



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Beatriz Garcia Teodoro da Silva

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) DE  
ANIMAIS AQUÁTICOS**

Florianópolis  
2024

Beatriz Garcia Teodoro da Silva

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) DE  
ANIMAIS AQUÁTICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Rafael Diego da Rosa, Dr.  
Coorientador: Prof. Diogo Robl, Dr.

Florianópolis

2024

Silva, Beatriz Garcia Teodoro da  
Potencial antifúngico de peptídeos antimicrobianos  
(AMPs) de animais aquáticos / Beatriz Garcia Teodoro da  
Silva ; orientador, Rafael Diego da Rosa, coorientador,  
Diogo Robl, 2024.  
72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,  
2024.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Atividade  
antifúngica. 3. Fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs).  
4. Taquiplesina. 5. Magainina. I. Rosa, Rafael Diego da.  
II. Robl, Diogo. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências. IV. Título.

Beatriz Garcia Teodoro da Silva

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) DE ANIMAIS  
AQUÁTICOS**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 14 de dezembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Rafael Diego da Rosa, Dr.  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup>. Fabienne Ferreira, Dr<sup>a</sup>.  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup> Franceli R. Kulcheski, Dr<sup>a</sup>.  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biotecnologias.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Rafael Diego da Rosa, Dr.  
Orientador

Prof. Diogo Robl, Dr.  
Coorientador

Florianópolis, 2024.

Dedico este trabalho a vó Arlette, carinhosamente conhecida como Má, uma presença constante em todas as fases da minha jornada acadêmica. Agora, do plano espiritual, ela contempla a conclusão desta etapa com a mesma afetuosa presença que sempre iluminou meu caminho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço meu orientador, Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa, pela paciência e vontade de me ensinar e apoiar durante todos esses anos, pela excelente orientação não só em meu trabalho, mas também na minha vida pessoal. Sei que não fui uma orientanda fácil, mas tenha certeza de que dei meu melhor. Não foram anos fáceis, mas certamente muito proveitosos e de muito aprendizado.

Agradeço meu coorientador Diogo Robl por todo o apoio, orientação e por ser meu note em muitas fases desse trabalho. Sua contribuição foi fundamental e de extrema importância. Agradeço também por me ensinar tanto no estágio na docência e por ser uma fonte imensurável de inspiração em minha vida tanto pessoal como acadêmica.

Agradeço aos membros da banca Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabienne Ferreira e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Franceli R. Kulcheski por se disponibilizarem em avaliar e contribuir positivamente nesse trabalho.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e biociências pela oportunidade e formação prestada.

Agradeço às agências de fomento CAPES e CNPq pelo financiamento dos projetos que permitiram a realização deste trabalho, assim como pela bolsa fornecida.

Agradeço em especial a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Perazzolo por todos os ensinamentos, apoio e carinho ao longo dos últimos anos. Com certeza seu apoio espiritual foi fundamental para mim.

Agradeço ao Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC por todos os camarões cedidos para realização deste trabalho.

Agradeço à infraestrutura e ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC pelo excelente atendimento prestado.

Agradeço meus pais, Rosana e Aires, por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas. Nunca me negaram nada para que eu tivesse tudo e realizasse todos os meus sonhos. Amo vocês, e serei eternamente grata. Também agradeço a toda minha família que sempre me incentivou e me mantiveram firme nesse processo.

Agradeço ao Peterson, sua presença foi imensurável em todo meu mestrado. A amizade e a ajuda que me proporcionou, certamente, foi o que me deu forças para continuar, persistir e não desistir.

Agradeço a Juliana Ferreira e ao Gabriel Matos por todo o suporte experimental e emocional desde o início de minhas atividades no laboratório, e que mesmo do Pará e de Estocolmo não mediram esforços para me ajudar.

Agradeço meus colegas de laboratório Zé, Camila, Joana e Abdon. Foi muito bom ensinar e auxiliar vocês nesses últimos anos, além de todos os nossos momentos de descontração e parceria. E agradeço a Mainara, que foi o ponta pé inicial dessa aventura de fazer mestrado.

Agradeço ao Alef, que mesmo sendo de fora do mundo acadêmico, me apoiou e incentivou a ser uma pessoa mais focada e correr atrás dos meus objetivos, além de me fazer descobrir novas paixões. Certamente sua parceria e cumplicidade fizeram parte da minha caminhada e foram essenciais para o encerramento dessa etapa.

Agradeço a Cassiana, uma grande amiga que ficou do meu lado em momentos difíceis e me deu todo o auxílio, suporte e amizade para que eu pudesse chegar aqui. E agradeço também ao Eduardo, que se fez presente e me cativou, especialmente por entender exatamente cada passo do que é fazer um mestrado.

Por fim, mas não menos importante, todos os meus amigos e colegas que ajudaram direta ou indiretamente nesse trabalho.

Deixo aqui, meu muito obrigada de coração, a todos!

## RESUMO

Os fungos são organismos de grande relevância econômica, ambiental e biotecnológica. Apesar disso, algumas espécies são agentes etiológicos de enfermidades que ameaçam desde a saúde humana até setores do agronegócio (agricultura, pecuária e aquicultura). O caráter oportunista da maioria das doenças fúngicas, tem levado a negligência de muitas delas. Sendo assim, fazem-se necessários avanços no entendimento das relações fungo-hospedeiro e em ações mitigatórias para o controle dessas enfermidades. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas produzidas por diferentes organismos e que podem apresentar um amplo espectro de atividade antimicrobiana. Os AMPs de animais aquáticos, em especial, são moléculas com alto potencial biotecnológico devido ao seu mecanismo de ação diverso e por se manterem estáveis mesmo em ambientes salinos e altamente alcalinos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o espectro de atividade antifúngica de peptídeos sintéticos derivados de AMPs de animais aquáticos (fatores anti-lipopolissacarídeos do camarão *Litopenaeus vannamei*, taquiplesina do limúldeo *Tachypleus tridentatus* e magainina da rã *Xenopus laevis*) contra fungos filamentosos e leveduriformes de interesse médico, veterinário, agrônômico e também em aquicultura e biotecnologia industrial. Além das linhagens de coleções, foram avaliados fungos isolados do intestino médio de camarões marinhos. Os isolados foram identificados por meio de características morfológicas das colônias e das estruturas reprodutivas. O potencial antifúngico dos AMPs foi avaliado por inibição do crescimento dos microrganismos *in vitro* (MIC: teste de concentração inibitória mínima), utilizando-se diferentes concentrações dos AMPs. Os resultados foram avaliados em microscopia invertida para germinação de esporos de fungos filamentosos e por absorvância para crescimento celular de leveduras. Para determinar o efeito fungicida (MFC), as culturas que apresentaram inibição no teste de MIC foram semeadas em meio sólido. Foram obtidas 15 espécies de fungos filamentosos e leveduras provenientes de coleções. No isolamento, foram obtidos 15 morfogrupos: 12 de fungos filamentosos e três de leveduras. Pela análise de características morfológicas, identificou-se linhagens de fungos filamentosos dos gêneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Scopulariopsis* e *Geotrichum* e leveduras do gênero *Rhodotorula*. Os testes antimicrobianos mostraram que os peptídeos sintéticos *Litvan* ALF-E e *Litvan* ALF-F apresentaram atividade contra cinco fungos, enquanto o *Litvan* ALF-G mostrou um maior espectro de atividade, sendo ativo contra 10 espécies. Assim como o *Litvan* ALF-G, o peptídeo derivado da taquiplesina se mostrou bastante eficaz na atividade antifúngica, com mais ênfase em leveduras do que em fungos filamentosos. Finalmente, a magainina apresentou atividade contra nove fungos. Os resultados deste estudo evidenciam o grande potencial que AMPs oriundos de animais aquáticos tem para o controle de fungos filamentosos e leveduriformes.

**Palavras-chave:** atividade antifúngica; fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs); taquiplesina; magainina.

## ABSTRACT

The fungi are organisms of great economic, environmental, and biotechnological relevance. Nevertheless, some species act as causative agents of diseases, posing threats to both human health and various sectors of agribusiness (agriculture, livestock, and aquaculture). Unlike diseases of viral and bacterial origin, the opportunistic nature of most fungal diseases has led to the neglect of many of them. Therefore, advances in understanding the fungus-host relationship and in mitigating actions for the control of these diseases are necessary. Antimicrobial peptides (AMPs) are molecules produced by different organisms and can exhibit a broad spectrum of antimicrobial activity. AMPs from aquatic animals, in particular, are molecules with high biotechnological potential due to their diverse mechanism of action and their ability to remain stable even in saline and highly alkaline environments. The present study aimed to evaluate the spectrum of antifungal activity of synthetic peptides derived from AMPs of aquatic animals (anti-lipopolysaccharide factors from the shrimp *Litopenaeus vannamei*, tachyplestin from the horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*, and magainin from the frog *Xenopus laevis*) against filamentous fungi and yeasts of medical, veterinary, agronomic, as well as aquaculture and biotechnological interest. In addition to fungi from strain collections, fungi isolated from the midgut of marine shrimp were evaluated. The isolates were identified based on morphological characteristics of colonies and reproductive structures. The antifungal potential of AMPs was evaluated by inhibiting the growth of microorganisms *in vitro* (MIC: minimum inhibitory concentration test), using different concentrations of AMPs. The results were evaluated by inverted microscopy for filamentous fungi and by absorbance for yeasts. To determine the fungicidal effect (MFC), cultures that showed inhibition in the MIC test were seeded on solid medium to check for growth. Fifteen species of filamentous fungi and yeasts were obtained from collections. In isolation, 15 morphotypes were obtained: 12 filamentous fungi and three yeasts. By analyzing morphological characteristics, filamentous fungi from the genera *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Scopulariopsis*, and *Geotrichum*, and yeasts from the genus *Rhodotorula* were identified. Antimicrobial tests showed that the synthetic peptides *Litvan* ALF-E and *Litvan* ALF-F had activity against five fungi, while *Litvan* ALF-G showed a broader spectrum of activity, being active against 10 species. Like *Litvan* ALF-G, the tachyplestin peptide proved to be quite effective in antifungal activity, with more emphasis on yeasts than on filamentous fungi. Finally, magainin showed activity against nine fungi. The results of this study highlight the great potential that AMPs from aquatic animals have for the control of both filamentous fungi and yeasts.

**Keywords:** antifungal activity; anti-lipopolysaccharide factors (ALFs); tachyplestin; magainin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das quatro formas de classificação dos AMPs baseados em estrutura e composição aminoacídicas. ....	16
Figura 2 - Representação dos principais mecanismos de ação dos AMPs.....	17
Figura 3 - Modelos tridimensionais e carga dos sete grupos de ALFs. ....	20
Figura 4 - Modelos das três isoformas distintas do AMP taquipesina. ....	21
Figura 5 – Modelo tridimensional do AMP Magainina. ....	22
Figura 6 – AMPs testados. ....	26
Figura 7 - Inóculo inicial dos fungos do intestino de camarões da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i> . ....	38
Figura 8 - Macro e micro morfologia dos gêneros fúngicos isolados do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> e cultivados nas duas temperaturas. ....	40
Figura 9 - Macro e micro morfologia dos gêneros fúngicos isolados do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> e cultivados em apenas uma das temperaturas. ....	41
Figura 10 – Imagem representativa dos resultados dos testes de inibição da germinação dos esporos. ....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens padrão de fungos filamentosos e leveduriformes utilizados no estudo. ....	33
Tabela 2 - Espectro de atividade antifúngica dos peptídeos sintéticos da família dos ALFs. ....	46
Tabela 3 - Espectro de atividade antifúngica do peptídeo sintético Tac I. ....	49
Tabela 4 - Espectro de atividade antifúngica do peptídeo sintético magainina (MSI-94). .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALFs – Fatores antilipopolissacarídeos  
AMPs – Peptídeos antimicrobianos  
ATCC – American Type Culture Collection  
BDA – Batata dextrose ágar  
BOD – Demanda bioquímica de oxigênio  
CCT – Collection of Tropical Cultures (Fundação André Tosello)  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DO<sub>595</sub> – Densidade óptica a 595 nm  
DO<sub>600</sub> – Densidade óptica a 600 nm  
EUCAST – European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing  
IB – Instituto Biológico de São Paulo  
LB – Lysogeny Broth  
LPS – Lipopolissacarídeos  
LTA – Ácidolipoteicoico  
MANE – Micoteca Anne-Lore Schroder  
Mag – Magainina  
MIC – Concentração inibitória mínima  
MFC – Concentração fungicida mínima  
MFBF – Micoteca Mário Barreto Figueiredo  
MM – Massa molecular  
MUCL – Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PDB – Caldo batata dextrose  
pI – Ponto isoelétrico teórico  
RNA – Ácido ribonucleico  
SDA – Sabouraud dextrose ágar  
SDB – Sabouraud dextrose Broth  
Tac – Taquiplesina  
UFC – Unidade formadora de colônia  
UTI – Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1	FUNGOS.....	14
1.2	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPS) .....	15
1.3	AMPS DE ANIMAIS AQUÁTICOS .....	18
<b>1.3.1</b>	<b>Fatores Anti-lipopolissacarídeos (ALFs)</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Taquiplesina</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Magainina</b> .....	<b>22</b>
1.4	AMPS COMO POTENCIAIS ANTIFUNGICOS .....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
3.1	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS .....	26
3.2	FUNGOS.....	27
<b>3.2.1</b>	<b>Linhagens de fungos provenientes de coleções</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Isolamento de fungos do intestino de camarões</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Criopreservação</b> .....	<b>29</b>
3.2.3.1	<i>Criopreservação de esporos de fungos filamentosos</i> .....	29
3.2.3.2	<i>Criopreservação de leveduras</i> .....	29
3.3	TESTES ANTIMICROBIANOS .....	30
<b>3.3.1</b>	<b>Teste fungistático</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Teste fungicida</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Teste leveduristático</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Teste leveduricida</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
4.1	LINHAGENS DE FUNGOS PROVENIENTES DE COLEÇÕES .....	32
4.2	ISOLAMENTO DE FUNGOS DE CAMARÕES .....	38
4.3	TESTES ANTIMICROBIANOS .....	43
<b>4.3.1</b>	<b>Fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs)</b> .....	<b>44</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Taquiplesina</b> .....	<b>48</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Magainina</b> .....	<b>50</b>

4.3.4	Novas perspectivas de AMPs como antifúngicos.....	53
5	CONCLUSÕES.....	55
6	PERSPECTIVAS.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXO A - ARTIGO EM COAUTORIA DESENVOLVIDOS DURANTE O MESTRADO.....	72

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FUNGOS

Os fungos desempenham um papel de extrema relevância no cenário ambiental e biotecnológico. Eles contribuem para o desenvolvimento das plantas por meio de associações simbióticas, como os fungos micorrízicos. Além disso, os fungos têm um papel crucial na produção de enzimas que permitiram o desenvolvimento de diversos produtos e processos biotecnológicos, incluindo a produção de alimentos fermentados, cervejas, queijos e a produção de antibióticos, como a penicilina (Moore, Robson e Trinci, 2011). Esses microrganismos estão amplamente distribuídos pelo planeta, sendo encontrados em diferentes ambientes, incluindo água, solo e até mesmo dentro de outros organismos, onde estabelecem relações desde simbióticas a patogênicas (Jain *et al.*, 2019). Esses microrganismos podem ser classificados de três maneiras conforme sua morfologia: Unicelulares, que representam o grupo das leveduras, os filamentosos, que representam os bolores e os pseudofilamentosos que são os fungos unicelulares que ao se reproduzirem por brotamento sucessivos acabam por desenvolver uma estrutura similar a hifa dos bolores (Venturella e Rambelli, 1995).

Uma notável relação benéfica envolve os fungos presentes na microbiota intestinal de metazoários. Esses fungos desempenham um papel essencial em vários processos metabólicos e fisiológicos relacionados ao intestino (Brody, 2020). A saúde dos animais vertebrados e invertebrados é profundamente influenciada por essa interação, e isso é de particular importância no campo da imunologia, uma vez que o intestino é uma das maiores superfícies de contato que antígenos externos têm com o interior do corpo (Fassarella *et al.*, 2021; Power *et al.*, 2014; Sekirov *et al.*, 2010).

No entanto, alguns fungos são oportunistas, o que pode resultar em doenças invasivas que causam uma considerável taxa de mortalidade, vitimando cerca de um milhão e meio de pessoas anualmente (Svedese *et al.*, 2022). Além de fungos que podem afetar a saúde de humanos e animais, há espécies que causam doenças em plantas, levando a perdas significativas na produção de produtos agrícolas, como soja e feijão (Eskola *et al.*, 2020; Pereira e Pinheiro,

2012). Essas doenças afetam até mesmo setores como a carcinicultura (cultivo de camarão), com relatos de infecções afetando larvas de camarão desde a década de 60 (Freitas *et al.*, 2021; Hubschman e Schmitt, 1969; Lightner e Fontaine, 1973).

A exposição a esses patógenos pode desencadear uma série de efeitos adversos à saúde de seres humanos, animais e plantas (Eskola *et al.*, 2020), resultando em problemas de saúde pública, pecuária, agricultura e, conseqüentemente, econômicos. Devido à ubiquidade e à natureza oportunista dos fungos, as doenças fúngicas e a presença desses microrganismos em diversos ambientes levantam a preocupação da negligência em relação a essas questões nos dias de hoje (Amend *et al.*, 2019; Rodrigues e Nosanchuk, 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) lista algumas doenças fúngicas como "doenças tropicais negligenciadas", incluindo a cromoblastomicose, o micetoma e outras micoses (Rodrigues e Nosanchuk, 2020). O aumento de enfermidades imunodepressoras em plantas, animais e seres humanos favorece o desenvolvimento de fungos, o que resulta em perdas na produção e representa um risco para a saúde pública.

Portanto, é fundamental o desenvolvimento de ações mitigatórias para abordar essa problemática (Rodrigues e Nosanchuk, 2020), uma vez que fungos resistentes a diversos tratamentos têm sido documentados. Essa resistência muitas vezes é ocasionada por diferentes fatores, como o uso inadequado de antifúngicos em terapias ou a utilização de medicamentos inadequados em várias situações (CDC, 2021; Lima, Colombo e Almeida Junior, de, 2019). Isso reforça a necessidade de explorar novas estratégias de controle que abordem esses microrganismos de forma diversificada e eficaz.

