



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

**IVNA RIBEIRO SALMITO MELO**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA FITOCISTATINA PURIFICADA A  
PARTIR DAS SEMENTES DE *Cassia leiandra* Benth. E SEU POTENCIAL  
ANTIFÚNGICO CONTRA *Candida tropicalis***

**FORTALEZA**

**2019**

IVNA RIBEIRO SALMITO MELO

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA FITOCISTATINA PURIFICADA A  
PARTIR DAS SEMENTES DE *Cassia leiandra* Benth. E SEU POTENCIAL  
ANTIFÚNGICO CONTRA *Candida tropicalis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: José Tadeu Abreu de Oliveira.

FORTALEZA

2019

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)

---

- M485c Melo, Ivna Ribeiro Salmiteo.  
Caracterização bioquímica de uma fitocistatina purificada a partir das sementes de *Cassia leiandra* Benth. e seu potencial antifúngico contra *Candida tropicalis* / Ivna Ribeiro Salmiteo Melo. – 2019.  
71 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.
1. *Cassia leiandra*. 2. Inibidor de protease cisteínica. 3. *Candida tropicalis*. I. Título.

CDD 572

---

IVNA RIBEIRO SALMITO MELO

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA FITOCISTATINA PURIFICADA A  
PARTIR DAS SEMENTES DE *Cassia leiandra* Benth. E SEU POTENCIAL  
ANTIFÚNGICO CONTRA *Candida tropicalis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 30/01/19

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Fabrício Eulálio Leite Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>a</sup>. Ana Karla Moreira Lobo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Gilvan Pessoa Furtado  
Fundação Oswaldo Cruz

## AGRADECIMENTOS

À DEUS pela força espiritual para concretização deste trabalho e por todas as bênçãos alcançadas.

Aos meus pais, Esliriam Melo e Graça Salmito, que são os pilares da minha vida, obrigada por todo incentivo, amor incondicional, conselhos e carinho que foram essenciais para a minha qualificação acadêmica e formação pessoal.

Ao meu marido, Solon, por estar sempre me apoiando e animando, após cada experimento mal sucedido. Obrigada pelas palavras de incentivo e por toda paciência, carinho e compreensão ao longo desses anos de doutorado.

Ao meu orientador, José Tadeu Abreu de Oliveira, por TUDO. Obrigada por toda a sua dedicação como orientador, tanto no auxílio em experimentos de bancada como na elaboração das redações científicas. Meu mais profundo agradecimento por ter sido meu maior incentivador nos momentos finais. Obrigada por todos os ensinamentos científicos e de princípios éticos para que nos tornemos profissionais qualificados e exemplares.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, Ana de Fátima Urano, Francisco Campos, Cristina Paiva, Daniele Sousa, Enéas Gomes, Hermógenes de Oliveira, Márcio Viana, Norma Barros, Raquel Miranda, com quem tive a oportunidade de cursar algumas disciplinas, e que contribuíram com sua experiência profissional e sabedoria para aprimorar o meu conhecimento científico. Em especial a Prof<sup>a</sup> Ilka Vasconcelos, que ministrava aulas esplêndidas e tornou-se um exemplo e inspiração de professora pra mim.

Aos técnicos administrativos e terceirizados do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFC pela valiosa contribuição na minha formação acadêmica.

A todos os laboratórios vinculados ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica que contribuíram com algum equipamento ou reagente para a realização dos experimentos dessa tese.

À Gláucia Almeida de Moraes pela realização das coletas de sementes de *Cassia leiandra*.

Ao Celso Nagano e Rômulo Carneiro pela contribuição com os experimentos de espectrometria para a determinação da massa molecular da proteína.

À Central analítica da UFC pela concessão da infra-estrutura e apoio técnico para a realização dos experimentos de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Márcio Viana e José Francisco de Carvalho pela oportunidade de participar e contribuir como bolsista do projeto Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado (nº 2013/12577-0), financiada pelo projeto, Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade, Edital nº 047/2012, subprojeto - “Análises prospectivas e aplicativas de recursos vegetais da floresta Amazônica” - Código 3267/2013.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), nº projetos 308107/2013-6, 306202/2017-4 e 431511/2016-0.

Aos membros da banca pelas valiosas contribuições para melhoria desta tese.

Ao Lucas e Nadine pela disponibilidade e todo o auxílio nos experimentos, vocês foram fundamentais para a conclusão dessa tese. Foram o otimismo e a força que eu precisava.

Aos meus companheiros de todas as horas, meu agradecimento pelo ombro amigo e por todos os sorrisos proporcionados que aliviaram meu estresse. Meu amoreco Queilane que é um exemplo de otimismo, força e determinação e que sempre foi uma incentivadora. Ao Dhel, que foi um grande companheiro, sempre ao meu lado na jornada da vida, escutando todas as minhas frustrações e me aconselhando. Ao Thiago, que tentou aguentar “gentilmente” todas as minhas perturbações e me acompanhou em muitos cafés, coxinhas e pães de queijo. Obrigada também pela ajuda nos experimentos e no layout das figuras.

Aos integrantes do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, Amanda, Anna Lídia, Babi, Débora, Dhel, Emanuel, Gislaine, Handerson, Joaquim, Larissa, Lucas, Mariana, Nadine, Queilane, Raíssa, Rodolpho, Pedro, Tarcymara, Thiago, obrigada por compartilharem seus conhecimentos científicos.

Aos integrantes do Laboratório de Proteínas Tóxicas, Ana Paula, Helen, Lady, Larissa, Luiz, Paulo, Marina, Tiago Deiveson, Xavier por todos os momentos de aprendizagem. Em especial a Helen e o Xavier, que sempre foram prestativos para esclarecer dúvidas em relação aos procedimentos experimentais e para discutir resultados.

Aos colegas da turma de doutorado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas. Em especial ao Jadilson e Tarcymara pelo companheirismo em momentos de aflição.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação, Adson, Domingos, Fabiano, Luiz Carlos, Roberto e Vilmara por todo apoio e incentivo.

À Universidade Federal do Cariri (UFCA), em especial à Kamila Correia e Edilza Vasquez, pela concessão do afastamento para realização do doutorado em Bioquímica.

Aos amigos e familiares que de alguma forma me apoiaram com palavras de encorajamento e ânimo ao longo desses anos de doutorado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

“Jesus nunca prometeu um caminho fácil, mas realmente prometeu um que levaria a esquecer as dificuldades da caminhada”.

*William Barclay*

## RESUMO

As infecções causadas por *Candida* são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos e imunossuprimidos. Para superar a resistência destes patógenos aos antifúngicos e evitar seus efeitos tóxicos às células humanas, é necessário encontrar drogas com novos modos de ação. As plantas da Amazônia são foco de interesse dos pesquisadores mundiais, como fonte de produtos naturais com atividade antimicrobiana. Este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar um inibidor de protease cisteínica isolado a partir de sementes de uma planta da Amazônia, *Cassia leiandra*, e verificar o seu efeito inibitório no crescimento de *Candida tropicalis*. O inibidor, denominado *CICPI*, foi purificado por meio de cromatografia de troca iônica e afinidade, seguida de ultrafiltração em Vivaspín 30 kDa, obtendo-se um rendimento de 4,36% e purificação de 140,05 vezes. O inibidor *CICPI* é constituído por uma única cadeia polipeptídica e não possui carboidratos ligados covalentemente à sua estrutura. A massa molecular determinada por SDS-PAGE na ausência ou presença de  $\beta$ -mercaptoetanol foi de 16,63 kDa e 18,362 kDa por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS). O inibidor manteve-se estável na faixa de pH 7,0 - 9,0 e foi termoestável até 60 °C por 20 minutos. O *CICPI* inibiu apenas proteases cisteínicas e apresentou mecanismo de inibição da papaína do tipo incompetitivo ( $IC_{50} = 8,5 \times 10^{-7}$  M;  $K_i = 4,1 \times 10^{-7}$  M). O *CICPI* inibiu o crescimento de *C. tropicalis* ( $CIM_{50}$  de  $2,6 \times 10^{-6}$  M) induzindo alterações morfológicas e permeabilização da membrana plasmática que culminou com a morte celular. Estes resultados sugerem que o *CICPI* é uma proteína promissora para o desenvolvimento de um antifúngico contra *C. tropicalis*.

**Palavras-chave:** *Cassia leiandra*. Inibidor de protease cisteínica. Antifúngico. *Candida tropicalis*.



## ABSTRACT

*Candida* infection is a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised and immunosuppressed patients. To overcome antifungal resistance and its toxic effect on human cells, it is necessary to find drugs with new modes of action. The Amazon plants are focus of interest of the worldwide researchers, as source of natural products with antimicrobial activity. The objective of this work was to purify and characterize a cysteine protease inhibitor from the seeds of the Amazon rainforest tree *Cassia leiandra* and test its inhibitory effect against *Candida tropicalis* growth. The inhibitor, named *CICPI*, was purified after ion exchange and affinity chromatography followed by ultrafiltration. *CICPI* is composed of a single polypeptide chain and it is not a glycoprotein. The molecular mass determined by SDS-PAGE in the absence or presence of  $\beta$ -mercaptoethanol was 16.63 kDa and 18.362 kDa by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). *CICPI* was stable in the pH range of 7.0-9.0 and thermostable up to 60 °C for 20 minutes. *CICPI* inhibited only cysteine proteases and inhibition mechanism of papain was uncompetitive type ( $IC_{50} = 8.5 \times 10^{-7}$  M;  $K_i$  of  $4.1 \times 10^{-7}$  M). The *CICPI* inhibited *C. tropicalis* growth ( $MIC_{50} = 2.6 \times 10^{-6}$  M) and the inhibitor induced disruption of the cell surface, which led to death. These results suggest that *CICPI* have a great potential for the development of an antifungal drug against *C. tropicalis*.

**Keywords:** *Cassia leiandra*. Cysteine protease inhibitor. Antifungal. *Candida tropicalis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Classificação dos inibidores de proteinases.....	22
Figura 2-	Estruturas vegetativas e reprodutivas de <i>Cassia leiandra</i> Benth. (Fabaceae, Caesalpinoideae). Árvore destacando as inflorescências (A), folhas (B), flor e botão floral (C), frutos tipo vagem maduros (D), sementes maduras inteiras e destegumentadas, destacando o cotilédone (E).....	29
Figure 3 -	Chromatographic steps for purification of <i>CICPI</i> .....	50
Figure 4 -	Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS (SDS-PAGE).....	52
Figure 5 -	Deconvoluted electrospray ionization mass spectrum (ESI-MS) of <i>CICPI</i> .....	53
Figure 6 -	Thermal and pH stability of <i>CICPI</i> .....	54
Figure 7 -	Inhibition parameters of <i>CICPI</i> against papain.....	56
Figure 8 -	<i>Candida tropicalis</i> growth curves.....	57
Figure 9 -	SEM images of <i>Candida tropicalis</i> .....	58
Figure 10 -	Fluorescence microscopy of <i>Candida tropicalis</i> cells .....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Drogas antifúngicas convencionais e modo de ação .....	17
Tabela 2-	Classificação das proteinases.....	21
Tabela 3-	Características bioquímicas dos inibidores de protease cisteínica purificados a partir de sementes .....	25
Table 4 -	Purification steps of <i>CICPI</i> .....	51
Table 5 -	Relative inhibitory activity of <i>CICPI</i> against serine and cysteine proteinases and alpha-amylase .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs	Antimicrobial peptides (peptídeos antimicrobianos)
CFU	Colony forming unit (unidade formadora de colônia)
CICPI	<i>Cassia leiandra</i> cysteine protease inhibitor (inibidor de protease cisteínica de <i>Cassia leiandra</i> )
CITI	<i>Cassia leiandra</i> trypsin inhibitor (inibidor de tripsina de <i>Cassia leiandra</i> )
CNA	<i>Candida non-albicans</i> ( <i>Candida</i> não-albicans)
DEAE-Cellulose	Diethylaminoethyl cellulose (Dietilaminoetil celulose)
ESI-MS	Electrospray ionization- mass spectrometry (espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> )
IC <sub>50</sub>	Half maximal inhibitory concentration (metade da concentração inibitória máxima)
LTP	Lipid transfer proteins (proteína transferidora de lipídio)
MIC <sub>50</sub>	Minimum inhibitory concentration to 50% (concentração inibitória mínima para inibir 50%)
PI	Proteinaceous protease inhibitors (inibidores proteicos de protease)
PR-proteínas	Proteínas relacionadas à patogênese
SEM	Scanning electron microscopy (microscopia eletrônica de varredura)
SPE	Soluble protein extract (extrato de proteínas solúveis)
K <sub>i</sub>	Inhibition constant (constante de inibição)
RIP	Ribosome-inactivating proteins (proteínas inativadoras de ribossomos)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Infecções fúngicas</b> .....	14
2.1.1	<i>Candida e o impacto nas infecções hospitalares</i> .....	14
2.1.2	<i>Mecanismo de ação dos antifúngicos e desenvolvimento de resistência</i> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Proteínas vegetais como fontes de antimicrobianos</b> .....	18
<b>2.3</b>	<b>Inibidores de proteases</b> .....	19
2.3.1	<i>Funções dos inibidores</i> .....	19
2.3.2	<i>Classificação dos inibidores de proteases</i> .....	19
2.3.3	<i>Purificação de inibidores de proteases cisteínicas e suas aplicações</i> .....	23
<b>2.4</b>	<b>Bioma Amazônia: foco de moléculas bioativas</b> .....	26
<b>2.5</b>	<b><i>Cassia leiandra</i>: uma planta da Amazônia como fonte potencial de antimicrobianos</b> .....	27
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE /OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3.1</b>	<b>Hipótese</b> .....	30
<b>3.2</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	30
<b>3.3</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	30
<b>4</b>	<b>ARTIGO REFERENTE À TESE</b> .....	31
<b>5</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	33
<b>6</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	33
<b>7</b>	<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	35
<b>7.1</b>	<b>Chemicals</b> .....	35
<b>7.2</b>	<b>Biological materials</b> .....	35
<b>7.3</b>	<b>Protein extraction procedure from <i>C. leiandra</i> seeds</b> .....	36
<b>7.4</b>	<b>Inhibitor purification procedure</b> .....	36
<b>7.5</b>	<b>Protein quantification assay</b> .....	37
<b>7.6</b>	<b>Enzyme inhibition assay</b> .....	37
<b>7.7</b>	<b>Characterization of CICPI</b> .....	38
7.7.1	<i>Molecular mass determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry</i> .....	38
7.7.2	<i>Evaluation of the presence of carbohydrate</i> .....	39
7.7.3	<i>Analysis of the thermal and pH stability of CICPI</i> .....	39

7.7.4	<i>Specificity assay</i> .....	39
7.7.5	<i>IC<sub>50</sub> and kinetic analysis of inhibition</i> .....	40
<b>7.8</b>	<b>Biological activity</b> .....	41
7.8.1	<i>Anticandidal assay of CICPI against Candida tropicalis</i> .....	41
7.8.2	<i>Evaluation of the action mode of CICPI on Candida tropicalis</i> .....	41
7.8.2.1	<i>Reactive oxygen species (ROS) detection assay</i> .....	41
7.8.2.2	<i>Scanning electron microscopy analysis</i> .....	42
7.8.2.3	<i>Cell membrane permeabilization assay</i> .....	42
<b>7.9</b>	<b>Statistical analysis</b> .....	43
<b>8</b>	<b>RESULTS</b> .....	43
<b>8.1</b>	<b>CICPI purification</b> .....	43
<b>8.2</b>	<b>Biochemical characterization of CICPI</b> .....	44
8.2.1	<i>Molecular mass, and sulfhydryl and carbohydrate contents</i> .....	44
8.2.2	<i>Thermal and pH stability</i> .....	44
8.2.3	<i>Specificity</i> .....	44
8.2.4	<i>IC<sub>50</sub>, mechanistic of inhibition, and Ki</i> .....	44
<b>8.3</b>	<b>Anticandidal activity</b> .....	45
<b>9</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	45
<b>10</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	48
<b>11</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	60
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções causadas por *Candida* vem aumentando consideravelmente em pacientes imunocomprometidos e imunossuprimidos, determinando altos índices de morbidade e mortalidade (DING *et al.*, 2016). Em paralelo, a quantidade de fármacos antifúngicos utilizados para o tratamento é limitada. Na maioria das vezes, possui efeito somente fungistático e, ainda, apresenta alguma toxicidade ao hospedeiro (RUIZ-HERRERA; SAN-BLAS, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006; MAURYA *et al.*, 2011). Além disso, há o desenvolvimento de resistência dos microrganismos, que limita o tempo de vida útil dos medicamentos, resultando no requerimento constante pela busca de novos compostos bioativos (HARRIS, 2002; LING *et al.*, 2015).

Com o intuito de contornar a resistência dos microrganismos às drogas existentes no mercado e descobrir antifúngicos menos tóxicos, várias pesquisas são realizadas em busca de novos antimicrobianos a partir de produtos naturais. As plantas são uma excelente alternativa para prospecção de agentes anti-candida e formulação de novas drogas (HOLETZ *et al.*, 2002; PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010).

Um bioma que tem sido foco mundial de interesse para busca de plantas como fonte de moléculas bioativas é a Amazônia. Esse bioma é o maior em diversidade de espécies. Ao longo da história geológica, as plantas sofreram pressões seletivas que induziram adaptações para a sua sobrevivência em florestas inundáveis ou não inundáveis, em ecossistemas pobres ou ricos de nutrientes, bem como em condições de clima quente/úmido e de intensa precipitação pluviométrica (HAUGAASEN; PERES, 2006; PAROLIN, 2001; LEITE; ROGERS, 2013). Essa diversidade de recursos genéticos representa uma fonte de biomoléculas com potencial biotecnológico para a indústria farmacêutica.

