adiponectin. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16690, 2011.

MONTEIRO, Sara et al. Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 93, n. 12, p. 1505-1512, 2003.

MELO, V. M. M. et al. Antifungal Properties of Proteins (Agglutinins) from the Red Alga *Hypneamusiformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica marina**, v. 40, n. 1-6, p. 281-284, 1997.

MITHÖFER, Axel; BOLAND, Wilhelm. Recognition of herbivory-associated molecular patterns. **Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 825-831, 2008.

MANDAL, Santi M. et al. The attack of the phytopathogens and the trumpet solo: identification of a novel plant antifungal peptide with distinct fold and disulfide bond pattern. **Biochimie**, v. 95, n. 10, p. 1939-1948, 2013.

- MISRA, Rajesh Chandra et al. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic *Arabidopsis*. **Scientific reports**, v. 6, 2016.
- MIN, Kyeongsik et al. Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 54, n. 1, p. 170-173, 2004.
- NIARCHOU, Anastasia et al. C-PAMP: large scale analysis and data base construction containing high scoring computationally predicted antimicrobial peptides for all the available plant species. **PloSone**, v. 8, n. 11, p. e79728, 2013.
- NARASIMHAN, M.L. et al. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. **Molecular Cell**. 8:921-930. 2001.
- NAWROT, Robert et al. Plant antimicrobial peptides. **Folia microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 181-196, 2014.
- NAWROT, Robert. Defense-related Proteins from *Chelidonium majus* L. as Important Components of its Latex. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, n. 8, p. 864-880, 2017.
- NARASIMHAN, Meena L. et al. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. **Molecular cell**, v. 17, n. 2, p. 171-180, 2005.
- PORTO, W. F.; PIRES, A. S.; FRANCO, O. L. Computational tools for exploring sequence databases as a resource for antimicrobial peptides. **Biotechnology Advances**, 2017.
- PREZOTO, Fábio et al. Agroecossistemas e o serviço ecológico dos insetos na sustentabilidade. *Sustentabilidade: Tópicos da Zona da Mata Mineira*. 1ª ed. Juiz de Fora, Real Consultoria em Negócios Ltda, p. 19-30, 2016.
- RAMOS, Marcio V. et al. Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from *Calotropis procera* and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: Insights into the mechanism of action. **Phytochemistry**, v. 119, p. 5-18, 2015.
- REGENTE, Mariana et al. A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. **Current microbiology**, v. 69, n. 1, p. 88-95, 2014.
- SCHILMILLER, Anthony L.; HOWE, Gregg A. Systemic signaling in the wound response. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 4, p. 369-377, 2005.
- SELS, Jan et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941-950.
- SINGH, Anu et al. Antifungal proteins: potent candidate for inhibition of pathogenic fungi. **Current Bioactive Compounds**, v. 9, n. 2, p. 101-112, 2013.

SCHWAN-ESTRADA, Kátia Regina Freitas; STANGARLIN, José Renato; CRUZ, Maria Eugênia da Silva. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, n. 12, 2000.

TONG, Zheng et al. Identification and functional characterization of HbOsmotin from *Hevea brasiliensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 171-180, 2016.

TANG, Y. Tom et al. PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. **Journal of molecular evolution**, v. 61, n. 3, p. 372-380, 2005.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

TRUITT, Christopher L.; WEI, Han-Xun; PARÉ, Paul W. A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin. **The Plant Cell**, v. 16, n. 2, p. 523-532, 2004.

THOMAS, Shaini et al. CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. **Nucleic acids research**, v. 38, n. suppl_1, p. D774-D780, 2009.

TRIVEDI, VR; CHORAWALA, MR; SHAH, GB. Osmotin: A new adiponectin agonist, in Type II diabetes and obesity. **Int J Pharm Sci Rev Res**. 16:70–74. 2012.

TIFFIN, Peter; MOELLER, David A. Molecular evolution of plant immune system genes. **Trends in genetics**, v. 22, n. 12, p. 662-670, 2006.

ULLAH, Abid et al. Osmotin: a plant defense tool against biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2017.

VIKTOROVA J, et al. Osmotin, a pathogenesis-related protein. **Curr Protein Pept Sci** 13:672–81. (2012).

VAN ZUNDERT, G. C. P. et al. The HADDOCK2.2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. **Journal of molecular biology**, v. 428, n. 4, p. 720-725, 2016.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of Inducible Defense related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**. 44:135–162. 2006.

VASILIAUSKAITÉ-BROOKS, Ieva et al. Structural insights into adiponectin receptors suggest ceramidase activity. **Nature**, v. 544, n. 7648, p. 120, 2017.

VIKTOROVA, Jitka et al. New findings in potential applications of tobacco osmotin. **Protein Expression and Purification**, v. 129, p. 84-93, 2017.

VELAZHAHAN, R. Samiyappan. R. and Vidhyasekaran, P. Relationship between antagonistic activities of *Pseudomonas fluorescens* isolates against *Rhizoctonia*

solani and their production of lytic enzymes. **J. Plant Dis. Protec**, v. 106, p. 244-250, 1999.

WANG, Guangshun; LI, Xia; WANG, Zhe. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D1087-D1093, 2015.

WEL, Henrik; LOEVE, Kees. Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. **European Journal of Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 221-225, 1972.

WOLOSHUK, Charles P. et al. Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. **The Plant Cell**, v. 3, n. 6, p. 619-628, 1991.

ZOETE, VINCENT; GROSDIDIER, AURÉLIEN; MICHIELIN, OLIVIER. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. **J. Cell. Mol. Med.** 13(2): 238-248. 2009.

APÊNDICE A- FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará, por meio dos Laboratório de Biotecnologia de Proteases Vegetais, coordenado pelo professor Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas, Laboratório de Plantas Laticíferas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, coordenado pelo professor Dr. Márcio Viana Ramos, Laboratório de Toxinas e Proteínas Tóxicas de Plantas, coordenado pela professora Dra. Iika Maria Vasconcelos, Laboratórios de Proteínas de Defesas de Plantas, coordenado pelo professor Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do fornecimento da bolsa de estudo.