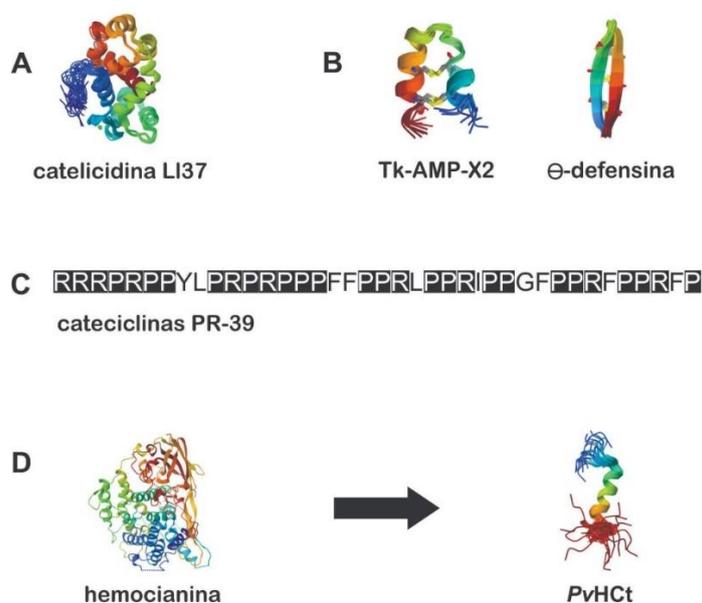
## 1.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPS)

Na imunologia existem dois tipos de resposta conhecidas como imunidade adaptativa e imunidade inata. Frente a estímulos, uma das respostas humorais induzidas pelo sistema imune inato é a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Lima, Colombo e Almeida Junior, de, 2019; Rosa e Barracco, 2010; Zhang e Gallo, 2016). Os AMPs são moléculas encontradas em diferentes seres vivos, desde bactérias até mamíferos (Mahlapuu *et al.*, 2016),

funcionando como uma primeira linha de defesa contra infecções (Matos e Rosa, 2022). Essas biomoléculas são peptídeos de pequeno tamanho, com até 10 kDa de massa molecular, que apresentam uma ampla variedade de conformações, composições de aminoácidos e propriedades bioquímicas.

Majoritariamente, os AMPs são constituídos por resíduos hidrofóbicos e catiônicos que se alinham em três dimensões formando estruturas únicas (Zhang e Gallo, 2016). Essa conformação faz com que essas moléculas sejam anfipáticas com propriedades detergentes que possuem três grupos principais: peptídeo anfipático linear em  $\alpha$ -hélice, peptídeos cíclicos, ou cíclicos com extremidades abertas, com uma ou mais ligações dissulfeto, peptídeos ricos em um tipo particular de aminoácido e peptídeos gerados a partir da hidrólise de moléculas precursoras (Bulet, Stöcklin e Menin, 2004; Reddy, Yedery e Aranha, 2004). Essa notável diversidade resulta em diversas famílias de AMPs, tais como crustinas, defensinas, magaininas, fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs), clavaninas, taquiplesinas, entre outras (figura 1) (Matos e Rosa, 2022).

Figura 1 – Representação das quatro formas de classificação dos AMPs baseados em estrutura e composição aminoacídicas.

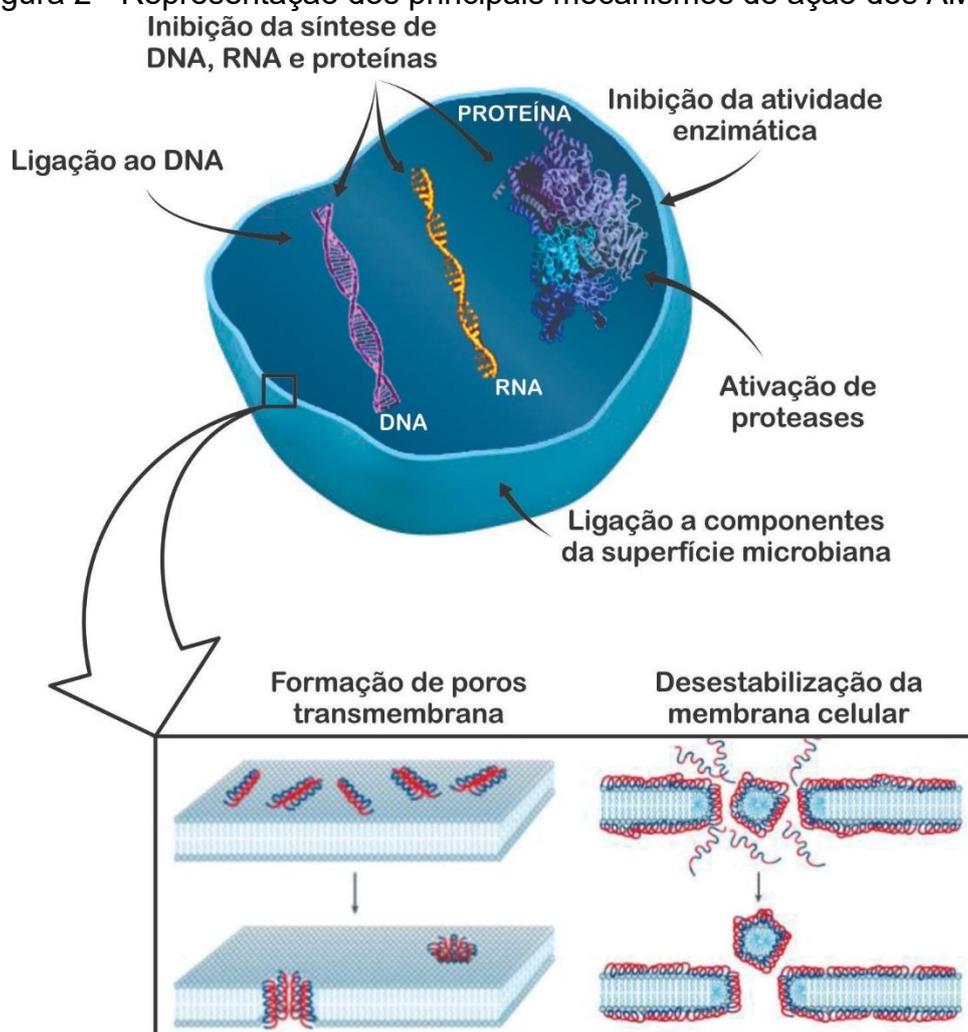


Fonte: Adaptado de Matos, (2018).

Legenda: (A) Catelicidina LI37 (Stathopoulos *et al.*, 2008): exemplo de peptídeo anfipático em  $\alpha$ -hélice. (B) Tk-AMP-X2 (Berkut *et al.*, 2014) e  $\theta$ -defensina (Conibear *et al.*, 2012): exemplos de AMPs cíclicos ou cíclicos com extremidades abertas. (C) Cateciclinas PR-39 (Anbanandam *et al.*, 2008): exemplo de peptídeo rico em um tipo particular de aminoácido, nesse caso prolina e arginina. (D) Hemocianina e PvHct (Hazes *et al.*, 1993; Petit *et al.*, 2016): exemplo de peptídeo gerado a partir da hidrólise de precursores.

Tal qual a grande diversidade de estruturas, o mecanismo de ação dos AMPs também é diverso, variando conforme a estrutura tridimensional e composição aminoacídica de cada um. O mecanismo de ação pode ser desestabilizando a membrana por interações eletrostáticas, se inserindo na membrana levando a formação de poros ou inibindo vias metabólicas (Brogden, 2005). Por exemplo, os AMPs podem inibir a síntese de RNA e DNA, a atividade de diferentes enzimas ou ainda formar poros na membrana microbiana, como mostrado na figura 2 (Brogden, 2005).

Figura 2 - Representação dos principais mecanismos de ação dos AMPs.



Fonte: Adaptado de Brogden, (2005).

Legenda: Figura ilustrativa dos principais mecanismos de ação dos AMPs, como os efeitos intracelulares e os efeitos que acometem a membrana celular.

Além da capacidade antimicrobiana dos AMPs, essas moléculas são multifuncionais e estão diretamente ligadas a propriedades imunorreguladoras

(Destoumieux-Garzón *et al.*, 2016; Lai e Gallo, 2009). Em concentrações inibitórias, os AMPs podem atuar na manutenção e homeostase da microbiota dos organismos (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2016). Outras funções foram relatadas sobre essas moléculas, como causadora de alterações das propriedades de membranas celulares, se apresentando de forma antígena e por consequência gerando efeitos anticarcinogênicos (Lai e Gallo, 2009).

Essas moléculas possuem um grande potencial para a indústria farmacêutica, pois podem apresentar um amplo espectro de atividade contra diferentes classes de microrganismos (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras) e apresentar uma menor probabilidade de resistência (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2016; Guaní-Guerra *et al.*, 2010; Matos *et al.*, 2018; Matos e Rosa, 2022).

Na década de 1960, o aumento de microrganismos multirresistentes criou a necessidade de buscar novas drogas eficazes para combater essas doenças. Nesse contexto, os AMPs começaram a ser estudados com foco na indústria farmacêutica (Hancock e Lehrer, 1998; Lima, Colombo e Almeida Junior, de, 2019; Talapko *et al.*, 2022). O banco de dados de peptídeos antimicrobianos fornecido pela Universidade de Nebraska indica que atualmente conta com 3940 peptídeos, dos quais 3146 são AMPs naturais presentes em todos os reinos da vida, além de serem utilizados em diversos estudos clínicos para o tratamento de doenças incluindo doenças bacterianas, virais, fúngicas e tumorais (Koo e Seo, 2019; Kordi *et al.*, 2023; Lai e Gallo, 2009; Mishra *et al.*, 2018; Wang, Li e Wang, 2016).

### 1.3 AMPS DE ANIMAIS AQUÁTICOS

Os AMPs estão entre os efetores imunes mais bem descritos de invertebrados aquáticos (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2016; Matos e Rosa, 2022). Essas biomoléculas apresentam uma alta diversidade de famílias e estruturas e um grande potencial para a indústria farmacêutica (Gerdol *et al.*, 2020; Leoni *et al.*, 2017).

Ao contrário de outras classes de peptídeos antimicrobianos, os AMPs provenientes de animais aquáticos demonstram notável estabilidade de atividade em ambientes alcalinos e sob variações de salinidade. Em outras

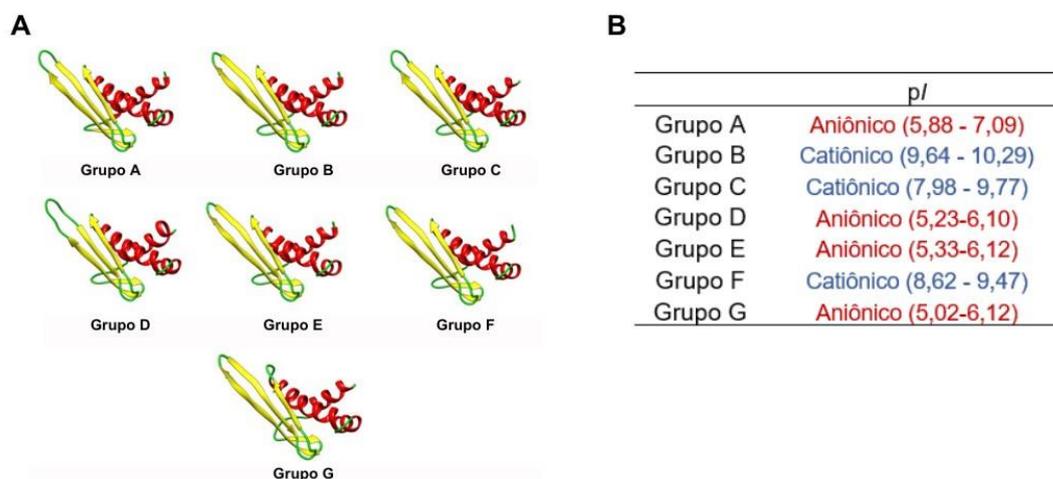
palavras, sua eficácia não é prejudicada em ambientes diversos, o que os torna aplicáveis em uma ampla gama de setores, incluindo a carcinicultura (Gerdol *et al.*, 2020; Hale e Hancock, 2007; Hancock e Diamond, 2000; Koo e Seo, 2019; Löfgren *et al.*, 2009; Zhang e Gallo, 2016). No presente trabalho, foram estudados alguns AMPs encontrados em animais aquáticos, incluindo os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs), a taquiplesina e a magainina.

### 1.3.1 Fatores Anti-lipopolissacarídeos (ALFs)

Os fatores anti-lipopolissacarídeos (anti-LPS factors ou ALFs) compreendem uma família multigênica de AMPs encontrados em crustáceos e quelicerados marinhos (limulídeos) (Liu *et al.*, 2006; Matos e Rosa, 2022). Eles representam uma família com notável diversidade funcional (Matos *et al.*, 2018). Os ALFs são moléculas anfipáticas que apresentam uma estrutura tridimensional contendo três  $\alpha$ -hélices, quatro folhas- $\beta$  e duas cisteínas estabilizando um grampo molecular central ( $\beta$ -*hairpin*) com uma ligação de dissulfeto (Yang *et al.*, 2009). Essa característica confere ao AMP um amplo espectro de atividade, tornando-o uma promissora ferramenta na biotecnologia.

Os ALFs estão categorizados em sete grupos, cada um com diferenças em suas estruturas primárias e características bioquímicas, o que pode refletir em diferentes propriedades funcionais (Matos *et al.*, 2018). Esses grupos, denominados de A a G, também exibem variações nas suas características eletrostáticas. Os grupos A, D, E e G são aniônicos, enquanto os grupos B, C e F são catiônicos (figura 3) (Matos *et al.*, 2018). Essa ampla diversidade resulta em características funcionais distintas para cada grupo. Por exemplo, o grupo B demonstra propriedades antimicrobianas eficazes contra uma grande variedade de microrganismos, enquanto o grupo D exibe atividade antimicrobiana limitada (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2016).

Figura 3 - Modelos tridimensionais e carga dos sete grupos de ALFs.



Fonte: Adaptado de Matos, (2018).

Legenda: (A) Modelos tridimensionais dos sete grupos da família dos ALFs de *L. vannamei*. Neles são mostradas as estruturas em  $\beta$ -hairpin em amarelo e as estruturas em  $\alpha$ -hélice em vermelho de cada um dos grupos. (B) Características eletroestáticas baseadas no ponto isoelétrico (pI) de cada um dos grupos dos ALFs de *L. vannamei*.

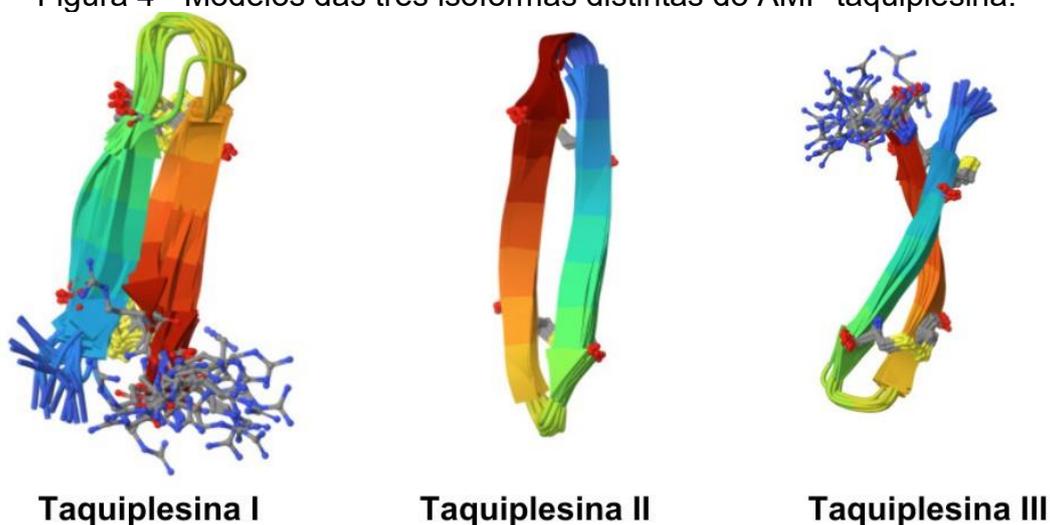
De maneira abrangente, os ALFs revelam a capacidade de se ligar aos lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas, além de interagir com outras moléculas na superfície microbiana, como o ácido lipoteicoico (LTA) e o  $\beta$ -glicanas, componentes essenciais da parede celular de bactérias Gram-positivas e fungos, respectivamente (Matos e Rosa, 2022). Nesse sentido, o principal mecanismo de ação dos ALFs está vinculado à sua ligação a elementos cruciais da parede celular microbiana (Schmitt, Rosa e Destoumieux-Garzón, 2016). Diante desse fato, essa família de peptídeos apresenta um amplo espectro de ação antimicrobiana, abrangendo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, vírus envelopados e fungos (Matos *et al.*, 2018; Matos e Rosa, 2022).

Os ALFs dos grupos A a D foram os primeiros a serem descobertos e amplamente estudados ao longo dos anos (Ponprateep *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2016; SOMBOONWIWAT *et al.*, 2005; Tharntada *et al.*, 2008). Por outro lado, os ALFs dos grupos E a G, recentemente identificados, ainda carecem de informações detalhadas sobre seu espectro de ação, ainda mais se tratando de uma fração isolada da parte funcional do peptídeo (Matos *et al.*, 2018).

### 1.3.2 Taquiplesina

O peptídeo antimicrobiano taquiplesina foi isolado a partir dos hemócitos de limúldeos e exibe um amplo espectro de atividade microbica (Nakamura *et al.*, 1988). A taquiplesina é um AMP catiônico que possui três isoformas distintas, denominadas I, II e III, sendo a isoforma I a primeira a ser isolada e mais extensamente estudada ao longo dos anos (Nakamura *et al.*, 1988). Similar aos ALFs, a taquiplesina possui uma estrutura em forma de  $\beta$ -hairpin, no entanto, é mantida por duas ligações de dissulfeto (figura 4) (Matsuzaki, 1999).

Figura 4 - Modelos das três isoformas distintas do AMP taquiplesina.



Fonte: Taquiplesina I (Kushibiki *et al.*, 2014), Taquiplesina II e Taquiplesina III (Vernen *et al.*, 2019)

Legenda: Modelo tridimensional das estruturas em  $\beta$ -hairpin dos três tipos de taquiplesina.

O AMP taquiplesina é conhecido por seu mecanismo de ação relacionado à desestabilização da membrana, formando poros transitórios (Hirakura, Kobayashi e Matsuzaki, 2002). Seu amplo espectro de atividade é atribuído a esse mecanismo de ação empregado por ela (Hirakura, Kobayashi e Matsuzaki, 2002).

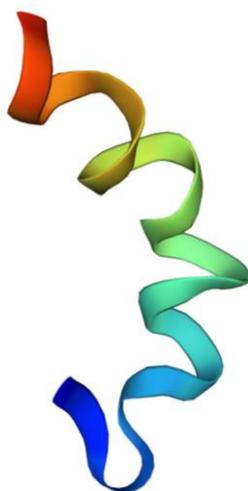
Esse AMP destaca-se por sua notável eficácia contra uma ampla variedade de microrganismos, sendo relevante tanto na área médica quanto na aquicultura, demonstrando atividade também contra fungos (Löfgren *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2022; Miao *et al.*, 2022). A taquiplesina é um peptídeo bifuncional, uma vez que algumas de suas derivadas da isoforma I também apresentaram

propriedades antitumorais (Lu *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2021). Além disso, a taquipesina apresentou a capacidade de inibir a trombose, indicando seu alto potencial farmacológico em diversos aspectos (Li, H. *et al.*, 2019; Priya *et al.*, 2022).