O presente trabalho tem como diferencial o estudo com uma planta nativa da Amazônia, *Cassia leiandra*, na prospecção de proteínas com atividade antifúngica contra *Candida*, e, assim, contribui com a exploração dos recursos genéticos da Amazônia para aplicação biotecnológica. O único estudo com *Cassia leiandra* descrito na literatura científica foi aquele publicado por Dias *et al.* (2017), que avaliaram o efeito inseticida do inibidor de tripsina C/ITI em larvas de *Aedes aegypti*. O presente trabalho descreve um inibidor de protease cisteínica, CICPI, purificado a partir de sementes de *C. leiandra*, que possui efeito antifúngico contra *C. tropicalis*.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Infecções fúngicas

#### 2.1.1 *Candida* e o impacto nas infecções hospitalares

Os fungos do gênero *Candida* normalmente estão presentes na microbiota da pele e de mucosas (oral, gastrointestinal e vaginal) em indivíduos saudáveis (SHAO *et al.*, 2007). Esses fungos são oportunistas, tornando-se patogênicos quando ocorrem alterações no sistema imunológico do hospedeiro ou há comprometimento das barreiras anatômicas devido à presença de queimaduras e a realização de procedimentos médicos invasivos (EGGIMAN; GARBINO; PITTET, 2003; FAN *et al.*, 2018). A baixa imunidade pode estar relacionada a diversos fatores, desde infecções por outros patógenos, desenvolvimento de doenças auto-imunes, doenças imunes adquiridas (AIDS), desordens no sistema endócrino (p.ex. diabetes, hipotireoidismo) e neoplasias (SAMARANAYAKE; CHEUNG; SAMARANAYAKE, 2002). Além desses fatores, pode ocorrer também a imunossupressão induzida por medicamentos em pacientes transplantados, com neoplasias e infecções bacterianas graves (HA *et al.*, 2011).

A infecção por *Candida* em pacientes hospitalizados também pode se estabelecer, em menor proporção, por meio da transmissão devido a procedimentos de assepsia inadequados, tanto pelas mãos dos profissionais como por materiais hospitalares. As espécies de *Candida* são encontradas colonizando os seguintes materiais hospitalares: cateteres intravenosos, circuitos hidráulicos usados na hemodiálise, tubos para nutrição parenteral de pacientes, bem como soluções intravenosas (KUHN *et al.*, 2002; PIRES *et al.*, 2011; INGHAM *et al.*, 2012).

As infecções podem ser superficiais, acometendo a pele, cabelo, unha e mucosas (orofaringe, esôfago e vagina) ou sistêmica, quando o patógeno atinge a corrente sanguínea e coloniza as vísceras (JAYATILAKE; TILAKARATNE; PANAGODA, 2009). Existem, pelo menos, 15 espécies distintas de *Candida* que são conhecidas como agentes causais de infecções em humanos. Contudo, mais de 95% das doenças invasivas são causadas por esses 5 patógenos: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (MCCARTY; PAPPAS, 2016). *C. albicans* é o agente causal predominante das infecções invasivas (HORN *et al.*, 2009), mas a incidência de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) vem aumentando. *C. tropicalis* tem sido considerada como determinante de altos índices de mortalidade, dentre as CNA, particularmente em pacientes portadores de



neutropenias, que possuem risco aumentado de desenvolver infecções graves, e pacientes oncológicos, cujas medidas terapêuticas como a quimioterapia e radioterapia diminuem as barreiras de defesa corpórea contra microrganismos (FORASTIERO *et al.*, 2013).

*C. tropicalis* é um fungo polimórfico. Portanto, possui a fase de levedura, pseudohifa e hifa verdadeira, sendo a forma filamentosa importante para a invasão do tecido e as células em forma de levedura essenciais para a eficiente disseminação (FURLANETO *et al.*, 2012). A parede celular das espécies de *Candida* tem 75-85% da sua massa seca constituída por dois polissacarídeos ( $\beta$ -glucano e  $\alpha$ -manana) e, em menor quantidade, quitina, além de proteínas e lipídios (JAYATILAKE, 2011).

A patogenicidade das espécies de *Candida* está relacionada com alguns fatores de virulência, tais como aderência, formação de biofilme (no tecido hospedeiro ou material hospitalar), produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e hemolisina), sendo esses fatores usados na colonização dos tecidos e para superar as defesas do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2012).

### 2.1.2 Mecanismo de ação dos antifúngicos e desenvolvimento de resistência

As drogas usadas para o tratamento de infecções fúngicas são agrupadas em quatro classes de acordo com o modo de ação do antifúngico (Tabela 1). Os azóis e polienos têm como alvo o ergosterol, um esteroide essencial na composição da membrana celular do fungo. Contudo, o modo de ação é diferente, os azóis inibem a enzima P450 demetilase que atua na síntese do ergosterol, promovendo uma redução na formação desse composto e, conseqüentemente, diminuindo o crescimento do fungo, como também pode induzir a produção de esteróis tóxicos que afetam a estrutura da membrana e suas funções, tais como transporte de nutrientes e síntese de quitina. Já os polienos se ligam ao ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana plasmática e formando poros que provocam o extravasamento dos componentes plasmáticos e a morte celular. As pirimidinas têm um modo de ação diferente, e atuam interferindo na síntese de DNA e RNA do fungo. Já as equinocandinas atuam inibindo a enzima glucano sintase que é responsável pela síntese de glucanos para a formação da parede celular (BOSSCHE, 1997; BEHR, 2003; ARENDRUP, 2013).

Os mecanismos de resistência aos antifúngicos não estão bem elucidados, mas em geral, podem ser associados a superexpressão de genes que codificam para bombas de efluxo da droga, mantendo a concentração intracelular do fármaco muito baixa. Pode também estar relacionado com a mutação do gene que codifica para a enzima alvo da droga, impedindo sua

ação ou pode ocorrer pelo aumento da quantidade de ergosterol presente na membrana. Mas a resistência é promovida, principalmente, pela formação de biofilmes. Algumas hipóteses são associadas a formação do biofilme. Quando há uma redução do crescimento dos fungos, alguns genes de virulência são suprimidos para evitar o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro e a subsequente indução de respostas de defesa. Assim, as células que sobrevivem irão possuir características fenotípicas e genotípicas únicas de resistência. Outra hipótese é que a presença da matriz do biofilme restringe a penetração de drogas por meio da formação de uma barreira de difusão, portanto somente as camadas mais superficiais estarão em contato com a droga (BOSSCHE, 1997; HA *et al.*, 2011; NETT *et al.*, 2011; ARENDRUP, 2013).

A infecção causada por *Candida* não é contagiosa, portanto os isolados resistentes raramente são transmitidos entre os pacientes, exceto em caso de contaminação de materiais hospitalares. A resistência surge, durante o tratamento com o antifúngico, em cada isolado. Além do desenvolvimento de resistência às drogas comercializadas, os antifúngicos tornam-se tóxicos durante o uso prolongado, visto que não possuem ação muito específica e afetam as células do hospedeiro que são também eucariontes (HARRIS, 2002; ARENDRUP, 2013; LING *et al.*, 2015).

É de interesse do mercado farmacêutico descobrir novos antifúngicos mais eficazes, menos tóxicos ao hospedeiro e com custo para produção viável. Nesse contexto, as biomoléculas ativas de plantas têm sido uma alternativa promissora para busca de novos antimicrobianos.

Tabela 1- Drogas antifúngicas convencionais e modo de ação

<b>Classe química</b>	<b>Drogas</b>	<b>Alvo</b>
Azóis	Miconazol	Síntese de ergosterol
	Cetoconazol	*Inibe a enzima P450 demetilase
	Fluconazol	
	Itraconazol	
	Terconazol	
	Voriconazol	
	Posaconazol	
Polienos	Anfotericina B desoxicolato ou Anf. Lipossomal	Função da membrana (ergosterol)
	Nistatina	
	Flucitosina	Síntese de RNA e DNA
Equinocandinas	Caspofungina	Síntese de glucano
	Micafungina	
	Anidulafungina	

Fonte: adaptado de Sardi *et al.* (2013)

## 2.2 Proteínas vegetais como fontes de antimicrobianos

As plantas possuem um potente mecanismo de defesa contra diversas pragas, tais como vírus, bactérias, fungos, nematoides, insetos fitófagos e outros herbívoros. Vários compostos secundários, tais como alcaloides, terpenoides, saponinas, flavonoides, taninos, isotiocianatos, glucosinolatos, e compostos primários, como peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos fazem parte deste arsenal de defesa contra fitopatógenos e pragas (PRAXEDES *et al.*, 2011). As proteínas e os peptídeos vegetais de defesa podem ser classificados de acordo com sua estrutura e/ou função em: proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas), dentre as quais  $\beta$ -1,3-glucanases, inibidores de proteases, peroxidases, quitinases e taumatinas; peptídeos antimicrobianos (AMPs); albuminas 2S; ciclotídeos; defensinas; proteínas ricas em glicina; proteínas tipo-heveína; proteínas transferidora de lipídio (LTP); tioninas; vicilinas, proteínas inativadora de ribossomos (RIP) e lectinas (SELS *et al.*, 2008; GOYAL; MATTOO, 2014; YAN *et al.*, 2015).

A prospecção e o isolamento de proteínas vegetais de defesa são realizados com o intuito de prover estratégias alternativas de controle para patógenos que causam impactos negativos na agricultura e na saúde humana (PELEGRINI *et al.*, 2009). A toxina da soja (SBTX) foi isolada a partir de sementes de soja e verificou-se o seu efeito na inibição do crescimento do fungo fitopatogênico *Cercospora sojina* (VASCONCELOS *et al.*, 2008). Proteínas ligantes à quitina Mo-CBP<sub>2</sub>, Mo-CBP<sub>3</sub> e Mo-CBP<sub>4</sub> foram isoladas a partir de sementes de *Moringa oleifera* e avaliadas quanto ao seu efeito antifúngico contra *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (NETO *et al.*, 2017). Várias outras proteínas têm sido purificadas de diversos tecidos vegetais, como raízes, pecíolos, pedúnculos, folhas, flores e sementes (PELEGRINI *et al.*, 2011). Dentre as diferentes fontes de biomoléculas ativas, as sementes se destacam pela diversidade e quantidade de proteínas que sintetizam, tanto como reserva, para garantir a germinação e desenvolvimento inicial das plantas, como para inibir o crescimento de microrganismos (CÂNDIDO *et al.*, 2011).

Uma classe de proteínas de defesa comumente encontrada nas plantas, particularmente nas suas sementes, são os inibidores proteicos de proteases, com destacado interesse biotecnológico, decorrente de suas propriedades biológicas multifacetadas.

## 2.3 Inibidores de proteases

### 2.3.1 Funções dos inibidores

Os inibidores de proteases possuem várias funções na planta que incluem tanto a regulação da atividade enzimática de proteases endógenas, em órgãos de reserva e vegetativos, como de proteases exógenas, que são produzidas por patógenos e predadores, durante o ataque da planta (ARAI *et al.*, 2002). A função primária dos inibidores é a regulação do balanço entre a proteólise e a síntese de proteínas. Os inibidores irão atuar regulando as proteases que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e celulares na planta, tais como deposição e mobilização de proteínas em órgãos de reserva, catabolismo e reciclagem de proteínas em órgãos senescentes e quando as plantas estão sob condições de estresse abiótico e/ou biótico, bem como morte celular programada (GRUDKOWSKA; ZAGDANSKA, 2004; MÜNTZ, 2007).

Os inibidores proteicos de proteases cisteínicas, ou as cistatinas, também têm papel de defesa contra estresses bióticos. Insetos fitófagos, herbívoros, fungos, vírus, bactérias e nematoides liberam proteases para penetrarem e se alimentarem do hospedeiro. Em reposta, as plantas produzem inibidores de proteases que agirão como proteínas antinutricionais, impedindo a alimentação. Esses inibidores promovem alterações no crescimento, sobrevivência, fecundidade e podem até provocar a morte dos microrganismos e pragas alvos. Além disso, podem interferir na ação de proteínas do patógeno que estão relacionadas com o estabelecimento do parasitismo (GIRARD *et al.*, 2007; SENTHILKUMAR *et al.*, 2010; LALUK; MENGISTE *et al.*, 2011; UEDA *et al.*, 2011).

### 2.3.2 Classificação dos inibidores de proteases

Os inibidores de proteases podem ser classificados de acordo com a classe mecanicista, ou seja, a classe de enzimas que eles inibem, sendo agrupados em inibidores de proteases serínicas, cisteínicas, aspárticas, treonina-proteases e metalo-proteases. Além dessas classes, existe um sexto grupo que são os inibidores com mecanismo catalítico desconhecido (RYAN, 1990; DUBEY *et al.*, 2007). Na Tabela 2, estão descritas as 4 proteinases mais estudadas e as respectivas enzimas pertencentes a cada classe (OLIVEIRA; XAVIER-FILHO; SALES, 2003). Outra classificação para os inibidores de proteases é baseada nas características bioquímicas, tais como sequência de aminoácidos, massa molecular, estrutura

secundária e terciária da proteína, incluindo número e posição das pontes dissulfeto, além da glicosilação (RAWLINGS; TOLLE; BARRET, 2004). São agrupadas em 6 principais famílias: serpinas, inibidor Kunitz, cistatinas, inibidor Bowman Birk, inibidor metalocarboxil peptidase e aspartil. A figura 1 mostra, resumidamente, as características dos inibidores de proteases pertencentes a cada família (SHAMSI *et al.*, 2016).

Os inibidores de proteinases cisteínicas e serínicas são os mais estudados. O presente trabalho tem como proteína de estudo uma fitocistatina. Os inibidores de proteases cisteínicas ou cistatinas são agrupados em quatro subfamílias: stefinas (I), cistatinas (II), quinogênios ou cininogênios (III) e as fitocistatinas (IV) que também são denominadas de cistatinas de plantas (Fig. 1). As fitocistatinas possuem algumas características bioquímicas semelhantes as cistatinas do grupo I e II, geralmente, isoladas de animais. Dentre essas características, a ausência de pontes dissulfeto e carboidratos ligados covalentemente a proteína. Além disso, possuem a seguinte sequência conservada, Gln- $X_{aa}$ -Val- $X_{aa}$ -Gly, que é característica da superfamília cistatina. Essa sequência fica localizada na região central do looping (onde  $X_{aa}$  representa qualquer aminoácido) e possui, na região N-terminal, um resíduo de glicina, enquanto na região C-terminal possui um triptofano. Já a sequência conseso, que é exclusiva das fitocistatinas, possui os seguintes aminoácidos [LVI-AGT-RKE-FY-AS-VI]-x-[EDQV-HYFQ]-N na região N-terminal da  $\alpha$ -hélice (MARGIS; REIS; VILLERET, 1998; CORR-MENGUY *et al.*, 2002; BENCHABANE *et al.*, 2010 ). As fitocistatinas são classificadas em 3 grupos. O grupo I inclui os inibidores com apenas um domínio e baixa massa molecular (12-16 kDa). O grupo II engloba os inibidores que possuem massa molecular de, aproximadamente, 23 kDa e um domínio conservado na região C-terminal, que inibe as proteases da legumina (C13). Já o grupo III agrupa as multicistatinas que possuem elevada massa molecular e são constituídas por mais de um domínio (WALSH; STRICKLAND, 1993; MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

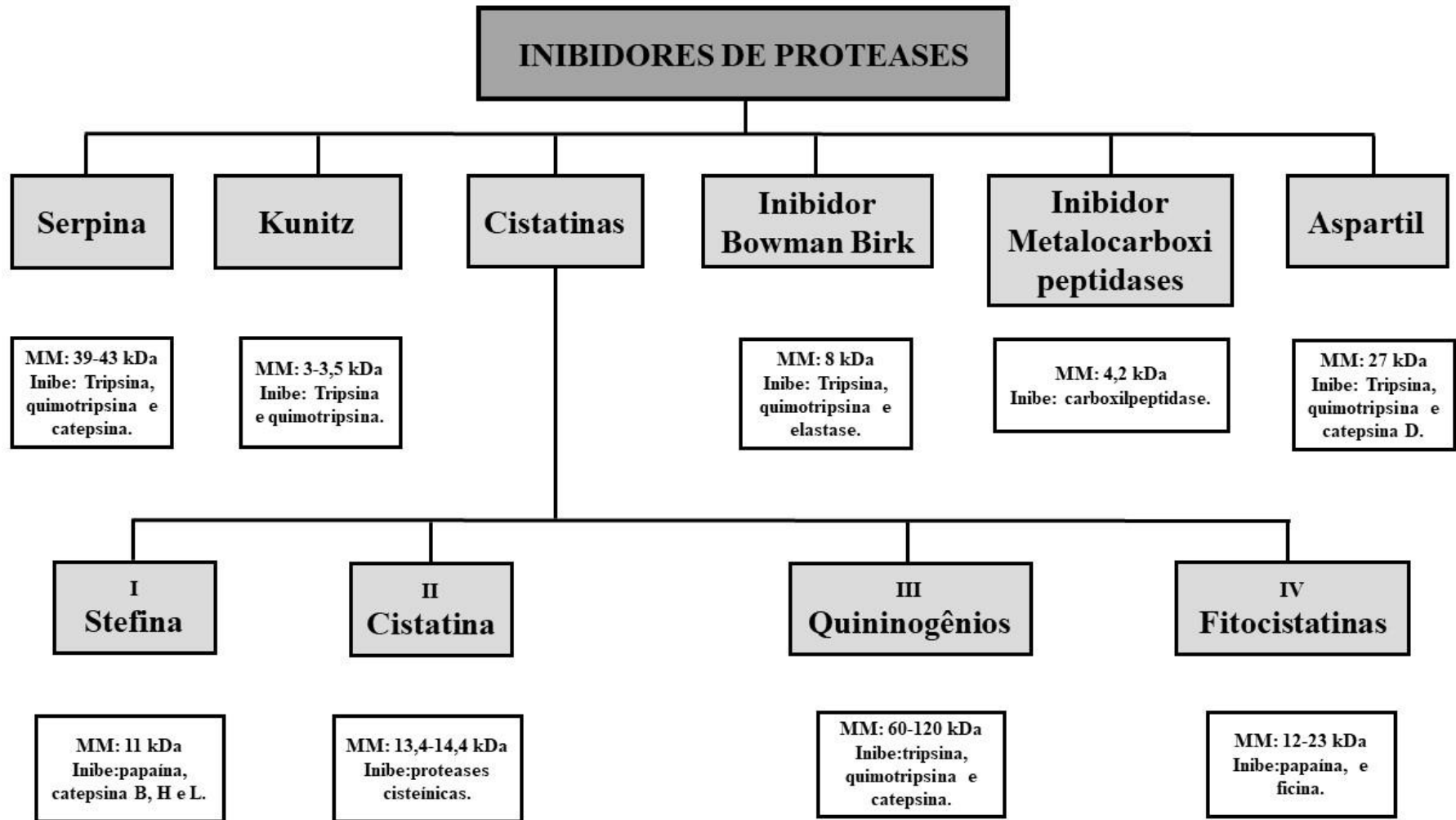
Tabela 2- Classificação das proteinases

<b>Proteinases</b>	<b>Grupo do sítio ativo</b>	<b>Faixa de pH ótimo</b>	<b>Enzimas</b>
Serínica (E.C. 3. 4. 21)	Ser, His	7-9	Tripsina, quimotripsina, elastase, catepsina G
Cisteínica (E.C. 3. 4. 22)	Cys	4-7	Papaína, ficina, bromelaína, ananaína, catepsinas (B, C, H, K, L, O, S e W)
Aspártica (E. C. 3. 4. 23)	Asp, Try	<5	Catepsina D e E, renina e pepsina
Metaloproteinases (E.C. 3. 4. 24)	Íon metálico	7-9	Carboxipeptidases A e B e aminopeptidases

E.C. código dado às enzimas pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular. 3: representa a classe hidrolase, 4: sub-classe de enzimas que hidrolisam ligações peptídicas, 21: sub-classe das proteinases serínicas, 22: proteinases cisteínicas, 23: proteinases aspárticas, 24: metaloproteinases.

