



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE
CASCAVEL CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS (PAFS)
EXPRESSOS POR FUNGOS DOS GÊNEROS *PENICILLIUM* E
*ASPERGILLUS***

NICKSON WILLIAN VEDIGAL WILKON

CASCAVEL-PR

2024

NICKSON WILLIAN VEDIGAL WILKON

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS (PAFs)
EXPRESSOS POR FUNGOS DOS GÊNEROS *PENICILLIUM* E
*ASPERGILLUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa *Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde*.

Orientador (a): Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva

**CASCADEL – PR
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Vedigal Wilkon, Nickson Willian

Avaliação da Produção de Peptídeos Antifúngicos (PAFs) expressos por fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* / Nickson Willian Vedigal Wilkon; orientador José Luis da

Conceição Silva. -- Cascavel, 2024.

81 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Peptídeos antifúngicos. 2. gênero *penicillium*. 3. gênero *aspergillus*. I. da Conceição Silva, José Luis, orient. II. Título.

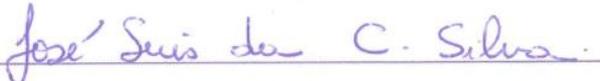
NICKSON WILLIAN VEDIGAL WILKON

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS (PAFs)
EXPRESSOS POR FUNGOS DO GÊNERO *PENICILLIUM* E *ASPERGILLUS***

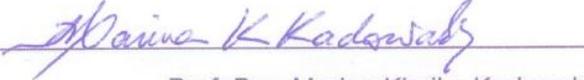
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador (a): Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. José Luis Conceição Silva
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE



Prof. Dra. Marina Kimiko Kadowaki
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE



Prof. Dr. Fabio Rogerio Rosado
Universidade Federal do Paraná - UFPR

BIOGRAFIA RESUMIDA

Nickson Willian Vedigal Wilkon natural de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, nascido no dia 03 de março de 1998, se graduou no Instituto de Ensino Superior de Foz do Iguaçu obteve o grau de Farmacêutico generalista, na cidade de Foz do Iguaçu (2020). Servidor público no município de Iporã – PR, lotado na Secretaria Municipal de Saúde onde atua como coordenador dos setores de Vigilância Sanitária, Vigilância Epidemiológica e Vigilância Ambiental. Desenvolveu projeto experimental do Mestrado em Ciência Farmacêuticas pela UNIOESTE na área de concentração de Prospecção de microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde com o título “Avaliação da produção de peptídeos antifúngicos (PAFs) expressos por fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*”, orientado pelo Prof. Dr. José Luis Conceição Silva.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo
menos outros dez.”

George Bernard Shaw

À ciência, à universidade pública gratuita e de qualidade e a todos os professores e estudantes brasileiros.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Dilceu e Carmelita, por sempre me oferecerem o suporte e o incentivo necessários para que eu pudesse continuar minha trajetória acadêmica, minha eterna gratidão.

Aos colegas de laboratório, especialmente Tatiane, Simone e Paula, cujas contribuições foram fundamentais ao longo desse processo. Agradeço também a todos os funcionários da Unioeste, que, com seu esforço diário, garantem o bom funcionamento das atividades acadêmicas.

Ao Fabrício, meu maior incentivador para ingressar no mestrado, foi decisivo ao me mostrar a importância de seguir este caminho, por mais difícil que seja. À Eva, que esteve ao meu lado, oferecendo todo o apoio e cuidado, como uma verdadeira mãe.

À querida amiga Dani, uma mulher inspiradora na luta incansável em defesa das instituições públicas e do serviço público contra o sucateamento, foi um exemplo de coragem. Ter sua companhia durante essa jornada foi essencial para mim.

Aos professores do laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Unioeste – Marina, Alexandre e Rita – por sua dedicação incansável em contribuir para a formação de todos nós, expresso meu profundo reconhecimento.

Ao meu orientador, Prof. José Luis, por sua constante atenção, criatividade e sábia orientação, que foram pilares no desenvolvimento deste trabalho, minha sincera gratidão.

Finalmente, agradeço à Unioeste, à CAPES, e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste projeto.

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS (PAFs) EXPRESSOS POR FUNGOS DO GÊNERO *PENICILLIUM* E *ASPERGILLUS*

Resumo

O surgimento de novas doenças fúngicas tornou-se um problema de saúde pública mundial. Nos últimos anos tem se acelerado a busca por novas fontes de bioativos capazes de serem aplicados contra fungos patogênicos aos humanos e para o controle de fitopatógenos. Nesse contexto, os peptídeos antifúngicos (PAFs) são moléculas estáveis e considerados promissores como novos antifúngicos eficazes para atacar fungos resistentes aos antifúngicos atuais. Os fungos para o estudo foram selecionados com base em avaliação da literatura e de bases de dados genômicos. Foram selecionados o fungo *Penicillium expansum*, *Penicillium citrinum* e *Aspergillus flavus* que são reportados como produtores de PAFs. Os fungos foram identificados por sequenciamento da região gênica do DNA ribossomal por amplificação com PCR convencional usando os primers descritos na literatura ITS1 e ITS4. O DNA genômico dos fungos foi extraído e purificado com Fenol-clorofórmio, e após quantificação e visualização da integridade do DNA genômico em gel de agarose foi realizado a PCR em nosso laboratório e sequenciamento pela empresa Ludwig Biotecnologia. As sequências obtidas foram analisadas pelo BLASTn e após a identificação dos fungos por análise filogenética, as sequências foram depositadas no GenBank. Um peptídeo antifúngico hipotético de *Aspergillus flavus* foi encontrado na base *Ensembl fungi* e primers foram desenhados com a ferramenta OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies-IDT) para amplificar o gene deste PAF. A estrutura tridimensional do peptídeo antifúngico foi inicialmente modelada utilizando modelos do banco de dados Swiss-Model. Foram sintetizados primers para 3 classes de PAFs já descritos na literatura e estes primers foram inicialmente utilizados na PCR com o DNA genômico do fungo *P. citrinum* para otimização da reação. Nesta reação a amplificação em *P. expansum*, *P. citrinum* e *A. flavus*, no entanto os amplicons sequenciados não corresponderam aos genes de PAFs. Os fungos foram cultivados em meio líquido com agitação e estacionário como descrito na literatura. Testes de atividade antifúngica em placas de 96 poços foram realizados utilizando amostras de extrato do cultivo purificados por cromatografia de exclusão de molecular. Foi verificada a sensibilidade do fungo *Aspergillus niger* aos extratos produzidos por *P. citrinum* e *A. flavus* em placas de cultura, revelando que as amostras de *P. citrinum* A2 e *A. flavus* foram A1, A2, A5, A6, G1, G6, G7, H1, H4, H5 e H8 apresentaram atividade antifúngica. As frações do extrato purificado do cultivo líquido foram dosadas e submetidas a eletroforese em Tricina SDS-PAGE 16% revelando a presença de peptídeos, entretanto estes não foram caracterizados neste trabalho, abrindo novas perspectivas para a caracterização bioquímica dos peptídeos presentes nos extratos.

Palavras chaves: Peptídeos antifúngicos, gênero *Penicillium*, Co-cultivo

EVALUATION OF THE PRODUCTION OF ANTIFUNGAL PEPTIDES (PAFs) EXPRESSED BY FUNGI OF THE GENUS *PENICILLIUM* AND *ASPERGILLUS*

Abstract

The emergence of new fungal diseases has become a global public health issue. In recent years, the search for new sources of bioactives capable of being applied against pathogenic fungi in humans and for the control of phytopathogens has accelerated. In this context, antifungal peptides (AFPs) are stable molecules considered promising as new effective antifungals to target fungi resistant to current antifungal treatments. The fungi for the study were selected based on a review of the literature and genomic database analyses. The fungi *Penicillium expansum*, *Penicillium citrinum*, and *Aspergillus flavus* were selected, as they are reported producers of AFPs. The fungi were identified through sequencing of the ribosomal DNA gene region via conventional PCR amplification using the ITS1 and ITS4 primers described in the literature. The fungal genomic DNA was extracted and purified with phenol-chloroform, and after quantification and visualization of DNA integrity on agarose gel, PCR was performed in our laboratory, and sequencing was carried out by Ludwig Biotechnology. The obtained sequences were analyzed using BLASTn, and after fungal identification through phylogenetic analysis, the sequences were deposited in GenBank. A hypothetical antifungal peptide from *Aspergillus flavus* was found in the Ensembl Fungi database, and primers were designed using the OligoAnalyzer tool (Integrated DNA Technologies-IDT) to amplify the gene encoding this AFP. The three-dimensional structure of the antifungal peptide was initially modeled using templates from the Swiss-Model database. Primers for three classes of AFPs previously described in the literature were synthesized and initially used in PCR with the genomic DNA of *P. citrinum* for reaction optimization. However, despite amplification in *P. expansum*, *P. citrinum*, and *A. flavus*, the sequenced amplicons did not correspond to AFP genes. The fungi were cultured in liquid medium under agitation and stationary conditions, as described in the literature. Antifungal activity assays were conducted in 96-well plates using culture extract samples purified through molecular exclusion chromatography. Sensitivity tests revealed that *Aspergillus niger* was susceptible to extracts produced by *P. citrinum* and *A. flavus*. Specifically, *P. citrinum* sample A2 and *A. flavus* samples A1, A2, A5, A6, G1, G6, G7, H1, H4, H5, and H8 exhibited antifungal activity. The fractions of the purified liquid culture extracts were quantified and subjected to electrophoresis using 16% Tricine SDS-PAGE, revealing the presence of peptides. However, these peptides were not characterized in this study, paving the way for future biochemical characterization of the peptides present in the extracts.

Keywords: Antifungal peptides, *Penicillium* genus, Co-cultivation

SUMÁRIO

SEÇÃO 1	16
Aspectos moleculares de peptídeos antifúngicos e estratégias de produção em cultivo submerso a partir de <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> : uma breve revisão	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. METODOLOGIA.....	18
3. PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS.....	18
3.1. Aspectos bioquímicos e mecanismo de ação.....	18
3.2. Peptídeos antifúngicos e atividade biológica.....	21
3.3 Estratégias de produção: Condições de cultura de Peptídeos antifúngicos de fungos.....	25
3.4 Técnicas de purificação de peptídeos antifúngicos	29
3.5 Motivo Molecular de PAFs e aplicações biotecnológicas	33
3.6 Perspectivas futuras: Estratégias alternativas de produção biotecnológica e sistema de co-cultivo.....	36
4. CONCLUSÃO.....	37
5. RECONHECIMENTOS.....	37
6. CONFLITOS DE INTERESSE: Os autores declaram não haver conflito de interesse.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	38
SEÇÃO 2	42
AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS (PAFs) DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR FUNGOS DO GÊNERO <i>PENICILLIUM</i> E <i>ASPERGILLUS</i>	42
1. INTRODUÇÃO	42
1.1 GÊNEROS <i>PENICILLIUM</i> E <i>ASPERGILLUS</i>	43
1.2 PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS.....	44
1.3 MECANISMO DE AÇÃO DOS PAFS.....	45
1.4 CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO	48
1.5 PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE PAFS	49
1.6 APLICAÇÕES DOS PAFS.....	50
2. OBJETIVOS	51
2.1 OBJETIVO GERAL.....	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3. MATERIAL E MÉTODOS	52

3.1	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS	52
3.2	ANÁLISES <i>IN SÍLICO</i> E DESENHO DOS PRIMERS PAFS.....	52
3.3	CEPAS FÚNGICAS: TAXONOMIA MOLECULAR	53
3.3.1	Extração de DNA	53
3.3.2	Reações de PCR.....	53
3.3.3	Análise de sequência do DNA genômico e identificação	54
3.3.4	Cultivos	54
3.3.5	Separação do cultivo e obtenção da amostra	55
3.3.6	Atividade antifúngica	55
3.3.7	Eletroforese em gel de Poliacrilamida-SDS-PAGE	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	IDENTIFICAÇÃO TAXONOMICA DOS FUNGOS.....	56
4.2	ANÁLISES <i>IN SÍLICO</i> DE PAFS E DESENHO DOS PRIMERS.....	59
4.5	PCR DOS GENES PAFS NO DNA.....	63
5.1	PURIFICAÇÃO EM COLUNA CROMATOGRÁFICA.....	65
4.6	SDS-PAGE	71
7.	REFERÊNCIAS	74

LISTA DE TABELAS

SEÇÃO 1

Tabela 1. Atividade biológica de alguns peptídeos antifúngicos de <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> e os seus mecanismos de ação.....	19
Tabela 2. Peptídeos antifúngicos produzidos pelos gêneros <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> em ordem cronológica dos estudos.....	22
Tabela 3 Tipos de cultivo, condições e meios de cultura (com constituintes) para produção de PAFs pelos gêneros <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i>	25
Tabela 4 Procedimentos metodológicos utilizados para purificação de PAFs produzidos pelos gêneros <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i>	30

SEÇÃO 2

Tabela 1. Composição do meio de cultura utilizados.....	54
Tabela 2. Tradução da sequência gênica de PAF hipotético de <i>A. flavus</i>	60
Tabela 3. Primers específicos para os genes de PAFs de <i>P.expansum</i>	62
Tabela 4. Primers específicos para o PAF hipotético de <i>A. flavus</i>	62

LISTA DE FIGURAS

SEÇÃO 1

Figura 1. A) Árvore filogenética do Método de Máxima Verossimilhança e Modelo de Jukes-Cantor dos peptídeos antifúngicos dos gêneros *Penicillium*. B) Alinhamento dos peptídeos antifúngicos com as sequências mais conservadas em *Penicillium* por Clustal Omega (EMBL).....34

Figura 2. (A) Proteína madura de *P. expansum* PAF-A modelada em modelo de superfície *ab initio* com motivo do núcleo γ destacado em vermelho; (B) modelo de superfície do motivo do núcleo γ e (C) motivo do núcleo γ com resíduos de lisina na região da folha β do motivo.....35

SEÇÃO 2

Figura 1. Imagem da proteção dos PAFs de *P. expansum*.....50

Figura 2. DNA genômico *P. expansum* UFPE e DNA genômico *P. citrinum*....57

Figura 3. PCR ITS fungos *P. expansum* e *P. citrinum*.....57

Figura 4. Árvore filogenética *P. citrinum*.....58

Figura 5. Árvore filogenética *P. expansum*.....59

Figura 6. Peptídeo antifúngico hipotético do *Aspergillus flavus* cepa AF70 modelado em Swiss-Model.....60

Figura 7. Análise filogenética do PAF hipotético de *A. flavus*.....61

Figura 8. PCR dos genes PeAfpA, PeafpB, PeAfpC presentes no DNA de *P. citrinum* e PAF hipotético.....63

Figura 9. PCR reamplificação dos genes PeAfpA, PeAfpB, PeAfpC presentes no DNA de *P. citrinum* e PAF hipotética de *A. flavus*.....64

Figura 10. Amostra de *A. flavus* submetida a purificação em coluna de exclusão molecular Sephadex®G50.....66

Figura 11. Amostra de *P. citrinum* submetida a purificação em coluna de exclusão molecular Sephadex®G50.....66

Figura 12. Teste de atividade antifúngica em placa de 96 poços. Frações purificadas do fungo *Aspergillus flavus*.....67

Figura 13. Teste de atividade em placa de 96 poços frações purificadas do fungo *Penicillium citrinum*.....68

Figura 14. Teste de atividade em placa de 96 poços amostras de frações purificadas.....68

Figura 15: Tabela das leituras realizadas no teste de atividade entre 24 e 48 horas.....	69
Figura 16: Tricina SDS-PAGE 16% extrato bruto.....	71
Figura 17: Tricina SDS-PAGE 16% amostras purificadas.....	72

SEÇÃO 1**Aspectos moleculares de peptídeos antifúngicos e estratégias de produção em cultivo submerso a partir de *Penicillium* e *Aspergillus*: uma breve revisão¹**

Aspectos moleculares de peptídeos antifúngicos e estratégias de produção em cultivo submerso de *Penicillium* e *Aspergillus*: uma breve revisão

N. W. V. Wilkon¹; S. A. Zismann²; R.C.G. Simão³; A. Maller⁴; M.K. Kadowaki⁵; J.L.C Silva⁶

¹²³⁴⁵⁶ Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - PCF, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 85816-110, Cascavel - Paraná, Brasil.