### 1.3.3 Magainina

O peptídeo magainina foi isolado de anfíbios e, além de sua atividade antimicrobiana, demonstra efeitos contra células tumorais, semelhantes à taquipesina (Matsuzaki *et al.*, 1997). A magainina pertence a uma classe de AMPs com uma estrutura de  $\alpha$ -hélice linear (figura 5) e podem ser classificados em dois tipos, denominados Tipo 1 e Tipo 2, com uma alteração em dois aminoácidos de um tipo para outro.

Figura 5 – Modelo tridimensional do AMP Magainina.



Fonte: (Vermeer, L.S., Mason, 2023)  
Legenda: Modelo tridimensional da magainina

O peptídeo sintético magainina MSI-94 é um AMP amplamente estudado. Esse peptídeo é uma molécula catiônica, anfipática e possui uma estrutura em  $\alpha$ -hélice (McMillan e Coombs, 2020). Essa conformação faz com que essa molécula interaja com a membrana e acabe por rompê-la (Bechinger, Zasloff e Opella, 1993). Estudos recentes indicaram que o mecanismo que a magainina-2 exerce sobre a membrana microbiana é do tipo toroidal (Billah *et al.*, 2022). Muitos estudos relatam a dificuldade em ocorrer mutação a nível de

membrana. Sendo assim, peptídeos permeabilizadores de membrana, tal qual a magainina, são menos propensos a desenvolver resistência ao longo do tempo (Somma, Di *et al.*, 2022).

O AMP magainina apresentou ação contra bactérias, fungos, protozoários e células tumorais induzindo apoptose em células do carcinoma (Eghtedari, Jafari Porzani e Nowruzi, 2021; Ghaly *et al.*, 2023; Kordi *et al.*, 2023; Mishra *et al.*, 2018). Alguns AMPs passaram para ensaios clínicos visando alvos procarióticos, dentre eles, um análogo à magainina, o pexiganan, entretanto apresentou falhas na fase III dos ensaios e permanece sem atualizações até os dias atuais (Grönberg *et al.*, 2014; Koo e Seo, 2019; Lipsky, Holroyd e Zasloff, 2008; Wei *et al.*, 2023). Os autores constatam que essa molécula é uma excelente alternativa para o tratamento de diversas doenças da mucosa oral, pode resolver os problemas relacionados a microrganismos multirresistentes e grandes candidatas a serem agentes quimioterápicos (Eghtedari, Jafari Porzani e Nowruzi, 2021; Koo e Seo, 2019; Lipsky, Holroyd e Zasloff, 2008).

#### 1.4 AMPS COMO POTENCIAIS ANTIFUNGICOS

É importante destacar que a grande maioria dos peptídeos com ação antifúngica conhecida está associada a mecanismos de ação que afetam a membrana celular (Rautenbach, Troskie e Vosloo, 2016). Vários estudos sugerem que os AMPs podem desempenhar papéis de antagonistas ou agonistas, uma vez que são moléculas naturais, altamente seletivas e geralmente bem toleradas pelas células do hospedeiro (Fernández de Ullivarri *et al.*, 2020; Fosgerau e Hoffmann, 2015; Nicola *et al.*, 2019). Além disso, os peptídeos sintéticos utilizados neste estudo foram projetados a fim de otimizar suas propriedades farmacológicas. Isso inclui o aumento da estabilidade da molécula, bem como o aprimoramento da hidrofobicidade e da anfipaticidade da molécula (Fernández de Ullivarri *et al.*, 2020; Talapko *et al.*, 2022).

Microrganismos resistentes representam uma preocupação séria para a saúde pública, tornando imperativa a busca por alternativas (McKenna, 2013). Os AMPs de animais aquáticos, devido ao seu notável potencial biotecnológico, emergem como uma promissora solução para esse problema (Barreto *et al.*,

2018; Sperstad *et al.*, 2011). Seu amplo espectro de ação, mecanismo de ação e estabilidade em condições alcalinas e variações de salinidade, que dificultam o desenvolvimento de cepas resistentes, acentuam a necessidade de uma investigação mais aprofundada do potencial dessas moléculas (Guaní-Guerra *et al.*, 2010). Com base nessa consideração, diversos estudos têm avaliado ao potencial de AMPs de animais aquáticos em conter espécies patogênicas, dentre delas algumas espécies de fungos de interesse na carcinicultura e em outros setores (Löfgren *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2021; Matos *et al.*, 2018; Silveira *et al.*, 2018).

Matsuzaki, (1999) descreve quatro características que são exigidas dos peptídeos antimicrobianos, representando o primeiro passo de autodefesa contra qualquer microrganismo patogênico invasor: (1) toxicidade seletiva: os peptídeos devem diferenciar as células hospedeiras e microbianas; (2) atividade rápida: o tempo necessário para a morte deve ser menor do que o tempo de multiplicação celular do microrganismo alvo; (3) amplo espectro antimicrobiano: ser eficaz contra muitas espécies de microrganismos e; (4) nenhum desenvolvimento de resistência: o peptídeo deve ter um mecanismo de ação tal que os microrganismos não possam desenvolver facilmente resistência contra ele. Sendo assim, o presente estudo visa ampliar os conhecimentos do item 3 em AMPs de animais aquáticos contra fungos filamentosos e leveduras de interesse em diversos seguimentos. Nesse contexto, a pesquisa sobre o potencial biotecnológico, bem como o espectro de atividade dos AMPs de animais aquáticos contra fungos filamentosos e leveduras revela-se de suma importância para diversas áreas, incluindo aquelas relacionadas com economia e saúde pública.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o espectro de atividade antimicrobiana *in vitro* de peptídeos sintéticos baseados em AMPs de animais aquáticos contra fungos filamentosos e leveduriformes de interesse médico, veterinário, agrônômico e industrial.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

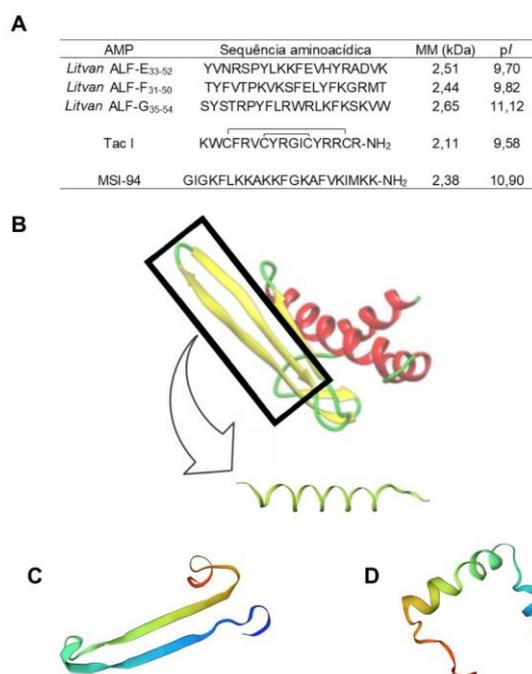
- Criar e organizar uma coleção de fungos filamentosos e leveduriformes;
- Isolar fungos do intestino de camarões marinhos;
- Determinar o espectro de atividade antifúngica *in vitro* de peptídeos sintéticos inspirados em AMPs de três espécies de animais aquáticos;
- Testar o efeito fungicida dos AMPs selecionados.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Para este estudo, foram utilizados peptídeos previamente sintetizados em estudos anteriores (Löfgren *et al.*, 2009; Silveira *et al.*, 2018). Os AMPs sintéticos foram baseados nas sequências aminoacídicas (A) de três membros da família dos fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) do camarão peneídeo *Litopenaeus vannamei* (Grupos E, F e G) (Matos *et al.*, 2018), (B) da taquiplesina (Tac I) do limulídeo *Tachypleus tridentatus* (Nakamura *et al.*, 1988) e (C) da magainina (MSI-94) da rã-de-unhas-africana *Xenopus laevis* (Matsuzaki, 1998) (figura 6).

Figura 6 – AMPs testados.



Fonte: Elaborado pela autora. Modelos tridimensionais feito através da ferramenta SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

Legenda: (A) Sequência aminoacídica, massa molecular (MM) em quilodaltons (kDa) e ponto isoelétrico teórico (pI) de cada AMP utilizada no presente estudo. Na nomenclatura de cada ALF os números representam a posição da sequência sintetizada correspondente na molécula completa. Na sequência aminoacídica da Tac I está representado as pontes de dissulfeto presentes na molécula através de chaves. (B) A região destacada mostra a região do  $\beta$ -hairpin que derivou a molécula em  $\alpha$ -hélice das três famílias de ALFs do camarão peneídeo *L. vannamei* usadas nesse estudo. (C) Modelo tridimensional do AMP sintético Tac I. (D) Modelo tridimensional do AMP MSI-94.

Em relação aos ALFs, foram sintetizados peptídeos lineares anfipáticos (conformação em  $\alpha$ -hélice) derivados da região funcional (*central  $\beta$ -hairpin*) dos membros *Litvan ALF-E*, *Litvan ALF-F* e *Litvan ALF-G* (figura 6). Os fragmentos peptídicos foram denominados de *Litvan ALF-E<sub>33-52</sub>*, *Litvan ALF-F<sub>31-50</sub>* e *Litvan ALF-G<sub>35-54</sub>* e produzidos por síntese química no equipamento *Liberty Blue automated microwave peptide synthesizer* (CEM Corp) a partir de aminoácidos com grupamentos 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) (Iris Biotech GmbH) em resina *Rink Amide 0.6 meq/g* (Chem-Impex). Esses fragmentos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e a massa confirmada por espectrometria de massa [*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass (MALDI-TOF) Spectrometry*].

Tac I é um peptídeo sintético análogo à taquipesina I nativa (peptídeo maduro) e que possui uma amidação no resíduo de arginina na região C-terminal (figura 6). Assim como a forma nativa, o peptídeo sintético Tac I possui quatro resíduos de cisteína que formam as seguintes ligações dissulfeto: C1-C4 e C2-C3 (Löfgren *et al.*, 2009). O AMP sintético MSI-94 é uma variação da magainina nativa (peptídeo maduro) contendo uma amidação no resíduo de lisina na região C-terminal (figura 6). Assim como os ALFs, os peptídeos Tac I e MSI-94 foram sintetizados quimicamente, purificados por RP-HPLC e suas massas confirmadas por MALDI-TOF (Löfgren *et al.*, 2009).

## 3.2 FUNGOS

### 3.2.1 Linhagens de fungos provenientes de coleções

Representantes de diferentes grupos de fungos filamentosos e leveduras (Ascomycota e Mucormycota) foram adquiridos por meio de compra ou doação de coleções de fungos de laboratórios parceiros. As culturas de fungos filamentosos foram repicadas através do esgotamento da alça em ágar batata dextrose (BDA) [KASVI] pH 5,0 e incubadas a 28 °C por 10 a 15 dias em estufa BOD. Esse teste foi realizado para confirmar a viabilidade e pureza das linhagens. A reativação das culturas de leveduras foi realizada pela técnica de semeadura por esgotamento em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud dextrose (SDA) (10 g/L peptona bacteriológica, 40 g/L dextrose, 15 g/L ágar

bacteriológico, pH 5,0). As placas foram incubadas a 28 °C por 24 a 48 h para confirmação da viabilidade das linhagens e verificação de possíveis contaminantes.

### 3.2.2 Isolamento de fungos do intestino de camarões

Com a finalidade de se obter linhagens de origem marinha, linhagens de fungos filamentosos e leveduriformes foram isolados do intestino médio de camarões. Camarões juvenis da espécie *L. vannamei* (n=5), cultivados em sistema de bioflocos, foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos do Departamento de Aquicultura da UFSC (UFSC/CCA/LCM). No laboratório, os camarões foram sacrificados por hipotermia (banho de gelo por 15 min) para a coleta do intestino médio. Após a coleta, os intestinos (com conteúdo luminal) foram macerados em 1 mL de solução Tris-salina estéril (10 mM Tris, 330 mM NaCl) e diluídos na mesma solução (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) (adaptado de Merrifield *et al.*, 2009). Em seguida, foram semeados 100 µL de cada diluição e do caldo bruto em meio BDA salino (água do mar estéril com salinidade ajustada para 15 ppm) suplementado com cloranfenicol (0,1 g/L), penicilina e estreptomicina [10<sup>7</sup> unidades/L de penicilina e 10 g/L de estreptomicina (GIBCO)]. As placas foram incubadas a 20 °C e 28 °C por 7 dias ao abrigo da luz. Por fim, o isolamento foi concretizado por repiques sucessivos de cada morfotipo de fungos filamentosos em BDA sem antibióticos e, para morfotipos leveduriformes, em meio SDA até a obtenção de colônias axênicas.

Para a identificação dos fungos isolados, foi avaliada a morfologia dos isolados. A macromorfologia foi a avaliação da colônia após a sua semeadura e desenvolvimento em meio BDA na respectiva temperatura de isolamento por 7 dias. A micromorfologia foi a avaliação das estruturas reprodutivas pela técnica do microcultivo (Hoog, De *et al.*, 2019). Para isso, foi feito um inóculo nas laterais de um bloco de meio BDA. Posteriormente, o inóculo foi coberto por uma lamínula estéril e incubado a 28 °C por 7 a 14 dias em câmara úmida. Após o período de crescimento, a lamínula foi retirada do inóculo e posta sobre uma lâmina que continha uma gota do corante azul de lactofenol. Finalmente, as lâminas foram deixadas para secar por um período de 12 a 24 h, seladas e, então, avaliadas por microscopia de luz.

### 3.2.3 Criopreservação

#### 3.2.3.1 Criopreservação de esporos de fungos filamentosos

Posteriormente ao teste de viabilidade, cada uma das espécies de fungos filamentosos foi repicada para dez placas de meio BDA e incubadas em BOD a 28 °C por 10 a 15 dias até abundante esporulação.

Para a extração dos esporos, foram adicionados 10 mL de uma solução Tween20 (0,1% v/v) estéril sobre cada placa de cultura e, então, realizada a raspagem da superfície das colônias com alças de Drigalski estéreis. A suspensão de esporos resultante foi filtrada em três camadas de gaze esterilizadas para remoção do micélio e centrifugada a 3.000 ×g por 15 min. Os esporos foram lavados duas vezes com Tween20 (0,1% v/v). Então, adicionou-se glicerol estéril numa concentração final de 25% (v/v). Essas amostras foram criopreservadas (-80 °C) e incluídas na coleção de fungos do LIAA (CCB/BEG). Para os testes antimicrobianos, a concentração de esporos foi ajustada para  $1 \times 10^7$  esporos/mL em glicerol 25% (concentração final). Para a avaliação de possíveis contaminantes bacterianos, uma alíquota de cada solução de esporos foi inoculada no meio *Lysogeny Broth* (LB: 10 g/L peptona bacteriológica, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl, pH 7,2) e incubada em estufa a 37 °C por 48 h.

#### 3.2.3.2 Criopreservação de leveduras

Uma colônia isolada de cada uma das espécies de levedura foi repicada para um tubo contendo 4 mL de caldo Sabouraud (SDB) pH 5,0 e incubadas em estufa a 28 °C por 12 h sob agitação constante (110 rpm). Esse inóculo foi diluído em glicerol estéril numa concentração final de 20%, criopreservado (-80 °C) e incluído na coleção de fungos do LIAA (CCB/BEG).

### 3.3 TESTES ANTIMICROBIANOS

O potencial antifúngico dos AMPs foi avaliado por testes *in vitro* de inibição de crescimento. Para isso, foram realizados testes de concentração inibitória mínima (MIC, do inglês “minimum inhibitory concentration”) e de concentração fungicida mínima (MFC, do inglês “minimum fungicidal concentration”) (Matos *et al.*, 2018).

#### 3.3.1 Teste fungistático

Os testes de MIC contra os fungos filamentosos foram realizados usando uma alíquota criopreservada contendo  $1 \times 10^7$  esporos/mL. Foi realizada uma diluição de 10  $\mu$ L dessa solução de esporos em 10 mL de meio PDB 50% (Caldo batata dextrose), para se obter uma concentração final de  $1 \times 10^4$  esporos/poço. Posteriormente, uma placa de 96 poços de fundo chato foi dividida em três grupos: controles positivos, controles negativos e os poços de testes. Em cada poço do controle positivo foram adicionados 90  $\mu$ L da solução de esporos e 10  $\mu$ L de água ultrapura estéril enquanto nos poços do controle negativo foram adicionados 90  $\mu$ L de meio PDB 50% e 10  $\mu$ L de água ultrapura estéril. Nos poços dos testes, foram adicionados 90  $\mu$ L da solução de esporos e 10  $\mu$ L de cada peptídeo em diferentes concentrações: 40, 20, 10, 5, 2,5 e 1,25  $\mu$ M. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 48 h em câmara úmida escura e sob agitação leve (100 rpm). A inibição do crescimento foi determinada a partir da avaliação da germinação dos esporos e formação de hifas no microscópio invertido OLYMPUS IX83 (*Olympus, Life Sciences*) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB). A MIC foi determinada como a concentração mínima do peptídeo capaz de inibir 100% a germinação dos esporos.

#### 3.3.2 Teste fungicida

As culturas que não apresentaram crescimento no teste fungistático foram semeadas (100  $\mu$ L) em placas contendo meio BDA. As placas foram

incubadas em estufa a 28 °C por 72 h e o efeito fungicida dos peptídeos foi determinado a partir da avaliação do crescimento dos fungos em meio sólido.

### 3.3.3 Teste leveduristático

Para os testes leveduristáticos, uma porção da cultura criopreservada foi semeada por esgotamento em placas contendo meio SDA, as quais foram incubadas em estufa a 28 °C por 12 h. Após o crescimento em placa, uma única colônia isolada foi cultivada em meio SDB a 28 °C por 12 h sob agitação constante. No dia seguinte, a cultura foi diluída (1:50) em um novo meio SDB e incubada em estufa a 28 °C sob agitação constante até atingir uma densidade ótica a 600 nm ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) entre 0,1 e 0,2. Para os testes, a cultura foi diluída 100× em meio SDB ( $DO_{600\text{ nm}} \sim 0,001-0,002$ ) Posteriormente, uma placa de 96 poços de fundo chato foi dividida em três grupos: controles positivos, controles negativos e os poços de testes. Em cada poço do controle positivo foram adicionados 90 µL da cultura e 10 µL de água ultrapura estéril (solução de suspensão dos peptídeos) enquanto nos poços do controle negativo foram adicionados 90 µL de meio SDB e 10 µL de água ultrapura estéril. Nos poços dos testes, foram adicionados 90 µL da cultura e 10 µL de cada peptídeo em diferentes concentrações: 40, 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 µM. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 h sob agitação leve. A inibição do crescimento foi determinada por espectrofotometria ( $DO_{595\text{ nm}}$ ) no equipamento *Tecan Infinite M200* pertencente ao LAMEB. A concentração inibitória mínima foi determinada como a concentração de peptídeo capaz de inibir 100% do crescimento das leveduras.