Fontes: NC-IUBMB (2018); Oliveira; Xavier-Filho; Sales (2003).

Figura 1- Classificação dos inibidores de proteinases



Fonte: Adaptado de Shamsi *et al.* (2016).



### 2.3.3 Purificação de inibidores de proteases cisteínicas e suas aplicações

Os protocolos para purificação de cistatinas de plantas vem sendo estabelecidos há pouco mais de 30 anos e a orizacistatina purificada a partir do arroz (*Oryza sativa*) é reconhecida, internacionalmente, como a primeira cistatina de planta bem caracterizada (ABE *et al.*, 1987; ABE *et al.*, 1991). Os inibidores de proteases representam, aproximadamente, 1-10% das proteínas presentes em plantas, sendo distribuídos por diversos órgãos, como folhas, raízes, frutos, flores, tubérculos e mais abundantemente em sementes (RICHARDSON *et al.*, 1991; ANDRADE *et al.*, 2010). As cistatinas já foram purificadas e caracterizadas a partir de várias espécies, tais como arroz, milho, soja, feijão, tomate, cevada, mostarda, grão de bico, dentre outras (ABE *et al.*, 1991; ABE *et al.*, 1992; MISAKA *et al.*, 1996; DIOP *et al.*, 2004; WU; HAARD, 2000; EL-LATIF, 2015; AHMED *et al.*, 2016; SHERAZ *et al.*, 2017 ). Algumas fitocistatinas purificadas nos últimos 10 anos e suas respectivas características bioquímicas de massa molecular, especificidade enzimática, cinética de inibição e estabilidade térmica e de pH estão citadas na tabela 3.

As fitocistatinas têm sido purificadas e caracterizadas para conhecer melhor seus papéis fisiológicos na planta, bem como com o intuito de serem aplicadas nas áreas da agricultura e indústria farmacológica. Somente para dar alguns exemplos, vários inibidores de proteases foram purificados e testados contra potyvírus (viroses), *Alternaria radicina* (podridão radicular), *Erwinia carotovora* (podridão mole), *Pythium aphanidermatum* (tombamento), nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* (meloidoginose), bem como contra os insetos pragas *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus* (WEN *et al.*, 2004; AGUIAR *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2010; SENTHILKUMAR *et al.*, 2010; POPOVIC *et al.*, 2013). Alguns pesquisadores estudam o efeito das fitocistatinas para produção de plantas transgênicas. Carrilo *et al.* (2011) investigaram o efeito de cistatinas de cevada na inibição de proteases dos ácaros *Tetranychus urticae* e *Brevipalpus chilensis* e produziram plantas de milho expressando genes que codificam o inibidor de protease HvCPI-6, resultando em plantas que se tornaram resistentes a esta praga.

Como relatado, as plantas produzem, naturalmente, os inibidores de proteases que têm atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoário e inseticida (SHAMSI; FÁTIMA, 2016; SHAMSI; PARVEEN; FÁTIMA, 2016). Contudo, ainda existem poucos trabalhos que investigam a ação das fitocistatinas no tratamento de doenças em humanos e elucidam o modo de ação do inibidor. Os inibidores de fitocistatinas possuem grande potencial para a formulação de antibióticos e antifúngicos, principalmente, porque há

evidências de que as proteases cisteínicas não são secretadas como enzimas digestivas intestinais em mamíferos (ATKINSON *et al.*, 2004). Alguns trabalhos foram realizados, relatando o efeito de cistatinas no controle dos patógenos que causam infecções em humanos. Sharma *et al.* (2006) purificaram duas cistatinas (PMC I e II) a partir de *Phaseolus mungo* e avaliaram seu efeito inibitório contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Melo *et al.* (2018) relataram que CaneCPI-4, uma cistatina isolada da cana-de-açúcar, inibe a protease cisteínica de *Plasmodium falciparum*, um protozoário que causa malária em humanos.

Tabela 3- Características bioquímicas dos inibidores de protease cisteínica purificados a partir de sementes

<b>Espécie (Família botânica)</b>	<b>Nome vulgar</b>	<b>Nome do Inibidor</b>	<b>MM (kDA)</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Cinética de inibição*</b>	<b>Estabilidade (térmica e pH)</b>	<b>Referência</b>
<i>Pithecelobium dumosum</i> (Le)	jurema	PdKI-2	18,1	T, P	Não competitivo Ki $5,1 \times 10^{-7}$ M	37-100 °C pH 2-12	Oliveira <i>et al.</i> , 2007
<i>Hordeum vulgare</i> (Po)	cevada	Barley PI	12,4 - 13,9	P	Não competitivo Ki $1,95 \times 10^{-9}$ M	20-80 °C pH 2-12	El-latif <i>et al.</i> , 2015
<i>Brassica alba</i> (B)	mostarda amarela	YMP	26	P, F, B	Não competitivo Ki $3,0 \times 10^{-7}$ M	30-60 °C pH 6-8	Ahmed <i>et al.</i> , 2016
<i>Brassica juncea</i> (B)	mostrada oriental	TPI	18,1	P, F, B	Não competitivo Ki $1,02 \times 10^{-7}$ M	30-60 °C pH 3-8	Khan <i>et al.</i> , 2016
<i>Allium sativum</i> (Li)	alho	GPC	12,5	P, F, B	Não competitivo Ki $8,5 \times 10^{-8}$ M	30-50 °C pH 6-8	Siddiqui <i>et al.</i> , 2017
<i>Cicer arietinum</i> (Le)	grão de bico	CPC	25,3	P, F	Competitivo Ki $8,2 \times 10^{-10}$ M	30-70 °C pH 3-10	Sheraz <i>et al.</i> , 2017

MM- massa molecular por SDS-PAGE, B - bromelaína, F - ficina, P - papaína, T - tripsina, B - Brassicaceae, Le - Leguminosae (Fabaceae), Li – Liliaceae, Po – Poaceae.

\* Valores da cinética de inibição para a enzima papaína

## 2.4 Bioma Amazônia: foco de moléculas bioativas

A Amazônia é o maior bioma do Brasil com extensão de 5 milhões de km<sup>2</sup>, em torno de 49,3% do território brasileiro. A floresta tropical abrange os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e ocupa uma pequena área do Maranhão, Tocantins e Mato-Grosso. O domínio fitogeográfico da Amazônia também se estende para outros países da América do Sul, tais como Bolívia, Peru, Equador e Colômbia (MYSTER, 2009; MEDEIROS *et al.*, 2014; IBGE, 2018). A Amazônia é o ecossistema de maior diversidade, pois possui mais de 10% de todas as espécies da Terra, sendo estimado que haja 30 mil espécies de plantas (MYSTER, 2009; MMA, 2018). Essa alta variabilidade biológica representa uma fonte incalculável de recursos genéticos que podem ser explorados com propósito biotecnológico.

As condições edafoclimáticas da Amazônia, relevo, clima quente/úmido e de intensa precipitação pluviométrica moldaram a paisagem e influenciaram na composição biótica ao longo da história geológica, favorecendo a diversidade de espécies (LEITE; ROGERS, 2013). A Amazônia possui uma grande variedade de fitofisionomias, mas predominam as Florestas de Igapó e Florestas de Terra-Firme. As florestas inundáveis são designadas de Várzea (inundada por água barrenta com ecossistema rico em nutrientes) e Igapó (inundada por águas negras com ecossistema pobre em nutrientes). Por sua vez, as florestas de Terra-firme não são alcançadas pelos ciclos anuais de enchente e, também, são regiões pobres em nutrientes. Os processos de sedimentação e erosão resultantes da energia cinética da água formam canais, lagos e barragens florestais. A combinação desses ambientes: lagos, florestas inundadas e não inundadas geram uma região altamente produtiva e diversificada (HAUGAASEN; PERES, 2006; PAROLIN, 2001). Assim, as plantas se adaptaram, produzindo várias estratégias de crescimento para sobreviverem nesses ambientes que são submetidos a longos períodos de enchente (BLOM; VOESENEK, 1996).

A diversidade vegetal da Amazônia possui tanto espécies com aplicabilidade comprovada como inúmeras espécies com potencial de aplicação biotecnológica e que ainda não foram ou são minimamente exploradas em relação à caracterização bioquímica e atividades biológicas de suas biomoléculas, como lipídios, carboidratos e proteínas/peptídeos (BARIANI *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2018).

## 2.5 *Cassia leiandra*: uma planta da Amazônia como fonte potencial de antimicrobianos

A espécie *Cassia leiandra* Benth. é popularmente conhecida como canafístula-de-igapó, fava-mari-mari, ingá, ingá-mari, mari, marimari, marimari-da-várzea, seruaia ou taxi preto da folha miúda. Possui a seguinte classificação taxonômica: Divisão Magnoliophyta; Classe Equisetopsida; Ordem Fabales, Família Fabaceae; e Subfamília Caesalpinoideae. A *C. leiandra* é nativa, tendo como origem a região central da Amazônia, sendo, atualmente, encontrada nos domínios fitogeográficos da Amazônia e Mata Atlântica, com distribuição geográfica, predominando nos estados da região Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima) e da região Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso). Porém, sua ocorrência também é registrada na região Nordeste, abrangendo os estados da Bahia, Maranhão e Pernambuco e na região Sudeste, nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (VIANA *et al.*, 2011; SOUZA; BORTOLUZZI, 2015). Essa espécie tem como habitat as florestas de várzea, igapó e terra firme, os lagos e igarapés, podendo crescer tanto em solos férteis nas planícies aluviais quanto em solos inférteis que sofrem inundações (MAIA, 2001; SOUZA *et al.*, 1996).

A *C. leiandra* (Figura 2) possui porte arbóreo, entre 6-8 m e raramente excede 12 m de altura, copa ampla, folhas pinadas e flores amarelas bissexuais dispostas em cachos. O fruto é uma vagem cilíndrica indeiscente, atingindo até 80 cm de comprimento e 1,5-3 cm de diâmetro, tendo cor verde quando imatura e tornando-se amarela ao amadurecer. As sementes são discoides, marrons, com 1 cm de comprimento e envolvidas por uma polpa verde que são separadas no interior do fruto por septos transversais, formando de 50-100 compartimentos para acomodar cada semente. A frutificação é observada em períodos variados, podendo iniciar em setembro ou dezembro e durando até maio ou, ainda, de março a junho, quando ocorrem os alagamentos (ARKCOLL, 1984; MAIA, 2001; SOUZA *et al.*, 1996; VIANA *et al.*, 2011).

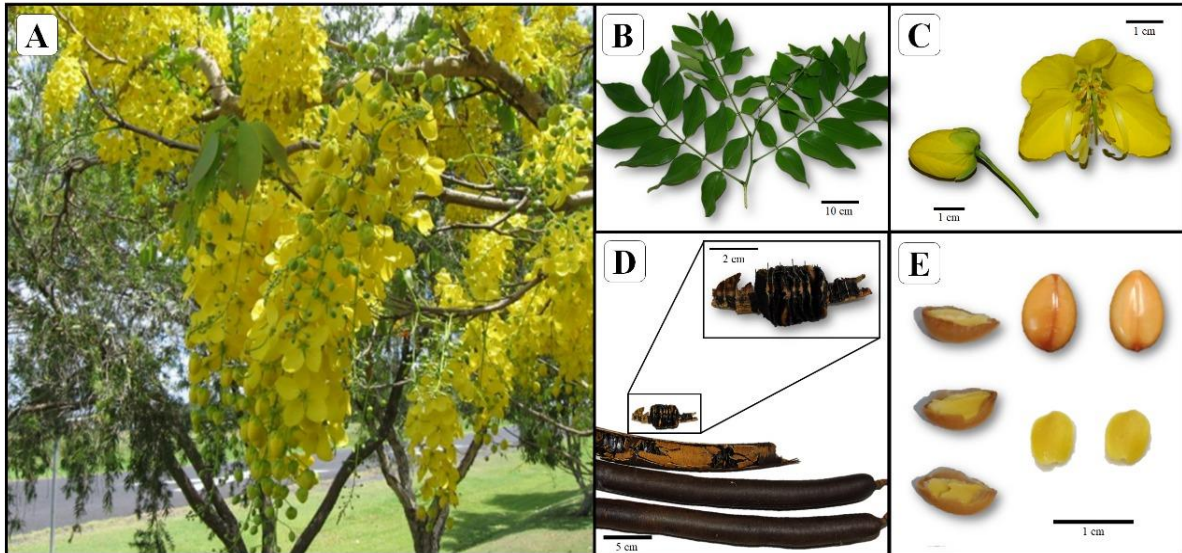
Os frutos de *C. leiandra* possuem uma polpa comestível com sabor agridoce, ligeiramente amargo-doce, sendo comercializado nas feiras de Manaus e nas cidades do interior do Amazonas para consumo *in natura*. Os frutos também são utilizados para alimentação ou isca de peixes. Além disso, a madeira dessa espécie é explorada economicamente para construção de residências rústicas, cabos de ferramentas, confecção de brinquedos e utilização como lenha. A planta também é utilizada na estabilização de rios e bancos de lagoas de peixe, como fixadora de nitrogênio e planta ornamental na arborização

urbana (MAIA; CHALCO, 2002, VIANA *et al.*, 2011; OLIVEIRA; CAVALCANTE, 2017). Existem relatos do uso popular, como planta medicinal, das folhas para tratamento de coceiras e dos frutos como laxante, mas não existem estudos científicos que comprovem essas atividades biológicas (JORDÃO *et al.*, 1986; MATTA, 2003).

Dias e colaboradores (2017) realizaram a primeira pesquisa para comprovar o uso de uma proteína isolada a partir de sementes de *C. leiandra*. O inibidor de tripsina, denominado *CITI*, foi purificado e seu efeito inseticida contra *Aedes aegypti*, um hospedeiro de grande relevância médica, avaliado. Nesse estudo, foi observado que o *CITI* reduziu em 50% as atividades de proteases presentes no intestino de *A. aegypti* e promoveu toxicidade em larvas do 3º instar. Além disso, o *CITI* afetou o desenvolvimento e sobrevivência da larva, provocando um atraso de 24h no estágio de desenvolvimento e 44% de mortalidade, após 10 dias de exposição ao inibidor.

A *C. leiandra* é uma planta ainda pouco explorada quanto à presença de biomoléculas ativas. De acordo com os estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa sobre a bioprospecção de proteínas em sementes *C. leiandra*, (ARAÚJO, 2016) esta espécie é uma promissora fonte de proteínas antimicrobianas.

Figura 2- Estruturas vegetativas e reprodutivas de *Cassia leiandra* Benth. (Fabaceae, Caesalpinoideae). Árvore destacando as inflorescências (A), folhas (B), flor e botão floral (C), frutos do tipo vagem maduros (D), sementes maduras inteiras e destegumentadas, destacando o cotilédone (E)



Fontes: Glauca Almeida de Moraes; Ivna R. Salmito Melo.

### 3 HIPÓTESE /OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótese

As sementes, em geral, são repositórios de proteínas bioativas contra diversos microrganismos. Portanto, a semente de *Cassia leiandra* Benth. é fonte de proteínas antimicrobianas, tais como os inibidores de proteases cisteínicas que podem ser utilizados como método de controle de *Candida tropicalis*.

#### 3.2 Objetivo Geral

Purificar e determinar as propriedades bioquímicas e fisicoquímicas de um inibidor de protease cisteínica de semente de *Cassia leiandra* Benth. e avaliar seu potencial antifúngico contra *Candida tropicalis*.

#### 3.3 Objetivos Específicos

- Estabelecer um protocolo de extração e purificação do inibidor de protease cisteínica, presente na semente de *C. leiandra* Benth.;
- Determinar a massa molecular do inibidor purificado (CICPI), o número de subunidades constituintes e se há carboidratos covalentemente ligados à sua estrutura;
- Determinar as propriedades cinéticas do CICPI (especificidade enzimática, mecanismo e constante de inibição) e estabilidade da atividade inibitória;
- Avaliar se o CICPI possui a atividade antifúngica relevante contra *C. tropicalis* e esclarecer seu mecanismo de ação.



#### **4 ARTIGO REFERENTE À TESE**

##### **❖ Revista científica**

O artigo referente à tese foi publicado na revista, intitulada como International Journal of Biological Macromolecules, cujo fator de impacto é 5.137 e qualis é A1 para a área de Ciências Biológicas II, de acordo com a avaliação trienal (2013-2016) realizada pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

***CICPI*, a cysteine protease inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has antifungal activity against *Candida tropicalis* by inducing disruption of the cell surface**

Ivna R. S. Melo<sup>a</sup>, Lucas P. Dias<sup>a,\*</sup>, Nadine M. S. Araújo<sup>a</sup>, Ilka M. Vasconcelos<sup>a</sup>, Thiago F. Martins<sup>a</sup>, Glaucia A. de Moraes<sup>b</sup>, Jose F. C. Gonçalves<sup>c</sup>, Celso S. Nagano<sup>d</sup>, Rômulo F. Carneiro<sup>d</sup>, Jose T. A. Oliveira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Science Center, Federal University of Ceara (UFC), Fortaleza-CE, 60020-181, Brazil.