*jlcsilva@gmail.com

Os fungos produzem muitas moléculas bioativas e, entre elas, os peptídeos antifúngicos (PAFs) têm se destacado nas últimas décadas. Atualmente, esses compostos têm sido estudados com o objetivo de encontrar moléculas com atividade biológica contra fungos patogênicos e outras aplicações biotecnológicas. Os PAFs de origem fúngicas são poucos difundidos e estudados, esta revisão visa apresentar as principais classes de peptídeos antifúngicos produzidos por espécies de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, com ênfase em seus aspectos moleculares, atividade biológica, estratégias de produção, purificação para facilitar o emprego dos métodos corretos para a caracterização de futuros PAFs. A metodologia aplicada consistiu na busca em bases de dados como PubMed, Web of Science, Scopus e Portal Periódicos – CAPES, utilizando as palavras-chave: *Penicillium*, *Aspergillus*, Peptídeos, Peptídeos antimicrobianos e Peptídeos antifúngicos, recuperando artigos de 2000 a 2022. A análise dos artigos revelou os tipos de meios de cultura e seus componentes, técnicas e materiais usados para purificar e produzidos por *Penicillium* e *Aspergillus*. Além disso, foram revisados os aspectos moleculares dessas moléculas, destacando motivos que poderiam afetar a atividade biológica e outros fatores (elementos químicos e fontes de nutrientes) que poderiam afetar a expressão de PAFs em cultura líquida. Devido à dificuldade excepcional de produzir PAFs em culturas axênicas, esta revisão buscou levantar questões sobre a possibilidade de usar técnicas de co-cultura para produzir PAFs a partir de fungos filamentosos.

Palavras-chave: Antifúngico peptídeo, co-cultivo, motivo.

¹ Artigo elaborado e formatado de acordo com as normas editoriais da revista científica à qual foi submetido, estando em processo de avaliação para possível publicação.

1. INTRODUÇÃO

As populações humanas têm contato com fungos desde o período pré-histórico, no entanto, o primeiro estudo relacionado aos fungos foi relatado no século XVII. Desde então, reforçado pela atribuição de um reino específico que incluiria esses organismos vivos – o Reino Fungi – denominação feita por Whittaker em 1969, esses organismos têm sido objeto de estudo científico em várias áreas, ganhando espaço na indústria química e farmacêutica, na agricultura, na medicina veterinária e humana. O Reino Fungi inclui muitas espécies distintas, com um número estimado de 1,5 milhão de espécies, entretanto, apenas 5% dessa biodiversidade é atualmente conhecida e sistematicamente classificada no Reino Fungi.

Penicillium e *Aspergillus* são os gêneros mais estudados do reino dos fungos e podem ser encontrados em diversos ambientes externos e internos, como solo, ar, alimentos e ambientes de condições extremas, atuando como excelentes decompositores. Em nível laboratorial, é conhecida a capacidade desses fungos de produzir compostos como antibióticos, herbicidas, antioxidantes, inseticidas, agentes antineoplásicos e até substâncias tóxicas. *Aspergillus* é um dos fungos mais encontrados no ambiente, interagindo com humanos, animais, plantas e vários ecossistemas.

Em termos de produção de moléculas ativas, os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* ocupam posição de destaque [5]. É conhecida a produção de policetídeos, peptídeos não ribossômicos, terpenos e alcalóides por fungos do gênero *Aspergillus*, os quais são de grande valor para o campo farmacológico [4]. Os compostos bioativos produzidos por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* que foram objeto de estudo desta revisão são os peptídeos antimicrobianos (AMPs), mais especificamente o grupo denominado peptídeos antifúngicos (PAFs), assim denominados devido à sua atividade predominante contra cepas fúngicas utilizadas para se defenderem de fungos nocivos [6].

Atualmente, os bancos de dados genômicos Ensembl Fungi (<https://fungi.ensembl.org/index.html>) e o portal do genoma JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/portal/>) têm nos auxiliado no estudo de novos candidatos a PAFs por meio da busca nos genomas sequenciados e anotados. Huang e colaboradores apontaram que os fungos produtores de peptídeos antimicrobianos (AMPs) com potencial atividade antifúngica pertencem principalmente à classe dos

Eurotiomycetes (*Aspergillus*, *Monascus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*) e Sordariomycetes (*Fusarium*) [7].

Esta revisão pretendeu reunir e descrever as estratégias de produção e purificação de PAFs que foram obtidos de espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Aqui as metodologias e o conhecimento atual das características bioquímicas dos PAFs que levaram à obtenção dessas moléculas e uma discussão sobre os aspectos estruturais que poderiam influenciar sua atividade biológica e outros fatores que poderiam afetar a expressão dos PAFs em cultura líquida. Além disso, a possibilidade de que este sistema de co-cultura poderia ser uma metodologia para melhorar a produção de PAFs não expressos em cultura pura.

2. METODOLOGIA

PubMed base de dados, Web of Science, Scopus e Portal de Periódicos da CAPES (<http://www.periodicos.capes.gov.br>) foram usados na procura por artigos com os descritores: *Penicillium*, *Aspergillus*, peptídeos, peptídeo antimicrobiano e peptídeo antifúngico, recuperando artigos de 2000 a 2024. Artigos com peptídeos de origem não fúngica e sintéticos foram excluídos. Artigos originais referindo-se aos primeiros PAFs antes desse período foram incluídos na revisão sistemática, porque foram os marcos no campo de pesquisa de PAFs. As sequências de nucleotídeos foram baixadas do Genbank (banco de dados NCBI) e as análises filogenéticas realizadas com Software Mega-X 10.2.6 e Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/>), ambos os softwares disponíveis online. A modelagem de peptídeo foi realizada com Pymol 2.5.3.

3. PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS

3.1. Aspectos bioquímicos e mecanismo de ação

Os PAFs pertencem a uma subclasse de peptídeos antimicrobianos (AMPs), compartilhando as características dessas moléculas. A maioria dos AMPs é composta, geralmente, de 10 a 50 aminoácidos, com uma carga positiva geral, variando de +2 a +11, e frequentemente assumem conformações de α -hélice ou folha β . Eles são sintetizados como pré-pró-proteínas, contendo uma sequência sinal (SP) para secreção no espaço extracelular e uma pró-sequência na extremidade N-terminal, que é removida antes ou durante a sua liberação no sobrenadante das culturas líquidas [8].

Os PAFs produzidos pelos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* na classe de peptídeos antimicrobianos do tipo defensinas, que são pequenos (menos de 50

aminoácidos), catiônicos e ricos em resíduos de cisteína, que se dobras em folhas β compactas estabilizadas por pontes dissulfeto [6]. Considerando as análises da sequência aminoacídica e da estrutura gênica dos PAFs, foi proposta uma nova classificação dessas moléculas, alocando os peptídeos em três classes (A, B e C) com base em aspectos filogenéticos, estruturais e genéticos [9, 10]. Os PAFs da classe A contêm de seis a oito resíduos de cisteína em sua sequência primária de peptídeo, além de três éxons e dois íntrons no gene. Os PAFs da classe B possuem o mesmo número de éxons e íntrons, mas são mais conservados dentro da própria classe B. No entanto, os PAFs da classe C apresentaram homologia conservada, mas diferem das classes A e B no número de éxons e íntrons, possuindo dois éxons e um íntron [10].

De modo geral, os fungos possuem um repertório complexo de PAFs, expressos de acordo com as condições do ambiente e as condições relatadas *in vitro*. Assim, compreender os processos biológicos de indução para a expressão dos PAFs é essencial para a descoberta de novos PAFs. Atualmente, a atividade antifúngica dos PAFs foi demonstrada experimentalmente, e muitos estudos estão sendo conduzidos para caracterizar os mecanismos de ação desses peptídeos [7].

A grande maioria dos PAFs atua em alvos de microrganismos, como: parede celular, membrana e outros componentes celulares, como ácidos nucleicos, organelas e macromoléculas intracelulares. Através de seus mecanismos de ação, os PAFs causam mudanças macroscópicas, inibindo o crescimento micelial, afetando a germinação de esporos ou provocando que as hifas ou esporos se rompam, inchem, torçam ou se deformem, entre outros efeitos [9]. Exemplos de PAFs e seus mecanismos de ação na tabela 1.

Tabela 1. Atividade biológica de alguns peptídeos antifúngicos de *Penicillium* e *Aspergillus* e os seus mecanismos de ação.

PAF	Espécie do fungo	Efeitos biológicos e mecanismos de ação	Referência
ANAFP	<i>Aspergillus niger</i>	Abertura de poros pelo modelo de parede de barril afetando a permeabilidade da membrana	[29]

AFP	<i>Aspergillus giganteus</i>	Abertura de poros pelo modelo de parede de barril afetando a permeabilidade da membrana [39]
	<i>Aspergillus giganteus</i>	Penetra na célula e pode condensar o DNA <i>in vitro</i> [40]
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penetra na célula e <i>in vitro</i> não apresentou interação com o DNA [49]
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Alterações morfológicas e espécies reativas de oxigênio (ROS). Efeitos semelhantes à apoptose devido à presença de microvesículas após interação [47]
NFAP	<i>Neosartorya fischeri</i>	Afeta a integridade da parede celular, a produção de ROS e o efeito apoptótico [42]
	<i>Neosartorya fischeri</i>	Efeitos no citoplasma celular, crescimento lento, encurtamento, inchaço e múltiplas ramificações [43]
	<i>Neosartorya fischeri</i>	Localização citoplasmática em células de <i>Neurospora crassa</i> de NFAP indica permeabilização e morte celular [44]

NFAP2	Neosartorya fischeri	Interage com a [45] membrana plasmática abrindo poros, porém não apresentou apoptose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e é metabolicamente inativo
Afpb	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Redução do [48] metabolismo, parede celular danificada, ROS, aumento da secreção de proteínas.

3.2. Peptídeos antifúngicos e atividade biológica

Os peptídeos antifúngicos são produzidos por diferentes organismos vivos como uma parte representativa da resposta imune inata para combater desafios microbianos [8]. Os fungos que se destacam nesta revisão como produtores de peptídeos antifúngicos foram *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium digitatum*, *Monascus pilosus*, *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus giganteus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium expansum* e *Aspergillus clavatus* [6-13].

O primeiro gene de PAF do gênero *Penicillium* foi o peptídeo antifúngico chamado PAF, isolado de *P. chrysogenum* Q176 por Marx [13] e posteriormente caracterizado por Kaiserer *et al.* [14]. Geisen [11] observou que *Penicillium nalgiovense* possui um gene com alta homologia ao gene do peptídeo antimicrobiano PAF de *P. chrysogenum*, demonstrando atividade antifúngica do extrato do fungo estudado, sem ter o peptídeo isolado. Isso também foi relatado na cepa *P. crustosum* FP11 por Menegotto *et al.* [26], cujo gene codifica o peptídeo *PcAFP*, homólogo ao gene que codifica o peptídeo *PgAFP*. Mesmo sem ter o peptídeo isolado, como relatado por Geisen [11], Menegotto *et al.* [26] obteve atividade antifúngica e antibacteriana do peptídeo *PcAFP*. Rodríguez-Martín *et al.* caracterizaram uma nova proteína antifúngica – *PgAFP* – de *P. chrysogenum* RP42C [15].

Seibold *et al.* [17] estudaram as propriedades de uma proteína de *P. brevicompactum* Dierckx chamada Bubble Protein, representativa da classe C dos PAMs, conforme classificado por Garrigues *et al.* [10]. Estudando fungos de sedimentos

árticos, Chen *et al.* [19] purificaram e caracterizaram um novo peptídeo de *P. chrysogenum* A096, o peptídeo *Pc-Arctin*. Garrigues *et al.* [20] também isolaram uma nova proteína antifúngica de *P. digitatum* CECT 20796, *AfpB*. Em *P. expansum* CECT 20906, Garrigues *et al.* [10] trouxeram novidades para a área de estudo ao atribuir a essa cepa a origem de três PAFs: *PeAfpA*, *PeAfpB* e *PeAfpC*. Huber *et al.* isolaram e analisaram uma nova proteína antifúngica de *P. chrysogenum* Q176, chamada *PAFB* [22]. O trabalho de Heredero *et al.* [23] mostra o planejamento e construção de uma proteína antifúngica híbrida, usando *P. digitatum* como maquinário celular de produção, através da junção de dois PAFs existentes: o *AfpB* de *P. digitatum* e o peptídeo sintético *PAF-26*.

No gênero *Aspergillus*, o primeiro PAF isolado foi o AFP, produzido pela cepa *A. giganteus* MDH 18894, com base nos estudos de Olson *et al.* [32] e Olson *et al.* [27]. Alguns anos depois, Lee *et al.* [29] isolou um PAF de *A. niger*, o *AnAFP*. Outra espécie proeminente na produção de PAFs é *A. clavatus*, que possui dois peptídeos descritos: *AcAFP*, isolado da cepa VR1 [12], e *AcAMP*, isolado da cepa ES1 [30]. Binder *et al.* [31] isolou mais um PAF de *A. giganteus* – *AFPNN5353* – da cepa A3274.

De acordo com Mahlapuu *et al.* [8], os peptídeos antimicrobianos têm um amplo espectro de atividade biológica e são ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, vírus, parasitas e alguns tipos de células cancerígenas. A Tabela 2 mostra os PAFs produzidos por diferentes fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* e os microrganismos nos quais eles têm atividade biológica inibitória.

Tabela 2. Peptídeos antifúngicos produzidos pelos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* em ordem cronológica dos estudos.

PAF	Fungo	(s) inibido	Referência
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i> Q176	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus giganteus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cochliobolus carbonum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Gliocládio roseum</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>P. chrysogenum</i> (cepa selvagem) e <i>Trichoderma koningii</i>	[13-14]
Não isolado (homólogo ao gene paf)	<i>Penicillium nalgiovense</i> BFE66 <i>Penicillium nalgiovense</i> BFE67	<i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium italicum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Mucor</i> sp. , <i>Bissoclâmide</i> sp e <i>Geotrichum cândida</i>	[11]
PgAFP	<i>Penicillium chrysogenum</i> RP42C	<i>Penicillium echinulatum</i> , <i>Penicillium commune</i> e <i>A. niger</i>	[15-16]
Proteína de bolha	<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[17-18]
Pc- Arctin	<i>Penicillium chrysogenum</i> A096	<i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Trichoderma viride</i> e <i>Alternaria longipes</i>	[19]
AfpB	<i>P. digitatum</i> CECT 20796	<i>P. digitatum</i> , <i>B. cinérea</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. italicum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>A. niger</i> e <i>F. oxysporum</i>	[20]
PeAfpA PeAfpB PeAfpC	<i>P. expansum</i> CECT 20906 (produção de PeAfpA) <i>P. chrysogenum</i> Δ <i>paf</i> (produção de PeAfpB e PeAfpC)	<i>P. expansum</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>P. italicum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Gibberella moniliformis</i> , <i>A.</i>	[10, 20]