### 3.3.4 Teste leveduricida

Os poços que não apresentaram crescimento no teste leveduristático foi semeado (100 µL) em placas contendo meio SDA. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 72 h e o efeito leveduricida dos peptídeos foi determinado a partir da avaliação do crescimento das leveduras em meio sólido.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 LINHAGENS DE FUNGOS PROVENIENTES DE COLEÇÕES

Representantes de diferentes grupos taxonômicos de fungos filamentosos e leveduriformes (Ascomycota e Mucoromycota) foram escolhidos por serem de interesse na saúde humana e veterinária, em agronomia, aquicultura e biotecnologia. Foram adquiridas 14 espécies de fungos, sendo oito representantes de fungos filamentosos e sete de leveduras. Todos os fungos adquiridos estão descritos na tabela 1 com suas respectivas procedências, origens e local de isolamento.

Tabela 1 - Linhagens padrão de fungos filamentosos e leveduriformes utilizados no estudo.

<b>Espécie</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Procedência</b>	<b>Fonte</b>	<b>Local</b>
<b>Filamentosos</b>				
<i>Aspergillus niger</i>	DR02	LAMPB	<i>Platanus</i> sp.	Curitiba/PR
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	LAMPB	Mirtilo	Carolina do Norte/ EUA
<i>Colletotrichum chrysophilum</i> ( <i>C. fructicola</i> )	MANE147	Labfitop	Maça Gala	Brasil
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	MANE166	Labfitop	<i>Arabidopsis</i> sp.	EUA
<i>Fusarium oxysporum</i>	MUCL909	IHPE	-	-
<i>Fusarium solani</i>	MMBF86/09	IB	Soja	Vargem Grande do Sul/SP
<i>Rhizopus</i> sp.	-	LAMPB	Ar	Florianópolis/SC
<i>Trichoderma virens</i>	ATCC 9645	LAMPB	Solo	Maryland/EUA
<b>Leveduriformes</b>				
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	LAMPB	Homem com broncomicose	-
<i>Candida albicans</i>	MDM8 (ICB 12A)	LIAA	Lesão na mucosa oral	São Paulo/SP
<i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>Candida krusei</i> )	ATCC 6258	LMC	Escarro de paciente com broncomicose	Sri Lanka
<i>Nakaseomyces glabratus</i> ( <i>Candida glabrata</i> )	CCT 0728	LAMPB	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	LMC	Caso de Espru	Porto Rico/EUA
<i>Candida tropicalis</i>	-	LMC	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CAT1	LAMPB	Usina de Catanduva	Ribeirão Preto/SP

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: ATCC: American Type Culture Collection; MANE: Micoteca Anne-Lore Schroder; MUCL: Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain; CCT: Collection of Tropical Cultures (Fundação André Tosello); MMBF: Micoteca Mário Barreto Figueiredo (Instituto Biológico de São Paulo); LAMPB: Laboratório de microrganismos e Processos Biotecnológicos (UFSC); Labfitop: Laboratório de Fitopatologia (UFSC); IHPE: Interactions Hôtes-Pathogènes Environnements (Université Montpellier); IB: Instituto Biológico de São Paulo; LMC: Laboratório de Micologia Clínica (UFSC).

*Aspergillus* é um gênero do filo Ascomycota, os quais são fungos ubíquos e saprofiticos que estão presentes em uma ampla variedade de ambientes. Esse gênero possui representantes responsáveis por uma série de infecções principalmente pulmonares em humanos. Essa doença é frequentemente encontrada em plantas, pássaros, insetos, alguns mamíferos e animais aquáticos (Seyedmousavi *et al.*, 2015). É importante destacar que a aspergilose é comum entre receptores de transplantes pulmonares e imunocomprometidos (Kosmidis e Denning, 2015). Este gênero está associado à placentite e é responsável por uma porcentagem significativa de casos de aborto em bovinos (Sarfati, Jensen e Latgé, 1996; Tell, 2005). Além dos aspectos negativos e, várias espécies desse gênero também são amplamente usadas industrialmente como produção de enzimas hidrolíticas (Chimbekujwo, Ja'afaru e Adeyemo, 2020; Varga *et al.*, 2007).

Dois linhagens de *Aspergillus* secção Niger foram usadas nesse trabalho, *A. niger* e *A. brasiliensis* (tabela 1). *Aspergillus niger* é usada comercialmente na síntese de ácido cítrico, além de oferecer uma boa estrutura para manipulação gênica com a finalidade de uso industrial (Show *et al.*, 2015). Toda via, esta espécie é a terceira mais frequente em casos de aspergilose em humanos. Outro exemplar de *Aspergillus* é *Aspergillus brasiliensis*. Esta espécie é frequentemente encontrada em solos e que pode contaminar alimentos (Okazaki *et al.*, 2023) e apesar fazer parte da secção Niger, como *A. niger*, esse é considerada nível de biossegurança 1 (Hoog, De *et al.*, 2019).

Além das espécies que são potenciais patógenos de humanos, alguns fungos utilizados nesse estudo são de extrema importância na área agrícola por serem fitopatógenos como os do gênero *Colletotrichum* que estão associadas a antracnose de banana, manga, mamão, pitaiá, dentre outros frutos (Zampounis *et al.*, 2016). Essa infecção pode causar malefícios tanto aos frutos, quanto outras partes da planta, como caule e folhas, o que pode ocasionar em grandes malefícios às produções, além de poder infectar múltiplos hospedeiros (Zakaria, 2021).

No presente estudo foram avaliadas duas espécies do gênero *Colletotrichum* que também pertencem ao filo Ascomycota. *C. chrysophilum* (anteriormente conhecida como *C. fructicola*) já foi descrito como um dos responsáveis por antracnose em muitas localidades ao redor do mundo como

por exemplo: no México infectando banana (*Musa* spp.), manga (*Mangifera indica*) na China, Brasil, mamão (*Carica papaya*) na Índia (Fuentes-Aragón *et al.*, 2021; Li, Q. *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2013; Saini, Gupta e Anandalakshmi, 2016). Outra espécie é *Colletotrichum higginsianum* que tem sido usada como modelo de interações patógeno-hospedeiro em estudos recentes (Yan *et al.*, 2018). Esta espécie também está relacionada a infecções por antracnose em herbáceas da família *Brassicaceae* na qual estão contidas diversas hortaliças de relevância econômica e *Arabidopsis thaliana*, que é uma planta bastante utilizada em pesquisas científicas (Delatorre e Silva, 2008; Yan *et al.*, 2022; Zampounis *et al.*, 2016).

Neste estudo trabalhou-se com duas espécies do filo Ascomycota pertencentes ao gênero *Fusarium*: *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* (tabela 1). O gênero *Fusarium* é ubíquo e oportunista causadoras de diversas doenças em diferentes grupos, como plantas, animais terrestres, aquáticos e humanos. Espécies deste gênero produzem metabólitos secundários tóxicos causadores de impactos econômicos e sociais. A podridão radicular causada por espécies do gênero *Fusarium* tem grande impacto em produções de mandioca no Brasil (Serra *et al.*, 2009). Esse gênero também é considerado o mais comum a afetar cultivos de camarões, pois as infecções por ela, levam a processos inflamatórios e melanização de tecidos dos animais (Chong, 2022; JOHNSON, 1995). Em animais domésticos como cães e gatos, *F. solani* é uma das principais causadoras de infecções quando existe enfermidades preexistentes (Sechi *et al.*, 2016). *F. oxysporum* é descrito como patógeno de relevância em videiras, na produção de banana dentre outras que tem potencial danos econômicos (Ploetz, 2015; SÔNEGO, GARRIDO e GRIGOLETTI JÚNIOR, 2005).

O gênero *Rhizopus* pertence ao filo Mucormycota, é ubíquo e saprofítico que é comumente associado a deterioração de pães. Entretanto, este gênero pode ser patógeno oportunista em humanos, principalmente os imunossuprimidos, causando necrose tecidual de diversos níveis (Marques *et al.*, 2010). Além disso, espécies deste gênero também estão associadas a patogenicidade em diversas espécies de plantas e frutos. Como citado por Junqueira e Junqueira, (2014), a podridão-parda (infecção por *Rhizopus stolonifer*) é uma doença fúngica de grande interesse pois afeta frutos de potencial econômico.

Composto por diversas espécies, o gênero *Trichoderma*, pertencente ao filo Ascomycota, é encontrado amplamente distribuído em uma grande variedade de ambientes. Nos últimos anos, espécies desse gênero vêm sendo avaliadas devido seu grande potencial biotecnológico. Tendo em vista a capacidade de micoparasitismo que algumas linhagens desta espécie fazem, estudos recentes mostram que ao se desenvolvendo junto ao hospedeiro agem como agentes de controle biológicos de fitopatógenos (Brotman, Kapuganti e Viterbo, 2010; Mukherjee *et al.*, 2022; Rees *et al.*, 2022). Halifu *et al.*, (2020) mostrou um grande potencial da espécie *Trichoderma virens* apresentando efeito inibitório significativo sobre outras espécies de fungos.

*Candida* é um gênero de leveduras do filo Ascomycota composto por mais de 200 espécies já descritas (Polke, Hube e Jacobsen, 2015). Essas leveduras são amplamente distribuídas em diversos ambientes, incluindo a microbiota de vários tecidos, como mucosas e pele, em animais e seres humanos, estabelecendo uma relação de comensalismo (Muzio *et al.*, 2021; Odds, 1987). Entretanto, eventos de disbioses estão associados ao aumento expressivo de crescimento dessas leveduras levando a infecções conhecidas como candidíases (Singh *et al.*, 2014). As infecções fúngicas invasivas mais corriqueiras são predominantemente causadas por *Candida*, sendo estes fungos patogênicos os mais comuns em infecções orais e genitais (Dangi, Soni e Namdeo, 2010). Dentre a grande diversidade de espécies do gênero *Candida*, 5 espécies são as grandes responsáveis por infecções: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Pappas *et al.*, 2018; Polke, Hube e Jacobsen, 2015).

A espécie *Candida albicans* é comumente colonizadora de mucosas humanas, interagindo com outros microrganismos e agindo na virulência de biofilmes polimicrobianos (Du *et al.*, 2021). A espécie *Pichia kudriavzevii* (= *Candida krusei*) é reconhecida como um patógeno emergente que representa uma ameaça à saúde pública. Esse fato se dá por essa espécie possuir resistência intrínseca ao fluconazol (antifúngico mais comumente utilizado), além de que desenvolve rapidamente resistência a outros medicamentos antifúngicos (Gómez-Gaviria e Mora-Montes, 2020; Jamiu *et al.*, 2021). Como resultado, estudos têm indicado a necessidade de desenvolver novos medicamentos

eficazes contra essa espécie (Douglass *et al.*, 2018; Gómez-Gaviria e Mora-Montes, 2020).

A espécie *Nakaseomyces glabratus* (previamente descrita como *Candida glabrata*) é capaz de causar uma ampla gama de infecções, desde casos graves, como endocardite, até infecções superficiais mais leves (Jim *et al.*, 2023). No entanto, essa espécie é conhecida por sua dificuldade de tratamento, devido à sua resistência intrínseca a certos medicamentos (Jim *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2012). Essa resistência dificulta o controle das infecções causadas por *N. glabratus*, tornando necessário o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas para combater essas infecções.

A espécie *Candida parapsilosis*, encontrada em diversas regiões do mundo, é comumente identificada em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Embora sua taxa de mortalidade seja geralmente baixa, relatos anteriores têm indicado a presença de resistência a medicamentos, o que representa um desafio no tratamento dessas infecções (Tóth *et al.*, 2019). Sendo uma das espécies não-albicans mais comuns de causar infecções invasivas, a *Candida tropicalis* também apresentou incidência e aumento de resistência a tratamentos habituais como fluconazol, por exemplo (Pfaller *et al.*, 2019; Ruan e Hsueh, 2009).

A espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae* também pertence ao filo Ascomycota e é amplamente reconhecida como um organismo modelo em diversas áreas de pesquisa e possui uma ampla gama de aplicações industriais. Além disso, ela é considerada um microrganismo facilmente manipulável geneticamente e geralmente considerado seguro para uso em escala industrial (Kim *et al.*, 2021).

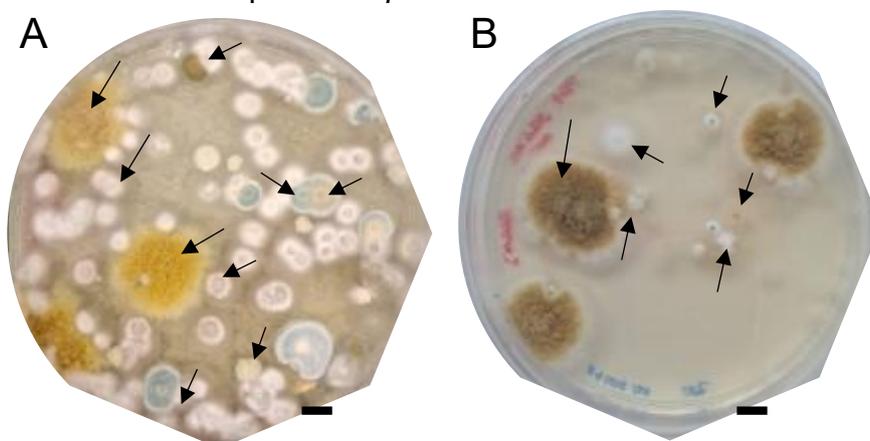
A linhagem de *S. cerevisiae* CAT-1, é considerada um dos exemplos mais bem-sucedidos no contexto da destilação alcoólica no Brasil (Santos *et al.*, 2017). O uso dessa linhagem de microrganismos na produção de etanol é tão proeminente que, juntamente com outra espécie chamada PE-2, elas são responsáveis por mais de 50% da produção nacional (Santos *et al.*, 2017). Além disso, é importante ressaltar que a linhagem *S. cerevisiae* CAT1 foi a primeira levedura destinada especificamente à produção de álcool combustível a ter seu código genético totalmente relatado. Essa conquista demonstra o

reconhecimento da importância dessa linhagem e sua relevância na indústria de produção de etanol no Brasil.

#### 4.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS DE CAMARÕES

Primeiramente, foi realizado o isolamento de fungos a partir de amostras diluídas ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) do trato gastrointestinal de camarões. Não foi observado crescimento em nenhuma das diluições utilizadas durante 15 dias. Sendo assim, utilizou-se a amostra concentrada de intestino macerado em tampão Tris-salina, que havia sido armazenado em geladeira. A amostra bruta foi inoculada sob as mesmas condições por 20 e 28 °C por 12 dias. Verificou-se abundante crescimento de fungos filamentosos com 10 dias (Figura 7). Foi possível isolar 15 morfotipos fúngicos distintos, dos quais 12 correspondiam a fungos filamentosos e três a leveduras (Figura 7).

Figura 7 - Inóculo inicial dos fungos do intestino de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*.



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Placas de Petri inoculadas em meio BDA com as amostras concentradas do intestino dos camarões após 12 dias de incubação ambas as temperaturas testadas (20 °C e 28 °C.).

(A) 20 °C; (B). 28 °C. Escala = 2 cm.

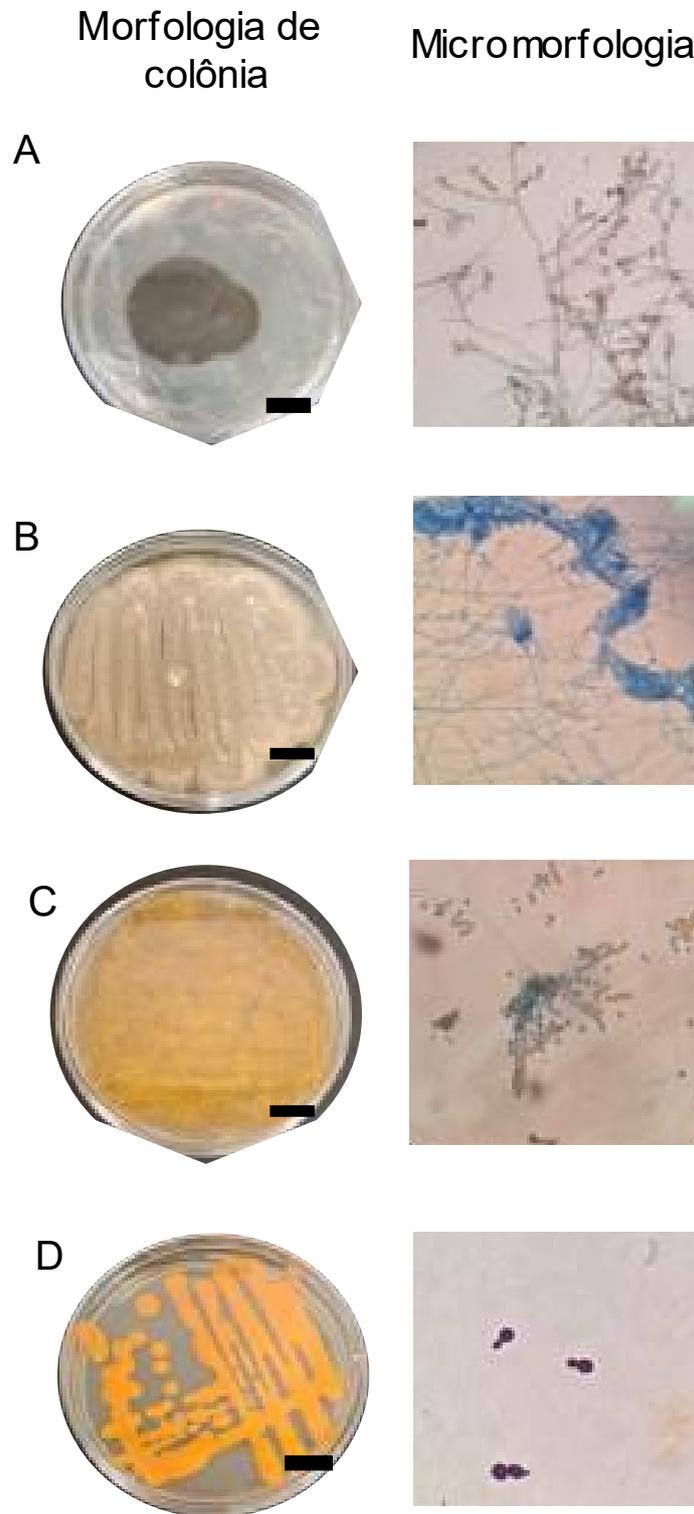
Nesse experimento, testou-se o isolamento fúngico em duas temperaturas, uma mais próxima da temperatura média da água do mar (20 °C) e outra temperatura ótima para crescimento de fungos mesófilos (28 °C). A análise revelou a obtenção de nove morfotipos na temperatura mais baixa e seis morfotipos na temperatura mais alta, conforme ilustrado na figura 7. Observou-se que a temperatura mais baixa favoreceu um crescimento letárgico, o que

impediu a sobreposição ou crescimento muito próximo das unidades formadoras de colônias (UFC). Tal fato é corroborado por Six e Bentz, (2007), que estudaram as variações sazonais, de temperatura entre outros fatores, influenciando a prevalência entre espécies fúngicas simbiotes em besouros.