<sup>b</sup>State University of Mato Grosso do Sul, Ivinhema - MS, 79740-000, Brazil

<sup>c</sup>National Institute for Amazonian Research, Manaus - AM, 69067-375, Brazil

<sup>d</sup>Department of Fisher Engineering, Center of Agricultural Sciences, UFC, Science Center, UFC, Fortaleza-CE, 60020-181, Brazil.

\*Corresponding authors: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Science Center, Federal University of Ceara (UFC), Fortaleza-CE, 60020-181, Brazil. Laboratory of Plant Defense Proteins, Av. Mister Hull, P.O. Box: 60451 Fortaleza, CE, Brazil. Telephone number: +55 85 33669823; Fax: +55 85 33669789.

E-mail addresses: [jtaolive@ufc.br](mailto:jtaolive@ufc.br) (J.T.A. Oliveira); [lpinheirodias@gmail.com](mailto:lpinheirodias@gmail.com) (L. P. Dias).

## 5 ABSTRACT

Infections caused by *Candida tropicalis* have increased significantly worldwide in parallel with resistance to antifungal drugs. To overcome resistance novel drugs have to be discovered. The objective of this work was to purify and characterize a cysteine protease inhibitor from the seeds of the Amazon rainforest tree *Cassia leiandra* and test its inhibitory effect against *C. tropicalis* growth. The inhibitor, named *CICPI*, was purified after ion exchange and affinity chromatography followed by ultrafiltration. *CICPI* is composed of a single polypeptide chain and is not a glycoprotein. The molecular mass determined by SDS-PAGE in the absence or presence of  $\beta$ -mercaptoethanol and ESI-MS were 16.63 kDa and 18.362 kDa, respectively. *CICPI* was stable in the pH range of 7.0-9.0 and thermostable up to 60 °C for 20 minutes. *CICPI* inhibited cysteine proteases, but not trypsin, chymotrypsin neither alpha-amylase. Inhibition of papain was uncompetitive with a  $K_i$  of  $4.1 \times 10^{-7}$  M and  $IC_{50}$  of  $8.5 \times 10^{-7}$  M. *CICPI* at  $2.6 \times 10^{-6}$  M reduced 50% *C. tropicalis* growth. *CICPI* induced damages and morphological alterations in *C. tropicalis* cell surface, which led to death. These results suggest that *CICPI* have great potential for the development of an antifungal drug against *C. tropicalis*.

**Keywords:** *Cassia leiandra*, cysteine inhibitor, antifungal, *Candida tropicalis*.

## 6 INTRODUCTION

*Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, and *Candida krusei* cause more than 90% of the invasive Candidiasis in humans. Ineffective diagnostic techniques and unsuitable antifungal therapies contribute to the high mortality rates caused by these opportunistic pathogenic yeasts (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). *C. albicans* is the most prevalent species isolated from patients infected with pathogenic yeasts, but the incidence of *Candida non-albicans* (CNA) species like *C. tropicalis* has increased. For instance, *C. tropicalis* has been related to higher mortality than any other CNA species and *C. albicans*, especially in neutropenic and cancer patients (FORASTIERO *et al.*, 2013). Because infections caused by *C. tropicalis* have increased dramatically globally and resistance to antifungal drugs like fluconazole has augmented, *C. tropicalis* has been considered an emerging pathogenic yeast (KOTHAVADE *et al.*, 2010). Therefore, new therapeutic alternatives for the treatment of *Candida* infections are of outmost importance in medicine.

Plants are natural sources of defense peptides and proteins as they have to face the attack of several enemies such as viruses, bacteria, fungi, nematodes, and insects. These bioactive molecules include proteinases inhibitors, chitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, peroxidases, lipid transfer proteins (LTP), lectins, ribosome-inactivating proteins (RIPs), and antimicrobial peptides (AMPs) that have useful biological activities (SHAMSI; FATIMA, 2016; SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016). Accordingly, these bioactive proteins have attracted the attention of several research groups because of the possibility of their use as new pharmaceutical drugs for the treatment of human diseases.

One of these groups of proteins with high potential to be used in the field of pharmaco-therapeutics is the proteinaceous protease inhibitors (PIs) (SHAMSI; FATIMA, 2016). The primary function of PIs in plants is to maintain a balance between proteolysis and protein synthesis in physiological processes. Moreover, they have also been implicated in the role of defense against pathogenic microorganism and herbivores or phytophagous insects (SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016). PIs are grouped into several families on the basis of the sequence similarities and structural relationships. Such families include Serpin, Kunitz inhibitors, Cystatin, Bowman-Birk inhibitors, Metalloprotease inhibitor and Aspartyl (CONSIGLIO *et al.*, 2011). Most of these PIs have antiprotozoal, antibacterial, antifungal and insecticidal activity and have also been investigated as therapeutic drugs. For example, JcTI-I, a trypsin inhibitor purified from *Jathropa curcas* seed cake, has activity against *Toxoplasma gondii* and decreased the intracellular parasitic number in the infected host cells (CARVALHO *et al.*, 2017). A Bowman–Birk inhibitor from the *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibited the growth and killed the multidrug-resistant bacterium *Staphylococcus aureus* (MARTINS, *et al.*, 2018). IETI, a trypsin inhibitor from *Inga edulis*, has antifungal activity against *Candida tropicalis* and *C. buinensis* (DIB *et al.*, 2019). The trypsin inhibitor RcTI, from the *Ricinus communis* seed cake, inhibited the midgut proteases of the dengue mosquito (*Aedes aegypti*) larvae (SILVA *et al.*, 2015). Therefore, purification and understanding of the structure/function relationship of new plant inhibitors have a direct impact on the design of new drugs for the treatment of several important human diseases.

Plants, like *Cassia leiandra* Benth., are natural repository of diverse biologically active molecules amongst them protease inhibitors. *C. leiandra* (Fabaceae, Caesalpinioideae) is an unexploited plant native to the Amazon rainforest that is employed as alternative medicine. It is used as a natural laxative and helps relieve itching (VIANA *et al.*, 2011). Dias *et al.* (2017) have recently purified and characterized the trypsin inhibitor CITI from *C. leiandra* seeds and showed that it has insecticidal activity against *Aedes aegypti*. Indeed, CITI

reduced the activity of the midgut proteases of *A. aegypti*, promoted acute toxicity, and delayed the development and mortality of its larvae. Nevertheless, little is still known on the biological properties of proteins from *C. leiandra*. In this present study, we reported that a cysteine protease inhibitor (CICPI) purified from *C. leiandra* seeds has antifungal activity against *Candida tropicalis*.

## **7 MATERIALS AND METHODS**

### **7.1 Chemicals**

DEAE-Cellulose, Papain-Sepharose 4B column, Superdex-75,  $\alpha$ -chymotrypsin (EC 3.4.21.1) and trypsin (EC 3.4.21.4) both from bovine pancreas, papain (EC 3.4.22.2) from papaya latex, bromelain (EC 3.4.22.32) from pineapple stem,  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) from human saliva, the electrophoresis reagents,  $N_{\alpha}$ -Benzoyl-DL-arginine  $\beta$ -naphthylamide hydrochloride (BANA), and 4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde (DMACA) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). The protein molecular weight markers used were obtained from GE Healthcare Life Science (New York, USA). The culture media were purchased from Himedia® Laboratories Pvt. Ltd. (Mumbai, India). All other chemicals used were of high purity grade.

### **7.2 Biological materials**

Identification of the plant species was done by the botanist and Dr. Glaucia Almeida de Moraes, of State University of Mato Grosso do Sul (UEMS). The *Cassia leiandra* mature seeds were collected at the campus of UEMS, Ivinhema City/MS-Brazil (Authorization and Information System on Biodiversity - SISBIO #47978-1). *Candida tropicalis* (clinical isolate) was obtained from the culture collection of the Emergent and Reemergent Pathogens Laboratory (LAPERRE) at the Department of Pathology and Legal Medicine of Federal University of Ceara (UFC), Fortaleza/CE-Brazil.

### 7.3 Protein extraction procedure from *C. leiandra* seeds

The soluble protein extract (SPE) from *C. leiandra* seeds was prepared according to Dias *et al.* (2017). The teguments of the mature seeds were removed and the cotyledons were ground in a coffee mill to obtain a fine powder. The fine seed flour was treated with *n*-hexane (1:10, m/v) to remove oil. After three changes at 4 h intervals for two days, hexane was removed and the defatted flour was dried under forced air flow at room temperature ( $25 \pm 2$  °C). The defatted flour was stored at -20 °C until use. To extract proteins, the defatted flour was homogenized (1:10, m/v) with 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, by continuous stirring for 3 h at 4 °C. The suspension was filtered through a fine-screen cloth and the homogenate was centrifuged at 12,000 *g* for 30 min at 4 °C (High-Speed Refrigerated Centrifuge, Hitachi, Japan). The supernatant obtained was dialyzed (cutoff 12 kDa) against the extracting buffer (three buffer changes a day for three consecutive days, 4 °C), under continuous stirring, to obtain SPE.

### 7.4 Inhibitor purification procedure

SPE (4.0 mL, containing 40.4 mg protein) was loaded on a DEAE-cellulose column (3 x 7 cm) equilibrated with 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5. The non-retained proteins, which showed high papain inhibitory activity, were eluted with the above buffer. The retained proteins were eluted with the equilibration buffer containing 0.1 M and 1 M NaCl. Elution was conducted at 60 mL.h<sup>-1</sup> flow rate and 6 mL fractions were collected. The active fractions were pooled, dialyzed (cutoff 12 kDa) against distilled water (1:25 fraction volume: distilled water; three changes a day for two days) at 4 °C, and were freeze-dried. The freeze-dried sample was dissolved in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing 0.2 M NaCl and it was centrifuged at 12,000 *g* for 15 min at 4 °C. The supernatant (2.5 mL, containing 1.55 mg protein) was applied onto a Papain-Sepharose 4B column (1 x 5 cm) pre-equilibrated with above buffer. The non-retained and retained proteins were eluted with the equilibration buffer and 0.1 M HCl, respectively. Fractions of 1 mL were collected at 60 mL.h<sup>-1</sup> flow rate and the protein elution was monitored at 280 nm (Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). The proteins retained on the Papain-Sepharose

4B column, with high antipain activity, were pooled, dialyzed (cutoff 12 kDa) against distilled water at 4 °C (1:300 fraction volume: distilled water; three changes for one day under continuous stirring,) and were filtrated through a Vivaspin 30 kDa MWCO (centrifugation at 4,000 g, 1h, 4 °C). The purified inhibitor, named *Cassia leiandra* Cysteine Protease Inhibitor (in short, *CICPI*) was obtained from the fraction that comprised the proteins with a molecular mass less than 30 kDa. *CICPI* was concentrated by centrifugation using Vivaspin 3 kDa as previously described. The *CICPI* samples obtained were stored at -20 °C until further analysis.

### 7.5 Protein quantification assay

Protein concentration was estimated following a dye-binding method previously described by Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA) as the standard protein.

### 7.6 Enzyme inhibition assay

This assay was conducted according to Abe *et al.* (1992), using  $N_{\alpha}$ -Benzoyl-DL-arginine  $\beta$ -naphthylamide hydrochloride (BANA) as substrate. The reaction mixture was prepared by addition of 20  $\mu$ L papain ( $0.025 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 100  $\mu$ L sample, 40  $\mu$ L of the activation solution and 340  $\mu$ L of 0.25 M sodium phosphate buffer, pH 6.0. The activation solution consisted of  $2 \times 10^{-3}$  M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and  $3 \times 10^{-3}$  M dithiothreitol (DTT) prepared in the above phosphate buffer. This mixture was incubated for 10 min at 37 °C and 200  $\mu$ L of  $10^{-3}$  M BANA, which was prepared in 1% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) and ultrapure water, were added to start the reaction. After 20 min incubation (37 °C in a water bath), the reaction was stopped by adding 500  $\mu$ L of 2% (v/v) HCl in ethanol. Then, 500  $\mu$ L of 0.06% (m/v) 4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde (DMACA) in ethanol were added and the resulting mixture was incubated for further 30 min at room temperature ( $25 \pm 2$  °C). Next, the absorbance of the reaction mixture was measured at 540 nm (Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). One papain inhibitory activity unit (IU) was defined as the decrease of 0.01 absorbance unit in relation to the absorbance of the inhibitor-free control mixture (100% of papain activity). The inhibitory activity was expressed in IU and the specific activity in IU per milligram protein ( $\text{IU}\cdot\text{mgP}^{-1}$ ).

## 7.7 Characterization of *CICPI*

### 7.7.1 Molecular mass determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry

To evaluate homogeneity and to determine the apparent molecular mass of *CICPI*, the samples (1.5 or 5  $\mu\text{g}$ ) was analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), according to Laemmli (1970). The sample was solubilized in 20  $\mu\text{L}$  of the sample buffer (0.0625 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 2% [m/v] SDS, 10% [v/v] glycerol and 0.01% [m/v] bromophenol blue). This mixture was boiled at 98  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min in the presence or absence of 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol. Next, it was centrifuged (12,000  $g$ , 15 min at 25  $^{\circ}\text{C}$ ) and it was loaded on a 12.5 or 17.5% (m/v) polyacrylamide gel (8.5 cm x 8.0 cm), which was prepared in 0.025 M Tris-HCl buffer, pH 8.8, containing 10% (m/v) SDS. The electrophoretic run was performed at 20 mA constant current and 150 volts (electrophoresis power supply-EP3501 XL, Armeshan Pharmacia®). Proteins were revealed with silver (BLUM; BEIER; GROSS, 1987). The molecular mass markers used were: phosphorylase B (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kDa). The apparent molecular mass of *CICPI* was calculated in relation to the molecular mass of the protein markers, which were run in parallel.

The average molecular mass of *CICPI* was also determined using Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (ESI-MS). *CICPI* was dissolved in a solution of 50% (v/v) acetonitrile containing 0.2% formic acid (v/v) to make up 60  $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . An aliquot (100  $\mu\text{L}$ ) was centrifuged at 8,000  $g$  for 5 min and the supernatant loaded into a nanoelectrospray source coupled to a Synapt HDMS ESI-Q-ToF mass spectrometer (Waters Corp., Milford, MA, USA), using a Hamilton syringe. The instrument was calibrated with phosphoric acid clusters. Mass spectra were acquired by scanning at  $m/z$  range from 1000 to 2100 and at 1  $\text{scan}\cdot\text{s}^{-1}$ . The mass spectrometer was operated in a positive mode, at 363 K source temperature and 3.5 kV capillary voltage. Data collection and processing were controlled by Mass Lynx 4.1 software (Waters).



### 7.7.2 Evaluation of the presence of carbohydrate

*CICPI* (4.0  $\mu\text{g}$ ) was submitted to SDS-PAGE (15%), as previously described. Next, the gel was stained following the Schiff's method (ZACHARIUS *et al.*, 1969) to assess the presence of carbohydrate covalently linked to the protein structure. The glycoprotein fetuin (10  $\mu\text{g}$ ) and the soybean trypsin inhibitor (10  $\mu\text{g}$ ) were used as the positive and negative control, respectively.

### 7.7.3 Analysis of the thermal and pH stability of *CICPI*

The lyophilized *CICPI* ( $1.8 \times 10^{-6}$  M) was resuspended in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, and it was incubated at 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 °C in a water bath for 20 minutes (JAMAL *et al.*, 2015). Then, the sample was kept in an ice-cold water bath for 10 minutes. After cooling, the residual inhibitory activity of the *CICPI* against papain was measured as detailed in 7.6. The pH stability of *CICPI* ( $6.0 \times 10^{-7}$  M) was assessed after solubilization of the sample in the following buffers, all at 0.05 M concentration: glycine-HCl pH 3.0; sodium acetate pH 5.0; sodium phosphate pH 7.0; Tris-HCl pH 9.0; and glycine-NaOH pH 11 (KLOMKLAO *et al.*, 2011). Incubation was done for 30 minutes at room temperature ( $25 \pm 2$  °C). Next, the sample was dialyzed against distilled water (three changes for one day, 4°C) and the residual papain inhibitory activity was examined as previously described.

### 7.7.4 Specificity assay

The activity of trypsin, chymotrypsin (bovine serine proteases) and bromelain (cysteine protease) was evaluated in the absence and presence of *CICPI* according to Erlanger *et al.* (1961), using azocasein as the substrate. Aliquots of 100  $\mu\text{L}$  *CICPI* ( $1.8 \times 10^{-6}$  M) were incubated in a water bath at 37 °C with 20  $\mu\text{L}$  of trypsin, chymotrypsin or bromelain solution all at  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  concentration prepared in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 0.02 M  $\text{CaCl}_2$  and 380  $\mu\text{L}$  of this buffer. After 15 min incubation, a 200  $\mu\text{L}$  aliquot of 1% (m/v) azocasein dissolved in the Tris-HCl buffer was added and the mixture was incubated for 30 min, 37 °C. The reaction was stopped by addition of 300  $\mu\text{L}$  20% (v/v) trichloroacetic acid.

The mixture was centrifuged (10,000 g, 10 min, room temperature) and 500  $\mu\text{L}$  of the supernatant were homogenized with 500  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH. The absorbance was recorded at 440 nm. The activity assay of the human salivary  $\alpha$ -amylase in the absence and presence of *CICPI* was performed according to Sudha *et al.* (2011). Aliquots (20  $\mu\text{L}$ ) of  $\alpha$ -amylase (0.1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  prepared in 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.9, containing 0.006 M NaCl) were incubated, at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 10 min, with 60  $\mu\text{L}$  *CICPI* ( $1.8 \times 10^{-6}$  M) dissolved in the above sodium phosphate buffer plus 170  $\mu\text{L}$  of the above buffer. The reaction was initiated by addition of 250  $\mu\text{L}$  of a 1% (m/v) starch solution. After 15 min, the reaction was stopped by addition of 500  $\mu\text{L}$  of 3,5-dinitrosalicylic acid (1% [m/v] in 1 M NaOH and 25% [m/v] potassium sodium tartrate). The mixture was boiled in a water bath for 10 min, diluted with 2.5 mL distilled water, cooled to room temperature ( $25 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ ) and the absorbance readings were taken at 540 nm. In all assays, the residual inhibitory activity in the presence of *CICPI* was calculated in relation to the enzyme activity (100%) in the absence of the inhibitor.