		<i>flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Arthrodermia</i> <i>vanbreuseghemii</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cândida glabrata</i> , <i>Cândida parapsilosis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	
PAFB	<i>P. chrysogenum</i> Q176 <i>P. crisógeno</i> Δ <i>paf</i>	<i>Aspergillus terreus</i> , [21-22] <i>A. fumigatus</i> , <i>A.</i> <i>niger</i> , <i>N. crassa</i> , <i>P.</i> <i>chrysogenum</i> , <i>T.</i> <i>rubrum</i> , <i>C. albicans</i> e <i>S. cerevisiae</i>	
Peptídeo Híbrido AfpB-PAF26	<i>P. digitatum</i> CECT 20796	<i>P. digitatum</i> , <i>P.</i> <i>chrysogenum</i> , <i>B.</i> <i>cinerea</i> , <i>P.</i> <i>expansum</i> , <i>P.</i> <i>italicum</i> e <i>A. niger</i>	[23]
PAFC	<i>P. chrysogenum</i> Q176 <i>P. crisógeno</i> ^{OE.paf} C (<i>P. chrysogenum</i> Δ <i>paf</i>)	<i>N. crassa</i> , [24-25] <i>Microsporum</i> <i>gypseum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C.</i> <i>glabrata</i> , <i>C.</i> <i>parapsilosis</i> , <i>Candida</i> <i>guilliermondii</i> e <i>Candida krusei</i>	
PCAFP	<i>Penicillium</i> <i>crustosum</i> FP11	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> e <i>C. albicans</i>	[26]
AFP	<i>Aspergillus</i> <i>giganteus</i> MDH 18894	<i>T. koningii</i> , <i>F.</i> <i>oxysporum</i> , <i>Penicillium</i> <i>purpurogenum</i> e <i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i>	[27-28]
UmaAFP	<i>Aspergillus niger</i> KCTC 2025	<i>Tricósporo Beigelli</i> , [29] <i>A. flavus</i> , <i>A.</i> <i>fumigatus</i> , <i>F.</i> <i>oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>C.</i> <i>albicans</i> e <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	
AcAFP	<i>Aspergillus clavatus</i> VR1	<i>F. oxysporum</i> , <i>F.</i> <i>solani</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>A. niger</i> , <i>Stacchibotris</i> <i>microbiospora</i> e <i>Alternaria Solani-Sol</i>	[12]
AcAMP		<i>S. aureus</i> , <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> , <i>Micrococcus</i>	[30]

	<i>Aspergillus clavatus</i> ES1	<i>lúteo</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>A. niger</i> , <i>F. oxysporum</i> e <i>F. solani</i>	
AFP NN5353	<i>Aspergillus giganteus</i> A3274	<i>Fusarium sambucinum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. giganteus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Gliocladium roseum</i> , <i>N. crassa</i> , <i>P. chrysogenum</i> e <i>T. koningii</i>	[31]

3.3 Estratégias de produção: Condições de cultura de Peptídeos antifúngicos de fungos

Desde o primeiro isolamento de PAFs, tem-se destacado que fontes de carbono e nitrogênio estão relacionadas à regulação da expressão gênica, conforme descrito para o peptídeo PAF de *P. chrysogenum*, que foi identificado em meios de cultura contendo sacarose e NaNO₃, em contraste com meios de cultura contendo glicose e glutamina, no qual a quantidade produzida não foi suficiente para a purificação [33]. O monossacarídeo D-glicose também foi eficaz na indução de *Anafp*, *AcAFP* e a proteína *Pc-Artic* [19, 29]. A metodologia escolhida para esta revisão estudou a produção de PAFs sem considerar técnicas de produção de peptídeos sintéticos. Portanto, é necessário expor o tipo de cultivo e as condições de cultivo, bem como o meio de cultura adotado para produzir cada um dos PAFs mencionados nesta revisão (Tabela 3).

Tabela 3 Tipos de cultivo, condições e meios de cultura (com constituintes) para produção de PAFs pelos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*.

PAF	Cultivo	Condições de crescimento	Meio de cultura	Componentes do meio de cultura	Referência
PAF	Cultivo líquido sem agitação	48 horas a 25 °C	Não descrito	NaNO ₃ , KCl, MgSO ₄ .7H ₂ O, FeSO ₄ .7H ₂ O, sacarose, tampão fosfato pH 5,8	[12-13]
	Cultivo líquido sem agitação	72 horas a 25 °C	Mídia completa	Peptona, extrato de levedura, NZ- amina, glicose, KCl, MgSO ₄ .7H ₂ O, KH ₂ PO ₄ , pH 6,5	
Não isolado (homólogo ao gene paf)	Cultivo sólido	96 horas a 25 °C	Ágar extrato de malte	Não descrito	[8]
PgAFP	Cultivo líquido sem agitação	360 horas a 25 °C	Caldo de extrato de malte	Extrato de malte, glicose, peptona, pH 4,5	[14-15]
	Cultivo líquido sem agitação	360 horas a 25 °C	Caldo de extrato de batata	Não descrito	
Proteína de bolha	Cultivo sólido	168 horas a 20 °C	Mídia MS	Caseína, fitagel e hidrolisado de maltose	[16-17]
Pc- Arctin	Cultivo líquido a 200 rpm	72 horas a 28 °C	Mídia SGY	Farinha de soja, glicose, extrato de levedura e NaCl	[18]

AfpB	Cultivo líquido sem agitação	264 horas a 25 °C	Mídia PdMM	Glicose, FeSO ₄ , NH ₄ NO ₃ , NaCl, MgSO ₄ .7H ₂ O, KH ₂ PO ₄ , H ₃ BO ₃ , CuSO ₄ .5H ₂ O, MnSO ₄ .H ₂ O, Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O, ZnSO ₄ .7H ₂ O, tampão MES pH 5,3	[19-20]
PeAfpA PeAfpB PeAfpC	Cultivo líquido sem agitação	Produção de PeAfpA: 240 horas (temperatura não descrita) PeAfpB e PeAfpC : 96 horas (temperatura não descrita)	Mídia PDB Mídia PCMM	Não descrito Sacarose, NaNO ₃ , KCl, MgSO ₄ .7H ₂ O, FeSO ₄ .7H ₂ O, H ₃ BO ₃ , CuSO ₄ .5H ₂ O, MnSO ₄ .H ₂ O, Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O, ZnSO _{4,7H2O} , NaCl/P _i pH 5,8	[10, 20]
PAFB	Produção natural: Cultivo líquido sem agitação	24 – 144 horas em 25 °C	Mídia MM	Não descrito	[20-21]
	Produção por expressão homóloga: cultura líquida a 200 rpm	72 – 96 horas em 25 °C	Mídia PCMM	Descrito acima	
Peptídeo Híbrido AfpB-PAF26	Cultivo líquido a 180 rpm	240 horas a 25 °C	Mídia PdMM	Descrito acima	[22]
PAFC	Cultivo líquido a 200 rpm	96 horas a 25 °C	Mídia PCMM	Descrito acima	[23-24]
PCAFP	Cultivo líquido a 180 rpm	168 horas a 28 °C	Mídia AFPIM	Amido, extrato de carne, peptona, NaCl e etanol	[25]

AFP	Cultivo líquido sem agitação a 250 rpm	48 horas a 30 °C	Não descrito	Amido de milho, extrato de carne, peptona e NaCl	[26-27, 31]
UmaAFP	Cultivo líquido sem agitação a 140 rpm	72 – 96 horas a 30 °C	Mídia YPD	Glicose, peptona e extrato de levedura	[28]
AcAFP	Cultivo líquido sem agitação a 150 rpm	96 horas a 30 °C	Mídia LGB	Extrato de levedura, peptona, NaCl e glicose	[9]
AcAMP	Cultivo líquido sem agitação a 150 rpm	96 horas a 30 °C	Não descrito	Extrato de levedura, peptona, NaCl e glicose	[29]
AFP _{NN5353}	Cultivo líquido sem agitação a 220 rpm	72 horas a 30 °C	Substrato AMC	Extrato de carne, peptona, amido de milho, NaCl e plurônico	[30]

A partir dos dados coletados, observou-se uma predominância do cultivo líquido em detrimento do sólido, sendo conduzido principalmente com agitação. A temperatura de incubação utilizada nas culturas de fungos do gênero *Penicillium* varia de 20 a 28 °C, com predominância de 25 °C. No cultivo do gênero *Aspergillus*, foi utilizada uma temperatura de 30 °C. A temperatura de incubação em todos os estudos coincide com a usual para a vida dos fungos filamentosos estudados. O tempo de incubação dos fungos varia conforme as necessidades de cada espécie. Os meios de cultura são necessariamente compostos por fontes de carbono, fontes de nitrogênio, sais e elementos essenciais, ajustados para um pH adequado, com alguns meios mais simples e outros mais elaborados. Os componentes do ambiente, como fontes de carbono e nitrogênio, bem como sais, são ajustados para a produção de peptídeos, uma vez que estão relacionados à indução ou repressão da transcrição gênica, um processo fundamental para a obtenção de peptídeos [33].

Além do método convencional de produção de peptídeos, que consiste no cultivo do fungo e na obtenção do produto desejado do sobrenadante, Sonderegger et al. [21] propuseram um sistema de expressão baseado em *P. chrysogenum*, que garante a produção de peptídeos na quantidade e pureza necessárias para a análise estrutural e funcional dessas moléculas. Esse sistema, que utiliza engenharia genética, visa produzir AMPs catiônicos e ricos em cisteína, sendo extremamente útil no estudo de PAFs do gênero *Penicillium*. O sistema consiste no forte promotor do gene *paf*, na sequência pré-pró do peptídeo PAF e no sinal de terminação do gene *paf*, o que permite a secreção de proteínas recombinantes em altos níveis, com o correto dobramento da proteína e a formação adequada das pontes dissulfeto. A expressão do sistema geralmente utiliza a maquinaria celular de uma cepa mutante de *P. chrysogenum*, a cepa *P. chrysogenum* Δ *paf*, que tem o gene *paf* deletado [21, 34].

Holzknacht et al. [24] usaram o sistema para obter o peptídeo PAFC em larga escala, no entanto, quando Huber et al. [22] usaram o mesmo sistema, não detectaram o peptídeo PAFB na cultura de *P. chrysogenum* Q176. Da mesma forma, Garrigues et al. [10], ao obter a produção de apenas um PAF (*PeAfpA*) diretamente de cultivo submerso de *P. expansum* não transformado, usaram o sistema de expressão para produzir os outros dois PAFs (*PeAfpB* e *PeAfpC*). Garrigues et al. [20], notando a ausência de *AfpB* na cepa nativa de *P. digitatum*, usaram dois sistemas de expressão: um baseado em *P. chrysogenum* (homólogo) e outro em *Pichia pastoris* (heterólogo), obtendo níveis mais altos de peptídeo via expressão homóloga; no entanto, não houve diferença na eficácia dos peptídeos produzidos pelos dois sistemas contra os microrganismos testados. Uma desvantagem clara no trabalho de Garrigues et al. [20] é o longo tempo (11 dias) para obter o produto. Além de isolar novos PAFs de novas cepas, os esforços estão voltados para melhorar os níveis de produção de peptídeos e maximizar sua atividade biológica. As possibilidades de produção de peptídeos por sistemas de expressão, como o sistema baseado em *P. chrysogenum*, permitem a produção fácil e barata dessas moléculas, possibilitando seu estudo detalhado e até a síntese de variantes que podem aumentar sua aplicabilidade, atualmente centrada na biotecnologia e na terapia farmacológica [8, 21, 37].

3.4 Técnicas de purificação de peptídeos antifúngicos

Após a incubação dos fungos produtores de PAFs, é necessário que o líquido de cultivo passe por etapas essenciais de purificação para obter a molécula desejada. Os

artigos estudados nesta revisão, com algumas particularidades intrínsecas, seguiram praticamente os mesmos passos metodológicos para obter o peptídeo purificado, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 Procedimentos metodológicos utilizados para purificação de PAFs produzidos pelos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*.

Técnica de separação	Concentração da amostra	Diálise	Purificação	Verificação da pureza da amostra	Referência
Centrifugação	Antes da purificação: ultrafiltração em Millipore YM-30. Após a purificação: ultrafiltração em Centriprep YM-3	Pós-purificação: tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 6,6)	Coluna CM-Sepharose CL-6B	SDS-PAGE 15%	[14]
Centrifugação	Após a purificação: liofilização	Antes da purificação: tampão fosfato 20 mM (pH 6,6). Após a purificação: água Milli-Q	Coluna Sepharose	SDS-PAGE 16%	[20]
Centrifugação	Não realizado	Antes da purificação: tampão fosfato 10 mM (pH 6,6). Após a purificação: água Milli-Q	Coluna - Sepharose	SDS-PAGE 16% PMF	[23]
Filtração	Centrifugação com 10000 filtros centrífugos (Millipore)	Tris-HCl (pH 7,6) 15 mM, NaCl 25 mM e EDTA 0,15 mM	Coluna Mono-Q-HR 5/5 e RP-HPLC	SDS-PAGE 12%	[13]

Filtração	Centrifugação em Microcon YM-3	Não realizado	HiTrap SP HP e coluna HiLoad 26/60 Superdex 75	SDS-PAGE 12%	[15-16]
Filtração	Antes da purificação: precipitação com sulfato de amônio e liofilização. Após a purificação: ultrafiltração em Vivaspin 15R	Após precipitação: água destilada	Coluna DEAE Sepharose e coluna CM Sepharose	SDS-PAGE 15%	[19]
Não descrito	Após a purificação: liofilização	PeAfpA Antes da purificação: tampão fosfato 20 mM (pH 6,6). Após a purificação: água Milli-Q PeAfpB e PeAfpC Antes da purificação: tampão acetato 20 mM (pH 5,4). Após a purificação: água Milli-Q	Coluna CM-Sepharose	SDS-PAGE 16%	[10]
Não descrito	Ultrafiltração em Ultracell 30 kDa	Após a purificação: água ultrapura	Coluna CM-Sepharose	SDS-PÁGINA 18%	[21-22]
Não realizado	Após purificação: ultrafiltração em Centriprep YM-30 e Microcon YM-30	Não realizado	Coluna Mono S 5/5 e coluna HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR	SDS-PAGE 12%	[17-18]

Não descrito	Antes da purificação: ultrafiltração em Ultracell 30 kDa . Após a purificação: filtração em Vivaspin 500 3 kDa.	Após purificação: água destilada	Coluna Bio-Pro S30) e RP-HPLC	SDS-PÁGINA 18%	[24-25]
Filtração	Rota- evaporador	Antes da purificação: água destilada	Coluna Amberlite XE64 e coluna Sephadex G-25	SDS-PAGE 0,1%	[28, 32]
Filtração	Antes da purificação: ultrafiltração em Amicon YM-30. Após a purificação: ultrafiltração em membrana YM3	Não realizado	Coluna CM-Sepharose e RP-HPLC (Ultraspher e C18 RP-HPLC)	MALDI-MS	[29]
Centrifugação	Pós-purificação: concentração em SpeedVac	Não realizado	Choque térmico (incubação da amostra a 70°C) e RP-HPLC (μ-Bondpack C18)	SDS-PAGE 15%	[12]
Centrifugação	Não realizado	Tampão fosfato 10 mM (pH 6,0)	Coluna S Sepharose	HPLC	[31]
Centrifugação	Não realizado	Não realizado	Choque térmico (incubação da amostra a 100 °C)	SDS-PAGE 15%	[30]

Assim, nesta revisão, observou-se que o cultivo líquido é submetido a processos para obter o sobrenadante dos meios de cultivo. Uma vez obtida essa fração, ela geralmente passa por um processo de diálise antes ou após a purificação, uma vez que alguns meios de cultura contêm sais que podem interferir com os protocolos de purificação de peptídeos, e o próprio processo de purificação envolve sais, pois são processos de troca iônica. A consistência dos resultados obtidos nos estudos de PAFs

é garantida com a verificação e confirmação da pureza dos produtos de purificação, principalmente por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Ao comparar os dados das Tabelas 2 e 4, é possível observar que os trabalhos de Geisen [11] e Menegotto [26] estão mostrados na Tabela 2, mas não aparecem na Tabela 4. Essa observação é justificada pelo fato de que, nesses estudos, os peptídeos não foram isolados.

A purificação de peptídeos nos estudos analisados foi bem-sucedida a partir da aplicação de técnicas baseadas principalmente em cromatografia de troca iônica. As colunas usadas nos estudos incluem colunas de troca aniônica (Mono-Q-HR 5/5 e DEAE Sepharose) e colunas de troca catiônica (CM-Sepharose CL-6B, HiTrap SP HP, Mono S 5/5, CM-Sepharose, Resource S, Bio-Pro S30, Amberlite XE64 e S Sepharose). Além disso, além da troca iônica, alguns estudos usaram uma etapa extra de purificação, com colunas de filtração em gel (HiLoad 26/60 Superdex 75, HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR e Sephadex G-25) ou cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (geralmente colunas C18).