Mesmo o experimento tendo sido feito sem repetições, verifica-se que na temperatura mais baixa obtivemos um maior número de UFCs. Isso pode sugerir que os fungos presentes no intestino do camarão estão mais adaptados a crescer em temperaturas mais próximas a temperatura média da água do mar. No entanto, são necessários experimentos adicionais que façam a quantificação dessas UFCs para confirmar a diferença de crescimento entre as temperaturas.

Os fungos isolados foram identificados através de características micro morfológicas usando a técnica do microcultivo. Essa técnica permitiu analisar as estruturas reprodutivas e identificar algumas linhagens em nível de gênero. Foi observada a presença de gêneros semelhantes nas duas temperaturas, porém com variações morfológicas, indicando linhagens distintas. Pelas características morfológicas, identificou-se fungos filamentosos dos gêneros *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium* e leveduras do gênero *Rhodotorula* nas duas condições de temperatura (Figura 8). O gênero *Acremonium* foi isolado exclusivamente a 28 °C, enquanto o gênero *Geotrichum* e um isolado não identificado foram obtidos apenas a 20 °C (Figura 9).

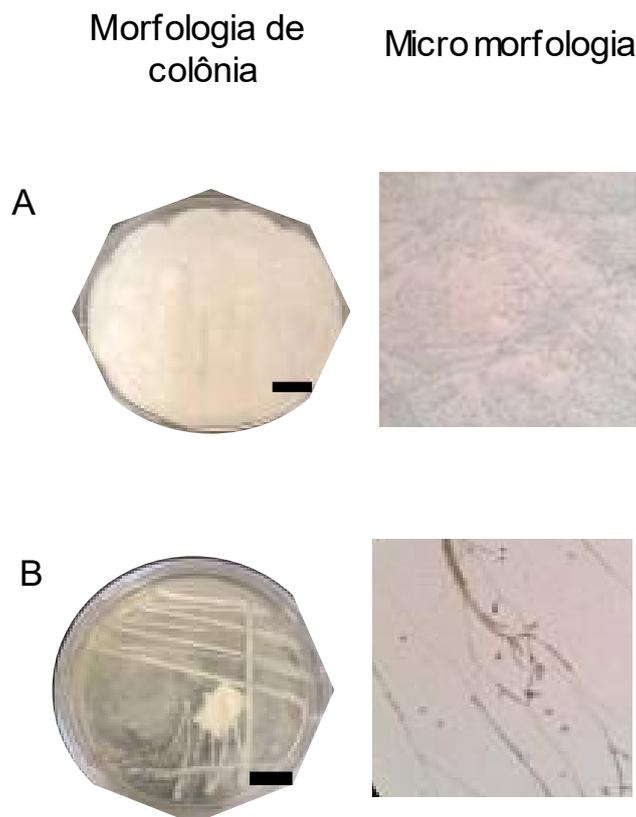
Figura 8 - Macro e micro morfologia dos gêneros fúngicos isolados do camarão *Litopenaeus vannamei* e cultivados nas duas temperaturas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Macro e micro morfologia dos gêneros fúngicos isolados em BDA em ambas as temperaturas testadas (20 °C e 28 °C.). (A) *Cladosporium*; (B) *Penicillium*; (C) *Aspergillus*; (D) *Rhodotorula*.

Figura 9 - Macro e micro morfologia dos gêneros fúngicos isolados do camarão *Litopenaeus vannamei* e cultivados em apenas uma das temperaturas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Macro e micro morfologia dos gêneros fúngicos isolados em BDA em somente uma das temperaturas (20 °C ou 28 °C.). (A) *Acremonium* cultivado a 28 °C; (B) *Geotrichum* cultivado a 20 °C. Escala do macrométrico = 2 cm.

De modo geral, os fungos encontrados no presente estudo são ubíquos e de natureza saprofítica, anteriormente reportados em águas salgadas e doces e em cultivos de camarão (Silva *et al.*, 2011). A grande maioria dos fungos identificados são representantes do filo Ascomycota que fora mencionado como o filo predominante em ambientes aquáticos (Shearer *et al.*, 2007). Jones *et al.*, (2009) relatou que leveduras do filo Basidiomycota, como a levedura do gênero *Rhodotorula*, foram predominantes em comunidades microplanctônicas. Resultado similar foi encontrado neste estudo, que isolou uma levedura desse gênero no intestino do camarão *L. vannamei*. Outras espécies como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* são frequentemente isolados de ambientes aquáticos, como documentado na revisão bibliográfica de Grossart *et al.*, (2019).

O gênero *Cladosporium* é conhecido por possuir espécies halotolerantes e, portanto, facilmente encontrado em ambientes com água do mar (Zalar *et al.*,

2007). Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também foram descritos compondo a microbiota de ambientes hipersalinos indicando a tolerância dos gêneros encontrados sobre a salinidade (Gunde-Cimerman e Zalar, 2014).

É amplamente reconhecido que a microbiota intestinal de vários organismos é influenciada por vários fatores, que vão desde alterações dietéticas até a presença de microrganismos na água e no solo, bem como a saúde dos animais e até mesmo a fase da vida em que o animal se encontra (Ringø *et al.*, 2016). De fato, a tecnologia de cultivo em que os camarões foram mantidos antes da coleta é um fator crucial a ser considerado. No sistema de bioflocos, ocorre uma comunidade microbiana complexa, e esses bioflocos podem servir como fonte adicional de alimento para os camarões (Emerenciano *et al.*, 2017). Portanto, é possível que os fungos isolados no presente estudo tenham origem nos próprios bioflocos, devido à presença desses microrganismos na comunidade microbiana do sistema.

A microbiota intestinal de organismos é exemplo de uma importante relação positiva dos fungos com seus hospedeiros. Esse local é composto por uma grande variedade de microrganismos, sendo que cada indivíduo possui uma comunidade específica que evolui e se mantém relativamente estável ao longo do tempo, mas que é suscetível a modificações tanto por agentes endógenos quanto exógenos (Blumberg e Powrie, 2012; Power *et al.*, 2014; Sekirov *et al.*, 2010). Essa interação é um fator que impacta a saúde dos organismos e, considerando que o intestino é uma das maiores superfícies de contato que antígenos externos têm com a parte interna do corpo, auxilia a homeostasia em diversos processos metabólicos, fisiológicos, nutricionais e imunológicos do hospedeiro (Power *et al.*, 2014; Sekirov *et al.*, 2010).

A interação entre os camarões, o ambiente de cultivo e a comunidade microbiana pode desempenhar um papel importante na composição dos fungos presentes no trato gastrointestinal dos camarões. Portanto, os microrganismos isolados no presente estudo foram encontrados sob as condições específicas de isolamento fúngico e do cultivo dos camarões. São necessários experimentos que detectem a presença dos mesmos gêneros em amostras da água, sedimento, ração e bioflocos, para confirmar a presença desses gêneros como componentes efetivos da microbiota intestinal dos camarões. Por fim, análises moleculares ainda são necessárias para a confirmação taxonômica dos isolados.

Como o objetivo dessa etapa do estudo era de selecionar um gênero de fungo filamentosos e um gênero de levedura que fossem taxonomicamente diferentes dos quais foram obtidos no item 4.1, o isolado de *Penicillium* sp. e o de *Rhodotorula* sp. foram selecionados para compor a coleção de fungos do LIAA. Essas espécies também foram escolhidas devido sua viabilidade de manipulação, como tempo de esporulação e nível de biossegurança.

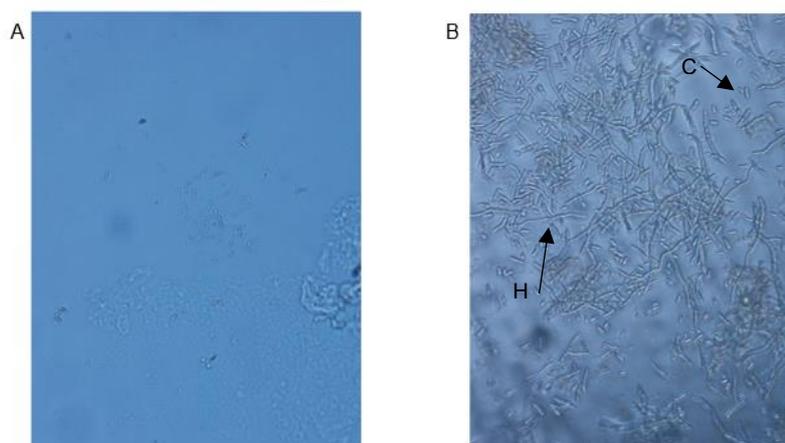
Esta etapa do presente estudo possuía um caráter exploratório, que visava a obtenção de novos exemplares para as etapas seguintes. Toda via, em estudos futuros realizar os isolamentos em uma quantidade maior de replicatas, controle rígido de contaminações e o isolamento dos microrganismos do local de cultivo e seria de grande importância a serem considerados para aprofundar os conhecimentos quanto a caracterização do microbioma de camarões.

#### 4.3 TESTES ANTIMICROBIANOS

A atividade antifúngica dos peptídeos foi testada contra linhagens de referência (Tabela 1) e contra as duas linhagens isoladas de intestino de camarão (*Penicillium* sp. e *Rhodotorula* sp.). No total, foram testados nove e oito linhagens de fungos filamentosos e leveduriformes, respectivamente, para assim contemplar uma ampla variedade de linhagens.

Em relação aos fungos filamentosos, inicialmente foi avaliado em cada poço da placa de teste a germinação dos esporos através da presença de hifas por microscopia invertida de contraste de fase. Essa abordagem foi escolhida, pois, apesar de tradicionalmente os testes antimicrobianos para fungos filamentosos serem avaliando o crescimento visível a olho nu, segundo os padrões da EUCAST (Comitê europeu de testes de susceptibilidade antimicrobiana (Arendrup *et al.*, 2020), a análise microscópica permitiu uma avaliação mais precisa da germinação dos conídios.

Figura 10 – Imagem representativa dos resultados dos testes de inibição da germinação dos esporos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: figura representativa dos testes de inibição da germinação dos esporos de *Fusarium oxysporum* MUCL 909. A. Controle negativo de germinação, onde hifas e conídios não estavam presentes depois do período de cultivo. Em aumento de 200 x. B. Controle positivo de germinação com presença de hifas (H) e conídios (C) indicados. Em aumento de 200 x.

#### 4.3.1 Fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs)

A atividade antifúngica dos peptídeos sintéticos baseados nos ALFs dos grupos E, F e G do camarão *L. vannamei* se mostrou distinta entre os grupos, como mostradas na tabela 2. O *Litvan* ALF-E<sub>33-52</sub> apresentou ação fungicida contra as linhagens *F. solani* MMBF86/09 e *S. cerevisiae* CAT1, sendo que as concentrações fungicidas foram de 2,5 a 5 e 20 a 40  $\mu$ M, respectivamente. Para as linhagens de *Rhizopus* sp., *C. tropicalis* e *Rhodotorula* sp. esse peptídeo apresentou somente ação inibitória nas concentrações 40 a 80, 10 a 20 e 5 a 10  $\mu$ M, respectivamente (tabela 2). O *Litvan* ALF-E<sub>33-52</sub> não mostrou atividade para as outras linhagens testadas.

O peptídeo *Litvan* ALF-F<sub>31-50</sub>, por sua vez, apresentou ação contra somente uma linhagem de fungo filamentoso, *F. solani* MMBF86/09, o qual esse peptídeo foi capaz de inibir entre 10 e 20  $\mu$ M (tabela 2). Para as leveduras, esse AMP foi eficaz em inibir o desenvolvimento de *C. albicans* ATCC 10231 e *S. cerevisiae* CAT1, ambas entre 20 e 40  $\mu$ M. Para *Rhodotorula* sp., o peptídeo sintético *Litvan* ALF-F<sub>31-50</sub> apresentou concentração inibitória entre 10 e 20  $\mu$ M. Esse AMP não apresentou atividade contra *C. albicans* ICB 12A, *N. glabratus* CCT 0728, *P. kudriavzevii* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, além de

não apresentar atividade contra a grande maioria dos fungos filamentosos testados no presente estudo (tabela 2).

O AMP *Litvan* ALF-G<sub>35-54</sub> apresentou ação contra as linhagens de fungos filamentosos: *F. oxysporum* MUCL909, *F. solani* MMBF86/09, *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp., entretanto foi somente para as espécies do gênero *Fusarium* que apresentou ação fungicida (10 a 20 e 2,5 a 2,5  $\mu$ M), como apresentado na tabela 2. Para as leveduras *C. albicans* ATCC 10231 e *S. cerevisiae* CAT1 esse peptídeo sintético apresentou ação fungicida entre 20 e 40  $\mu$ M. Em contraponto, para a levedura *C. tropicalis*, o *Litvan* ALF-G<sub>35-54</sub> demandou de uma concentração menor para apresentar ação fungicida (10 a 20  $\mu$ M). O AMP sintético *Litvan* ALF-G<sub>35-54</sub> mostrou demandar de concentrações entre 5 e 10  $\mu$ M para ação fungicida contra as espécies *P. kudriavzevii* ATCC 6258 e *Rhodotorula* sp. (tabela 2). Por fim, para *C. parapsilosis* ATCC 22019 apresentou somente ação inibitória em concentração entre 20 e 40  $\mu$ M, enquanto para demais espécies analisadas, ele não apresentou ação.

Tabela 2 - Espectro de atividade antifúngica dos peptídeos sintéticos da família dos ALFs.

Espécies	Linhagem	Filo	<i>Litvan</i> ALF-E <sub>33-52</sub>		<i>Litvan</i> ALF-F <sub>31-50</sub>		<i>Litvan</i> ALF-G <sub>35-54</sub>	
			MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<b>Filamentosos</b>								
<i>A. brasiliensis</i>	ATCC 16404	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>A. niger</i>	DR02	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>C. chrysophilum</i>	MANE147	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>C. higginsianum</i>	MANE166	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>F. oxysporum</i>	MUCL909	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	10-20	10-20
<i>F. solani</i>	MMBF86/09	Ascomycota	2,5-5	2,5-5	10-20	NA	2,5-2,5	2,5-2,5
<i>Penicillium</i> sp.	LIAA-UFSC	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	20-40	NA
<i>T. virens</i>	ATCC 9645	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Rhizopus</i> sp.	-	Mucoromycota	40-80	NA	NA	NA	20-40	NA
<b>Leveduriformes</b>								
<i>C. albicans</i>	ICB 12A	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	Ascomycota	NA	NA	20-40	NA	10-20	20-40
<i>N. glabratus</i>	CCT 0728	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>P. kudriavzevii</i>	ATCC 6258	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	5-10	5-10
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	20-40	NA
<i>C. tropicalis</i>	-	Ascomycota	10-20	NA	10-20	10-20	5-10	10-20
<i>S. cerevisiae</i>	CAT1	Ascomycota	20-40	20-40	20-40	NA	10-20	20-40
<i>Rhodotorula</i> sp.	LIAA-UFSC	Basidiomycota	5-10	NA	10-20	NA	1,25-2,5	5-10

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Os valores de concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) estão expressos em  $\mu\text{M}$ . Os resultados são expressos em um intervalo que representa a maior concentração de peptídeo que houve desenvolvimento microbiano e a menor concentração necessária para inibir o crescimento. NA: não ativo nas concentrações testadas.

Dentre os três ALFs testados, o peptídeo *Litvan* ALF-G<sub>35-54</sub> se destacou dos demais em relação ao amplo espectro de espécies que apresentaram atividade antifúngica, embora os ALFs E<sub>33-52</sub> e F<sub>31-50</sub> apresentaram atividade inibitória contra algumas linhagens testadas.

Interessantemente os peptídeos *Litvan* ALF-F<sub>31-50</sub> e *Litvan* ALF-G<sub>35-54</sub>, que foram sintetizados baseados em AMPs encontrados no camarão *L. vannamei*, apresentaram atividade contra as linhagens fúngicas extraídas do intestino do camarão da mesma espécie. A interação observada entre o amplo espectro de ação inibitória dos ALFs e o perfil da microbiota intestinal no camarão *L. vannamei* sugere uma possível contribuição desses AMPs na preservação do equilíbrio da comunidade microbiana. Essa perspectiva, corroborada por estudos em outros organismos, aponta não apenas para a capacidade dos AMPs em combater microrganismos externos, mas também para seu papel na modulação e preservação dos microbiomas hospedeiros (Soderholm e Pedicord, 2019).

Os ALFs sintéticos *Litvan* ALF-F<sub>31-50</sub> e ALF-G<sub>35-54</sub> apresentaram concentrações distintas para as duas linhagens de *Candida albicans* usadas no presente estudo. É possível perceber a ausência de atividade na linhagem ICB 12A, enquanto para a linhagem ATCC 10231 tanto *Litvan* ALF-F<sub>31-50</sub> quanto *Litvan* ALF-G<sub>35-54</sub> apresentaram ação inibitória e fungicida, respectivamente. Tais diferenças levantam hipóteses sobre a sensibilidade que cada linhagem possui. Ambas as linhagens são rotineiramente usadas em ensaios de sensibilidade a fármacos (Allam *et al.*, 2023; Olyaei *et al.*, 2023; Storto, 2015; Weinfeld, Birman e Paula, 1999).

Estudos revelaram que peptídeos derivados da região entre cisteínas dos ALFs apresentam atividade antimicrobiana semelhante à molécula completa (Jiang *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2018; Nagoshi *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2013). No entanto, é importante considerar o pI da região entre as cisteínas, pois esse fator pode ter um impacto direto na atividade antimicrobiana dos ALFs (Matos *et al.*, 2018). Em um estudo anterior, Matos *et al.*, (2018) avaliaram as propriedades antimicrobianas dos três ALFs (E, F e G) em comparação com duas linhagens utilizadas no presente estudo (*C. albicans* ICB 12A e *F. oxysporum* MUCL 909), contudo obtendo resultados distintos. Os peptídeos sintéticos utilizados por eles, também provenientes da região entre cisteínas, continham as cisteínas, mantendo a conformação secundária em uma estrutura em  $\beta$ -hairpin, diferente

da forma tridimensional de  $\alpha$ -hélice usada neste estudo. Essas alterações, juntamente com o aumento do  $pI$ , podem ter contribuído para as diferenças nos resultados desses peptídeos.

Como mencionado anteriormente, as infecções fúngicas invasivas mais frequentes são predominantemente causadas por *Candida*, sendo *C. albicans*, *Nakaseomyces glabratus*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Pichia kudriavzevii* as principais espécies de preocupação clínica (Dangi, Soni e Namdeo, 2010; Pappas *et al.*, 2018; Polke, Hube e Jacobsen, 2015). Na análise dos testes antimicrobianos dos *Litvan* ALFs é possível observar que esses AMPs apresentem ação contra esses patógenos de grande relevância, reforçando o grande potencial biotecnológico que essas moléculas têm em relação a novas terapias clínicas.