#### 7.7.5 $IC_{50}$ and kinetic analysis of inhibition

The concentration of *CICPI* capable of reducing the papain activity by 50% ( $IC_{50}$ ) was determined by incubating the papain with different concentrations of this inhibitor ( $3.0 \times 10^{-7}$  M at  $24.1 \times 10^{-7}$  M). To determine the mechanism of inhibition, the kinetic data of *CICPI* was analyzed using the Lineweaver-Burk double reciprocal plots ( $1/V$  vs.  $1/[S]$ , where  $V$  is the reaction velocity and  $[S]$  the substrate concentration). To determine the inhibition constant ( $K_i$ ) the Dixon plot ( $1/V$  vs.  $[I]$ , where  $[I]$  is the inhibitor concentration) was built. These above assays were conducted using *CICPI* at 0,  $6.0 \times 10^{-7}$  M, and  $9.0 \times 10^{-7}$  M final concentrations, the substrate BANA at  $0.5 \times 10^{-3}$  M,  $2.5 \times 10^{-3}$  M, and  $10 \times 10^{-3}$  M, and papain at  $0.025 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  concentration. The inhibitory activity of papain was performed as described in section 7.6. The reciprocal of the enzyme reaction rate was expressed as  $1/V$  (inhibition units (IU).  $\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) and  $K_i$  values were calculated from the intersection of the three lines plotted in the Dixon plot generated using three different BANA concentrations.

## 7.8 Biological activity

### 7.8.1 Anticandidal assay of *CICPI* against *Candida tropicalis*

The *in vitro* antifungal assay was conducted applying the microdilution technique, performed in Sabouraud dextrose broth, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), with modifications (2012). Aliquots (100  $\mu\text{L}$ ) of a *C. tropicalis* cell suspension ( $2.5 \times 10^3$  CFU.mL<sup>-1</sup>; absorbance of 0.1 at 600 nm) were incubated with 100  $\mu\text{L}$  *CICPI* in wells of polystyrene flat-bottom 96-well microtiter plates, for 48h, 37 °C, in the dark. *CICPI* was dissolved in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, and was two-fold serially diluted to  $6.0 \times 10^{-6}$  M,  $3.0 \times 10^{-6}$  M, and  $1.5 \times 10^{-6}$  M final concentrations, which were used in the anticandidal assay. All solutions used in the assay were sterilized in 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filters. The absorbance readings were monitored at 600 nm using an automated absorbance microplate reader (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, USA). The commercial antifungal Nystatin (Legrand®, 100 IU) at  $12.3 \times 10^{-5}$  M and 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, were used as positive (100% growth inhibition) and negative (100% growth) controls, respectively. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *CICPI* was defined as the minimal protein concentration that promotes 50% growth inhibition of the clinical isolate of *C. tropicalis* used in this study.

### 7.8.2 Evaluation of the action mode of *CICPI* on *Candida tropicalis*

#### 7.8.2.1 Reactive oxygen species (ROS) detection assay

Induction of ROS production by *CICPI* was verified according to Ding *et al.* (2016). Aliquots (100  $\mu\text{L}$ ) of the *C. tropicalis* cell suspension ( $2.5 \times 10^3$  CFU.mL<sup>-1</sup>) which were previously incubated with *CICPI* ( $3.0 \times 10^{-6}$  M) or 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5 (control) as described above (section 7.8.1). The mixture was centrifuged (2,000 g, 5 min, 25 °C, Mikro 200R centrifuge, Hettich, Germany) and the recovery cells were washed with 0.15 M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4, three times, by repeated centrifugations. Then,

2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), prepared in PBS, was added to  $10^{-5}$  M final concentration and the mixture was incubated for 30 min at 28 °C in the dark. Next, the cells were centrifuged at 2,000 g, 5 min, at 25 °C, and they were washed three times with 0.15 M PBS, pH 7.4, by centrifugation. The cells were observed under a fluorescence microscope (Eclipse 80i, Nikon, Japan; excitation and emission wavelengths of 340-380 nm and 435-485 nm, respectively). The presence of green fluorescence indicates ROS production.

#### 7.8.2.2 Scanning electron microscopy analysis

Scanning electron microscopy was used to visualize possible alterations in the morphology of the *C. tropicalis* cells exposed to CICPI according to Staniszevska *et al.*, with modifications (2013). The *C. tropicalis* cells were incubated with CICPI ( $3.0 \times 10^{-6}$  M) or with 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, as the negative control. After 48 h incubation, the mixture was centrifuged (3,000 g, 5 min, at 10 °C) and the cell pellets were fixed with 200 µL of the fixation solution [2.5% (v/v) glutaraldehyde prepared in 0.15 M Na-phosphate buffer, pH 7.2]. After fixation for 16 h at 25 °C, the cells were centrifuged as above, washed three times with 0.15 M Na-phosphate buffer, pH 7.2, by repeated centrifugations, and they were treated with 1.0% (m/v) osmium tetroxide for 10 min, at 25 °C. Next, the cells were centrifuged again and they were dehydrated using a gradient ethanol solution (30%, 70%, 100%, 100%, and 100% v/v), for 10 min each, followed by centrifugation as previously described. The cells were immersed in 50/50 ethanol/hexamethyldisilazane (HMDS) for 5 min and were centrifuged. The cell pellet was solubilized in 30 µL 100% (v/v) HMDS and it was transferred to a coverslip. After complete drying, the coverslip was assembled on stubs and coated with 20 nm gold layer using a PET coating machine (Q150TES, Quorum Technologies, England). The cells were assessed in a scanning electron microscope (Quanta 450 FEG, FEI Company, Hillsboro, USA).

#### 7.8.2.3 Cell membrane permeabilization assay

Aliquots (100 µL) of the *C. tropicalis* cells ( $2.5 \times 10^3$  CFU.mL<sup>-1</sup>) previously treated with CICPI ( $3.0 \times 10^{-6}$  M) or 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5 (control), as

described early (section 7.8.1), were incubated with 10  $\mu\text{L}$  of  $10^{-3}$  M propidium iodide for 1h at 35 °C under constant stirring (75 rpm) (REGENTE *et al.*, 2014). The cells were observed under a fluorescence microscope (Eclipse 80i, Nikon, Japan, excitation and emission wavelengths of 528-553 nm and 590-650 nm, respectively).

## 7.9 Statistical analysis

All experiments were conducted in triplicate and the results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. The statistical analysis was performed using the Assistat software (version 7.7 beta). The analysis of variance (ANOVA) was conducted followed by the Tukey test ( $p \leq 0.05$  denotes significant difference between the means).

# 8 RESULTS

## 8.1 *CICPI* purification

The purification procedure of the cysteine protease inhibitor from *C. leiandra* seeds involved 4 steps: extraction (SPE), two subsequent chromatography techniques (DEAE-Cellulose and Papain-Sepharose 4B), and ultrafiltration through Vivaspin 30 kDa. The dialyzed extract (SPE, 36.89 IU.mg<sup>-1</sup> protein), which contained the protein of interest, was loaded on DEAE-Cellulose column and separated into three protein fractions (Fig. 3A). The non-retained proteins (175.89 IU.mg<sup>-1</sup> protein) presented antipapain activity. The fractions were pooled, lyophilized, and applied on a Papain-Sepharose 4B affinity column (Fig. 3B). The adsorbed proteins were pooled and showed the highest inhibitory activity against papain (1,812.50 IU.mg<sup>-1</sup> protein). The purified inhibitor, named *CICPI* (5,166.67 IU.mg<sup>-1</sup>), was obtained after the adsorbed proteins from the affinity column were filtrated through Vivaspin 30 kDa (Table 4). The purification procedure provided 140.05-fold purification and 4.36% protein yield. At each purification step, the fraction obtained was examined by SDS-PAGE (Fig. 4A). At the last protein purification stage, a single protein band was visualized (Fig. 4A, track 4), which suggests that *CICPI* was of high purity grade.

## 8.2 Biochemical characterization of *CICPI*

### 8.2.1 *Molecular mass, and sulfhydryl and carbohydrate contents*

On SDS-PAGE, *CICPI* migrated as a single protein band with an apparent molecular mass of 16.63 kDa (Fig. 4B), irrespective whether it was in the absence or presence of the disulfide bond reducing agent  $\beta$ -mercaptoethanol. Staining with the Schiff's reagent indicated the lack of carbohydrate covalently linked to *CICPI* (Fig. 4C). The deconvoluted mass spectra of *CICPI* obtained by ESI-MS revealed a major ion of 18.362 kDa molecular mass (Fig. 5).

### 8.2.2 *Thermal and pH stability*

*CICPI* preserved 81% of its antipapain activity (Fig. 6A) when incubated at 60 °C for up 20 minutes. Above 60 °C, the inhibitory activity decreased steadily and at 100 °C the inhibitor lost 57% activity. Incubation of *CICPI* at pHs between 7.0-9.0 did not significantly affect the inhibitor, but the highest inhibitory activity (40.5%) was achieved at pH 7.0 (Fig. 6B). The antipapain activity of *CICPI* decreased by 50% at lower (3.0-5.0) as well as higher (11.0) pHs.

### 8.2.3 *Specificity*

*CICPI* strongly inhibited the cysteine protease papain, but it was less effective against bromelain (Table 5). However, *CICPI* was a weak inhibitor of the serine proteases trypsin and chymotrypsin. Alpha-amylase was not inhibited.

### 8.2.4 *IC<sub>50</sub>, mechanistic of inhibition, and K<sub>i</sub>*

The IC<sub>50</sub> of *CICPI* against papain was  $8.5 \times 10^{-7}$  M (Fig. 7A). The V<sub>max</sub> of the reaction in the presence of *CICPI* decreased as a function of the increased inhibitor

concentration (Fig. 7B). Therefore, an uncompetitive mechanism of inhibition took place. The  $K_i$  value for papain was  $4.1 \times 10^{-7}$  M (Fig. 7C), which suggests a high affinity of *CICPI* toward this cysteine protease.

### 8.3 Anticandidal activity

*CICPI* exhibited antifungal activity against *C. tropicalis*. Inhibition of 75%, 54%, and 41% yeast growth were achieved at the inhibitor concentrations of  $6.0 \times 10^{-6}$  M,  $3.0 \times 10^{-6}$  M and  $1.5 \times 10^{-6}$  M, respectively. The MIC value was  $2.6 \times 10^{-6}$  M (Fig. 8). Investigation of the antifungal mechanism of *CICPI* revealed that ROS overproduction was not apparently involved. Indeed, DCFH-DA fluorescence was not observed in the *C. tropicalis* cells after exposure to *CICPI* (images not shown). However, *C. tropicalis* cells treated with *CICPI* were deformed. They were elongated, irregular, and have a wrinkled surface (Fig. 9B, C), whereas control cells presented oval shape, smooth surface, and no leakage of the cytoplasmic materials (Fig. 9A). Moreover, *CICPI* induced the appearance of truncated bud scars located at the cell pole of tube-like cells (Fig. 9B, arrows) and deep craters (Fig. 9C). *CICPI* also altered the *C. tropicalis* membrane permeability. This was indicated by the uptake of PI followed by its binding to the cell nucleic acids, which resulted in the emission of red fluorescence (Fig. 10).

## 9 DISCUSSION

This study shows that *Cassia leiandra*, an unexploited plant native to the Amazon rainforest, is a repository of bioactive molecules that can be exploited for the discovery of antifungal drugs. *CICPI* was isolated from *C. leiandra* seeds by a protocol that differs from those usually employed to purify protease inhibitors. Very often, purification of cysteine protease inhibitors starts with the precipitation of proteins from an extract by ammonium sulfate followed by gel filtration chromatography. *CICPI* was purified from SPE using ion exchange chromatography on DEAE-cellulose, followed by Papain-Sepharose 4B affinity chromatography and ultrafiltration (Fig. 3, Tab. 4). A 4.36% yield and 140.05-fold purification were achieved. A yield of 3.6% was attained for the inhibitor PdKI-2 from

*Pithecelobium dumosum* (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Actually, cysteine protease inhibitors have been purified at varied yields from several plant sources, such as rice (ABE *et al.*, 1987), maize (YAMADA *et al.*, 2000), soybean (MISAKA; KURODA; IWABUCHI, 1996), tomato (WU; HAARD, 2000) and cowpea (DIOP *et al.*, 2004).

On SDS-PAGE a molecular mass of 16.63 kDa was calculated for *CICPI* (Fig. 4A, B), whereas ESI-MS revealed a molecular mass of 18.362 kDa (Fig. 5). Such difference between these values is because by SDS-PAGE the molecular mass is apparent. Nevertheless, generally, the inhibitors so far purified have molecular mass varying from around 9 to 26 kDa (OLIVEIRA; XAVIER-FILHO; SALES, 2003). The finding that a unique protein band was revealed after SDS-PAGE, in the absence of presence of  $\beta$ -mercaptoethanol, indicates the lack of intermolecular disulfide bridges (Fig. 4B). Moreover, *CICPI* is not, apparently, a glycoprotein (Fig. 4C). The cystatin inhibitor purified from *Allium sativum* has a single polypeptide subunit and it is not a glycoprotein (SIDDIQUI; AHMED; BANO, 2017). Usually, phytocystatins are not glycoprotein, contrary to animal cystatins classified in the kininogen family that are glycoproteins (SHAMSI; PARVEEN; FATIMA, 2016). *CICPI* was specific for cysteine proteases papain and did not efficiently inhibit the serine proteases trypsin and chymotrypsin and neither the endoglycosidase  $\alpha$ -amylase (Table 5). These biochemical characteristics suggest that *CICPI* belongs to group I of phytocystatin family (MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

*CICPI* was stable at 60 °C for 20 minutes (Fig. 6A). This result is comparable to those observed for the inhibitors purified from the seeds of mustard (*Brassica alba*) (AHMED; SHAMSI; BANO, 2016) and *B. juncea* (KHAN *et al.*, 2016). *CICPI* was stable in pHs between 7-9 (Fig. 6B). However, its inhibitory activity against papain significantly decreased in acid and basic pHs. This result is similar to those reported for the phytocystatins purified from *Allium sativum* (GPC) and *Brassica alba* (YMP) that were stable in the pH range from 6 to 8 (SIDDIQUI; AHMED; BANO, 2017; AHMED; SHAMSI; BANO, 2016). Some phytocystatins are stable over a broad range of pH like those from *Hordeum vulgare* seeds (EL-LATIF, 2015) and from *Hevea brasiliensis* cell suspension (BUNYATANG; CHIRAPONGSATONKUL; CHURNGCHOW, 2013). Moreover, the bifunctional inhibitors, which have antipapain-antitrypsin activity, have the ability to withstand a wide range of temperature and pH (OLIVEIRA *et al.*, 2007).



The  $IC_{50}$  value for *CICPI* was  $8.5 \times 10^{-7}$  M (Fig. 7A). It is much higher than that for the barley PI ( $0.17 \times 10^{-7}$  M) (EL-LATIF, 2015). Most cystatins are competitive, reversible, tight binding inhibitors (BENCHABANE *et al.*, 2010; TURK; STOKA; TURK, 2008). However, *CICPI* exhibited uncompetitive-type kinetics, as constant slopes were obtained independent of the substrate concentration (Fig. 7B). In this mechanism the inhibitor interacts only with the complex formed between the enzyme and the substrate (ES complex) at a region other than the catalytic site, to form the enzyme-substrate-inhibitor complex (ESI). This means that the binding site for the inhibitor is accessible only after the enzyme has bound to its substrate. Uncompetitive-type inhibitors decrease  $K_m$  due to their greater affinity to the ES complex but decrease  $V_{max}$  because they interfere negatively, by an allosteric like effect, with the binding of the enzyme to its substrate, which slows down the reaction velocity (CORNISH-BOWDEN, 2014). Monti *et al.* (2004) also purified an uncompetitive inhibitor from *Carica papaya* and Sheraz *et al.* (2017) isolated a phytocystatin from a chickpea (*Cicer arietinum*) that has a competitive inhibition kinetic. The phytocystatins from *Hevea rubber* (BANGRAK; CHOTIGEAT, 2011) and *Amaranthus hypochondriacus* (VALDES-RODRIGUEZ *et al.*, 2010) exhibited a non-competitive type of inhibition to papain. The  $K_i$  value for *CICPI* was  $4.1 \times 10^{-7}$  M (Fig. 7C). This data is lower in comparison with  $5.1 \times 10^{-7}$  M calculated for PdKI-2, a trypsin-papain inhibitor purified from the seeds of *Pithecelobium dumosum* (OLIVEIRA *et al.*, 2007), but higher than the phytocystatin from *Sesamum indicum* that exhibited  $K_i$  of  $0.789 \times 10^{-7}$  M for papain (SHYU *et al.*, 2004). Both  $IC_{50}$  and  $K_i$  values suggest that *CICPI* has a high affinity for the complex ES (papain-BANA).

It is well known that phytocystatins have inhibitory effects on the growth and development of herbivores and phytopathogens (ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015; WEN *et al.*, 2004; POPOVIC *et al.*, 2013; ANDRADE *et al.*, 2010; SENTHILKUMAR; CHENG; YEH, 2010). However, there are few studies in which phytocystatins were tested against human pathogens. Sharma *et al.* (2006) purified two *Phaseolus mungo* cystatins (PMC I and II) and showed their inhibitory effect against the human pathogens *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Melo *et al.* (2018) reported that CaneCPI-4, a cystatin isolated from sugarcane, inhibits the cysteine protease from *Plasmodium falciparum*, a protozoan parasite that causes malaria in humans.