A confirmação dos processos de purificação foi feita na maioria dos estudos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com o gel de alta resolução. Alguns autores optaram por outras técnicas nesta fase da pesquisa, como ionização/desorção assistida por matriz acoplada com espectrometria de massa e cromatografia líquida de alta performance [29, 31]. O uso de Fingerprint Peptide Mass (PMF) como técnica adicional ao SDS-PAGE foi realizado no estudo de Heredero et al. [23].

3.5 Motivo Molecular de PAFs e aplicações biotecnológicas

Marx et al. relataram que os motivos conservados na região promotora do gene *paf* de *P. chrysogenum* estavam associados com a regulação da transcrição [13]. Em um estudo similar que corroborou os dados anteriores, foi relatado que a estrutura e os motivos de uma proteína ou peptídeo estão intimamente relacionados ao mecanismo de ação e à sua atividade biológica [33]. Além dessas características bioquímicas e genéticas, outros motivos estruturais de PAFs, como os motivos γ -core, estão atualmente em evidência [34-36]. Na classe Eurotiomycetos, foi relatado que a presença do motivo γ -core confere atividade anti-cândida [35].

Na Figura 1-A, mostramos a árvore filogenética dos PAFs construída com sequências depositadas no NCBI para o gênero *Penicillium*, onde também está inserido o peptídeo obtido pelo nosso grupo de pesquisa de *Penicillium crustosum* FP 11 (número de acesso GenBank QID 75821.1.26). A sequência deste PAF homólogo foi

O primeiro aminoácido do peptídeo maduro é indicado pela seta (Leucina – L) e os resíduos de aminoácidos (39-50) marcam o motivo γ -core delimitado pelo retângulo. QID75821.1 *Penicillium crustosum*, ACX54052.1 *Penicillium chrysogenum*, QQK40788.1 *Penicillium digitatum*, KAF3387261.1 *Penicillium rolsii* e OKP12994.1 *Penicillium subrubescens*.

O motivo γ -core é uma sequência de dez aminoácidos localizada no loop 1 dos PAFs, sendo uma sequência conservada tanto em organismos eucarióticos quanto procarióticos. Não apenas a sequência de aminoácidos, mas também a estrutura desse motivo é conservada. Consiste em duas fitas β antiparalelas, conectadas por uma região curva intercalada [34]. Existem variações pontuais na sequência de aminoácidos do motivo γ -core observadas entre as diferentes classes de peptídeos antimicrobianos, mas a posição é conservada na estrutura primária, o que também se aplica aos PAFs dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* [35].

Na Figura 2, mostramos a estrutura modelada do PeAFP-A (A) de *P. expansum*, incluindo a região da proteína madura e o motivo γ -core (GXC-X [3-9]), (Fig. 2-C), modelada *ab initio* com o software Quark (<https://seq2fun.dcmf.med.umich.edu//QUARK/>) e analisada com o software Pymol 2.5.

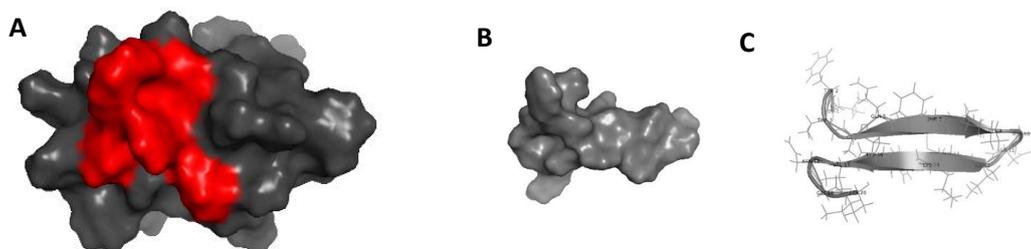


Figura 2. (A) Proteína madura de *P. expansum* PAF-A modelada em modelo de superfície *ab initio* com motivo do núcleo γ destacado em vermelho; (B) modelo de superfície do motivo do núcleo γ e (C) motivo do núcleo γ com resíduos de lisina na região da folha β do motivo.

Utesch et al. mostraram a importância do motivo γ -core do peptídeo AFP na interação com membranas fúngicas [36]. No modelo PAF-A (Fig. 2), a região do motivo γ -core do PAF-A de *P. expansum* (Fig. 2-A) apresenta cerca de 70% dos resíduos de aminoácidos conservados da região do motivo γ -core do NFAP relatado em *Neosartorya fischeri*. Nesse motivo estão localizados os resíduos de Lisina (K) que estão envolvidos na interação com os alvos na membrana plasmática (Fig. 2-C). Huber et al. [34], estudando o motivo γ -core dos peptídeos PAF e PAFB, notaram em seus experimentos

que o motivo γ -core tem relevância na atividade biológica do peptídeo PAF e um papel essencial na estrutura e estabilidade do peptídeo PAFB. Isso demonstra que a função desse motivo é essencial e pode variar de peptídeo para peptídeo. É notável que peptídeos modificados em seu motivo γ -core podem mostrar atividade aprimorada contra microrganismos e que peptídeos sintéticos baseados nesse motivo podem apresentar atividade biológica por si próprios [34-37]. O estudo desses motivos estruturais é importante para a aplicação na produção de peptídeos curtos com ação antifúngica para aplicação na indústria farmacêutica [8].

Recentemente, Tóth et al. [37] demonstraram que o motivo γ -core pode ser alterado para aumentar a atividade antifúngica por meio de design racional baseado nas propriedades dos aminoácidos, conferindo carga isoelétrica e pH, o que implica em uma atividade antifúngica aprimorada contra ascomicetos fitopatogênicos. Corroborando este estudo, a otimização do motivo γ -core de um PAF obtido de *Phaseolus vulgaris* também confirma essa hipótese ao aumentar a atividade contra cepas de *Candida albicans* e *Candida buinenses* [40].

O efeito protetor dos PAFs contra patógenos é de relevância agrícola, tendo sido aplicado algumas vezes, como é o caso da cevada, trigo e tomate [37-38]. Em modelos animais, não apresentaram reações, demonstrando que o PAF é um excelente candidato para o desenvolvimento de novos medicamentos [46].

3.6 Perspectivas futuras: Estratégias alternativas de produção biotecnológica e sistema de co-cultivo

P. chrysogenum é uma excelente máquina para genes heterólogos devido à sua expressão extremamente alta de proteínas heterólogas [10, 21], o que foi confirmado por Galgóczy et al. pela expressão do gene NFAP de *N. fischeri* em *Aspergillus nidulans* [42]. Virágh et al. observaram que a produção de hNFAP aumentou em seis vezes em *Pichia pastoris* quando comparada à cepa original [50].

Uma abordagem recente para a produção de biomoléculas com atividade biológica tem sido a co-cultura de microrganismos. Nessa técnica fermentativa, a competição ou antagonismo leva à produção de compostos não presentes em culturas axênicas. A co-cultivação tem mostrado promessa na indução da produção de metabólitos secundários, e o estudo pioneiro de co-cultivo para a produção de PAF de *A. giganteus* foi realizado em meio de cultivo sólido [51, 52]. A fermentação em co-cultivação de *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 com *Aspergillus nidulans* resultou na inibição do crescimento fúngico e alteração das proteínas secretadas no meio de cultura

[53]. Compartilhando essa metodologia aplicada, o cultivo de *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens* induziu genes relacionados ao metabolismo secundário, micoparasitismo, antioxidantes e foi benéfico para o crescimento das plantas [54]. Boruta et al. investigaram a co-cultura entre *Penicillium rubens* e *Aspergillus terreus* e mostraram o efeito da co-cultura na produção de metabólitos secundários [55].

Até agora, o sistema de co-cultura foi estudado em meio líquido para produzir metabólitos secundários e avaliar mudanças no metabolismo do fungo. No entanto, até o momento, essa metodologia ainda não foi avaliada para a produção de PAFs. É possível melhorar a produção de PAFs em cultura líquida por co-cultivo? Nesta revisão, levantamos a possibilidade de que o sistema de co-cultura poderia ser uma forma de produzir PAFs em meio líquido, o que tem se mostrado difícil de induzir em culturas axênicas. Existem fungos filamentosos que ainda não foram estudados e que poderiam produzir PAFs, tornando essa ferramenta promissora para esse propósito.

4. CONCLUSÃO

Nesta breve revisão podemos destacar que os processos de produção e purificação de PAFs têm um padrão de técnicas utilizadas, embora com algumas particularidades, dependendo do peptídeo analisado. Métodos de biologia molecular como sistemas de vetores de expressão têm sido explorados no estudo de PAFs, facilitando e viabilizando práticas na produção e análise dessas moléculas. Ainda assim, a descoberta de novos peptídeos através do cultivo do fungo em um determinado meio de cultura e o isolamento da molécula dessa cultura não parecem tornar obsoletos procedimentos clássicos que não utilizam técnicas sofisticadas de engenharia genética.

Independentemente de como os peptídeos são obtidos e purificados, as etapas de produção e purificação de PAFs são vitais para o estudo e caracterização de novas moléculas, levando ao entendimento de características essenciais dos peptídeos, como o motivo γ -core. Assim, esforços são investidos neste tipo de estudo, uma vez que há uma diversidade de moléculas que podem ser exploradas nos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Estudos futuros usando a técnica de co-cultura podem ser explorados, uma vez que o papel desses AFPs pode estar relacionado à competição fúngica.

5. RECONHECIMENTOS

Agradecemos à Universidade à Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) pelo apoio estrutural à pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES) pelo apoio ao curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF/Unioeste).

6. CONFLITOS DE INTERESSE: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

7. REFERÊNCIAS

- Oliveira JC. (1999) Micologia Médico. Control-Lab Rio de Janeiro (1999).
- Yadav, AN, Verma, P., Kumar, V., Sangwan, P., Mishra, S., Panjari, N., Gupta, VK, & Saxena, AK (2017). Biodiversidade do gênero penicillium em diferentes habitats. Em *Novos e Futuros Desenvolvimentos em Biotecnologia Microbiana e Bioengenharia: Propriedades e Aplicações do Sistema Penicillium* (pp. 3–18). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00001-6>
- Park, MS, Fong, JJ, Oh, SY, Kwon, KK, Sohn, JH, & Lim, YW (2014). Penicillium derivado de organismos marinhos na Coreia: diversidade, atividade enzimática e propriedades antifúngicas. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 106 (2), 331–345. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0205-5>
- Soltani, J. (2016). Diversidade de Metabólitos Secundários do Gênero Aspergillus: Avanços Recentes. Em *Novos e Futuros Desenvolvimentos em Biotecnologia e Bioengenharia Microbiana: Propriedades e Aplicações do Sistema Aspergillus* (pp. 275–292). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00035-X>
- Frisvad, JC (2014). Taxonomia, quimiodiversidade e quimioconsistência de espécies de aspergillus, penicillium e talaromyces . Em *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Edição DEC). Frontiers Media SA <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00773>
- Garrigues, S., Gandía, M., & Marcos, JF (2016). Ocorrência e função de proteínas antifúngicas fúngicas: um estudo de caso do patógeno pós-colheita de citros *Penicillium digitatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (5), 2243–2256. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7110-3>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Peptídeos antimicrobianos: classificação, design, aplicação e progresso da pesquisa em vários campos. Em *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media SA <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Peptídeos antimicrobianos: Uma categoria emergente de agentes terapêuticos. Em *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 6, Edição DEC). Frontiers Media SA <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Li, T., Li, L., Du, F., Sun, L., Shi, J., Long, M., & Chen, Z. (2021). Atividade e mecanismo de ação de peptídeos antifúngicos de microrganismos: Uma revisão. Em *Molecules* (Vol. 26, Edição 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26113438>
- Garrigues, S., Gandía, M., Castillo, L., Coca, M., Marx, F., Marcos, JF, & Manzanares, P. (2018). Três proteínas antifúngicas de penicillium expansum: Diferentes padrões de produção e atividade antifúngica. *Frontiers in Microbiology*, 9 (OUT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02370>
- Geisen RP nalgiovense carrega um gene que é homólogo ao gene paf de P. chrysogenum que codifica um peptídeo antifúngico. *Int J Food Microbiol*. 2000 Dez 5;62(1-2):95-101. doi : 10.1016/S0168-1605(00)00367-6. PMID: 11139027.
- Skouri -Gargouri H, Gargouri A. Primeiro isolamento de um novo peptídeo antifúngico termoestável secretado por *Aspergillus clavatus* . *Peptídeos*. 2008 Nov;29(11):1871-7. doi : 10.1016/j.peptides.2008.07.005. Epub 2008 Jul 18. PMID: 18687373.
- Marx F, Haas H, Reindl M, Stöffler G, Lottspeich F, Redl B. Clonagem, organização estrutural e regulação da expressão do gene paf de *Penicillium chrysogenum* que codifica uma proteína abundantemente secretada com atividade antifúngica. *Gene*. 1995 Dez 29;167(1-2):167-71. doi : 10.1016/0378-1119(95)00701-6. PMID: 8566771.
- Kaiserer L, Oberparleiter C, Weiler- Görz R, Burgstaller W, Leiter E, Marx F. Caracterização da proteína antifúngica PAF de *Penicillium chrysogenum*. *Arco Microbiol*. Setembro de

- 2003;180(3):204-10. doi: 10.1007/s00203-003-0578-8. Epub 2003, 10 de julho. PMID: 12856109.
15. Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ, Asensio MA. Caracterização da nova proteína antifúngica PgAFP e do gene codificador de *Penicillium chrysogenum*. *Peptídeos*. 2010 Abr;31(4):541-7. doi : 10.1016/j.peptides.2009.11.002. Epub 2009 Nov 13. PMID: 19914321.
 16. Acosta R, Rodríguez-Martín A, Martín A, Núñez F, Asensio MA. Seleção de fungos produtores de proteína antifúngica a partir de produtos cárneos curados a seco. *Int J Food Microbiol*. 2009 Set 30;135(1):39-46. doi : 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.020. Epub 2009 Jul 28. PMID: 19683356.
 17. Seibold M, Wolschann P, Bodevin S, Olsen O. Propriedades da proteína bolha, uma defensina e um componente abundante de um exsudato fúngico. *Peptídeos*. 2011 Out;32(10):1989-95. doi : 10.1016/j.peptides.2011.08.022. Epub 2011 Set 1. PMID: 21906643.
 18. Olsen JG, Flensburg C, Olsen O, Bricogne G, Henriksen A. Resolvendo a estrutura da proteína bolha usando o sinal de enxofre anômalo somente a partir de dados de difração de Cu K α de cristal único interno. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 fev;60(Pt 2):250-5. doi : 10.1107/S0907444903025927. Epub 2004 jan 23. PMID: 14747700.
 19. Chen Z, Ao J, Yang W, Jiao L, Zheng T, Chen X. Purificação e caracterização de uma nova proteína antifúngica secretada por *Penicillium chrysogenum* de um sedimento ártico. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Dez;97(24):10381-90. doi: 10.1007/s00253-013-4800-6. Epub 2013 Mar 10. PMID: 23474616.
 20. Português Garrigues S, Gandía M, Popa C, Borics A, Marx F, Coca M, Marcos JF, Manzanares P. Produção e caracterização eficientes da nova e altamente ativa proteína antifúngica AfpB de *Penicillium digitatum*. *Sci Rep*. 2017 Nov 7;7(1):14663. doi : 10.1038/s41598-017-15277-w. PMID: 29116156; PMCID: PMC5677034.
 21. Sonderegger C, Galgóczy L, Garrigues S, Fizil Á, Borics A, Manzanares P, Hegedüs N, Huber A, Marcos JF, Batta G, Marx F. Um sistema de expressão baseado em *Penicillium chrysogenum* para a produção de pequenas proteínas antifúngicas ricas em cisteína para análises estruturais e funcionais. *Microb Cell Fact*. 2016 Nov 11;15(1):192. doi : 10.1186/s12934-016-0586-4. PMID: 27835989; PMCID: PMC5106836.
 22. Huber A, Hajdu D, Bratschun -Khan D, Gáspári Z, Varbanov M, Philippot S, Fizil Á, Czajlik A, Kele Z, Sonderegger C, Galgóczy L, Bodor A, Marx F, Batta G. Novo potencial antimicrobiano e propriedades estruturais de PAFB: uma proteína catiônica rica em cisteína de *Penicillium chrysogenum* Q176. 2018, 29 de janeiro;8(1):1751. doi : 10.1038/s41598-018-20002-2. PMID: 29379111; PMCID: PMC5788923.
 23. Heredero M, Garrigues S, Gandía M, Marcos JF, Manzanares P. Design racional e produção biotecnológica de novas proteínas antifúngicas quiméricas AfpB-PAF26. *Microorganisms*. 2018 Out 15;6(4):106. doi : 10.3390/microorganisms6040106. PMID: 30326659; PMCID: PMC6313716.
 24. Holzkecht J, Kühbacher A, Papp C, Farkas A, Váradi G, Marcos JF, Manzanares P, Tóth GK, Galgóczy L, Marx F. A proteína antimicrobiana *Penicillium chrysogenum* Q176 PAFB inibe efetivamente o crescimento do patógeno humano oportunista *Candida albicans*. *J Fungi (Basileia)*. 2020 19 de agosto;6(3):141. doi : 10.3390/jof6030141. PMID: 32824977; PMCID: PMC7557831.
 25. Czajlik A, Holzkecht J, Galgóczy L, Tóth L, Poór P, Ördög A, Váradi G, Kühbacher A, Borics A, Tóth GK, Marx F, Batta G. Estrutura da solução, dinâmica e novos aspectos antifúngicos dos ricos em cisteína Miniproteína PAFB. *Int J Mol Sci*. 25 de janeiro de 2021;22(3):1183. doi : 10.3390/ijms22031183. PMID: 33504082; IDPM: PMC7865535.
 26. Menegotto JB, Ribeiro LF, Simão R de CG, Maller A, Kadowaki MK, C.Silva JL da. Caracterização estrutural e genética de um novo peptídeo antifúngico obtido da cepa *Penicillium crustosum* FP11. *Int J Biochem Res Rev*. 2020;29(1):50–60.
 27. Jennings JC, Olson BH, Roga V, Junek AJ, Schuurmans DM. Alfa sarcina, um novo agente antitumoral. II. Fermentação e espectro antitumoral. *Appl Microbiol*. 1965 maio;13(3):322-6. doi : 10.1128/am.13.3.322-326.1965. PMID: 14330325; PMCID: PMC1058251.
 28. Lacadena J, Martínez del Pozo A, Gasset M, Patiño B, Campos-Olivas R, Vázquez C, Martínez-Ruiz A, Mancheño JM, Oñaderra M, Gavilanes JG. Caracterização da proteína antifúngica secretada pelo fungo *Aspergillus giganteus*. *Arco Bioquímica Biophys*. 1995 dez 20;324(2):273-81. doi : 10.1006/abbi.1995.0040. PMID: 8554319.