#### 4.3.2 Taquiplesina

O espectro de atividade do AMP sintético Tac I é apresentado na tabela 3. É possível perceber que a Tac I apresentou atividade fungicida para as espécies *F. oxysporum* MUCL909 e *Rhizopus* sp. na concentração de 10 a 20  $\mu$ M, enquanto para a espécie *F. solani* MMBF86/09, esse AMP demandou concentrações baixas para apresentar ação microbicida (2,5 a 5  $\mu$ M). Esse AMP não apresentou ação contra *A. brasiliensis* ATCC 16404, *A. niger* DR02, *C. chrysophilum* MANE147, *C. higginsianum* MANE166, *Penicillium* sp. LIAA-UFSC e *T. virens* ATCC 9645.

A Tac I demonstrou um amplo espectro de atividade contra as leveduras, visto que exibiu eficácia em todas as espécies testadas neste estudo. A faixa de concentração necessária para manifestar atividade fungicida foi de 10 a 20  $\mu$ M para todas as espécies, exceto para *Rhodotorula* sp., o qual apresentou ação fungicida na faixa de 5 a 10  $\mu$ M (tabela 3).

Tabela 3 - Espectro de atividade antifúngica do peptídeo sintético Tac I.

Espécies	Linhagem	Filo	MIC	MFC
<b>Filamentosos</b>				
<i>A. brasiliensis</i>	ATCC 16404	Ascomycota	NA	NA
<i>A. niger</i>	DR02	Ascomycota	NA	NA
<i>C. chrysophilum</i>	MANE147	Ascomycota	NA	NA
<i>C. higginsianum</i>	MANE166	Ascomycota	NA	NA
<i>F. oxysporum</i>	MUCL909	Ascomycota	10-20	10-20
<i>F. solani</i>	MMBF86/09	Ascomycota	2,5-5	2,5-5
<i>Penicillium</i> sp.	LIAA-UFSC	Ascomycota	NA	NA
<i>T. virens</i>	ATCC 9645	Ascomycota	NA	NA
<i>Rhizopus</i> sp.	-	Mucoromycota	10-20	10-20
<b>Leveduriformes</b>				
<i>C. albicans</i>	ICB 12A	Ascomycota	10-20	10-20
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	Ascomycota	5-10	10-20
<i>N. glabratus</i>	CCT 0728	Ascomycota	10-20	10-20
<i>P. kudriavzevii</i>	ATCC 6258	Ascomycota	5-10	10-20
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	Ascomycota	10-20	10-20
<i>C. tropicalis</i>	-	Ascomycota	2,5-5	10-20
<i>S. cerevisiae</i>	CAT1	Ascomycota	10-20	10-20
<i>Rhodotorula</i> sp.	LIAA-UFSC	Basidiomycota	0,6-1,25	5-10

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Os valores de concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) estão expressos em  $\mu\text{M}$ . Os resultados são expressos em um intervalo que representa a maior concentração de peptídeo que houve desenvolvimento microbiano e a menor concentração necessária para inibir o crescimento. NA: não ativo nas concentrações testadas.

Estudos enfatizam que o AMP taquiplesina possui atividade antifúngica (Miao *et al.*, 2022; Priya *et al.*, 2022). Dentre o espectro de espécies analisadas no presente estudo, esse peptídeo apresentou o maior espectro de atividade. Dentre os gêneros de fungos filamentosos que possuíram atividade, se destacam as duas espécies de *Fusarium* e uma de *Rhizopus*. Esses gêneros são de grande interesse no âmbito agrícola e aquícola, pois representam grandes perda em produções e os patógenos fúngicos mais conhecidos em sistemas de carcinicultura.

Os resultados apresentados indicam que o espectro de atividade que se assemelha a antifúngicos usados atualmente no tratamento de diversas candidíases, como o fluconazol. Este antifúngico de uso comum é conhecido por seu amplo espectro de atividade leveduricida e baixa eficácia contra filamentosos (Inaldo, Izamara e Renata, 2005; McKeny, Nessel e Zito, 2023). Ambas as substâncias apresentam seu mecanismo de ação relacionado a parede e membrana celular fúngica. Enquanto o fluconazol age inibindo a síntese de ergosterol (um importante componente da membrana que desempenha função estrutural), a taquiplesina está relacionado a desestabilização de membrana quando se trata de procariotos (Amiss *et al.*, 2022; Nakamura *et al.*, 1988; Xie, Wei e Qin, 2016). No entanto, o conhecimento sobre o mecanismo de ação contra fungos ainda permanece desfalcado.

Assim como o *Litvan* ALF- G35-54, o AMP Tac I se mostrou bastante eficiente no controle de fungos de interesse médico. Além disso, ambos também se mostraram eficazes contra as espécies descritas como patógenos de sistemas de carcinicultura, sendo um dos fatores que podem causar grandes perdas na produção de camarão.

#### 4.3.3 Magainina

A atividade inibitória do AMP sintético MSI-94 foi observada para *F. oxysporum* MUCL909 no intervalo das concentrações de 0,6 a 1,25  $\mu\text{M}$ , *F. solani* em concentrações de 0,6 a 1,25  $\mu\text{M}$  e *Rhizopus* sp. de 2,5 a 5  $\mu\text{M}$ . Esse peptídeo apresentou, nas mesmas concentrações, atividade fungicida contra *F. oxysporum* MUCL909 e *Rhizopus* sp., com exceção da linhagem de *F. solani*, a qual somente em concentrações mais elevadas (de 10 a 20  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de ser observada essa atividade (tabela 4). Esse peptídeo não mostrou atividade contra *A. brasiliensis* ATCC 16404, *A. niger* DR02, *C. chrysophilum* MANE147, *C. higginsianum* MANE166, *Penicillium* sp. LIAA-UFSC e *T. virens* ATCC 9645.

O MSI-94 apresentou atividade leviduristática e leveduricida contra *C. albicans* ICB 12A e *S. cerevisiae* CAT1 nas concentrações entre 10 e 20  $\mu\text{M}$  e contra *C. albicans* ATCC 10231 e *P. kudriavzevii* ATCC 6258 nas concentrações entre 5 e 10  $\mu\text{M}$  (tabela 4). Para a linhagem *C. tropicalis* LMC-UFSC, esse peptídeo apresentou ação leviduristática nas concentrações entre 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ,

mas somente foi observado efeito leveduricida nas concentrações entre 10 e 20  $\mu\text{M}$ . Para *Rhodotorula* sp. LIAA-UFSC, a ação inibitória foi constatada entre 1,25 e 2,5  $\mu\text{M}$  e a ação leveduricida entre 5 e 10  $\mu\text{M}$ . Esse peptídeo não mostrou atividade contra as leveduras *N. glabratus* CCT 0728 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 em nenhuma das concentrações avaliadas.

Tabela 4 - Espectro de atividade antifúngica do peptídeo sintético magainina (MSI-94).

Espécies	Linhagem	Filo	MIC	MFC
<b>Filamentosos</b>				
<i>A. brasiliensis</i>	ATCC 16404	Ascomycota	NA	NA
<i>A. niger</i>	DR02	Ascomycota	NA	NA
<i>C. chrysophilum</i>	MANE147	Ascomycota	NA	NA
<i>C. higginsianum</i>	MANE166	Ascomycota	NA	NA
<i>F. oxysporum</i>	MUCL909	Ascomycota	0,6-1,25	0,6-1,25
<i>F. solani</i>	MMBF86/09	Ascomycota	0,6-1,25	10-20
<i>Penicillium</i> sp.	LIAA-UFSC	Ascomycota	NA	NA
<i>T. virens</i>	ATCC 9645	Ascomycota	NA	NA
<i>Rhizopus</i> sp.	-	Mucoromycota	2,5-5	2,5-5
<b>Leveduriformes</b>				
<i>C. albicans</i>	ICB 12A	Ascomycota	10-20	10-20
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	Ascomycota	5-10	5-10
<i>N. glabratus</i>	CCT 0728	Ascomycota	NA	NA
<i>P. kudriavzevii</i>	ATCC 6258	Ascomycota	5-10	5-10
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	Ascomycota	NA	NA
<i>C. tropicalis</i>	-	Ascomycota	2,5-5	10-20
<i>S. cerevisiae</i>	CAT1	Ascomycota	10-20	10-20
<i>Rhodotorula</i> sp.	LIAA-UFSC	Basidiomycota	1,25-2,5	5-10

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Os valores de concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) estão expressos em  $\mu\text{M}$ . Os resultados são expressos em um intervalo que representa a maior concentração de peptídeo que houve desenvolvimento microbiano e a menor concentração necessária para inibir o crescimento. NA: não ativo nas concentrações testadas.

Devido ao fato de a magainina ter sido isolada da pele da rã *X. laevis*, sugere-se que esse AMP possui uma grande relevância na prevenção de

doenças associadas a anfíbios (McMillan e Coombs, 2020). Sabe-se que espécies fúngicas são as grandes responsáveis para o declínio populacional de anfíbios no planeta (O'Hanlon *et al.*, 2018). Sendo assim, é notório a importância desse peptídeo atrelado ao controle e prevenção de doenças fúngicas. Estudos realizados ao longo dos anos indicam a alta eficiência desse AMP contra fungos, como por exemplo, Park, Lee e Hahm, (2004), que atesta o alto potencial dessas moléculas como antifúngicos potentes em seu estudo contra *C. albicans*.

Sabe-se que, diferentemente de microrganismos procarióticos, os fungos possuem uma estrutura celular diferente. Park *et al.*, (2008) relatou que AMPs que atuam de maneira similar ao AMP magainina (HP2-20 - Peptídeo catiônico  $\alpha$ -helicoidal isolado da porção N-terminal da proteína ribossômica do *Helicobacter pylori*, que atua fazendo poros do tipo toroidal) se ligam especificamente à quitina na parede fúngica. Sendo assim, em teoria, nos fungos que possuem quitina em suas paredes, os peptídeos poderiam apresentar maior atividade, como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* testados por eles. Interessantemente, no presente estudo foram testadas duas espécies do mesmo gênero (*Aspergillus niger* DR02 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404), entretanto o MSI-94 não apresentou atividade contra essas linhagens, indicando possíveis hipóteses, como: o peptídeo apresente afinidade por outro componente da parede; essas linhagens não são sensíveis a esse AMP, essas espécies podem secretar alguma protease que degrada o MSI-94, dentre outras.

Neste estudo, o peptídeo MSI-94 mostrou atividade contra três fungos, sendo dois do mesmo gênero (*Fusarium*). Esse fato indica um alto potencial para o uso desse AMP na agroindústria e na carcinicultura, tendo em vista que o gênero *Fusarium* é um grande patógeno nesses setores (Chong, 2022; JOHNSON, 1995; Serra *et al.*, 2009). Ademais, nessas espécies que foram ativas, esse AMP demandou concentrações muito baixas para a atividade fungicida, como mostrado na tabela 4, o que indica sua alta eficácia contra esses patógenos.

O presente estudo demonstrou também o amplo espectro da magainina contra as espécies leveduriformes testadas (tabela 4). Além do amplo espectro, o MSI-94 demandou concentrações baixas para apresentar atividade contra patógenos oportunistas de grande interesse hospitalar, como *Rhodotorula* sp., por exemplo, que além de ser saprofítico, portanto, encontrado em diversos

locais, se apresenta como um patógeno emergente em pacientes com leucemia e resistente a tratamentos habituais (Erinmez, Zer e Büyüктаş Manay, 2022).

Nota-se que o peptídeo sintético MSI-94 apresentou atividade contra as duas linhagens de *C. albicans*. Entretanto, os dados mostram que para a linhagem ICB 12A foi necessária concentração maior do peptídeo para que houvesse ação. Löfgren *et al.*, (2009) também testaram o mesmo derivado sintético do AMP magainina contra uma terceira linhagem de *C. albicans*, todavia, também obteve concentrações diferentes. Esse fenômeno sugere que testes realizados em diferentes linhagens podem influenciar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e a Concentração Fungicida Mínima (MFC). Isso é provavelmente devido à variabilidade na sensibilidade de cada linhagem. Esse fenômeno é amplamente estudado em procariontes. Por exemplo, Dias *et al.*, (2010) avaliaram a sensibilidade de 44 cepas diferentes de *E. coli* e observaram resultados distintos para cada cepa testada. Da mesma forma, Zamora, Chaves e Arias, (2006) investigaram a sensibilidade de diferentes cepas de *L. monocytogenes* e *Salmonella* a antibióticos, também obtendo resultados diversos entre as cepas da mesma espécie. Resultados similares foram encontrados por Carretto *et al.*, (2011). Nesse estudo, foi testado a atividade antimicrobiana de um composto contra 50 linhagens distintas de *C. albicans*, sendo somente 68% das linhagens sensíveis ao composto.

No caso dos fungos nos quais o peptídeo demonstrou atividade, é aconselhável conduzir estudos adicionais, incluindo linhagens da mesma espécie de diversas origens, e até mesmo espécies relacionadas, a fim de aprimorar a compreensão sobre a eficácia e potencial aplicação desses peptídeos.

#### **4.3.4 Novas perspectivas de AMPs como antifúngicos**

Os AMPs de animais aquáticos utilizados no presente estudo surgem como uma estratégia promissora no enfrentamento e controle de doenças fúngicas. Sua notável baixa citotoxicidade para células eucarióticas, conforme evidenciado em estudos prévios (Löfgren *et al.*, 2009; Matos *et al.*, 2023), confere-lhes potencial para ensaios clínicos, também enfatizado em várias pesquisas (Costa *et al.*, 2019; Datta e Roy, 2021; Erdem Büyükkiraz e Kesmen,

2022; Guaní-Guerra *et al.*, 2010). É importante ressaltar, contudo, que essa aplicação não se restringe exclusivamente a esse contexto, sugerindo possíveis outras abordagens. A estabilidade de ação dessas moléculas sobre alterações de salinidade e pH complementam os resultados apresentados no presente estudo enfatizando a possível funcionalidade e abrindo precedentes para novos estudos de novas perspectivas e de utilização dessas biomoléculas.

Atualmente contaminação de superfícies, por exemplo, é um grave problema não somente em ambiente hospitalar, mas também em ambientes com alta taxa de rotatividade de pessoas (Jabłońska-Trypuć *et al.*, 2022). Assim como a contaminação de superfícies, temos também o consumo de alimentos contaminados por micotoxinas, que também causam prejuízos na saúde pública e no ambiente industrial (Garvey e Rowan, 2023). Existem diversas formas de controle de desinfecção fúngica, toda via, o surgimento de linhagens resistentes a esses métodos demandam que busquemos novas estratégias para a solução desse problema (Garvey e Rowan, 2023).

Utilizar os AMPs de animais aquáticos com desinfetante de superfícies e antissépticos pode ser um contexto importante a ser abordado em pesquisas futuras. A prevenção de contaminações de doenças fúngicas é a melhor maneira de evitar doenças. Sendo assim, alavancar esse mercado e ampliar as aplicações biotecnológicas dos AMPs de animais aquáticos se tornam de urgente e extrema importância.

## 5 CONCLUSÕES

- O atual estudo possibilitou ampliar os conhecimentos acerca do microbioma intestinal dos camarões da espécie *L. vannamei*. Embora análises mais precisas e quantitativas deverão ser feitas para constatar a correta variabilidade das espécies encontradas.
- Estabeleceu-se uma coleção abrangente de fungos filamentosos e leveduras, contendo exemplares de relevância médica, veterinária, agropecuária e biotecnológica. Essa coleção oferece um amplo espectro de espécies para avaliações antimicrobianas envolvendo peptídeos antimicrobianos.
- Os AMPs *Litvan* ALF-G<sub>35-54</sub>, taquiplesina Tac I e magainina MSI-94 mostraram grande potencial antifúngico pois além de apresentarem um grande espectro de atividade relacionada as espécies testadas, algumas delas demandaram de concentrações baixas para a apresentar atividade.
- Através deste estudo exploratório, evidenciou-se o substancial potencial dos AMPs provenientes de animais aquáticos como agentes antifúngicos, o qual fornece a base para o desenvolvimento de novas pesquisas relacionadas a essas biomoléculas em fungos.

## 6 PERSPECTIVAS

- Isolar fungos do trato gastrointestinal dos camarões a fim de obter dados quantitativos das espécies;
- Aprofundar a nível molecular os testes de identificação dos fungos isolados do intestino;
- Reavaliar os ensaios antimicrobianos para que sejam refeitos os testes em um número maior de réplicas;
- Avaliar novas possibilidades de aplicação biotecnológicas dos AMPs de animais aquáticos.

## REFERÊNCIAS

ALLAM, A. M.; ABUBAKR, H. O.; YASSIN, A. M.; ABDEL-RAZEK, A. S.; KHATTAB, M. S.; GOUDA, E. M.; MOUSA, S. Z. Potential chemopreventive effects of Broccoli extract supplementation against 7, 12 dimethyl Benz(a)anthracene (DMBA) -induced toxicity in female rats. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 17234, 11 out. 2023.

AMEND, A. *et al.* Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. **mBio**, v. 10, n. 2, p. 1–15, 2019.

AMISS, A. S. *et al.* Modified horseshoe crab peptides target and kill bacteria inside host cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 1, p. 38, 31 jan. 2022.

ANBANANDAM, A.; ALBARADO, D. C.; TIRZIU, D. C.; SIMONS, M.; VEERARAGHAVAN, S. Molecular Basis for Proline- and Arginine-Rich Peptide Inhibition of Proteasome. **Journal of Molecular Biology**, v. 384, n. 1, p. 219–227, dez. 2008.

ARENDRUP, M. C. *et al.* How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v. 10.0 European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 11, p. 1464–1472, 1 nov. 2020.

BARRETO, C.; ROSA COELHO, J. DA; YUAN, J.; XIANG, J.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Specific molecular signatures for type II crustins in penaeid shrimp uncovered by the identification of crustin-like antimicrobial peptides in *litopenaeus vannamei*. **Marine Drugs**, v. 16, n. 1, p. 5–7, 2018.

BECHINGER, B.; ZASLOFF, M.; OPELLA, S. J. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Protein Science**, v. 2, n. 12, p. 2077–2084, dez. 1993.

BERKUT, A. A.; USMANOVA, D. R.; PEIGNEUR, S.; OPARIN, P. B.; MINEEV, K. S.; ODINTSOVA, T. I.; TYTGAT, J.; ARSENIYEV, A. S.; GRISHIN, E. V.; VASSILEVSKI, A. A. Structural Similarity between Defense Peptide from Wheat and Scorpion Neurotoxin Permits Rational Functional Design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 20, p. 14331–14340, maio 2014.

BILLAH, M. M.; SAHA, S. K.; OR RASHID, M. M.; HOSSAIN, F.; YAMAZAKI, M. Effect of osmotic pressure on pore formation in lipid bilayers by the antimicrobial peptide magainin 2. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 24, n. 11, p. 6716–6731, 2022.

BLUMBERG, R.; POWRIE, F. Microbiota, Disease, and Back to Health: A Metastable Journey. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 137, 6 jun. 2012.

BRODY, H. The gut microbiome. **Nature**, v. 577, n. 7792, p. S5–S5, 30

jan. 2020.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, mar. 2005.

BROTMAN, Y.; KAPUGANTI, J. G.; VITERBO, A. Trichoderma. **Current Biology**, v. 20, n. 9, p. R390–R391, maio 2010.