This study is the first report on a papain inhibitor with anticandidal activity (Fig. 8) purified from a plant species from the Amazon rainforest. *CICPI* promoted 75% and 50% inhibition of *C. tropicalis* growth, after 48h, at  $6.0 \times 10^{-6}$  M and  $2.6 \times 10^{-6}$  M concentrations, respectively. The Kunitz-type trypsin inhibitor purified from *Enterolobium timbouva* (EtTI) (OLIVEIRA *et al.*, 2018) showed a minimal protein concentration of  $21.63 \times 10^{-6}$  M to inhibit 50% *C. tropicalis* growth. For the seed proteins *Mo-CBP*<sub>2</sub>, *Mo-CBP*<sub>3</sub>, and *Mo-CBP*<sub>4</sub>, purified from *Moringa oleifera*, the minimal protein concentration to inhibit 50% *C. tropicalis* growth was  $18.90 \times 10^{-6}$  M,  $303.98 \times 10^{-6}$  M, and  $300.12 \times 10^{-6}$  M, respectively (NETO *et al.*, 2017).

After exposed to *CICPI*, the *C. tropicalis* cells underwent deformation in the cell morphology and presented truncated bud scars at the tips of the tube-like cells (Fig. 9). Moreover, *CICPI* induced lysis of the yeast cell wall as clearly proved by propidium iodide (PI) uptake (Fig. 10) and SEM images (Fig. 9). PI is a cell impermeable dye and only interacts with DNA after damage in the plasma membranes. The inhibitor ILTI purified from *Inga laurina* (MACEDO *et al.*, 2016) and the lipid transfer proteins (Ca-LTP1) from *Capsicum annuum* (DIZ *et al.*, 2011) disrupted the cell wall of *C. tropicalis*.

## 10 CONCLUSIONS

This study shows that *C. leiandra*, an unexploited plant native to the Amazon rainforest, is a repository of bioactive molecules that can be exploited to develop biologically active drugs. Accordingly, a trypsin inhibitor named *CITI* purified from *C. leiandra* seeds has insecticidal activity against *A. aegypti* and has anticandidal activity against *C. albicans* (unpublish date). This current study shows that the papain inhibitor *CICPI* has antifungal activity against *C. tropicalis*. Therefore, these two novel protease inhibitors (*CITI* and *CICPI*) from *C. leiandra* seeds must be further exploited to develop new compounds capable of replacing or work synergistically with the conventional drugs available in the market.

## **Acknowledgments**

We are grateful to the Center of Advanced Microscopy and Microanalysis (Central Analytical facilities) at the Federal University of Ceara, Brazil, for the Scanning Electron Microscopy (SEM) analyses.

## **Competing interest**

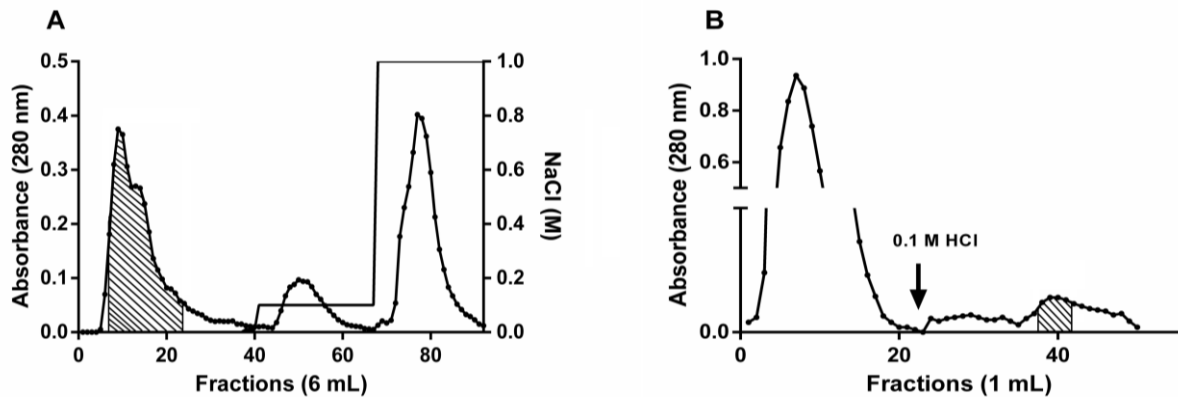
The authors declare no competing financial interest.

## **Author's contributions**

JTAO, IMV, IRSM, and LPD participated in the conception and design of the study. IRSM, LPD, NMSA, GAM, and TFM executed most of the experimental procedures and acquisition of data. CSN and RFC performed of the mass spectrometry experimental procedures. JTAO, IMV, IRSM, and LPD interpreted the data. JTAO, IMV, IRSM, and LPD contributed with the manuscript preparation. JTAO, IMV and LPD revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## **Fundings**

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES), Project: Prospective analyzes and applications of vegetal resources of the Amazonian forest (Pro-Amazon - Biodiversity and Sustainability), Finance Code 3267/2013; and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number 308107/2013-6 and 306202/2017-4 to JTAO and Project Finance Code 431511/2016-0 to IMV. IRSM was the recipient of a CAPES fellowship from the Pro-Amazon - Biodiversity and Sustainability project (2013/12577-0).



**Figure 3 - Chromatographic steps for purification of CICPI.** (A) The elution profile of the soluble protein extract (SPE), applied (40.4 mg protein) on a DEAE-Cellulose column. The non-retained proteins were eluted with 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, at  $60 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  flow rate, and 6 mL fractions collected. (B) Elution profile of the non-retained proteins (1.55 mg) obtained from the DEAE-Cellulose column, which has antipain activity, loaded on the Papain-Sepharose 4B column. The adsorbed proteins were eluted with 0.1 M HCl and 1.0 mL fractions were collected at a  $60 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  flow rate. In (A) and (B) the hatched areas indicate the fractions with antipain activity.

**Table 4**  
Purification steps of *CICPI*

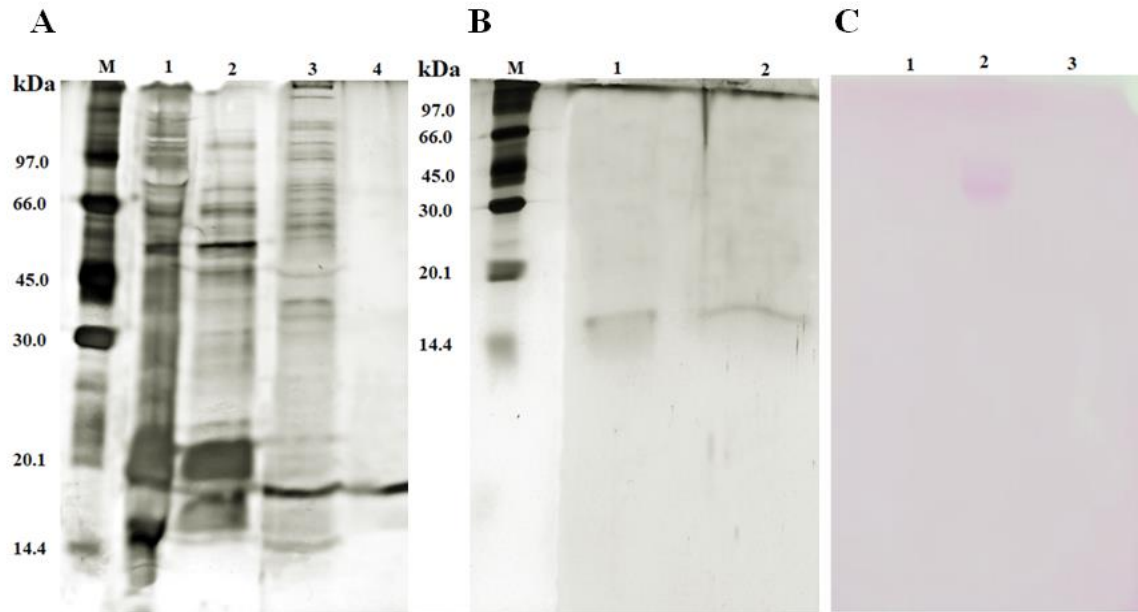
Steps	Total protein (mg) <sup>a</sup>	Total inhibitory activity (IU) <sup>b</sup>	Specific activity (IU. mg <sup>-1</sup> protein)	Purification fold (x) <sup>c</sup>	Yield (%) <sup>d</sup>
Soluble Protein Extract (SPE)	1,799.76	66,394.00	36.89	1.00	100
DEAE-cellulose	109.78	19,309.44	175.89	4.77	29.08
Papain-sepharose 4B	8.83	16,002.20	1,812.25	49.12	24.10
<i>CICPI</i>	0.56	2,896.95	5,173.12	140.23	4.36

<sup>a</sup> Total amount of protein recovered from 27 g of defatted flour from *C. leiandra* seeds.

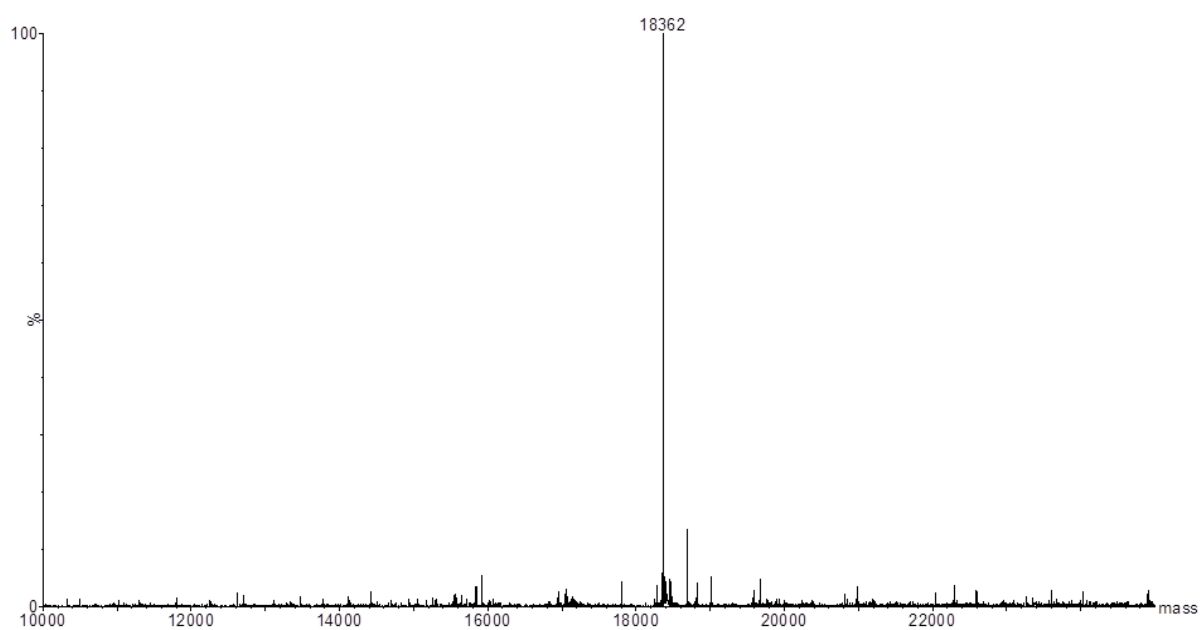
<sup>b</sup> One papain inhibitory activity unit (IU) was defined as the decrease of 0.01 absorbance unit at 540 nm.

<sup>c</sup> Purification fold was calculated as the ratio between the specific activity of each purification step and SPE (considered 1.0).

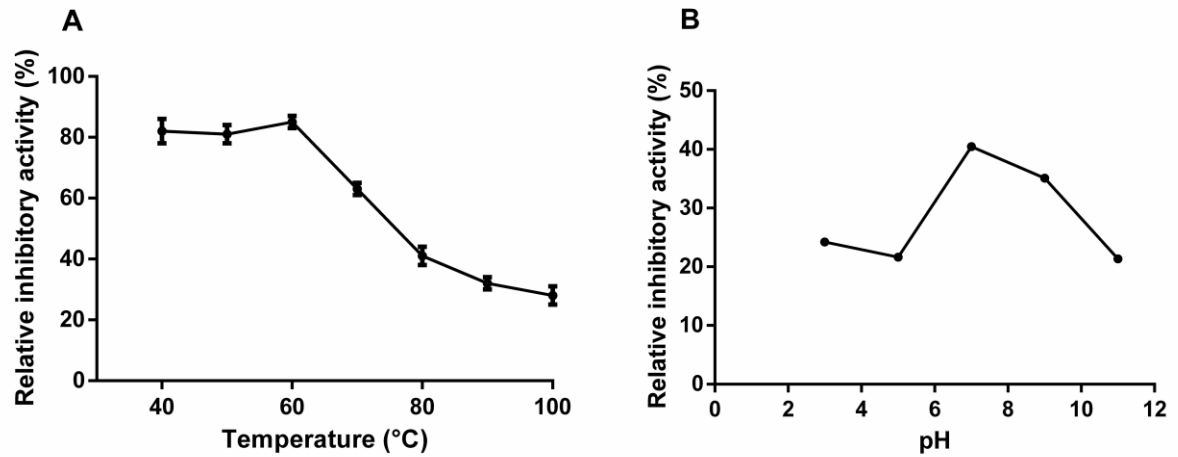
<sup>d</sup> It was calculated in relation to the total inhibitory units of SPE (100% yield).



**Figure 4 - Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS (SDS-PAGE).** (A) SDS-PAGE (12.5%) profiles of the fractions obtained during the purification process. Lane (M), molecular mass markers; (1) 5  $\mu\text{g}$  of the soluble protein extract; (2) 5  $\mu\text{g}$  of the non-retained proteins on DEAE-Cellulose; (3) 1.5  $\mu\text{g}$  of the retained proteins on Papain-Sepharose 4B; (4) 1.5  $\mu\text{g}$  of *CICPI*. (B) SDS-PAGE (17.5%) in the absence and presence of the reduction agent  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME). Lane (M), molecular mass markers; (1) 1.5  $\mu\text{g}$  *CICPI* without  $\beta$ -ME; (2) 1.5  $\mu\text{g}$  *CICPI* with 5% (v/v)  $\beta$ -ME. In (A) and (B) proteins were silver stained. (C) SDS-PAGE (15%) stained with the Schiff's reagent for carbohydrate detection. Lane (1), 4  $\mu\text{g}$  of *CICPI*; (2) 10  $\mu\text{g}$  of fetuin (glycoprotein, positive control); (3) 10  $\mu\text{g}$  of soybean trypsin inhibitor (negative control).



**Figure 5 - Deconvoluted electrospray ionization mass spectrum (ESI-MS) of ClCPI. The exact molecular mass is depicted.**



**Figure 6 - Thermal and pH stability of CICPI.** (A) Inhibitory activity after incubation of *CICPI* for 20 min at temperatures varying from 40 to 100 °C. (B) pH stability after incubation of *CICPI* for 30 min at  $25 \pm 2$  °C, at the pH range of 3.0 to 11.0. The residual papain inhibitory activity was measured using BANA as substrate. The bars represent standard deviation of three replicates.

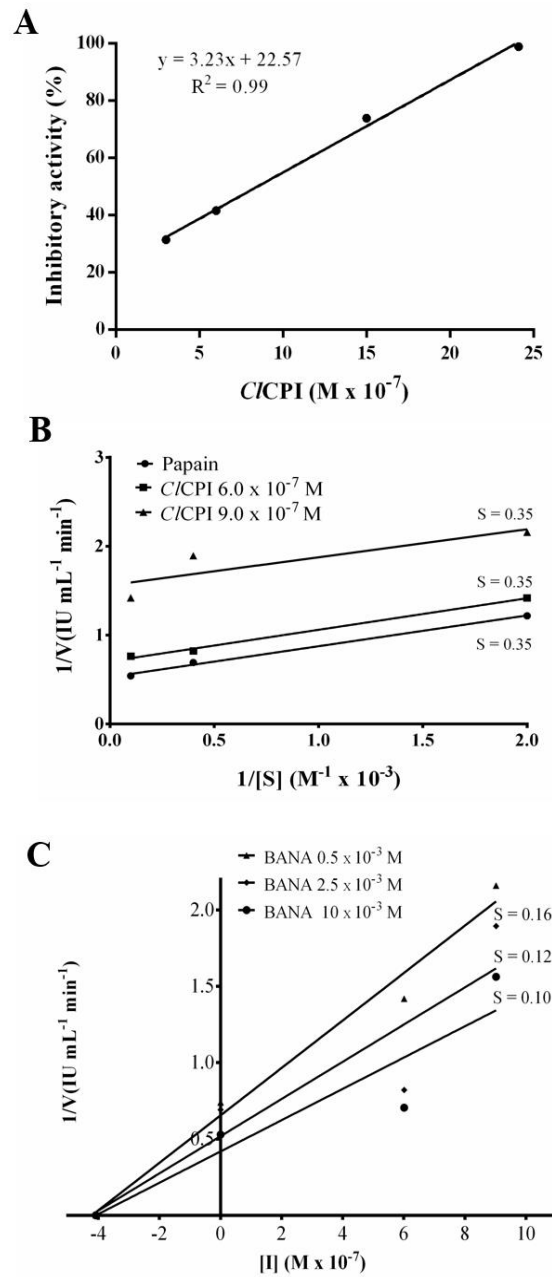


**Table 5**

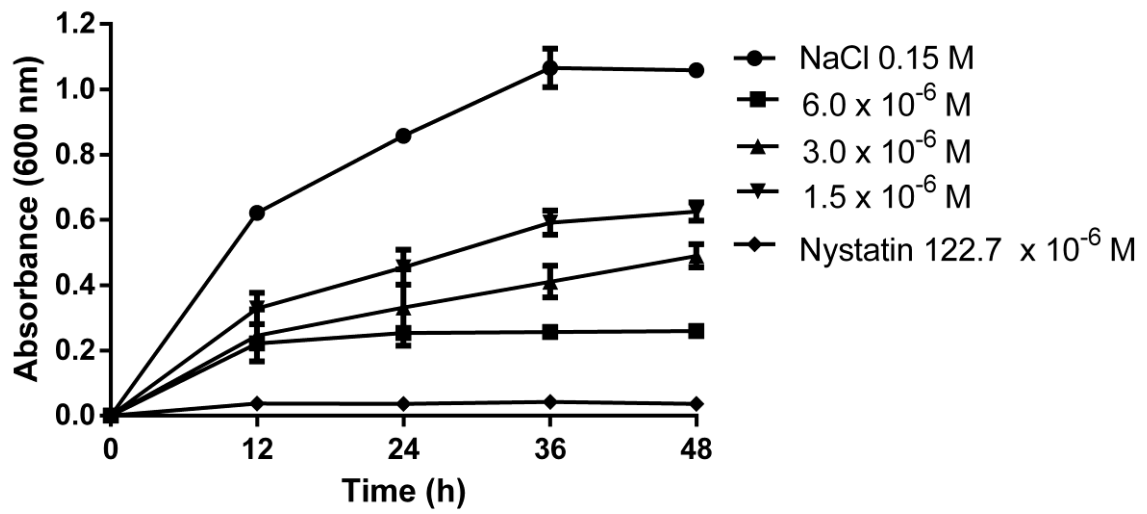
Relative inhibitory activity of *CICPI* against serine and cysteine proteinases and alpha-amylase