29. Gun Lee D, Shin SY, Maeng CY, Jin ZZ, Kim KL, Hahm KS. Isolamento e caracterização de um novo peptídeo antifúngico de *Aspergillus niger*. *Biochem Biophys Res Commun* . 5 de outubro de 1999;263(3):646-51. doi : 10.1006/bbrc.1999.1428. PMID: 10512732.
30. Hajji M, Jellouli K, Hmidet N, Balti R, Sellami-Kamoun A, Nasri M. Um peptídeo antimicrobiano altamente termoestável de *Aspergillus clavatus* ES1: caracterização bioquímica e molecular. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010 agosto;37(8):805-13. doi: 10.1007/s10295-010-0725-6. Epub 2010 maio 4. PMID: 20440534.
31. Binder U, Bencina M, Eigentler A, Meyer V, Marx F. A proteína antifúngica AFPNN5353 de *Aspergillus giganteus* atua a via de integridade da parede celular e perturba a homeostase do cálcio. *BMC Microbiol*. 2011 23 de setembro; 11:209. doi : 10.1186/1471-2180-11-209. PMID: 21943024; PMCID: PMC3197501.
32. Olson BH, Goerner GL. Alpha sarcin , um novo agente antitumoral. I. Isolamento, purificação, composição química e a identidade de um novo aminoácido. *Appl Microbiol*. 1965 maio;13(3):314-21. doi: 10.1128/am.13.3.314-321.1965. PMID: 14325268; PMCID: PMC1058250.
33. Marx F. Proteínas antifúngicas pequenas e básicas secretadas por ascomicetes filamentosos: um estudo comparativo sobre expressão, estrutura, função e potencial aplicação. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004 agosto;65(2):133-42. doi: 10.1007/s00253-004-1600-z. Epub 2004 mar 23. PMID: 15042327.
34. Huber A, Galgóczy L, Váradi G, Holzkecht J, Kakar A, Malanovic N, Leber R, Koch J, Keller MA, Batta G, Tóth GK, Marx F. Duas pequenas proteínas antifúngicas catiônicas e ricas em cisteína de *Penicillium chrysogenum*: Um estudo comparativo de PAF e PAFB. *Biochim Biophys Acta Biomembr* . 2020 ago 1;1862(8):183246. doi : 10.1016/j.bbmem.2020.183246. Epub 2020 mar 3. PMID: 32142818; PMCID: PMC7138148.
35. Sonderegger C, Váradi G, Galgóczy L, Kocsuó S, Posch W, Borics A, Dubrac S, Tóth GK, Wilflingseder D, Marx F. O motivo evolutivo conservado do γ -Core influencia a atividade anti-*Candida* da proteína antifúngica PAF de *Penicillium chrysogenum*. *Microbiol frontal*. 20 de julho de 2018; 9:1655. doi : 10.3389/fmicb.2018.01655. PMID: 30079061; PMCID: PMC6062912.
36. Utesch T, de Miguel Catalina A, Schattenberg C, Paeye N, Schmiieder P, Krause E, Miao Y, McCammon JA, Meyer V, Jung S, Mroginski MA. Uma abordagem de modelagem computacional prevê a interação da proteína antifúngica AFP de *Aspergillus giganteus* com membranas fúngicas por meio de seu motivo γ -Core. *mSphere* . 2018 Out 3;3(5): e00377-18. doi : 10.1128/mSphere.00377-18. PMID: 30282755; PMCID: PMC6170789.
37. Tóth L, Boros É, Poór P, Ördög A, Kele Z, Váradi G, Holzkecht J, Bratschun -Khan D, Nagy I, Tóth GK, Rákhely G, Marx F, Galgóczy L. O uso potencial da proteína antifúngica *Penicillium chrysogenum* PAF, a variante projetada PAF^{opt} e seu peptídeo de núcleo γ Py^{optam} na proteção de plantas. *Micróbio Biotechnol*. 2020 Set;13(5):1403-1414. doi : 10.1111/1751-7915.13559. Epub 2020 Mar 24. PMID: 32207883; PMCID: PMC7415367.
38. Barna B, Leiter E, Hegedus N, Bíró T, Pócsi I. Efeito da proteína antifúngica (PAF) de *Penicillium chrysogenum* em patógenos de oídio da cevada e ferrugem da folha do trigo. *J Basic Microbiol*. 2008 Dez;48(6):516-20. doi: 10.1002/jobm.200800197. PMID: 18798177.
39. Theis T, Wedde M, Meyer V, Stahl U. A proteína antifúngica de *Aspergillus giganteus* causa permeabilização da membrana. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 fev;47(2):588-93. doi : 10.1128/AAC.47.2.588-593, 2003. PMID: 12543664; PMCID: PMC151754.
40. Martinez Del Pozo A, Lacadena V, Mancheno JM, Olmo N, Onaderra M, Gavilanes JG. A proteína antifúngica AFP de *Aspergillus giganteus* é uma proteína contendo dobras de ligação de oligonucleotídeo/oligosacarídeo (OB) que produz condensação de DNA. *J Biol Chem*. 2002 Nov 29;277(48):46179-83. doi: 10.1074/jbc.M207472200. Epub 2002 Sep 25. PMID: 12351633.
41. de Oliveira Mello É, Taveira GB, de Oliveira Carvalho A, Gomes VM. Peptídeos menores melhorados com base no aumento da carga positiva do motivo γ -core de Pv D₁ e seu mecanismo de ação contra espécies de *Candida*. *Int J Nanomedicine*. 2019 Jan 9; 14:407-420. doi : 10.2147/IJN.S187957. PMID: 30666103; PMCID: PMC6331069.
42. Galgóczy L, Kovács L, Karácsony Z, Virágh M, Hamari Z, Vágvölgyi C. Investigação do efeito antimicrobiano da proteína antifúngica de *Neosartorya fischeri* (NFAP) após expressão heteróloga em *Aspergillus nidulans*. *Microbiologia (Leitura)*. Fevereiro de 2013;159(Pt 2):411-419. doi : 10.1099/mic.0.061119-0. Epub 2012, 29 de novembro. PMID: 23197172.
43. Kovács L, Virágh M, Takó M, Papp T, Vágvölgyi C, Galgóczy L. Isolamento e caracterização da proteína antifúngica de *Neosartorya fischeri* (NFAP). *Peptídeos*. Agosto de

- 2011;32(8):1724-31. doi : 10.1016/j.peptídeos.2011.06.022. Epub 2011, 30 de junho. PMID: 21741420.
44. Hajdu D, Huber A, Czajlik A, Tóth L, Kele Z, Kocsubé S, Fizil Á, Marx F, Galgóczy L, Batta G. Estrutura da solução e novos insights sobre a filogenia e o modo de ação da proteína antifúngica (NFAP) de *Neosartorya* (*Aspergillus*) *fischeri*. *Int J Biol Macromol*. 15 de maio de 2019; 129:511-522. doi : 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.016. Epub 7 de fevereiro de 2019. PMID: 30738898.
 45. Tóth L, Kele Z, Borics A, Nagy LG, Váradi G, Virágh M, Takó M, Vágvölgyi C, Galgóczy L. NFAP2, uma nova proteína anti-levadura rica em cisteína de *Neosartorya fischeri* NRRL 181: isolamento e caracterização. *AMB Express*. Dezembro de 2016;6(1):75. doi: 10.1186/s13568-016-0250-8. Epub 2016, 15 de setembro. PMID: 27637945; PMCID: PMC5025423.
 46. Palicz Z, Jenes A, Gáll T, Miszti-Blasius K, Kollár S, Kovács I, Emri M, Márián T, Leiter E, Pócsi I, Csósz E, Kalló G, Hegedűs C, Virág L, Csernoch L, Szentesi P. Aplicação in vivo de uma proteína antifúngica de baixo peso molecular de *Penicillium chrysogenum* (PAF). *Toxicol Appl Pharmacol*. 15 de maio de 2013;269(1):8-16. doi: 10.1016/j.taap.2013.02.014. Epub 2013, 4 de março. PMID: 23466426.
 47. Leiter E, Szappanos H, Oberparleiter C, Kaiserer L, Csernoch L, Pusztahelyi T, Emri T, Pócsi I, Salvenmoser W, Marx F. A proteína antifúngica PAF afeta severamente a integridade da membrana plasmática de *Aspergillus nidulans* e induz um fenótipo semelhante à apoptose. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jun;49(6):2445-53. doi: 10.1128/AAC.49.6.2445-2453.2005. PMID: 15917545; PMCID: PMC1140496.
 48. Delgado J, Owens RA, Doyle S, Asensio MA, Núñez F. Impacto da proteína antifúngica PgAFP de *Penicillium chrysogenum* no perfil proteico em *Aspergillus flavus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Oct;99(20):8701-15. doi : 10.1007/s00253-015-6731-x. Epub 2015 Jun 16. PMID: 26078108.
 49. Batta G, Barna T, Gáspári Z, Sándor S, Kövér KE, Binder U, Sarg B, Kaiserer L, Chhillar AK, Eigentler A, Leiter E, Hegedűs N, Pócsi I, Lindner H, Marx F. Aspectos funcionais da solução estrutura e dinâmica do PAF - uma proteína antifúngica altamente estável de *Penicillium chrysogenum*. *FEBS J*. maio de 2009;276(10):2875-90. doi : 10.1111/j.1742-4658.2009.07011.x. PMID: 19459942; IDPM: PMC4290664.
 50. Virágh M, Vörös D, Kele Z, Kovács L, Fizil Á, Lakatos G, Maróti G, Batta G, Vágvölgyi C, Galgóczy L. Produção de uma proteína antifúngica semelhante à defensina NFAP de *Neosartorya fischeri* em *Pichia pastoris* e sua atividade antifúngica contra isolados de fungos filamentosos de infecções humanas. *Proteína Expr Purif*. Fevereiro de 2014; 94:79-84. doi : 10.1016/j.pep.2013.11.003. Epub 2013, 19 de novembro. PMID: 24269762.
 51. Thissera B, Alhadrami HA, Hassan MHA, Hassan HM, Bawazeer M, Yaseen M, Belbahri L, Rateb ME, Behery FA. Indução de derivados antifúngicos crípticos de pulvicatina de *Pantoea aglomerados* por Microbial Co-Culture. *Biomoléculas*. 2020 fev 10;10(2):268. doi : 10.3390/biom10020268. PMID: 32050703; PMCID: PMC7072716.
 52. Meyer V, Stahl U. A influência do co-cultivo na expressão da proteína antifúngica em *Aspergillus giganteus*. *J Basic Microbiol*. 2003;43(1):68-74. doi : 10.1002/jobm.200390007. PMID: 12596244.
 53. Ström K, Schnürer J, Melin P. Co-cultivo do antifúngico *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 e *Aspergillus nidulans*, avaliação dos efeitos no crescimento fúngico e expressão proteica. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 1 de maio;246(1):119-24. doi : 10.1016/j.femsle.2005.03.047. PMID: 15869970.
 54. Karuppiyah V, Sun J, Li T, Vallikkannu M, Chen J. Co-cultivo de *Trichoderma asperellum* GDFS1009 e *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 causa expressão gênica diferencial e melhoria no crescimento do trigo e atividade de biocontrole. *Front Microbiol*. 2019 16 de maio; 10:1068. doi : 10.3389/fmicb.2019.01068. PMID: 31156586; PMCID: PMC6532653.
 55. Boruta T, Marczyk A, Rychta K, Przydacz K, Bizukojc M. Confronto entre *Penicillium rubens* e *Aspergillus terreus* : Investigando a produção de metabólitos secundários fúngicos em co-culturas submersas. *J Biosci Bioeng*. 2020 Nov;130(5):503-513. doi: 10.1016/j.jbiosc.2020.06.012. Epub 2020 Ago 2. PMID: 32758403.

SEÇÃO 2

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS (PAFs) DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR FUNGOS DO GÊNERO PENICILLIUM E ASPERGILLUS

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são divididos em grupos de acordo com sua morfologia, leveduriformes ou filamentosos sendo respectivamente unicelulares e multicelulares, os mais abundantes na natureza são os filamentosos. Um terceiro grupo descrito pode se apresentar de ambas as formas transformando-se de acordo com a temperatura em que está exposto. (POWERSFLETCHER et al., 2016).

Os fungos apresentam diversas cores devido aos seus pigmentos, utilizam glicogênio como substância reserva e as plantas amido, além de não produzirem carboidratos através da fotossíntese e não apresentam celulose na parede celular, essas são as características morfofisiológicas que os diferenciam dos integrantes do reino vegetal (FRAZIER, 1991; JAY, 1994;). São eucariotos e heterotróficos nutrindo-se por absorção (GOMPERTZ et al., 1999).

Quanto a sua fisiologia, em relação ao oxigênio a maioria pode ser denominado aeróbico e um outro grupo anaeróbico respirando com a presença desse gás ou fermentando na ausência dele. Também dependem da água para sua sobrevivência, crescimento e desenvolvimento (POWERSFLETCHER et al., 2016).

O surgimento de novas doenças de origem fúngica e a crescente disseminação desses microrganismos vem se tornando um problema de saúde pública, principalmente pela resistência existente a tratamentos convencionais e o acometimento na população imunocomprometida. (POWERSFLETCHER et al., 2016)

O grande marco envolvendo o reino fungi no setor farmacêutico foi a descoberta e isolamento da Penicilina em 1928 por Alexandre Fleming, o médico observou acidentalmente que o *Penicillium notatum* inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*. (FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008)

1.1 GÊNEROS *PENICILLIUM* E *ASPERGILLUS*

Esse gênero recebeu essa denominação devido a sua morfologia, sua aparência externa demonstra semelhança a um pincel por apresentarem micélios septados e conídios ramificados, por isso, *Penicillium* do latim pincel = penicillus (FRAZIER, 1991; JAY, 1994;). Os fungos deste gênero tornaram-se conhecidos graças a descoberta da penicilina. (FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008).