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 169–184, 5 abr. 2004.

CARRETTO, C. DE F. P.; JUNQUEIRA, J. C.; ALMEIDA, R. B. DE A.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C. Antimicrobial activity of *Mentha piperita* L. against *Candida* spp. **Brazilian Dental Science**, v. 13, n. 1/2, p. 4–9, 5 ago. 2011.

CDC. **Antifungal Resistance | Fungal Diseases | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/antifungal-resistance.html>>. Acesso em: 26 jun. 2022.

CHIMBEKUJWO, K. I.; JA'AFARU, M. I.; ADEYEMO, O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. **Scientific African**, v. 8, p. e00398, jul. 2020.

CHONG, R. S.-M. Shrimp fusarium disease. *In*: **Aquaculture Pathophysiology**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 279–281.

CONIBEAR, A. C.; ROSENGREN, K. J.; HARVEY, P. J.; CRAIK, D. J. Structural Characterization of the Cyclic Cystine Ladder Motif of  $\theta$ -Defensins. **Biochemistry**, v. 51, n. 48, p. 9718–9726, 4 dez. 2012.

COSTA, F.; TEIXEIRA, C.; GOMES, P.; MARTINS, M. C. L. Clinical Application of AMPs. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 281–298.

DANGI, S. Y.; SONI, M. L.; NAMDEO, K. P. ORAL CANDIDIASIS: A REVIEW. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 36–41, 2010.

DATTA, S.; ROY, A. Antimicrobial Peptides as Potential Therapeutic Agents: A Review. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 555–577, 1 mar. 2021.

DELATORRE, C. A.; SILVA, A. A. DA. *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. **Revista de Ciências Agrárias.**, v. 31, n. 2, p. 58–67, 2008.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; ROSA, R. D.; SCHMITT, P.; BARRETO, C.; VIDAL-DUPIOL, J.; MITTA, G.; GUEGUEN, Y.; BACHÈRE, E. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1695, 26 maio 2016.

DIAS, M. T.; SANTOS, P. C. R. F.; OLIVEIRA, L. A. T.; MARIN, V. A. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna linnaeus*, 1758) à antimicrobianos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 319–324, jun. 2010.

DOUGLASS, A. P.; OFFEI, B.; BRAUN-GALLEANI, S.; COUGHLAN, A. Y.; MARTOS, A. A. R.; ORTIZ-MERINO, R. A.; BYRNE, K. P.; WOLFE, K. H. Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 7, p. e1007138, 19 jul. 2018.

DU, Q. *et al.* *Candida albicans* promotes tooth decay by inducing oral microbial dysbiosis. **The ISME Journal**, v. 15, n. 3, p. 894–908, 4 mar. 2021.

EGHTEDARI, M.; JAFARI PORZANI, S.; NOWRUZI, B. Anticancer potential of natural peptides from terrestrial and marine environments: A review. **Phytochemistry Letters**, v. 42, p. 87–103, abr. 2021.

EMERENCIANO, M. G. C.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MIRANDA-BAEZA, A. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. *In: Water Quality*. [s.l.] InTech, 2017.

ERDEM BÜYÜKKIRAZ, M.; KESMEN, Z. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 3, p. 1573–1596, 1 mar. 2022.

ERINMEZ, M.; ZER, Y.; BÜYÜKTAŞ MANAY, A. *Rhodotorula fungemia* in a patient with acute lymphoblastic leukemia. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 12, n. 1, 24 maio 2022.

ESKOLA, M.; KOS, G.; ELLIOTT, C. T.; HAJŠLOVÁ, J.; MAYAR, S.; KRŠKA, R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 16, p. 2773–2789, 2020.

FASSARELLA, M.; BLAAK, E. E.; PENDERS, J.; NAUTA, A.; SMIDT, H.; ZOETENDAL, E. G. Gut microbiome stability and resilience: elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health. **Gut**, v. 70, n. 3, p. 595–605, mar. 2021.

FERNÁNDEZ DE ULLIVARRI, M.; ARBULU, S.; GARCIA-GUTIERREZ, E.; COTTER, P. D. Antifungal Peptides as Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 17 mar. 2020.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, jan. 2015.

FREITAS, J. DE; PEREIRA NETO, L. M.; SILVA, T. I. B. DA; OLIVEIRA, T. F. L. DE; ROCHA, J. H. L. DA; SOUZA, M. D.; MARCHI, P. G. F. DE; ARAÚJO, Á. V. DE. Counting and identification of molds and yeasts in dry salted shrimp commercialized in Rio Branco, Acre, Brazil. **Food Science and Technology**, v.

41, n. suppl 1, p. 284–289, jun. 2021.

FUENTES-ARAGÓN, D.; REBOLLAR-ALVITER, A.; OSNAYA-GONZÁLEZ, M.; ENCISO-MALDONADO, G. A.; GONZÁLEZ-REYES, H.; SILVA-ROJAS, H. V. Multilocus phylogenetic analyses suggest the presence of *Colletotrichum chrysophilum* causing banana anthracnose in Mexico. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 128, n. 2, p. 589–595, 2 abr. 2021.

GARVEY, M.; ROWAN, N. J. Pathogenic Drug Resistant Fungi: A Review of Mitigation Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1584, 13 jan. 2023.

GERDOL, M.; SCHMITT, P.; VENIER, P.; ROCHA, G.; ROSA, R. D.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. Functional Insights From the Evolutionary Diversification of Big Defensins. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 758, 30 abr. 2020.

GHALY, G.; TALLIMA, H.; DABBISH, E.; BADR ELDIN, N.; ABD EL-RAHMAN, M. K.; IBRAHIM, M. A. A.; SHOEIB, T. Anti-Cancer Peptides: Status and Future Prospects. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1148, 23 jan. 2023.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MORA-MONTES, H. M. Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 13, p. 1673–1689, jun. 2020.

GRÖNBERG, A.; MAHLAPUU, M.; STÄHLE, M.; WHATELY-SMITH, C.; ROLLMAN, O. Treatment with <scp>LL</scp> -37 is safe and effective in enhancing healing of hard-to-heal venous leg ulcers: a randomized, placebo-controlled clinical trial. **Wound Repair and Regeneration**, v. 22, n. 5, p. 613–621, 20 set. 2014.

GROSSART, H.-P.; WYNGAERT, S. VAN DEN; KAGAMI, M.; WURZBACHER, C.; CUNLIFFE, M.; ROJAS-JIMENEZ, K. Fungi in aquatic ecosystems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 339–354, 12 jun. 2019.

GUANÍ-GUERRA, E.; SANTOS-MENDOZA, T.; LUGO-REYES, S. O.; TERÁN, L. M. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 1–11, 1 abr. 2010.

GUNDE-CIMERMAN, N.; ZALAR, P. Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 170–179, 2014.

HALE, J. D. F.; HANCOCK, R. E. W. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 5, n. 6, p. 951–959, dez. 2007.

HALIFU, S.; DENG, X.; SONG, X.; SONG, R.; LIANG, X. Inhibitory Mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia solani*. **Plants**, v. 9, n. 7,

p. 912, 19 jul. 2020.

HANCOCK, R. E. W.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402–410, 1 set. 2000.

HANCOCK, R. E. W.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 82–88, 1 fev. 1998.

HAZES, B.; KALK, K. H.; HOL, W. G. J.; MAGNUS, K. A.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J.; DAUTER, Z. Crystal structure of deoxygenated limulus polyphemus subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: Clues for a mechanism for allosteric regulation. **Protein Science**, v. 2, n. 4, p. 597–619, abr. 1993.

HIRAKURA, Y.; KOBAYASHI, S.; MATSUZAKI, K. Specific interactions of the antimicrobial peptide cyclic  $\beta$ -sheet tachyplesin I with lipopolysaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1562, n. 1–2, p. 32–36, maio 2002.

HOOG, S. DE; GUARRO, J.; GENÉ, J.; AHMED, S.; AL-HATMI, A.; FIGUERAS, M.; VITALE, R. **Atlas of Clinical Fungi**. [s.l: s.n.].

HUBSCHMAN, J. H.; SCHMITT, J. A. Primary mycosis in shrimp larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 13, n. 3, p. 351–357, 1 maio 1969.

INALDO, S. J.; IZAMARA, S.; RENATA, B. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol General traits of action, treatment and fungal resistance to fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, p. 189–197, 2005.

JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, A.; MAKUŁA, M.; WŁODARCZYK-MAKUŁA, M.; WOŁEJKO, E.; WYDRO, U.; SERRA-MAJEM, L.; WIATER, J. Inanimate Surfaces as a Source of Hospital Infections Caused by Fungi, Bacteria and Viruses with Particular Emphasis on SARS-CoV-2. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 13, p. 8121, 1 jul. 2022.

JAIN, A.; SARSAIYA, S.; WU, Q.; LU, Y.; SHI, J. A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. **Bioengineered**, v. 10, n. 1, p. 409–424, 1 jan. 2019.

JAMIU, A. T.; ALBERTYN, J.; SEBOLAI, O. M.; POHL, C. H. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 14–30, 4 jan. 2021.

JIANG, H.-S.; ZHANG, Q.; ZHAO, Y.-R.; JIA, W.-M.; ZHAO, X.-F.; WANG, J.-X. A new group of anti-lipopolysaccharide factors from *Marsipenaues japonicus* functions in antibacterial response. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 48, n. 1, p. 33–42, jan. 2015.

JIM, K. K.; DAEMS, J. J. N.; BOEKHOLDT, S. M.; DIJK, K. VAN. *Nakaseomyces glabrata* endocarditis: A therapeutic dilemma. **Medical**

**Mycology Case Reports**, v. 40, p. 54–57, jun. 2023.

JOHNSON, S. K. **Handbook of Shrimp Disease**. [s.l.: s.n.].

JONES, E. B. J.; SAKAYAROJ, J.; SUETRONG, S.; SOMRITHIPOL, S.; PANG, L. K. Classification of marine ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. **Fungal Diversity**, v. 35, n. March, p. 1–187, 2009.

JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P. Principais doenças de Anonáceas no Brasil: descrição e controle. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 55–64, 2014.

KIM, J.; BAIDOO, E. E. K.; AMER, B.; MUKHOPADHYAY, A.; ADAMS, P. D.; SIMMONS, B. A.; LEE, T. S. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for isoprenol production. **Metabolic Engineering**, v. 64, p. 154–166, mar. 2021.

KOO, H. B.; SEO, J. Antimicrobial peptides under clinical investigation. **Peptide Science**, v. 111, n. 5, 3 set. 2019.

KORDI, M.; BORZOUYI, Z.; CHITSAZ, S.; ASMAEI, M. HADI; SALAMI, R.; TABARZAD, M. Antimicrobial peptides with anticancer activity: Today status, trends and their computational design. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 733, p. 109484, jan. 2023.

KOSMIDIS, C.; DENNING, D. W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Thorax**, v. 70, n. 3, p. 270–277, 1 mar. 2015.

KUSHIBIKI, T.; KAMIYA, M.; AIZAWA, T.; KUMAKI, Y.; KIKUKAWA, T.; MIZUGUCHI, M.; DEMURA, M.; KAWABATA, S.; KAWANO, K. Interaction between tachyplesin I, an antimicrobial peptide derived from horseshoe crab, and lipopolysaccharide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 3, p. 527–534, mar. 2014.

LAI, Y.; GALLO, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 3, p. 131–141, mar. 2009.

LEONI, G.; POLI, A. DE; MARDIROSSIAN, M.; GAMBATO, S.; FLORIAN, F.; VENIER, P.; WILSON, D. N.; TOSSI, A.; PALLAVICINI, A.; GERDOL, M. Myticalins: A Novel Multigenic Family of Linear, Cationic Antimicrobial Peptides from Marine Mussels (*Mytilus* spp.). **Marine Drugs** **2017**, Vol. 15, Page 261, v. 15, n. 8, p. 261, 22 ago. 2017.

LI, H. *et al.* The inhibitory effect of tachyplesin I on thrombosis and its mechanisms. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 94, n. 3, p. 1672–1679, 12 set. 2019.

LI, Q.; BU, J.; SHU, J.; YU, Z.; TANG, L.; HUANG, S.; GUO, T.; MO, J.; LUO, S.; SOLANGI, G. S.; HSIANG, T. *Colletotrichum* species associated with mango in southern China. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18891, 11 dez. 2019.

LIGHTNER, D. V.; FONTAINE, C. T. A new fungus disease of the white

shrimp *Penaeus setiferus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 22, n. 1, p. 94–99, 1 jul. 1973.

LIMA, N. B.; A. BATISTA, M. V. DE; MORAIS, M. A. DE; BARBOSA, M. A. G.; MICHEREFF, S. J.; HYDE, K. D.; CÂMARA, M. P. S. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 75–88, 4 jul. 2013.

LIMA, S. L.; COLOMBO, A. L.; ALMEIDA JUNIOR, J. N. DE. Fungal Cell Wall: Emerging Antifungals and Drug Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. November, p. 1–9, 2019.

LIPSKY, B. A.; HOLROYD, K. J.; ZASLOFF, M. Topical versus Systemic Antimicrobial Therapy for Treating Mildly Infected Diabetic Foot Ulcers: A Randomized, Controlled, Double-Blinded, Multicenter Trial of Pexiganan Cream. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 12, p. 1537–1545, 15 dez. 2008.

LIU, H.; JIRAVANICHPAISAL, P.; SÖDERHÄLL, I.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Antilipopolysaccharide Factor Interferes with White Spot Syndrome Virus Replication In Vitro and In Vivo in the Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Virology**, v. 80, n. 21, p. 10365–10371, nov. 2006.

LÖFGREN, S. E.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E. D. F. A.; BACHÈRE, E.; BARRACCO, M. A. Comparative activity and stability under salinity conditions of different antimicrobial peptides isolated from aquatic animals. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 16, p. 1805–1812, nov. 2009.

LU, J.; LI, X.; QIU, Q.; CHEN, J.; XIONG, J. Gut interkingdom predator-prey interactions are key determinants of shrimp health. **Aquaculture**, v. 546, 15 jan. 2022.

MACHADO, L. G. V.; GONCALVES, P.; BARRETO, C.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Farfantepenaeus gene-encoded antimicrobial peptides: Identification, molecular characterization and gene expression in response to fungal infections. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 182, n. August 2020, p. 1–8, 2021.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJÖRN, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, 27 dez. 2016.

MARQUES, S. A.; CAMARGO, R. M. P. DE; ABBADE, L. P. F.; MARQUES, M. E. A. Mucormicose: Infecção Oportunística Grave Em Paciente Imunossuprimido. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, n. 2, 2010.

MATOS, G. M. **CHARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NOVOS FATORES ANTI-** Florianópolis. [s.l.] Federal University of Santa Catarina, 2018.

\_\_\_\_\_. Antimicrobial Spectrum of Activity and Mechanism of Action of Linear Alpha-Helical Peptides Inspired by Shrimp Anti-Lipopolysaccharide

Factors. **Biomolecules**, v. 13, n. 1, 2023.

MATOS, G. M.; ROSA, R. D. On the silver jubilee of crustacean antimicrobial peptides. **Reviews in Aquaculture**, n. August, p. 1–19, 2022.

MATOS, G. M.; SCHMITT, P.; BARRETO, C.; FARIAS, N. D.; TOLEDO-SILVA, G.; GUZMÁN, F.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Massive Gene Expansion and Sequence Diversification Is Associated with Diverse Tissue Distribution, Regulation and Antimicrobial Properties of Anti-Lipopolysaccharide Factors in Shrimp. **Marine Drugs** **2018**, Vol. 16, Page 381, v. 16, n. 10, p. 381, 11 out. 2018.

MATSUZAKI, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v. 1376, n. 3, p. 391–400, nov. 1998.

\_\_\_\_\_. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1462, n. 1–2, p. 1–10, dez. 1999.

MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K. I.; HARADA, M.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1327, n. 1, p. 119–130, 5 jul. 1997.

MCKENNA, M. Antibiotic resistance: The last resort. **Nature**, v. 499, n. 7459, p. 394–396, 2013.

MCKENY, P. T.; NESSEL, T. A.; ZITO, P. M. **Antifungal Antibiotics**. [s.l.: s.n.].

MCMILLAN, K. A. M.; COOMBS, M. R. P. Review: Examining the Natural Role of Amphibian Antimicrobial Peptide Magainin. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5436, 20 nov. 2020.

MERRIFIELD, D. L.; BURNARD, D.; BRADLEY, G.; DAVIES, S. J.; BAKER, R. T. M. Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 40, n. 9, p. 1064–1072, 2009.

MIAO, F.; TAI, Z.; WANG, Y.; ZHU, Q.; FANG, J. K.-H.; HU, M. Tachyplesin I Analogue Peptide as an Effective Antimicrobial Agent against *Candida albicans* – *Staphylococcus aureus* Poly-Biofilm Formation and Mixed Infection. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 1839–1850, 9 set. 2022.

MISHRA, B.; WANG, X.; LUSHNIKOVA, T.; ZHANG, Y.; GOLLA, R. M.; NARAYANA, J. L.; WANG, C.; MCGUIRE, T. R.; WANG, G. Antibacterial, antifungal, anticancer activities and structural bioinformatics analysis of six naturally occurring temporins. **Peptides**, v. 106, p. 9–20, ago. 2018.

MOORE, D.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J. **21st Century Guidebook to Fungi**. [s.l.] Cambridge University Press, 2011.

MUKHERJEE, P. K.; MENDOZA-MENDOZA, A.; ZEILINGER, S.; HORWITZ, B. A. Mycoparasitism as a mechanism of Trichoderma-mediated suppression of plant diseases. **Fungal Biology Reviews**, v. 39, p. 15–33, mar. 2022.

MUZIO, L. LO *et al.* Overview of Candida albicans and Human Papillomavirus (HPV) Infection Agents and their Biomolecular Mechanisms in Promoting Oral Cancer in Pediatric Patients. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–11, 2 nov. 2021.

NAGOSHI, H. *et al.* Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having an LPS binding domain in kuruma prawn Marsupenaeus japonicus. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 13, p. 2061–2069, maio 2006.

NAKAMURA, T.; FURUNAKA, H.; MIYATA, T.; TOKUNAGA, F.; MUTA, T.; IWANAGA, S.; NIWA, M.; TAKAO, T.; SHIMONISHI, Y. Tachyplestin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (Tachypleus tridentatus). Isolation and chemical structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 32, p. 16709–16713, 15 nov. 1988.

NICOLA, A. M.; ALBUQUERQUE, P.; PAES, H. C.; FERNANDES, L.; COSTA, F. F.; KIOSHIMA, E. S.; ABADIO, A. K. R.; BOCCA, A. L.; FELIPE, M. S. Antifungal drugs: New insights in research & development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 195, p. 21–38, mar. 2019.

O'HANLON, S. J. *et al.* Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. **Science**, v. 360, n. 6389, p. 621–627, 11 maio 2018.

ODDS, F. C. Candida Infections: An Overview. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–5, 2 jan. 1987.