<b>Enzymes</b>	<b><sup>a</sup>Inhibition (%)</b>
Serine proteinases	
Trypsin	8.45 ± 0.01
Chymotrypsin	7.20 ± 0.00
Cysteine proteinases	
Bromelain	28.49 ± 0.00
Papain	80.83 ± 0.00
Oligosaccharide endoglycosidase	
Alpha-amylase	9.40 ± 0.03

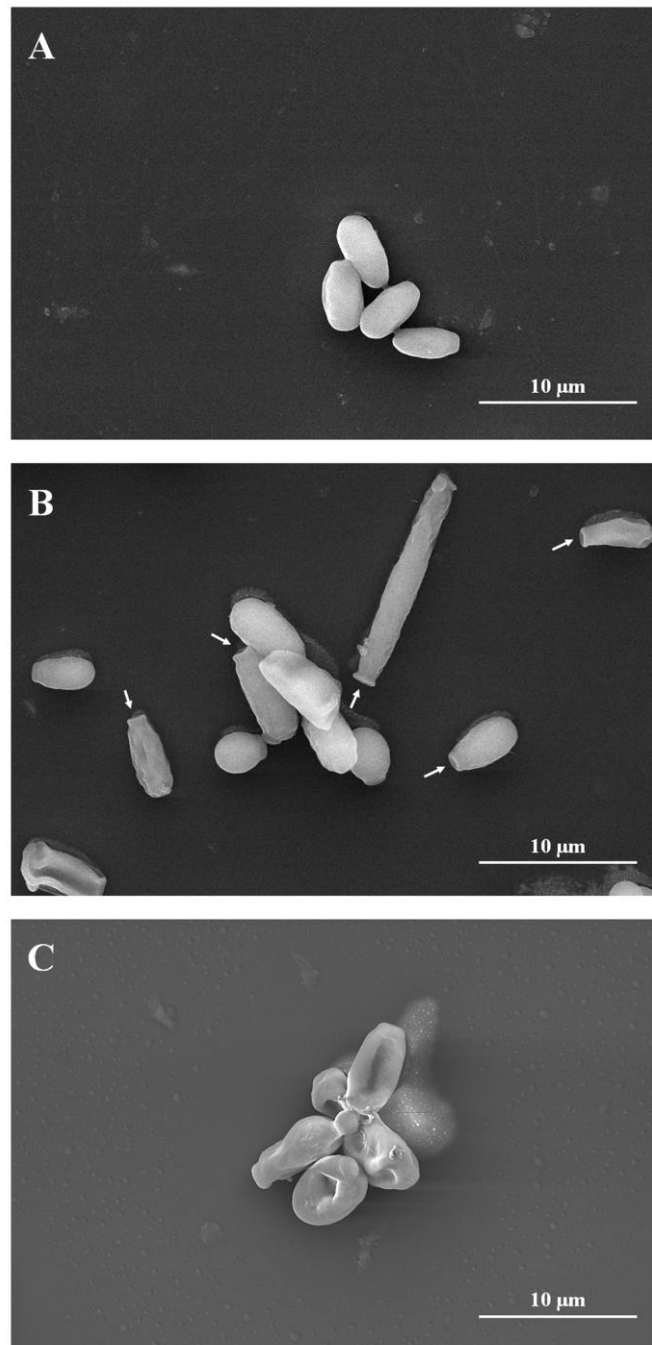
<sup>a</sup>The assays were performed with  $1.80 \times 10^{-6}$  M of *CICPI*.



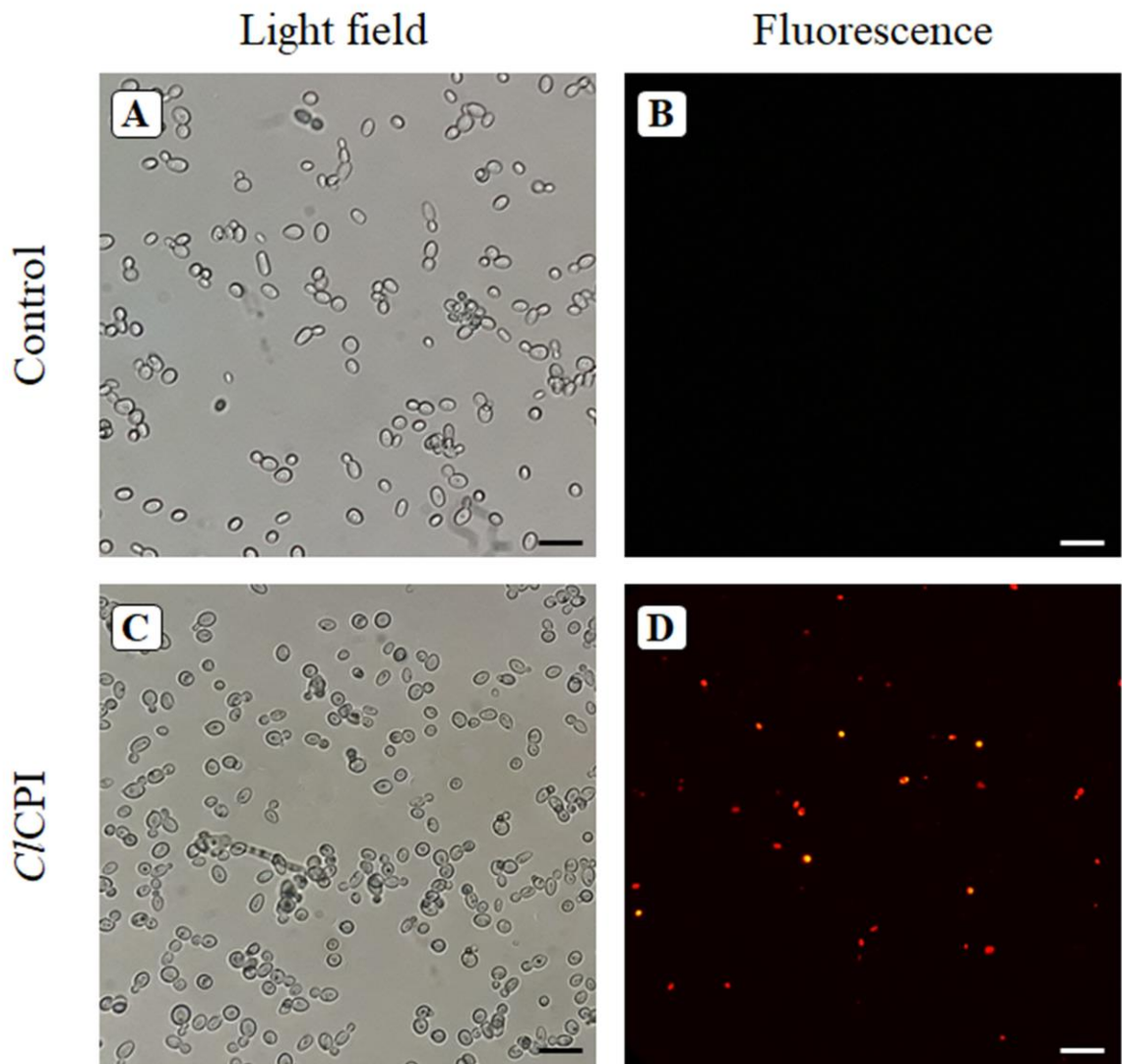
**Figure 7 - Inhibition parameters of *ClCPI* against papain.** (A) Relationship between the inhibitory activity (%) versus *ClCPI* concentration to calculate  $IC_{50}$  value of *ClCPI* ( $8.5 \times 10^{-7} M$ ). (B) The Lineweaver-Burk double-reciprocal plot of *ClCPI* at different concentrations showing the uncompetitive inhibition mechanism. (C) Dixon plot to assess the inhibition constant ( $K_i = 4.1 \times 10^{-7} M$ ) of *ClCPI*.



**Figure 8 - *Candida tropicalis* growth curves.** The yeast cells were cultured in the presence of Nistatin, 0.15 M NaCl, or *CICPI*. The cell growth was evaluated for up to 48 h incubation by measuring the absorbance at 600 nm. Data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation.



**Figure 9 - SEM images of *Candida tropicalis*.** (A) The yeast cells were treated with 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5 (control). They have homogeneous, well defined, and organized surfaces. (B-C) The *C. tropicalis* cells were treated with *CICPI* dissolved in the sodium phosphate buffer for up to 48 h. They exhibited anomalies in the cell surface. The arrow in (B) depicts truncated bud scars at the tips of the tube-like cells.



**Figure 10 - Fluorescence microscopy of *Candida tropicalis* cells.** Cells were incubated with 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.5 (**A**, **B**: control) or C/CPI (**C**, **D**) dissolved in the sodium phosphate buffer. The presence of red fluorescence in (**D**) indicates that the *C. tropicalis* cells internalized propidium iodide (PI). Bars = 20  $\mu$ M.

## 11 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O *CICPI* é um inibidor de protease cisteínica, isolado a partir de uma planta da Amazônia, com atividade anti-*Candida* com potencial para uso como antifúngico no tratamento de infecções causadas por *Candida tropicalis*. Contudo, é necessário realizar outros experimentos para esclarecer o modo de ação do inibidor e verificar a toxicidade às células de mamíferos, a fim de se iniciar as análises farmacológicas.

Os experimentos propostos para elucidar o modo de ação do inibidor são: teste de TUNEL para verificar a formação de poros e PCR em tempo real para analisar a expressão de genes em *Candida*, como *fks1*, *egr11* e *mdr1* relacionados a formação de glucanos, biofilme, biossíntese de ergosterol e efluxo de drogas.

Para contornar o baixo rendimento de purificação do inibidor, bem como a dificuldade para se coletar as sementes de *Cassia leiandra*, após o sequenciamento da proteína, poderia ser realizada a construção de peptídeos bioinspirados no *CICPI*.

## REFERÊNCIAS

- ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUZUKI, K.; ARAI, S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 35, p. 16793–16797, dec. 1987.
- ABE, K.; KONDO, H.; WATANABE, H.; EMORI, Y.; ARAI, S. Oryzacystatins as the first well-defined cystatins of plant origin and their target proteinases in rice seeds. **Biomedica Biochimica Acta**, v. 50, n. 4-6, p. 637-641, nov. 1991.
- ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin: Molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 933-937, jul. 1992.
- AGUIAR, J. M.; FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; BLOCH JR, C.; MONTEIRO, A. C.; FLORES, V. M.; JACINTO, T.; XAVIER-FILHO, J.; OLIVEIRA, A. E. A.; GROSSI-DE-SA, M. F.; FERNANDES, K. V. Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid pests. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 63, n. 3, p. 662-670, may 2006.
- AHMED, A.; SHAMSI, A.; BANO, B. Purification and biochemical characterization of phytocystatin from *Brassica alba*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, p. 223–231, jan. 2016.
- ANDRADE, L. B. S.; OLIVEIRA, A. S.; RIBEIRO, J. K. C.; KIYOTA, S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; SALES, M. P. Amazonian species displaying antifungal activity **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4145–4152, mar. 2010.
- ARAI, S.; MATSUMOTO, I.; EMORI, Y.; ABE, K. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6612-6617, sept. 2002.
- ARAÚJO, N. M. S. **Bioprospecção de proteínas antifúngicas em sementes de *Cassia leiandra* Benth. ativas contra *Candida* spp.** 2016. 80 f. Monografia (Graduação em Biotecnologia)-Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ARENDRUP, M. C. *Candida* and Candidaemia. Susceptibility and epidemiology. **Danish Medical Journal**, v. 60, n. 11, p. 1-30, nov. 2013.
- ARKCOLL, D. B. Some leguminous trees providing useful fruits in the north of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, p. 235 -239, jun. 1984.
- BANGRAK, P.; CHOTIGEAT, W. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cystatin from *Hevea rubber* latex, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 244–250, mar. 2011.
- BARIANI, A. B.; PANDO, S. C.; CARVALHO GONÇALVES, J. F.; CHEVREUIL, L. R.; JÚNIOR, A. D. R. N.; SOUZA, L. A. G. Análise do Perfil Proteico e da Atividade

Hemaglutinante no Extrato total de Sementes de *Peltogyne venosa*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 207-209, jul. 2007.

BEHR, J. B. Chitin synthase as an antifungal target: recent advances. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents**, v. 2, n. 2, p. 173-189, jun. 2003.

BENCHABANE, M.; SCHLÜTER, U.; VORSTER, J.; GOULET, M. C.; MICHAUD, D. Plant cystatins. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1657–1666, nov. 2010.

BLOM, C. W. P. M.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding: the survival strategies of plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 7, p. 290-295, jul. 1996.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93–99, jan. 1987.

BOSSCHE, H. V. Mechanisms of antifungal resistance. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 14, n. 2 p. 44-49, jun. 1997.

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

BUNYATANG, O.; CHIRAPONGSATONKUL, N.; CHURNGCHOW, N. Purification of a protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* cell suspension and its effect on the growth of *Phytophthora palmivora*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 185–192, apr. 2013.

CÂNDIDO, E. S.; PINTO, M. F. S.; PELEGRINI, P. B.; LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; POGUE, R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; FRANCO, O. L. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 10, p. 3290-3305, jul. 2011.

CARRILLO, L.; MARTINEZ, M.; RAMESSAR, K.; CAMBRA, I.; CASTANERA, P.; ORTEGO, F.; DIAZ, I. Expression of a barley cystatin gene in maize enhances resistance against phytophagous mites by altering their cysteine proteases. **Plant Cell**, v. 30, p. 101–112, nov. 2011.

CARVALHO, L. P.; SOARES, A. M. S.; COSTA, H. P. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; MELO, E. J. T. Intracellular *Toxoplasma gondii* elimination in presence of JcTI-I, a protease inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 4, n. 6, p. 87–92, jun. 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; 4<sup>th</sup> Informational Supplement. **CLSI Document M27-S4**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.

CONSIGLIO, A.; GRILLO, G.; LICCIULLI, F.; CECI, L. R.; LIUNI, S.; LOSITO, N.; VOLPICELLA, M.; GALLERANI, R.; LEO, F. PlantPIs – An interactive web resource on plant protease inhibitors. **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 5, p. 448–454, mar. 2011.



CORNISH-BOWDEN, A. **Principles of Enzyme Kinetics**. Butterworths & Co Ltd., London, 2014. 220 p.

CORR-MENGUY, F.; CEJUDO F. J.; MAZUBERT, C.; VIDAL, J.; LELANDAIS-BRIÈRE, C.; TORRES, G.; RODE, A.; HARTMANN, C. Characterization of the expression of a wheat cystatin gene during caryopsis development. **Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 687-698, nov. 2002.

DIAS, L. P.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; SOUSA, D. O. B.; COSTA, H. P. S.; ARAUJO, N. M. S.; CARVALHO, A. F. U.; TABOSA, P. M. S.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; LOBO, M. D. P.; MORENO, F. B. M. B.; ROCHA, B. A. M.; LOPES, J. L. S.; BELTRAMINI, L. M.; VASCONCELOS, I. M. A trypsin inhibitor purified from *Cassia leiandra* seeds has insecticidal activity against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 228–238, jun. 2017.

DIB, H. X.; OLIVEIRA, D. G. L.; OLIVEIRA, C. F. R.; TAVEIRA, G. B.; MELLO, E. O.; VERBISK, N. V.; CHANG, M. R.; CORRÊA JUNIOR, D.; GOMES, V. M.; MACEDO, M. L. R. Biochemical characterization of a Kunitz inhibitor from *Inga edulis* seeds with antifungal activity against *Candida* spp. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 2, p. 223-233, nov. 2018.

DING, Y.; LI, Z.; LI, Y.; LU, C.; WANG, H.; SHEN, Y.; DU, L. HSAF-induced antifungal effects in *Candida albicans* through ROS-mediated apoptosis. **RSC Advances**, v. 6, n. 37, p. 30895-30904, mar. 2016.

DIOP, N. N.; KIDRIČ, M.; REPELLIN, A.; GAREIL, M.; D'ARCY-LAMETA, A.; PHAM THI, A. T.; ZUILY-FODIL, Y. A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. **FEBS Letters**, v. 577, n. 3, p. 545–550, nov. 2004.

DIZ, M. S.; CARVALHO, A. O.; RIBEIRO, S. F. F.; CUNHA, M.; BELTRAMINI, L.; RODRIGUES, R.; NASCIMENTO, V. V.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annum*) seeds with novel  $\alpha$ -amylase inhibitory properties. **Physiologia Plantarum**, v. 142, p. 233–246, jul. 2011.

DUBEY, V. K.; PANDE, M.; SINGH, B. K.; JAGANNADAHAN, M. V. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 9, p. 1077-1086, may 2007.

EGGIMAN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 685–702, nov. 2003.

EL-LATIF, A. O. A. Isolation and purification of a papain inhibitor from Egyptian genotypes of barley seeds and its in vitro and in vivo effects on the cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (F.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 26–32, feb. 2015.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271–278, nov. 1961.