Esses microrganismos são bem distribuídos na natureza, são onipresentes e universais, suas colônias crescem rapidamente (cerca de três/quatro dias) inicialmente branca, algodonosa e veludosa e posteriormente verde ou azul-esverdeado, amarelo-esverdeado, castanho-amarelado ou castanho avermelhado variando de acordo com a espécie (SIDRIM et al., 2004).

Existe cerca de 150 espécies que compõem o gênero *Penicillium* tornando-o muito vasto (FURTADO, 1990). Estão entre os principais contaminantes do ar e se proliferam em abundância na poeira, no solo e em diversos alimentos, grãos, derivados do trigo e frutas levando-as a podridão. (EVANGELISTA, 1994).

O gênero *Penicillium* é facilmente superado no que tange a presença nos mais diversos substratos, nos riscos à saúde principalmente em regiões tropicais pelo gênero *Aspergillus*. Diversas espécies possuem aplicações industriais, na produção de enzimas, biotransformação, ácidos orgânicos e substâncias químicas. As micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos *Aspergillus spp.* são comumente associados a intoxicações e o potencial patógeno para populações humanas e animais (SAMSON; VARGAS, 2010).

A medicina juntamente com a agricultura vem sendo desafiada frente ao eminente crescimento de cepas resistentes a antifúngicos e o nível elevado de pacientes imunocomprometidos, portanto, há uma demanda considerável de novas substâncias bioativas com amplo espectro antimicótico. Estruturalmente as defensinas se assemelham a algumas proteínas excretadas por fungos filamentosos que possuem atividade antimicrobiana nos mesmos (DELGADO et al., 2015).

1.2 PEPTÍDEOS ANTIFÚNGICOS

Os peptídeos antifúngicos (PAFs) são considerados promissores na indústria de alimentos e como possíveis novos medicamentos, possuem um espectro antifúngico amplo, dotados de uma alta especificidade e um baixo nível de resistência. É provável que cada família de PAFs tenha uma relação de estrutura atividade que as diferem uns dos outros, suas características biofísicas e ação são diversificados. A maior parte dos PAFs descritos possuem uma sequência de 11 a 20 resíduos de aminoácidos, com a finalidade de reduzir custos os novos peptídeos a serem sintetizados tendem a ser mais curtos. (AKKAM, 2016)

A atividade antimicrobiana dos PAFs vem sendo muito estudada, nota-se uma sucessão de pesquisas em torno do seu poder antibacteriano e a antifúngica deve ser mais explorada, para isso, o conhecimento dos mecanismos de ação das células dos fungos deve ser conhecida (WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013).

A sequência e estrutura peptídica determinam a atividade antifúngica, os PAFs são divididos em cinco grupos sendo os ricos em aminoácidos, α -hélice, β -folha e α -hélice/ β -folha misto. Cerca de 50% ainda não foram elucidados e dentre os conhecidos os α -hélices são os mais numerosos. Por meio da interação com membranas anfipáticas esses peptídeos se tornam helicoidais. Os β -folha contam com a presença de dois ou mais resíduos de cisteína, essa característica é comum entre eles (AKKAM, 2016).

Outra classificação das PAFs foi sugerida seguindo critérios: na proteína madura foram avaliados o comprimento de sequência, padrões de cisteína e homologia entre elas, na sequência gênica a presença de domínios Pfam e a estrutura íntron-exon foram consideradas. De acordo com as análises realizadas as classes A, B e C assim denominadas, se diferem e se assemelham em determinadas características. A classe A apresenta homologia que pode ser alta ou relativamente baixa, possuem de seis a oito cisteínas e dois íntrons em sua sequência gênica. A classe B possui o mesmo número de íntrons em relação à classe A, mas se diferencia na estrutura tridimensional da molécula nativa. A

classe C não varia tanto em homologia, mas distingue-se das outras classes no número de íntrons denotando apenas um (GARRIGUES et al., 2016).

A maioria dos fungos codificam os genes de PAFs, por se assemelharem e graças sua sequência genômica (GARRIGUES; GANDÍA; MARCOS, 2016). O primeiro peptídeo PAF foi descrito do gênero *Penicillium* foi isolado do fungo *Penicillium Chrysogenum* (MARX, 1995).

Um estudo averiguou que o *P. expansum* é capaz de codificar as três classes de PAFs, as cepas selvagens apenas expressaram no sobrenadante o PAF da classe A. As outras classes foram expressas somente por cepas transformadas PAFB e PAFC que apresentaram respectivamente atividade moderada e inatividade nos microrganismos testados (GARRIGUES et al., 2018a).

Por meio de sistemas de expressão baseados em *P. chysogenum*, o fungo filamentoso *Penicillium digitatum* expressou o gene de PAFB que apresentou atividade antifúngica eficiente (GARRIGUES et al., 2017a). *Aspergillus niger* codifica a proteína denominada Anafp pertencente a classe B, demonstrando atividade antifúngica eficiente contra alguns fungos filamentosos e outras leveduras (GUN LEE et al., 1999a). O PAFB também já foi relatado *P. chrysogenum* (HUBER et al., 2018a).

Das proteínas elencadas como classe C, foi identificada em *P. brevicompactum* por meio de similaridade a proteína isolada de *P. chysogenum* verificando atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*. (HOLZKNECHT et al., 2020). Uma cepa de *P. chysogenum* oriunda de isolados do Ártico também codifica PAFC (CHEN et al., 2013; CZAJLIK et al., 2021).

A composição do meio de cultivo pode interferir diretamente na produção dos PAFs, pontualmente a produção dos peptídeos pode ser influenciada pela fonte de carbono utilizada, assim como sua respectiva concentração. A presença de sacarose também pode demonstrar uma maior produção e o excesso de nutrientes também pode inibir a expressão dos genes a depender das condições testadas (GANDÍA et al., 2020).

1.3 MECANISMO DE AÇÃO DOS PAFS

O primeiro relato em torno do mecanismo de ação foi de Anafp isolada de *Aspergillus niger*, verificou-se que essa proteína afeta a integridade da membrana fúngica abrindo poros e liberando elementos do citosol para fora da célula. Sua ação antibacteriana foi testada e apresentou-se ineficaz, fungos filamentosos exibiram sensibilidade a ela (GUN LEE et al., 1999).

Possuindo 51 aminoácidos em sua forma madura e contando com 8,5 resíduos de cisteína, uma relação evolutiva de AFP com a Fosfolipase A2 foi deduzida (NAKAYA et al., 1990). A AFP foi investigada quanto ao seu mecanismo de ação, e não foram detectadas alterações morfológicas causadas por ela, testes de fluorescência identificaram que a AFP interage com a membrana plasmática.

A interação *in vitro* com o DNA foi averiguada, no qual a promoção da condensação pôde ser considerada, isso se dá pela capacidade química de se ligar aos resíduos de tirosina (MARTÍNEZ DEL POZO et al., 2002a). Diferentemente da AFP de *Aspergillus giganteus*, PAF de *Penicillium chrysogenum* não teve efeitos sob o DNA (BATTA et al., 2009).

A internalização de PAF ocorre no gênero *Aspergillus* e sua atividade depende de fatores como a conservação de sua estrutura, disponibilidade de receptores específicos e do transporte adequado para as hifas fúngicas (OBERPARLEITER et al., 2003). A atividade de PAF em Zygomycetos e Dermatophytos é comprovada, e a ação conjunta de PAF e outros bioativos como as estatinas e fluconazol que possuem propriedades antifúngicas, foram mais eficazes em sinergismo contra algumas espécies testadas (GALGÓCZY et al., 2005, 2007, 2008). O motivo γ -core se demonstrou importante na ação e é filogeneticamente relacionado com outras PAFs (SONDEREGGER et al., 2018).

Testes foram realizados para verificar integridade da membrana de *Aspergillus nidulans* após a interação do PAF. Altas concentrações de K⁺ em sobrenadantes, formas reativas de oxigênio intracelular e alterações morfológicas foram detectadas. Provocando um efeito muito semelhante a apoptose, observou-se o descolamento da parede celular fúngica, fato que reforça essa confrontação é o surgimento de microvesículas e pode se assemelhar a uma característica importante da célula apoptótica (KAISERER et al., 2003; LEITER et al., 2005).

NFAP de *Neosartorya Fischeri* apresenta 57 aminoácidos em sua sequência e um peso molecular de 6,6kD e estruturalmente se assemelha a PAF com uma identidade de 53,7% (HAJDU et al., 2019; KOVÁCS et al., 2011). O efeito apoptótico de NFAP também foi deduzido durante a produção heteróloga de NFAP em *Asperillus nidulans*. O crescimento germinativo foi avaliado e espécies reativas de oxigênio (ROS) foram observados, a integridade da parede celular foi afetada, quanto a inoculação acima de 105 conídios do transformantes ocorreu a inibição por completo durante o crescimento germinativo de *A. nidulans*. A permeabilização da membrana, ruptura do micélio e a organização da quitina na parede celular foi afetada (GALGÓCZY et al., 2013).

A proteína NFAP produzida em sua cepa natural quando aplicada em *A. niger* seu crescimento foi lento, nas hifas o encurtamento foi constatado além de inchaço e múltiplos ramos foram observados. A proteinase K não foi efetiva na desnaturação, quanto a temperatura e pH, até 30 minutos em 100°C não perdeu sua atividade e o pH mais favorável à sua ação foi no intervalo de 8,4-8,6 (KOVÁCS et al., 2011). A internalização de NFAP no fungo sensível depende da captação de energia do fungo sensível *Neurospora crassa*, além de que a localização no citoplasma indica permeabilização e morte celular (HAJDU et al., 2019).

Outro peptídeo codificado por *N. fischeri* também é resistente a temperatura, apresenta um modo de ação um pouco distintos de NFAP, NFAP2 e é eficaz contra leveduras, mas não apresentou traços de apoptose em *Saccharomyces cerevisiae* e não alterou metabolicamente essa levedura (TÓTH et al., 2016). A proteína bolha (PB) caracterizada de *P. brevicompactum* apresentou atividade antifúngica contra a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, possui quatro pontes dissulfeto o que explica sua resistência a redução e a enzimas, apesar da homologia considerável a outras PAFs e apresenta uma dobra knottin (SEIBOLD et al., 2011).

Devido à falta de sensibilidade ou de interação das PAFs a proteína PgAFP produzida biotecnologicamente em *P. chrysogenum* em alguns fungos testados como o *Penicillium polonicum*, sugere que o uso combinado com quitinases aumentaria a eficácia, pois em análises de géis identificaram Rho

GTPase Rho1 uma proteína que induz maior produção de quitina (DELGADO et al., 2016). A Afpb foi testada em *A. flavus* e as quantidades de Rho GTase Rho1 foram menores além de apresentar redução de seu metabolismo, a parede celular foi prejudicada, espécies reativas de oxigênio e houve aumento na secreção de glutatona bem como aumento da produção de proteínas envolvidas no choque térmico não foram capazes de evitar a necrose (DELGADO et al., 2015).

A proteína de *Penicillium digitatum* não pôde ser detectada em meio de cultura, por isso, sua caracterização ocorreu por meio de processos biotecnológicos (GARRIGUES et al., 2017a). Afpb tem múltiplos alvos em seu mecanismo de ação já relatados em outras PAFs, e possui uma função de regulação do crescimento fúngico (BUGEDA et al., 2020) e em mutantes onde o gene de Afpb é deletado verificou-se que não é um fator determinante para seu crescimento (GARRIGUES; GANDÍA; MARCOS, 2016).

Uma proteína foi detectada em caldo de *Penicillium digitatum* denominada Sca, possui carga negativa é rica em cisteína e além de aumentar o crescimento do patógeno, quando adicionada com AfpB potencializa seu potencial antifúngico (GARRIGUES et al., 2020).

1.4 CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO

Uma discussão em torno das condições de expressão da AFP de *A. giganteus* não foi levantada em primeiro momento, apesar de ter sido isolada e apresentar resíduos de cisteína, possuir carga positiva e ser resistente a enzimas proteolíticas (NAKAYA et al., 1990).

Entretanto, com o isolamento do PAF de *Penicillium chrysogenum*, constatou-se que a regulação da expressão estava atrelada as fontes de carbono e hidrogênio (MARX et al., 1995). Este PAF foi identificado em caldo contendo sacarose e NaNO₃, e em meio contendo glicose e glutamina sua produção em níveis detectáveis não foi alcançada (MARX et al., 1995). Em outra cepa fúngica advinda do ártico a proteína denominada Pc-Artic foi obtida na presença de glicose como fonte de carbono, essa proteína difere-se de PAF na sequência (CHEN et al., 2013).

Outro gene codificante de uma proteína antifúngica denominada PAFB também de *P. chrysogenum*, foi cultivado inicialmente em meio de cultura mínimo e seu mRNA atingiu o pico após 72 h, porém não foi identificado em caldo, posteriormente verificou-se que o excesso de nutrientes em caldo de cultura induzia sua produção (HUBER et al., 2018b; HUBER; LERCHSTER; MARX, 2019).

Neosartorya Fischeri codifica e expressa NFAP, em meio de cultura contendo extrato de carne bovina, peptona, NaCl e etanol, esse padrão diferencia-se dos demais (KOVÁCS et al., 2011). Outra proteína secretada por *N. fischeri* foi produzida em meio mínimo contendo sacarose e NaNO₃ no qual foi caracterizada com sucesso e é anti-levedura (TÓTH et al., 2016).

A grande maioria das PAFs foram isoladas em cultivos líquidos submersos, a BP de *P. brevicompactum* foi identificada no exsudato de meio sólido sendo a composição de seu cultivo diferente de todos os apresentados até então (OLSEN et al., 2004; SEIBOLD et al., 2011).

1.5 PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE PAFS

O fungo *P. chrysogenum* pode ser considerado uma excelente maquinaria para genes heterólogos, graças a sua elevadíssima expressão (MARX et al., 1995). Um cassete de expressão baseado em *P. chrysogenum* foi criado para a produção de proteínas que não foram detectadas em suas cepas selvagens, foi eficaz no dobramento, possibilitando resultados inéditos no que tange a relação estrutura-atividade dos PAFs (SONDEREGGER et al., 2016).

O gene que codifica a proteína antifúngica de *Neosartorya fischeri* foi inserido em *Aspergillus nidulans* para produção de NFAP, em que sua obtenção foi relativamente análoga com a produzida pelo fungo produtor natural. Esse vetor se demonstrou apropriado para a produção em grandes quantidades dessa proteína antifúngica (GALGÓCZY et al., 2013). Na levedura *Pichia pastoris* foi aumentada em seis vezes a quantidade produzida quando comparada a cepa original e foi denominada hNFAP, a atividade e o dobramento correto não foram afetados já que seu efeito antifúngico permaneceu igual (VIRÁGH et al., 2014).

P. pastoris e *P. chrysogenum* foram utilizados para a obtenção de Afpb de *P. digitatum*, pois sua produção não havia sido alcançada, a proteína se enovelou de forma correta demonstrando que não é necessária a produção pelo fungo nativo *P. digitatum* e conferiu resistência a enzimas e a temperatura (GARRIGUES et al., 2017).

1.6 APLICAÇÕES DOS PAFS

O efeito protetor das PAFs frente a patógenos de relevância agrícola já foi aplicado algumas vezes, como é o caso da cevada e trigo (BARNA et al., 2008). Os PAFs produzidos pelo fungo *P. expansum* foram testados na conservação de fruto pós-colheita de maçãs, laranjas e de folhas de tomate, e se demonstraram efetivos na proteção contra infecções (GANDÍA et al., 2020).