OKAZAKI, K.; SUMITANI, H.; TAKAHASHI, K.; ISEGAWA, Y. Mode of Antifungal Action of Daito-Gettou (Alpinia zerumbet var. exelsa) Essential Oil against Aspergillus brasiliensis. **Foods**, v. 12, n. 6, p. 1298, 18 mar. 2023.

OLYAEI, A.; GHALEGHOVANDI, N.; MOGHADAMI, F.; SADEGHPOUR, M.; ABEDIHA, S. Design, synthesis, antimicrobial, antibiofilm evaluation and Z/E -isomerization of novel 6-((arylamino)methylene)benzo[ a ] phenazin-5(6 H)-ones induced by organic solvent. **RSC Advances**, v. 13, n. 42, p. 29393–29400, 2023.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B. J. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18026, 11 maio 2018.

PARK, S.-C.; KIM, M.-H.; HOSSAIN, M. A.; SHIN, S. Y.; KIM, Y.; STELLA, L.; WADE, J. D.; PARK, Y.; HAHM, K.-S. Amphipathic  $\alpha$ -helical peptide, HP (2–20), and its analogues derived from Helicobacter pylori: Pore formation mechanism in various lipid compositions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1778, n. 1, p. 229–241, jan. 2008.

PARK, Y.; LEE, D. G.; HAHM, K.-S. HP(2–9)-magainin 2(1–12), a

synthetic hybrid peptide, exerts its antifungal effect on *Candida albicans* by damaging the plasma membrane. **Journal of Peptide Science**, v. 10, n. 4, p. 204–209, abr. 2004.

PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B. Identificação e manejo das principais doenças fúngicas do meloeiro. 2012.

PETIT, V. W.; ROLLAND, J.-L.; BLOND, A.; CAZEVIEILLE, C.; DJEDIAT, C.; PEDUZZI, J.; GOULARD, C.; BACHÈRE, E.; DUPONT, J.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; REBUFFAT, S. A hemocyanin-derived antimicrobial peptide from the penaeid shrimp adopts an alpha-helical structure that specifically permeabilizes fungal membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 3, p. 557–568, mar. 2016.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; TURNIDGE, J. D.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997–2016. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Supplement\_1, p. S79–S94, 15 mar. 2019.

PLOETZ, R. C. Fusarium Wilt of Banana. **Phytopathology**®, v. 105, n. 12, p. 1512–1521, dez. 2015.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* Survival Strategies. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 139–235.

PONPRATEEP, S.; THARNTADA, S.; SOMBOONWIWAT, K.; TASSANAKAJON, A. Gene silencing reveals a crucial role for anti-lipopolysaccharide factors from *Penaeus monodon* in the protection against microbial infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 1, p. 26–34, jan. 2012.

POWER, S. E.; O'TOOLE, P. W.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F. Intestinal microbiota, diet and health. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 3, p. 387–402, 14 fev. 2014.

PRIYA, A.; ADITYA, A.; BUDAGAVI, D. P.; CHUGH, A. Tachyplesin and CyLoP-1 as efficient anti-mycobacterial peptides: A novel finding. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1864, n. 7, p. 183895, jul. 2022.

RAUTENBACH, M.; TROSKIE, A. M.; VOSLOO, J. A. Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. **Biochimie**, v. 130, p. 132–145, nov. 2016.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 6, p. 536–547, dez. 2004.

REES, H. J.; DRAKULIC, J.; CROMEY, M. G.; BAILEY, A. M.; FOSTER, G. D. Endophytic *Trichoderma* spp. can protect strawberry and privet plants from infection by the fungus *Armillaria mellea*. **PLOS ONE**, v. 17, n. 8, p. e0271622, 1 ago. 2022.

RINGØ, E. *et al.* Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 219–282, 7 abr. 2016.

RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 2, p. 1–9, 2020.

ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans Abstract Crustaceans are a large and diverse invertebrate animal group that mounts a complex and efficient innate immune response against a variety of microorganisms . The crustacean immune system is primarily related. **Isj**, v. 7, n. 1824– 307X, p. 262–284, 2010.

ROSA, R. D.; CAPELLI-PEIXOTO, J.; MESQUITA, R. D.; KALIL, S. P.; POHL, P. C.; BRAZ, G. R.; FOGAÇA, A. C.; DAFFRE, S. Exploring the immune signalling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 59, p. 1–14, jun. 2016.

ROSA, R. D.; VERGNES, A.; LORGERIL, J. DE; GONCALVES, P.; PERAZZOLO, L. M.; SAUNÉ, L.; ROMESTAND, B.; FIEVET, J.; GUEGUEN, Y.; BACHÈRE, E.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. Functional Divergence in Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors (ALFs): From Recognition of Cell Wall Components to Antimicrobial Activity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67937, 4 jul. 2013.

RUAN, S.-Y.; HSUEH, P.-R. Invasive Candidiasis: An Overview from Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 108, n. 6, p. 443–451, jun. 2009.

SAINI, T. J.; GUPTA, S. G.; ANANDALAKSHMI, R. First report of papaya anthracnose caused by *Colletotrichum fructicola* in India. **New Disease Reports**, v. 34, n. 1, p. 27–27, 7 jul. 2016.

SANTOS, R. M.; NOGUEIRA, F. C. S.; BRASIL, A. A.; CARVALHO, P. C.; LEPREVOST, F. V.; DOMONT, G. B.; ELEUTHERIO, E. C. A. Quantitative proteomic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains CAT-1 and PE-2. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 114–121, jan. 2017.

SARFATI, J.; JENSEN, H. E.; LATGÉ, J. P. Route of infections in bovine aspergillosis. **Medical Mycology**, v. 34, n. 6, p. 379–383, jan. 1996.

SCHMITT, P.; ROSA, R. D.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. An intimate link between antimicrobial peptide sequence diversity and binding to essential components of bacterial membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 958–970, maio 2016.

SECHI, G. V.; FARIAS, M. R.; LUCINA, S. B.; PACHECO, B. D.; KUNG, D. C. Fusariose cutânea em um gato com infecção retroviral: primeiro caso no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 13, n. 3, p. 43–43, 2016.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; CAETANO M ANTUNES, L.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 859–904, jul. 2010.

SERRA, I. M. R. DE S.; SILVA, G. S. DA; NASCIMENTO, F. S.; LIMA, L. K. F. *Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 4, p. 327–328, dez. 2009.

SEYEDMOUSAVI, S.; GUILLOT, J.; ARNÉ, P.; HOOG, G. S. DE; MOUTON, J. W.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E. Aspergillus and aspergilloses in wild and domestic animals: A global health concern with parallels to human disease. **Medical Mycology**, v. 53, n. 8, p. 765–797, 2015.

SHEARER, C. A.; DESCALS, E.; KOHLMAYER, B.; KOHLMAYER, J.; MARVANOVÁ, L.; PADGETT, D.; PORTER, D.; RAJA, H. A.; SCHMIT, J. P.; THORTON, H. A.; VOGLYMAYR, H. Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 49–67, 27 jan. 2007.

SHOW, P. L.; OLADELE, K. O.; SIEW, Q. Y.; AZIZ ZAKRY, F. A.; LAN, J. C.-W.; LING, T. C. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 271–283, 3 jul. 2015.

SILVA, L. R. C. DA; SOUZA, O. C. DE; FERNANDES, M. J. DOS S.; LIMA, D. M. M.; COELHO, R. R. R.; SOUZA-MOTTA, C. M. Culturable fungal diversity of shrimp *Litopenaeus vannamei* boone from breeding farms in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 49–56, mar. 2011.

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.

SILVEIRA, A. S.; MATOS, G. M.; FALCHETTI, M.; RIBEIRO, F. S.; BRESSAN, A.; BACHÈRE, E.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, 1 fev. 2018.

SINGH, A.; VERMA, R.; MURARI, A.; AGRAWAL, A. Oral candidiasis: An overview. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 18, n. 4, p. 81, 2014.

SIX, D. L.; BENTZ, B. J. Temperature Determines Symbiont Abundance in a Multipartite Bark Beetle-fungus Ectosymbiosis. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 1, p. 112–118, 3 jul. 2007.

SODERHOLM, A. T.; PEDICORD, V. A. Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity. **Immunology**, v. 158, n. 4, p. 267–280, 4 dez. 2019.

SOMBOONWIWAT, K.; MARCOS, M.; TASSANAKAJON, A.; KLINBUNGA, S.; AUMELAS, A.; ROMESTAND, B.; GUEGUEN, Y.; BOZE, H.; MOULIN, G.; BACHERE, E. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 29, n. 10, p. 841–851, 2005.

SOMMA, A. DI; CANÉ, C.; MORETTA, A.; ILLIANO, A.; PINTO, G.; CAVASSO, D.; AMORESANO, A.; PADUANO, L.; DUILIO, A. The antimicrobial peptide Magainin-2 interacts with BamA impairing folding of E. coli membrane proteins. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, 17 out. 2022.

SÔNEGO, O. R. .; GARRIDO, L. R. .; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPUV/8134/1/cir056.pdf>>.

SPERSTAD, S. V; HAUG, T.; BLENCCKE, H.-M.; STYRVOLD, O. B.; LI, C.; STENSVÅG, K. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. 2011.

STATHOPOULOS, P. B.; ZHENG, L.; LI, G.-Y.; PLEVIN, M. J.; IKURA, M. Structural and Mechanistic Insights into STIM1-Mediated Initiation of Store-Operated Calcium Entry. **Cell**, v. 135, n. 1, p. 110–122, out. 2008.

STORTO, V. R.; (ORIENTADORA), M. DE F. C. P. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel sobre *Candida albicans*, no interior do canal radicular in vitro e como medicação intracanal. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 12, n. 133, p. 25–26, 30 jan. 2015.

SVEDESE, V. M.; SANTOS MACEDO, E.; FERREIRA LEÃO, I.; CORREIA DINIZ, M. Covid-19 E Doenças Fúngicas Invasivas: Levantamento Bibliográfico E Patentário Covid-19 and Invasive Fungal Disease: Bibliographic and Patent Survey. **Saúde Meio Ambient.** v, v. 11, p. 25–42, 2022.

TALAPKO, J.; MEŠTROVIĆ, T.; JUZBAŠIĆ, M.; TOMAS, M.; ERIĆ, S.; HORVAT ALEKSIJEVIĆ, L.; BEKIĆ, S.; SCHWARZ, D.; MATIĆ, S.; NEUBERG, M.; ŠKRLEC, I. Antimicrobial Peptides—Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, p. 1417, 16 out. 2022.

TELL, L. A. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. **Medical Mycology**, v. 43, n. s1, p. 71–73, jan. 2005.

THARNTADA, S.; SOMBOONWIWAT, K.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. Anti-lipopolysaccharide factors from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, are encoded by two genomic loci. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, n. 1, p. 46–54, jan. 2008.

TÓTH, R.; NOSEK, J.; MORA-MONTES, H. M.; GABALDON, T.; BLISS, J. M.; NOSANCHUK, J. D.; TURNER, S. A.; BUTLER, G.; VÁGVÖLGYI, C.; GÁCSEK, A. *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, 20 mar. 2019.

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R. A. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1925–1932, 1 ago. 2007.

VENTURELLA, G.; RAMBELLI, A. Micologia: Aiorphological comparative analysis on mycorrhizas of abes atebrodl?hsis (lojac.) riatixi and abies alba I. Seedlings in sicily. **Giornale Botanico Italiano**, v. 129, n. 2, p. 196, 1995.

VERMEER, L.S., MASON, J. . **Magainin Structure**. Disponível em: <[https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb\\_00002lsa](https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00002lsa)>.

VERNEN, F.; HARVEY, P. J.; DIAS, S. A.; VEIGA, A. S.; HUANG, Y.-H.; CRAIK, D. J.; LAWRENCE, N.; TROEIRA HENRIQUES, S. Characterization of Tachyplesin Peptides and Their Cyclized Analogues to Improve Antimicrobial and Anticancer Properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 4184, 26 ago. 2019.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, 4 jan. 2016.

WEI, Y. *et al.* Efficacy and Safety of PL-5 (Pecelaganan) Spray for Wound Infections. **Annals of Surgery**, v. 277, n. 1, p. 43–49, jan. 2023.

WEINFELD, I.; BIRMAN, E. G.; PAULA, C. R. Macrophage phagocytosis of *Candida albicans*. An in vitro study. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n. 3, p. 233–238, jul. 1999.

WU, J.; CHEN, X.; ZHANG, J.; CHEN, J.; WANG, Y.; WEI, T.; MA, J.; LI, Y.; MO, T.; HE, Z.; ZHANG, H. Tachyplesin induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells and enhances the chemosensitivity of A549/DDP cells to cisplatin by activating Fas and necroptosis pathway. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 97, n. 4, p. 809–820, 5 abr. 2021.

XIE, H.; WEI, J.; QIN, Q. Antiviral function of Tachyplesin I against iridovirus and nodavirus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 58, p. 96–102, nov. 2016.

YAN, Y.; TANG, J.; YUAN, Q.; LIU, H.; HUANG, J.; HSIANG, T.; BAO, C.; ZHENG, L. Ornithine decarboxylase of the fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum* plays an important role in regulating global metabolic pathways and virulence. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 1093–1116, 23 mar. 2022.

YAN, Y.; YUAN, Q.; TANG, J.; HUANG, J.; HSIANG, T.; WEI, Y.; ZHENG, L. *Colletotrichum higginsianum* as a model for understanding host–pathogen interactions: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1–18, 2018.

YANG, Y. *et al.* NMR structure of r ALF- Pm3 , an anti-lipoplysaccharide

factor from shrimp: Model of the possible lipid A-binding site. **Biopolymers**, v. 91, n. 3, p. 207–220, 17 mar. 2009.

ZAKARIA, L. Diversity of Colletotrichum Species Associated with Anthracnose Disease in Tropical Fruit Crops—A Review. **Agriculture**, v. 11, n. 4, p. 297, 30 mar. 2021.

ZALAR, P.; HOOG, G. S. DE; SCHROERS, H. J.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; GUNDE-CIMERMAN, N. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. **Studies in Mycology**, v. 58, p. 157–183, 2007.

ZAMORA, J. M.; CHAVES, C.; ARIAS, M. L. [Comparison of the antibiotics sensibility pattern of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. strains isolated from food with clinical origin samples]. **Archivos latinoamericanos de nutricion**, v. 56, n. 2, p. 171–4, jun. 2006.

ZAMPOUNIS, A.; PIGNÉ, S.; DALLERY, J.-F.; WITTENBERG, A. H. J.; ZHOU, S.; SCHWARTZ, D. C.; THON, M. R.; O'CONNELL, R. J. Genome Sequence and Annotation of *Colletotrichum higginsianum*, a Causal Agent of Crucifer Anthracnose Disease. **Genome Announcements**, v. 4, n. 4, 25 ago. 2016.

ZHANG, L. J.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. R14–R19, 11 jan. 2016.

## ANEXO A - ARTIGO EM COAUTORIA DESENVOLVIDOS DURANTE O MESTRADO

MATOS, Gabriel Machado et al. Antimicrobial Spectrum of Activity and Mechanism of Action of Linear Alpha-Helical Peptides Inspired by Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors. *Biomolecules*, v. 13, n. 1, p. 150, 2023.

DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13010150>



Article

### Antimicrobial Spectrum of Activity and Mechanism of Action of Linear Alpha-Helical Peptides Inspired by Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors

Gabriel Machado Matos <sup>1,\*</sup>, Beatriz Garcia-Teodoro <sup>1,4</sup>, Camila Pimentel Martins <sup>1,4</sup>, Paulina Schmitt <sup>2</sup>, Fanny Guzmán <sup>3</sup>, Ana Claudia Oliveira de Freitas <sup>4</sup>, Patricia Hermes Stoco <sup>4</sup>, Fabienne Antunes Ferreira <sup>5</sup>, Marciel João Stadnik <sup>6</sup>, Diogo Robl <sup>7</sup>, Luciane Maria Perazzolo <sup>1</sup> and Rafael Diego Rosa <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil
  - <sup>2</sup> Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso 2373223, Chile
  - <sup>3</sup> Núcleo Biotecnología Curatema, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso 2373223, Chile
  - <sup>4</sup> Laboratory of Protozoology, Department of Microbiology, Parasitology and Immunology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil
  - <sup>5</sup> Laboratory of Molecular Genetics of Bacteria, Department of Microbiology, Parasitology and Immunology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil
  - <sup>6</sup> Laboratory of Plant Pathology, Department of Plant Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88034-001, Brazil
  - <sup>7</sup> Laboratory of Microorganisms and Biotechnological Processes, Department of Microbiology, Parasitology and Immunology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil
- \* Correspondence: gabrielmatos92@gmail.com (G.M.M.); rafael.d.rosa@ufsc.br (R.D.R.); Tel.: +55-48-3721-6163 (R.D.R.)
- † Present address: Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden.
- ‡ These authors contributed equally to this work.



Citation: Matos, G.M.; Garcia-Teodoro, B.; Martins, C.P.; Schmitt, P.; Guzmán, F.; de Freitas, A.C.O.; Stoco, P.H.; Ferreira, E.A.; Stadnik, M.J.; Robl, D.; et al. Antimicrobial Spectrum of Activity and Mechanism of Action of Linear Alpha-Helical Peptides Inspired by Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors. *Biomolecules* **2023**, *13*, 150. <https://doi.org/10.3390/biom13010150>

Academic Editor: Zofia Urbanczyk-Lipkowska  
 Received: 21 December 2022  
 Revised: 6 January 2023  
 Accepted: 9 January 2023  
 Published: 11 January 2023



Copyright © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Shrimp antilipopolysaccharide factors (ALFs) form a multifunctional and diverse family of antimicrobial host defense peptides (AMPs) composed of seven members (groups A to G), which differ in terms of their primary structure and biochemical properties. They are amphipathic peptides with two conserved cysteine residues stabilizing a central  $\beta$ -hairpin that is understood to be the core region for their biological activities. In this study, we synthesized three linear (cysteine-free) peptides based on the amino acid sequence of the central  $\beta$ -hairpin of the newly identified shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ALFs from groups E to G. Unlike whole mature ALFs, the ALF-derived peptides exhibited an  $\alpha$ -helix secondary structure. In vitro assays revealed that the synthetic peptides display a broad spectrum of activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi but not against the protozoan parasites *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (L.) infantum*. Remarkably, they displayed synergistic effects and showed the ability to permeabilize bacterial membranes, a mechanism of action of classical AMPs. Having shown low cytotoxicity to THP-1 human cells and being active against clinical multiresistant bacterial isolates, these nature-inspired peptides represent an interesting class of bioactive molecules with biotechnological potential for the development of novel therapeutics in medical sciences.

**Keywords:** crustacean; antimicrobial peptide (AMP); host defense peptide (HDP); antibacterial; antifungal; antiparasitic activity; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); membrane-disrupting; synergy; cytotoxicity

#### 1. Introduction

The selection of microorganisms with resistance against multiple conventionally used antibiotics represents one of the leading health problems worldwide [1]. The study of antimicrobial host defense peptides (AMPs) has recently expanded and emerged as an