- FAN, C.; TIAN, Q.; HUANG, G.; ZHANG, L.; WU, Q.; ZHANG, K. *Candida tropicalis* burn wound sepsis: A series of histopathology-confirmed cases. **Intensive & Critical Care Nursing**, v. 46, p. 6-9, jun. 2018.
- FORASTIERO, A.; MESA-ARANGO, A. C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; ALCAZAR-FUOLI, L.; BERNAL-MARTINEZ, L.; PELAEZ, T.; LOPEZ, J. F.; GRIMALT, J. O.; GOMEZ-LOPEZ, A.; CUESTA, I.; ZARAGOZA, O.; MELLADO, E. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4769–4781, oct. 2013.
- FURLANETO, M. C.; JESUS ANDRADE, C. G. T.; FURLANETO-MAIA, L.; FRANÇA, E. J. G.; MORALES, A. T. P. Pathogenic attributes of non-*Candida albicans* *Candida* species revealed by SEM. In **Scanning Electron Microscopy. Intechopen**, p. 295-310, mar. 2012.
- GIRARD, C.; RIVARD, D.; KIGGUNDU, A.; KUNERT, K.; GLEDDIE, S. C.; CLOUTER, C.; MICHAUD, D. A multicomponent, elicitor-inducible cystatin complex in tomato, *Solanum lycopersicum*, **New Phytologist**, v. 173, n. 4, p. 841-851, jan. 2007.
- GOYAL, R. K.; MATTOO, A. K. Multitasking antimicrobial peptides in plant development and host defense against biotic/abiotic stress. **Plant Science**, v. 228, p. 135-149, nov. 2014.
- GRUDKOWSKA, M.; ZAGDANSKA, B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 3, p. 609-624, jul. 2004.
- HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEATH, C. H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, n. 2, p. 181-195, mar. 2011.
- HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **International Journal of Aromatherapy**, v. 12, n. 2, p. 83–91, june 2002.
- HAUGAASEN, T.; PERES, C. A. Floristic, edaphic and structural characteristics of flooded and unflooded forests in the lower Rio Purús region of central Amazonia, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 1, p. 25-35, mar. 2006.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, oct. 2002.
- HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J.; FISHMAN, J. A.; STEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A.; PFALLER, M. A.; CHANG, C. H.; WEBSTER, K. M. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1695–1703, jun. 2009.
- IBGE**. Disponível em: <http://ibge.gov.br/pt/biomas/Amazônia>. Acesso em: 6 mai. 2018.
- INGHAM, C. J.; BOONSTRA, S.; LEVELS, S.; LANGE, M.; MEIS, J. F.; SCHNEEBERGER, P. M. Rapid susceptibility testing and microcolony analysis of *Candida*

spp. cultured and imaged on porous aluminum oxide. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33818, mar. 2012.

JAMAL, F.; PANDEY, P. K.; SINGH, D.; AHMED, W. A Kunitz-type serine protease inhibitor from *Butea monosperma* seed and its influence on developmental physiology of *Helicoverpa armigera*. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 311–316, feb. 2015.

JAYATILAKE, J. A. M. S.; TILAKARATNE, W. M.; PANAGODA, G. J. Candidal onychomycosis: a mini-review. **Mycopathologia**, v. 168, n. 4 p. 165-173, oct. 2009.

JAYATILAKE, J. A. M. S. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 4, 235-250, apr. 2011.

JORDAO, A. A.; GEROLANA, D. Q.; LIMA, R. V. L.; SUCUPIRA, V. A. B. **Flora regional na medicina caseira**. Porto Velho: Rondônia, Secretaria de Estado de Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1986. 38 p.

KHAN, S.; AHMAD, S.; SIDDIQI, M. I.; BANO, B. Physico-chemical and in-silico analysis of a phytocystatin purified from *Brassica juncea* cultivar RoAgro 5444, **Biochemistry and Cell Biology**, v. 94, n. 6, p. 584-596, dec. 2016.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; CHAIJAN, M. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1348–1354, dec. 2011.

KOTHAVADE, R. J.; KURA, M. M.; VALAND, A. G.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 873–880, aug. 2010.

KUHN, D. M.; GEORGE, T.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1773–1780, jun. 2002.

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

LALUK, K.; MENGISTE, T. The Arabidopsis extracellular unusual serine protease inhibitor functions in resistance to necrotrophic fungi and insect herbivory. **The Plant Journal**, v. 68, n. 3, p. 480-494, nov. 2011.

LEITE, R. N.; ROGERS, D. S. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 13, n. 4, p. 639-664, jun. 2013.

LING, L. L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A. J.; SPOERING, A. L.; ENGELS, I.; CONLON, B. P.; MUELLER, A.; SCHABERLE, T. F.; HUGHES, D. E.; EPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDE, L.; STEADMAN, V. A.; COHEN, D. R.; FELIX, C. R.; FETTERMAN, K. A.; MILLETT, W. P.; NITTI, A. G.; ZULLO, A. M.; CHEN, C.; LEWIS,

K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, p. 455-459, jan. 2015.

MACEDO, M. L. R.; RIBEIRO, S. F. F.; TAVEIRA, G. B.; GOMES, V. M.; BARROS, K. M. C. A.; MARIA-NETO, S. Antimicrobial activity of ILTI, a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Inga laurina* (SW.) Willd. **Current Microbiology**, v. 72, p. 538–544, may 2016.

MAIA, L. M. A. **Frutos da Amazônia**: fonte de alimento para peixes. Manaus: INPA, 2001. 143 p.

MAIA, L. A.; CHALCO, F. P. Produção de frutos de espécies da floresta de várzea da Amazônia central importantes na alimentação de peixes. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 1, p. 45-54, mar. 2002.

MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 359, n. 1, p. 24–30, nov. 1998.

MARTÍNEZ, M.; ABRAHAM, Z.; CARBONERO, P.; DÍAZ, I. Comparative phylogenetic analysis of cystatin gene families from arabidopsis, rice and barley. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 273, n. 5, p. 423–432, jun. 2005.

MARTINS, T. F.; VASCONCELOS, I. M.; SILVA, R. G. G.; SILVA, F. D. A.; SOUZA, P. F. N.; VARELA, A. L. N.; ALBUQUERQUE, L. M.; OLIVEIRA, J. T. A. A Bowman–Birk inhibitor from the seeds of *Luetzelburgia auriculata* inhibits *Staphylococcus aureus* growth by promoting severe cell membrane damage. **Journal of Natural Products**, v. 8, n. 7, p. 1497–1507, jul. 2018.

MATTA, A. A. **Flora médica brasiliense**. 3 ed. Manaus: Valer, 2003. 356 p.

MAURYA, I. K.; PATHAK, S.; SHARMA, M.; SANWAL, H.; CHAUDHARY, P.; TUPE, S.; DESHPANDE, M.; CHAUHAN, V. S.; PRASAD, R. Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1732-1740, aug. 2011.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103-124, mar. 2016.

MEDEIROS, H.; OBERMÜLLER, F. A.; DALY, D. C.; SILVEIRA, M.; CASTRO, W.; FORZZA, R. C. Botanical advances in Southwestern Amazonia: The flora of Acre (Brazil) five years after the first Catalogue. **Phytotaxa**, v. 177, n. 2, p.101–117, aug. 2014.

MELO, P. M. S.; MALUF, S. E. C.; AZEVEDO, M. F.; PASCHOALIN, T.; BUDU, A.; BAGNARESI, P.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES-COSTA, A.; GAZARINI, M. L.; CARMONA, A. K. Inhibition of *Plasmodium falciparum* cysteine proteases by the sugarcane cystatin CaneCPI-4. **Parasitology International**, v. 67, n. 2, p. 233–236, apr. 2018.

MISAKA, T.; KURODA, M.; IWABUCHI, K., ABE, K.; ARAI, S. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization

from other cystatins of animal and plant origin. **European Journal of Biochemistry**, v. 240, n. 3, p. 609–614, sept. 1996.

MMA. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/amazonia>. Acesso em: 6. maio 2018.

MONTI, R.; CONTIERO, J.; GOULART, A. J. Isolation of natural inhibitors of papain obtained from *Carica papaya* latex. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 747–754, sept. 2004.

MÜNTZ, K. Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 10, p. 2391–2407, feb. 2007.

MYSTER, R. W. Plant communities of western Amazonia. **The Botanical Review**, v. 75, n. 3, p. 271–291, may 2009.

NC-IUBMB- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB Enzyme Nomenclature. Disponível em: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>. Acesso em: 2 de dez. 2018.

NETO, J. X. S.; PEREIRA, M. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; LOPES, T. D. P.; COSTA, H. P. S.; SOUSA, D. O. B.; ROCHA, B. A. M.; GRANGEIRO, T. B.; FREIRE, J. E. C.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; LOBO, M. D. P.; BRILHANTE, R. S. N.; VASCONCELOS I. M. A. Chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell membrane permeability and reactive oxygen species production. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–12, june 2017.

NETT, J. E.; SANCHEZ, H.; CAIN, M. T.; ROSS, K. M.; ANDES, D. R. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 12, p. 1660–1669, dec. 2011.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine proteinases and cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91–104, jan. 2003.

OLIVEIRA, L. F.; JORGE, A. O.; SANTOS, S. S. In vitro minocycline activity on superinfecting microorganisms isolated from chronic periodontitis patients. **Brazilian Oral Research**, v. 20, n. 3, p. 202–206, sept. 2006.

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

OLIVEIRA, P. C.; CAVALCANTE, S. Ethnobotany in the Amazon floodplain ecosystem: a case study, Quilombo Saracura, Pará, Brazil. **International Journal of Botany Studies**, v. 2, n. 1, p. 89-99, jan. 2017.

OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T.; TAVEIRA, G. B.; MELLO, E. O.; GOMES, V. M.; MACEDO, M. L. R. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor from *Enterolobium*

*timbouva* with activity against *Candida* species, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 645–653, nov. 2018.

PAROLIN, P. Seed germination and early establishment of 12 tree species from nutrient-rich and nutrient-poor Central Amazonian floodplains. **Aquatic botany**, v. 70, n. 2, p. 89-103, jun. 2001.

PELEGRINI, P. B.; FARIAS, L. R.; SAUDE, A. C. M.; COSTA, F. T.; BLOCH JR, C.; SILVA, L. P.; OLIVEIRA, A. S.; GOMES, C. E. M.; SALES, M. P.; FRANCO, O. L. A novel antimicrobial peptide from *Crotalaria pallida* seeds with activity against human and phytopathogens. **Current microbiology**, v. 59, n. 4, p. 400-404, oct. 2009.

PELEGRINI, P. B.; DEL SARTO, R. P.; SILVA, O. N.; FRANCO, O. L.; GROSSI-DE-SA, M. F. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. **Biochemistry Research International**, v. 2011 p. 1-9, mar. 2011.

PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. e1001067, oct. 2010.

PIRES, R. H.; SANTOS, J. M.; ZAIA, J. E.; MARTINS, C. H. G.; MENDES-GIANNINI, M. J. *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 646–654, sept. 2011.

POPOVIC, M.; ANDJELKOVIC, U.; BURAZER, L.; LINDNER, B.; PETERSEN, A.; GAVROVIC-JANKULOVIC, M. Biochemical and immunological characterization of a recombinantly produced antifungal cysteine proteinase inhibitor from green kiwifruit (*Actinidia deliciosa*), **Phytochemistry**, v. 94, p. 53–59, oct. 2013.

PRAXEDES, P. G.; ZERLIN, J. K.; DIAS, L. O.; PESSONI, R. A. B. A novel antifungal protein from seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 3, p. 687-692, aug. 2011.

RAMOS, M. V.; BRITO, D.; FREITAS, C. D. T.; GONÇALVES, J. F. C.; PORFIRIO, C. T. M. N.; LOBO, M. D. P.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; SOUZA, L. A. C.; FERNANDES, A. V. Proteomic identification and purification of seed proteins from native Amazonian species displaying antifungal activity. **Planta**, v. 248, n. 1, p. 197-209, jul. 2018.

RAWLING, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRET, A. J. Evolutionary families of peptidases inhibitors. **Journal Biochemistry**, v. 378, p. 705-716, mar. 2004.

REGENTE, M.; TAVEIRA, G. B.; PINEDO, M.; ELIZALDE, M. M.; TICCHI, A. J.; DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; LA CANAL, L.; GOMES, V. M. A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. **Current Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 88–95, jul. 2014.

RICHARDSON, M. Seeds storage proteins: the enzyme inhibitor. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 5, p. 259-305, 1991.

RUIZ-HERRERA, J.; SAN-BLAS, G. Chitin synthesis as a target for antifungal drugs. **Current Drug Targets – Infectious Disorders**, v. 3, n. 1, p. 77-91, mar. 2003.

RYAN, C. A. Proteases inhibitor in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 425-449, sept. 1990.

SAMARANAYAKE, L. P.; CHEUNG, L. K.; SAMARANAYAKE, Y. H. Candidiasis and other fungal diseases of the mouth. **Dermatologic Therapy**, v. 15, n. 3, p. 251–269, sept. 2002.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. J. S. M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, jan. 2013.

SELS, J.; MATHYS, J.; CONINCK, B. M.; CAMMUE, B. P.; BOLLE, M. F. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941-950, jun. 2008.

SENTHILKUMAR, R.; CHENG, C. P.; YEH, K. W. Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 1, p. 65–75, jan. 2010.

SHAMSI, T. N.; FATIMA, S. Protease inhibitors as ad-hoc antibiotics. **Open Pharmaceutical Sciences Journal**, v. 3, p. 131-137, jun. 2016.

SHAMSI, T. N.; PARVEEN, R.; FATIMA, S. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1120–1133, oct. 2016.

SHAO, L. C.; SHENG, C. Q.; ZHANG, W. N. Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. **Acta pharmaceutica Sinica**, v. 42, n. 11, p. 1129–1136, nov. 2007.

SHARMA, S.; RASHID, F.; BANO, B. Studies on low molecular mass phytocystatins purified from *Phaseolus mungo* (Urd). **Biochemistry**, v. 71, n. 4, p. 406–413, apr. 2006.

SHERAZ, A. B.; BHAT, W. F.; AALIYA, S.; SHAHNAWAZ, K. M.; RIZWAN, R. K.; BILQEES, B. Purification and biochemical characterization of a cystatin-like thiol proteinase inhibitor from *Cicer arietinum* (Chickpea). **Journal of Chromatography and Separation Technique**, v. 8, n. 6, p. 1–13, jan. 2017.

SHYU, D. J. H.; CHOU, W.-M.; YIU, T.-J.; LIN, C. P. C.; TZEN, J. T. C. Cloning, functional expression, and characterization of cystatin in sesame seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1350–1356, mar. 2004.

SIDDIQUI, M. F.; AHMED, A.; BANO, B. Insight into the biochemical, kinetic and spectroscopic characterization of garlic (*Allium sativum*) phytocystatin: Implication for cardiovascular disease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 734–742, feb. 2017.

- SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, mar. 2012.
- SILVA, R. G. G.; VASCONCELOS, I. M.; FILHO, A. J. U. B.; CARVALHO, A. F. U.; SOUZA, T. M.; GONDIM, D. M. F.; VARELA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. T. A. Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 48–55, aug. 2015.
- SOUZA, A. G. C.; SOUZA, N. R.; SILVA, S. E. L.; NUNES, C. D. M.; CANTO, A. C.; CRUZ, L. A. A. **Fruteiras da Amazônia**. Brasília: EMBRAPAS PI, 1996. 204 p.
- SOUZA, V. C.; BORTOLUZZI, R. L. C. **Cassia in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22863>. Acesso em: 8 set. 2018.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms : Traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1–13, jun. 2013.
- STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; SWOBODA-KOPEC, E.; SIENNICKA, K.; SYGITOWICZ, G.; KURZATKOWSKI, W. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 813–821, dec. 2013.
- SUDHA, P.; ZINJARDE, S. S.; BHARGAVA, S. Y.; KUMAR, A. R. Potent  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 1-5, jan. 2011.
- TURK, V.; STOKA, V.; TURK, D. Cystatins: Biochemical and structural properties, and medical relevance. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 14, p. 5406–5420, feb. 2008.
- UEDA, M.; YAMASHITA, T.; NAKAZAWA, M.; MIYATAKE, K.; OHKI, S.; SAKAGUCHI, M.; INOUE, K. Purification and characterization of a new serine protease (EF-SP2) with anti-plant viral activity from *Eisenia foetida*: Analysis of anti-plant viral activity of EF-SP2. **Process biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1711-1716, sept. 2011.
- VALDES-RODRIGUEZ, S.; CEDRO-TANDA, A.; AGUILAR-HERNANDEZ, V.; CORTES-ONOFRE, E.; BLANCO-LABRA, A.; GUERRERO-RANGEL, A. Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 6, p. 469–475, jun. 2010.
- VASCONCELOS, I. M.; MORAIS, J. K. S.; SIEBRA, E. A.; CARLINI, C. R.; SOUSA, D. O. B.; BELTRAMIN, L. M.; MELO, V. M. M.; OLIVEIRA, J. T. A. SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean [*Glycine max*] proteins, and its inhibitory effect on *Cercospora sojina* growth. **Toxicon**, v. 51, n. 6, p. 952–963, may 2008.
- VIANA, C. A. S.; PAIVA, A. O.; JARDIM, C. V.; RIOS, M. N. S.; ROCHA, N. M. S.;



PINAGÉ, G. R.; ARIMORO, O. A. S.; SUGANUMA, E.; GUERRA, C. D.; ALVEZ, M. M.; PASTORERELLI, J. F. **Plantas da Amazônia** : 450 espécies de uso geral. Brasília: Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011. 3140 p.

WALSH, T. A.; STRICKLAND, J. A. Proteolysis of the 85-kilodalton crystalline cysteine proteinase inhibitor from potato releases functional cystatin domains. **Plant Physiology**, v. 103, n. 4, p. 1227–1234, dec. 1993.

WEN, R.; ZHANG, S. C.; MICHAUD, D.; SANFAÇON, H. Inhibitory effects of cystatins on proteolytic activities of the Plum pox potyvirus cysteine proteinases. **Virus Research**, v. 105, p. 175–182, jul. 2004.

WU, J.; HAARD, N. F. Purification and characterization of a cystatin from the leaves of methyl jasmonate treated tomato plants. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127, p. 209–220, jun. 2000.

YAMADA, T.; OHTA, H.; SHINOHARA, A.; IWAMATSU, A.; SHIMADA, H.; TSUCHIYA, T.; MASUDA, T.; TAKAMIYA, K.-I. A Cysteine Protease from Maize Isolated in a Complex with Cystatin. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, n. 2, p. 185-191, feb. 2000.

YAN, J.; YUAN, S. S.; JIANG, L. L.; YE, X. J.; NG, T. B.; WU, Z. J. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 4961-4981, may 2015.

ZACHARIUS, R. M.; ZELL, T. E.; MORRISON, J. H.; WOODLOCK, J. J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p.148–152, jul. 1969.

ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R. Insect response to plant defensive protease inhibitors, **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 233–252, jan. 2015.