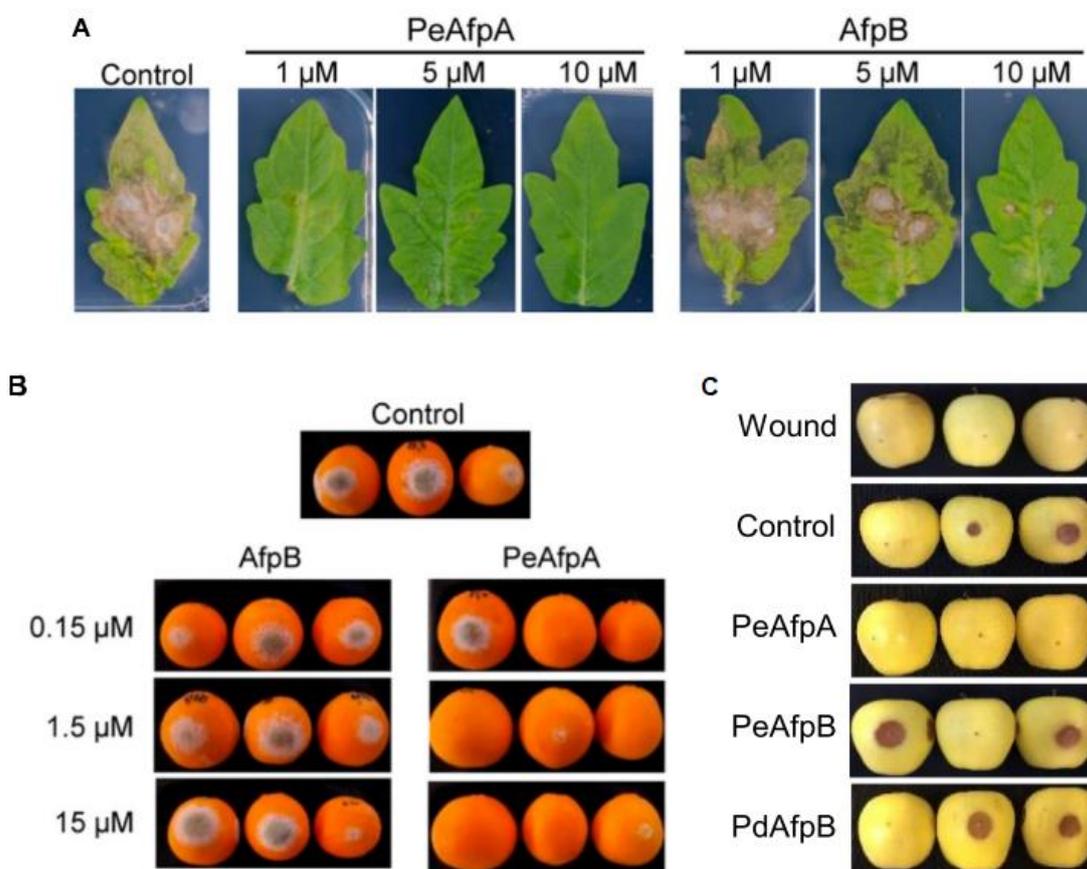


Figura 1: Imagem da proteção dos PAFs de *P. expansum* em folhas de tomate (A) em laranja (B) e em maçãs (C). Fonte: Adaptado de (GANDÍA et al., 2020; GARRIGUES et al., 2018a)

Em modelos animais foi bem tolerado não apresentando quaisquer reações em diversos órgãos examinados ou efeitos colaterais, demonstrando que PAF é um excelente candidato para o desenvolvimento de novos fármacos (PALICZ et al., 2013). *In vivo* a atuação simultânea de PAF com Anfotericina B foi mais efetiva em camundongos (PALICZ et al., 2016).

O presente trabalho justifica-se no que norteia a crescente constante de doenças infecciosas de origem fúngica e a busca por novos medicamentos para contornar a resistência já existente em relação a classe dos antimicóticos. Contribuir para a descoberta de novos peptídeos que no futuro possam se tornar alvos de estudo para a produção de medicamentos. Além disso, nossas conclusões podem servir de base para outros estudos da área.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e avaliar a presença de peptídeos antifúngicos expressos nos fungos *Penicillium citrinum* e *Aspergillus flavus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma mineração de genes hipotéticos nas bases de dados disponíveis para encontrar prováveis Peptídeos ainda não purificados;
- Extrair as proteínas e peptídeos do meio de cultivo para dosagem e separação eletroforética das proteínas produzidas;
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos;
- Dosar as proteínas e realizar a análise eletroforética por Tricina SDS-PAGE e/ou SDS-PAGE para separação de peptídeos;
- Purificar os extratos por meio de colunas cromatográficas e realizar os testes de atividades antimicóticas contendo o peptídeo purificado;
- Extrair o DNA genômico do micélio das culturas puras para identificação molecular e verificação de presença dos genes de peptídeos antifúngicos;
- Desenhar primers específicos para os peptídeos antifúngicos presentes no genoma dos fungos *P. expansum* e *A. flavus*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS

A origem das cepas do *P. expansum*, *P. citrinum*, *A. flavus* e *A. niger* foi respectivamente da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco), Universidade Estadual de Maringá (UEM) e as duas últimas cedidas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

As cepas dos fungos *A. flavus*, *P. expansum*, *P. citrinum* e o *Aspergillus niger* foram reativadas em placas de petri com Ágar batata dextrose (BDA). A manutenção da linhagem fúngica em laboratório foi realizada em tubos de ensaios contendo 5 mL de meio ágar batata dextrose (BDA), incubado em estufa a 28 °C, por 7 dias e em seguida, conservadas em geladeira por um período máximo de 30 dias.

3.2 ANÁLISES *IN SILICO* E DESENHO DOS PRIMERS PAFS

Levando em conta as cepas fúngicas identificadas e catalogadas no Laboratório de bioquímica de microrganismos da UNIOESTE, análises genômicas foram realizadas utilizando a base de dados Ensembl Fungi com o objetivo de identificarmos fungos filamentosos produtores de peptídeos antifúngicos (PAFs) ainda não purificados e caracterizados para o desafio fúngico frente ao *P. expansum* e *P. citrinum*. A mineração de sequências gênicas de PAFs hipotéticos foi realizada utilizando espécies que possuem genoma completo disponível.

Os primers para amplificação dos genes PeAfpA, PeAfpB, PeAfpC de *P. expansum* foram desenhados a partir das regiões exônicas dos PAFs de *P. expansum* e da região exônica do PAF hipotético de *A. flavus*, a fim de obter produtos de PCR a partir do material genômico. Primers descritos na literatura foram sintetizados como padrão para a amplificação dos PAFs de *P. expansum* e os primers controle da reação de amplificação para β -tubulina.

3.3 CEPAS FÚNGICAS: TAXONOMIA MOLECULAR

3.3.1 Extração de DNA

A identificação de todas as cepas fúngicas em nível taxonômico foi feita por técnicas moleculares de sequenciamento de sequências intercalantes (ITS) dos genes ribossomais (WHITE et al., 1990). Os fungos cultivados em dois meios de culturas diferentes ágar batata e meio malte.

Esporos de fungo foi coletada com uma espátula em uma única raspada, os esporos adicionados em um microtubo com solução de Breaking buffer e esferas de vidros foram submetidos a agitação por 30 segundos em vórtex. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 70 °C e agitadas a cada 10 minutos, fenol foi adicionado e agitado por mais 5 minutos, centrifugado e o sobrenadante foi recolhido. Para a precipitação foi utilizado etanol 100%, centrifugado por 5 minutos e lavado com etanol 70%.

Para a estocagem as amostram foram novamente centrifugadas, o microtubo foi vertido em papel adsorvente e o sedimento ressuspendido em 100uL de água e congelado a -20 °C.

3.3.2 Reações de PCR

Os reagentes e condições aplicados ao PCR foram: 2,5 µL de Tampão de amostra, 1 µL de cada primer 10 pmol, 1 µL de dNTPs, 1 µL de DNA 100 ng/µL, 1 µL MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de Taq Polimerase e 17 µL de Água, totalizando 25 µL de amostra para a reação. A programação foi 95 °C durante 2 minutos. Trinta e cinco ciclos de 94 °C por 1 minuto foram repetidos, 58 °C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, por último 72 °C para a extensão final e 4 °C para o Hold. O primer utilizado para as reações foram ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990).

Cerca de 5 µL das amostras foi aplicado em gel de agarose 1%, o tampão TBE (Tris- borato-EDTA) foi usado para a corrida eletroforética a 100V. As bandas ou amplicons de DNA e o padrão foram observadas no equipamento transiluminador UVP DigiDoc Biilmaging Systems®.

3.3.3 Análise de sequência do DNA genômico e identificação

As sequências obtidas dos amplicons foram submetidas à análise por meio da ferramenta BLASTn no *GenBank*, e as sequências resultantes do Blastn com maior identidade foram comparadas e os fungos identificados. As sequências inéditas foram depositadas no *GenBank* e o número de acesso obtido. Análises filogenéticas foram realizadas com o software Mega X para verificar e confirmar as relações taxonômicas dos fungos.

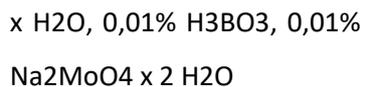
3.3.4 Cultivos

As células fúngicas foram contadas e as soluções de esporos padronizadas em 10^9 esporos/mL utilizando uma câmara de Neubauer. Os cultivos líquidos foram inoculados considerando a velocidade de crescimento dos fungos.

O meio mínimo de crescimento (PcMM) usado anteriormente por (SONDEREGGER et al., 2016) serviu para o cultivo *P. expansum* e *P. citrinum*. Os meios efetivos na indução da expressão das PAFs do gênero *Aspergillus spp* presentes na literatura foram aplicados aos nossos experimentos (GUN LEE et al., 1999c; KOVÁCS et al., 2011; SKOURI-GARGOURI; GARGOURI, 2008; THEIS et al., 2003).

Tabela 1: Composição do meio de cultura utilizado. Fonte: dados da pesquisa.

Identificação	Composição	Referência
PcMM (Meio mínimo de <i>Penicillium chrysogenum</i>)	2% sacarose, 0,3% NaNO ₃ , 0,05% KCl, 0,05% MgSO ₄ x 7H ₂ O, 0,005% FeSO ₄ x 7H ₂ O, 0,1% elementos traços, solução A, 25mM NaCl/Pi (pH 5.8)	SONDEREGGER <i>et al.</i> 2016)
Elementos traços solução A	0,1% FeSO ₄ x 7 H ₂ O, 0,9% ZnSO ₄ x 7H ₂ O, 0,01% MnSO ₄	



3.3.5 Separação do cultivo e obtenção da amostra

Para obter o extrato extracelular após o cultivo dos fungos em meio líquido, os meios de cultivo foram filtrados à vácuo em funil de Buchner com papel filtro Whatman nº 1 e centrifugados a 10.000 rpm por 4 minutos para eliminação de sedimentos. Após o congelamento em freezer -20 °C, 10 mL do filtrado foi concentrado em liofilizador até o atingir 1mL, essa fração da amostra foi utilizada para realizar teste de atividade antifúngica. Os micélios foram conservados em freezer -20 °C de acordo com metodologias específicas do laboratório.

3.3.6 Purificação em coluna cromatográfica

A cromatografia é um dos métodos mais comuns de purificação de proteínas. Consiste na passagem de uma mistura de proteica através de uma coluna (fase estacionária) que tem por objetivo reter ou diminuir a velocidade da passagem da fase móvel onde estão as macromoléculas (proteínas). A coluna cromatográfica escolhida foi a CM-Sephadex G50 conforme protocolos estabelecidos pelo laboratório de Bioquímica de microrganismos da UNIOESTE.

3.3.6 Atividade antifúngica

A atividade biológica em placa tem a finalidade de verificar a atividade antimicrobiana da fração proteica das amostras. O extrato foi filtrado, centrifugado a 10.000g por 4 minutos sob refrigeração a 4 °C, logo após congelado a -20 °C até o uso. O meio de cultura utilizado foi o BDA, o método consiste em utilizar placas de 96 poços de diâmetro onde cerca de 100 µL de cada fração da amostra foi adicionada e 100 µL de meio contendo esporos em uma concentração final de aproximadamente 10⁴ esporos/mL foi acrescentado

aos poços. Os testes foram realizados em triplicata, além do meio estéril sem esporos e água estéril foi utilizado como controle negativo e como controle positivo meio contendo esporos sem amostras. Para os testes a cepa utilizada foi *Aspergillus niger* considerado um microrganismo altamente sensível as PAFs foram usadas.

3.3.7 Eletroforese em gel de Poliacrilamida-SDS-PAGE

A concentração de proteínas das amostras foi mensurada pela metodologia de Bradford (1976). Para confirmação da presença do peptídeo antimicrobiano, as amostras que apresentaram atividade antifúngica foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida Tricina SDS-PAGE com visualização por meio do corante Coomassie Brilliant Blue para confirmação da presença do peptídeo e estimativa da massa molecular do mesmo (SCHÄGGER, 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO TAXONOMICA DOS FUNGOS

O DNA genômico dos fungos *P. citrinum*, *P. expansum* e *A. flavus* foram visualizados em gel de agarose 0,7% após sua extração ideal e suas purezas confirmadas por esse método.

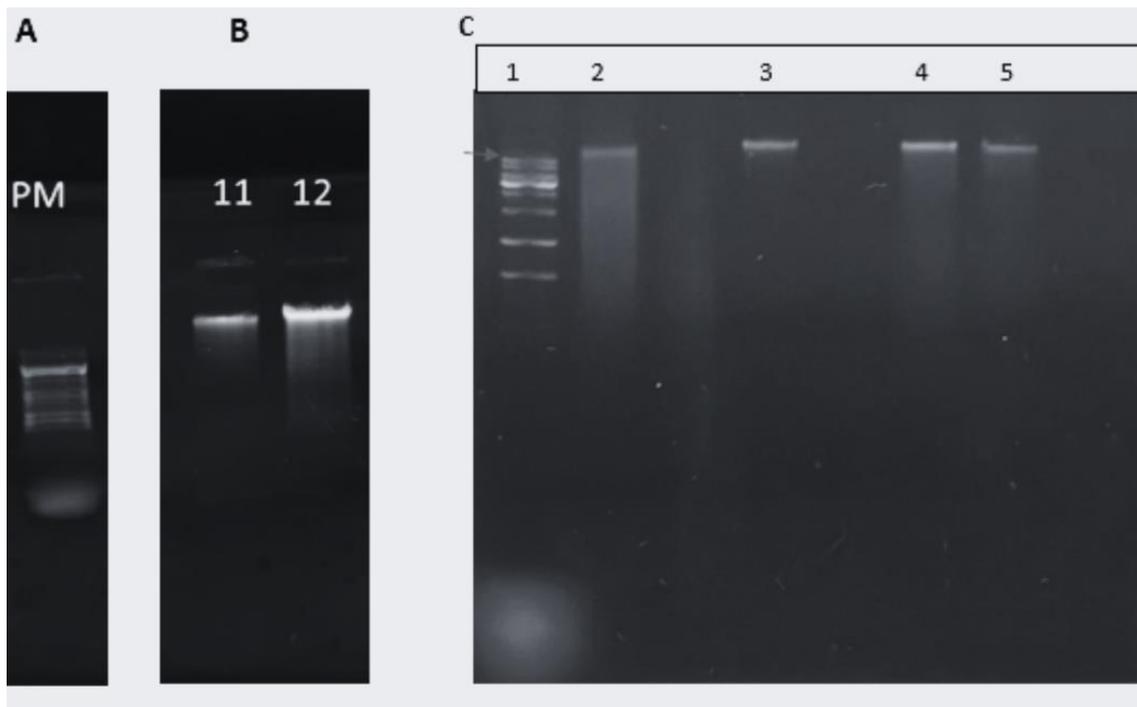


Figura 2: A: PM (Marcador 1 Kb Ludwig); B: 11 = DNA genômico *P. expansum* UFPE; 12= DNA genômico *P. citrinum*; C: 1 = Marcador 1Kb Ludwig; 2 = DNA *A. flavus* degradado; 3 = DNA genômico *A. flavus*; 4 e 5 = DNA genômico *P. citrinum*. Fonte: dados da pesquisa.

Na figura 2 as bandas 11 e 12 (B), 3, 4 e 5 (C) correspondem ao DNA genômico de alto peso molecular e íntegro, já a amostra de *P. citrinum* 2 (C) o DNA está degradado, por isso, foi descartado. A figura 3 mostra o resultado da PCR com os primers ITS1 e ITS4, onde ocorreu a amplificação da região do DNA ribossomal com alta especificidade, sendo visualizado no gel de agarose somente o amplicon da região ITS dos genes ribossomais.



Figura 3: 1 = Padrão Ludwig Ladder 100pb 2= PCR ITS fungo *P. expansum* UFPE 3= PCR ITS fungo *Penicillium citrinum*. Fonte: dados da pesquisa.

Penicillium citrinum (OR041664), e os fungos *Aspergillus flavus* (KJ470626) e *Penicillium expansum* cepa 01 LBQM-Unioeste foram identificados através do sequenciamento dos amplicons. A sequência de *P. citrinum* foi depositada no Genbank e uma análise filogenética realizada com sequências ITS de outras espécies mostrou a similaridade de *P. citrinum* OR041664 com outra cepa da mesma espécie *P. citrinum* KY400584.1 confirmando também sua identidade (figura 4).

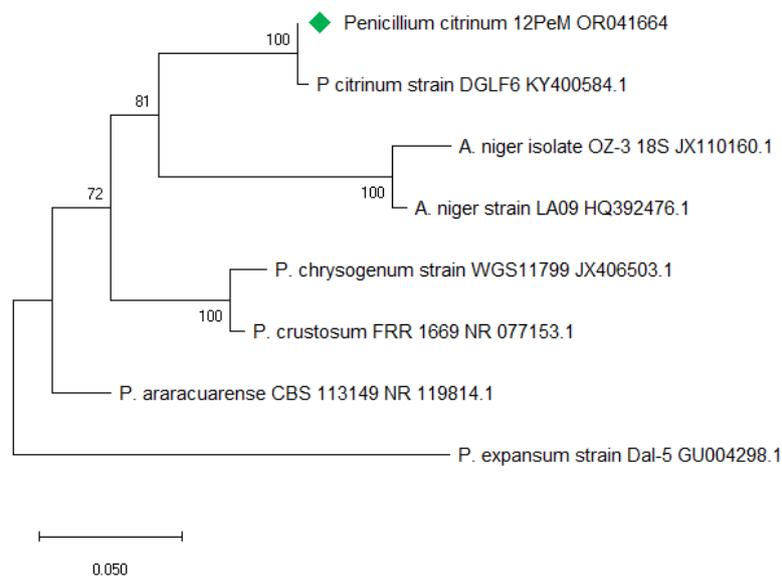


Figura 4: Relações evolutivas dos táxons. A história evolutiva foi derivada usando o método Neighbor-Joining [1]. A árvore ideal com soma do comprimento do galho = 0,44608786 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados em um teste de bootstrap (500 réplicas) são mostrados ao lado dos ramos [2]. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades que as distâncias evolutivas usadas para derivar a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Máxima Verossimilhança Composta [3] e estão em unidades do número de substituições de bases por local. Esta análise incluiu 8 sequências de nucleotídeos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão aos pares). Houve um total de 757 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA X. Fonte: dados da pesquisa.

Na figura 5 a relação taxonômica do *P. expansum* cepa 01 LBQM-UNIOESTE com outras sequências de PAFs já caracterizados *Genbank*.

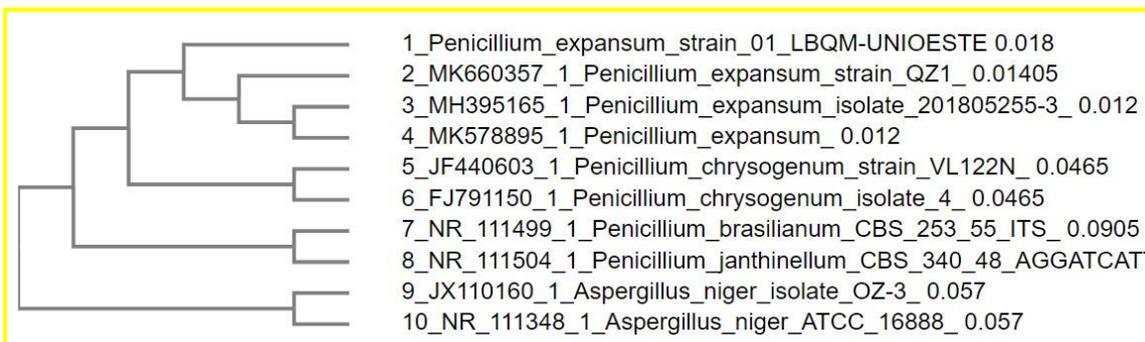


Figura 5: Construção da árvore filogenética das regiões ITS com base em 8 sequencias nucleotídicas obtidas do Genbank comparando espécies do gênero *Penicillium* e 2 sequencias de espécies do gênero *Aspergillus* como grupo externo. Fonte: dados da pesquisa.

4.2 ANÁLISES *IN SILICO* DE PAFS E DESENHO DOS PRIMERS

Ferramentas de bioinformática desempenham um papel crucial na descoberta de novos peptídeos antifúngicos (PAFs), permitindo o uso de bancos de dados e métodos estatísticos para explorar propriedades que conferem atividade antifúngica a PAFs já conhecidos. Como esses peptídeos são produzidos por uma ampla variedade de organismos, a identificação de PAFs eficazes por métodos tradicionais é cara e demorada. Por isso, classificadores computacionais e bancos de dados genômicos se destacam como alternativas promissoras para a identificação de novos peptídeos antifúngicos hipotéticos, acelerando o processo de descoberta e reduzindo os custos associados às abordagens experimentais (SHARMA et al., 2022; RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2023). Dentre os dados genômicos dos fungos analisados no Ensembl fungi, a cepa AF70 de *A. flavus* possui um gene de um PAF hipotético, seu mRNA foi analisado, traduzido (tabela 2).

Tabela 2: Tradução da sequência gênica de PAF hipotético de *A. flavus*. Fonte: dados da pesquisa

mRNA do PAF hipotético de <i>A. flavus</i>	5'ATGCAAATCACCACAGTTGTCCTTTTCCTCTTCGCTGCAATGGGT GCGGTAGCCACCCCATTTGAATCCGAGTCATTGGCCTCGATACC AGAGCTGAGGCCAGTACCCTAATCAAATACCCTGGAAAATGCTCC AAAGCCAAGAACGAATGCAAATTCAAAGGCCAAACCAAAAAGGA CACTTTCGTCAAGTGCCCTTCATTCGCTAACAAGAGGTGCACCAA GGATGGCAATCCGTGCCACTTCGACAGCTACTCCCGCACTGTTGA TTGTAAGTAG3'
Translate tool – expasy site	MQITTVVLF LFAAMGAVATPIESESFGLDTRA EASTLIKYPGKCSKAKNECKFKGQTKKDTFVK CPSFANKRCKDGNPCHFDSYSRTVDCK

A sua estrutura tridimensional foi predita utilizando 20 templates da base de dados e modelado no Swiss-Model (A) e modelada pelo algoritmo QUARK para predição de estrutura e enovelamento de proteína *Ab initio* (B).

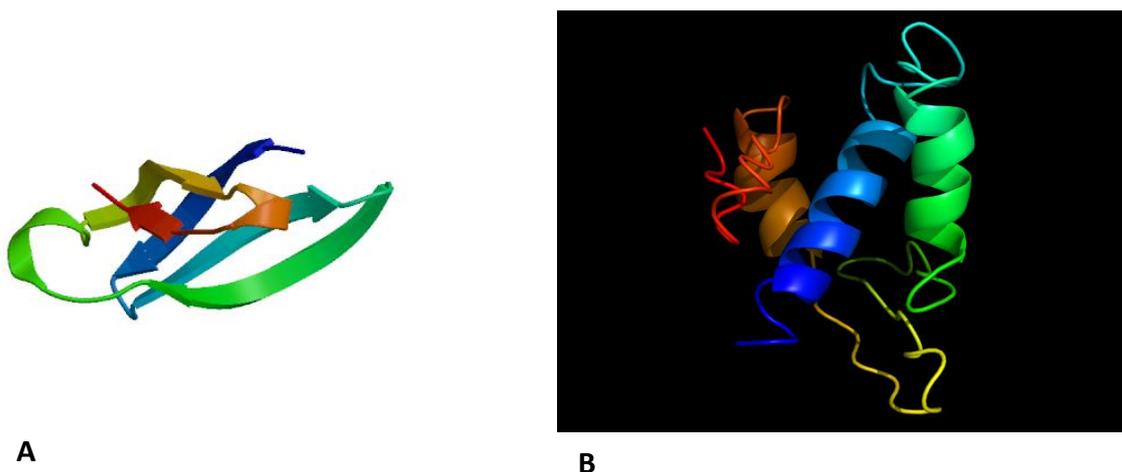


Figura 6: Peptídeo antifúngico hipotético do *Aspergillus flavus* cepa AF70 modelado em Swiss-Model (A) e o modelo *Ab initio* (<https://seq2fun.dcmf.med.umich.edu/QUARK/>) em B Fonte: dados da pesquisa.

A sequência do PAF traduzida a partir do mRNA da cepa AF70 apresenta uma composição de aminoácidos rica em resíduos hidrofóbicos (valina, leucina e fenilalanina), além de aminoácidos carregados positivamente, como lisina (K) e arginina (R). A sequência forma uma hélice anfipática, com um lado hidrofóbico e outro hidrofílico, típico de PAFs com atividade membranolítica. O papel funcional de resíduos de aminoácidos específicos é conhecido, por conta das forças eletrostáticas aminoácidos carregados positivamente se ligam à lipídeos que possuem carga negativa nas membranas dos microrganismos formando

poros (JEAN-FRANÇOIS et al., 2008). Os resíduos de aminoácidos Fenilalanina (F) e Leucina (L) contribuem para a inserção hidrofóbica na bicamada lipídica da célula fúngica devido ao seu caráter hidrofóbico (MYGLANDER et al., 2005).

A árvore filogenética mostrada na figura 7 foi construída usando sequências de aminoácidos de peptídeos antifúngicos depositadas no Genbank (NCBI) para confirmar a relação evolutiva com peptídeos do gênero *Aspergillus*.

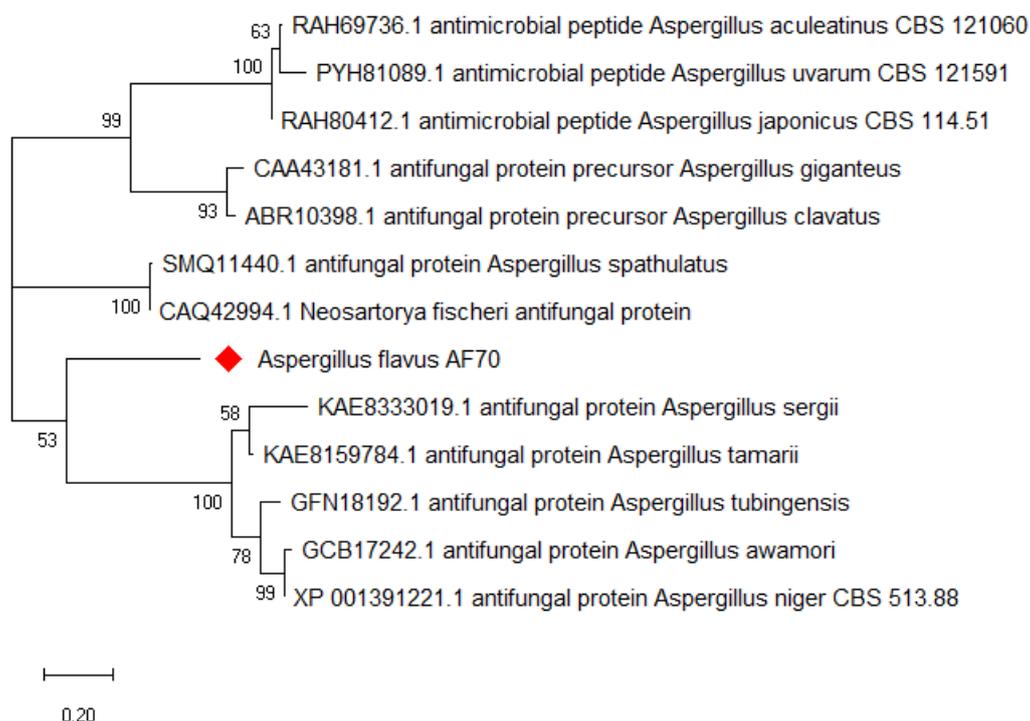


Figura 7: Relações evolutivas dos táxons. A história evolutiva foi derivada usando o método Neighbor-Joining [1]. A árvore ideal com soma do comprimento do galho = 0,44608786 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados em um teste de bootstrap (500 réplicas) são mostrados ao lado dos ramos [2]. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades que as distâncias evolutivas usadas para derivar a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Máxima Verossimilhança Composta [3] e estão em unidades do número de substituições de bases por local. Esta análise incluiu 8 sequências de nucleotídeos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de exclusão aos pares). Houve um total de 757 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA X. Fonte: dados da pesquisa.

Esta análise filogenética nos permite inferir que este peptídeo hipotético de *A. flavus* pertence a classe dos PAFs, e ainda não foi relatado a sua produção e caracterização bioquímica, o que torna este fungo um candidato para o estudo e produção desta biomolécula.

A existência dos genes de PAFs também foi verificada em nossas cepas utilizando primers desenhados com o IDT primer software, e sintetizados pela empresa IDT Technologies. Os primers foram confeccionados utilizando como molde o genoma do fungo *P. expansum* por possuir as 3 classes de PAFs em seu genoma. A princípio os primers foram desenhados para estudar a transcrição dos genes *PeafpA*, *PeafpB* e *PeafpC* em nossas condições experimentais.

Tabela 3: Primers específicos para os genes de PAFs de *P. expansum*. Fonte: dados da pesquisa.

Forward Primer <i>PeafpA</i>	5'- TCA ATG CTA GAC CCG AGA ATG-3'
Reverse Primer <i>PeafpA</i>	5'- TTA CTT GCG GAA GTC ACA GG -3'
Forward Primer <i>PeafpB</i>	5'- CGA GTC GAG GGA TGT TGA TG -3'
Reverse Primer <i>PeafpB</i>	5'- TAA ACC GGT GGT TGG CAG T -3'
Forward Primer <i>PeafpC</i>	5'- TCA ATG CTA GAG CCG AGA ATG -3'
Reverse Primer <i>PeafpC</i>	5'- TTA CTT GCG GAA GTC ACA GG -3'
Forward Primer B-tubulina	5'- AGC GGT GAC AAG TAC GTT CC -3'
Reverse Primer B-tubulina	5'- ACC CTT GGC CCA GTT AC -3'

O desenho dos primers do peptídeo antifúngico hipotético de *A. flavus* seguiu a mesma metodologia, a cepa utilizada como referência AF70 cujo genoma completo está disponível na base de dados Ensembl Fungi (http://fungi.ensembl.org/Aspergillus_flavus_af70_gca_000952835/Info/Index). O gene B-tubulina serviu para o desenho dos primers controle.

Tabela 4: Primers específicos para o gene PAF de *A. flavus*. Fonte: dados da pesquisa.

Forward Primer Afp 70	5 – TCCTTCTCAGATACTCCGATACA – 3'
Reverse Primer Afp 70	5 – CCAGGGTATTTGATTAGGGTACT – 3'

Forward Primer β tub Af	'5 – GCTAACCAGTTTGCAGCCTC – 3'
Reverse Primer β tub Af	'5 – CTGCACAGGATACTGCACCA – 3'

4.5 PCR DOS GENES PAFS NO DNA

Os primers foram usados para verificar a presença dos genes PeAfpA, PeAfpB e PeAfpC no DNA de *P. citrinum*, uma banda fraca pode ser levemente visualizada no poço 5, correspondendo ao gene de PeAfpB. A Amplificação dos genes PeAfpA e PeAfpC ocorreu em um nível muito baixo, a banda presente no poço 3 é indicativo de amplificação do gene do PAF hipotético de *A. flavus*, portanto esses indícios poderiam indicar a presença desses genes em seus genomas (Pista nº1).

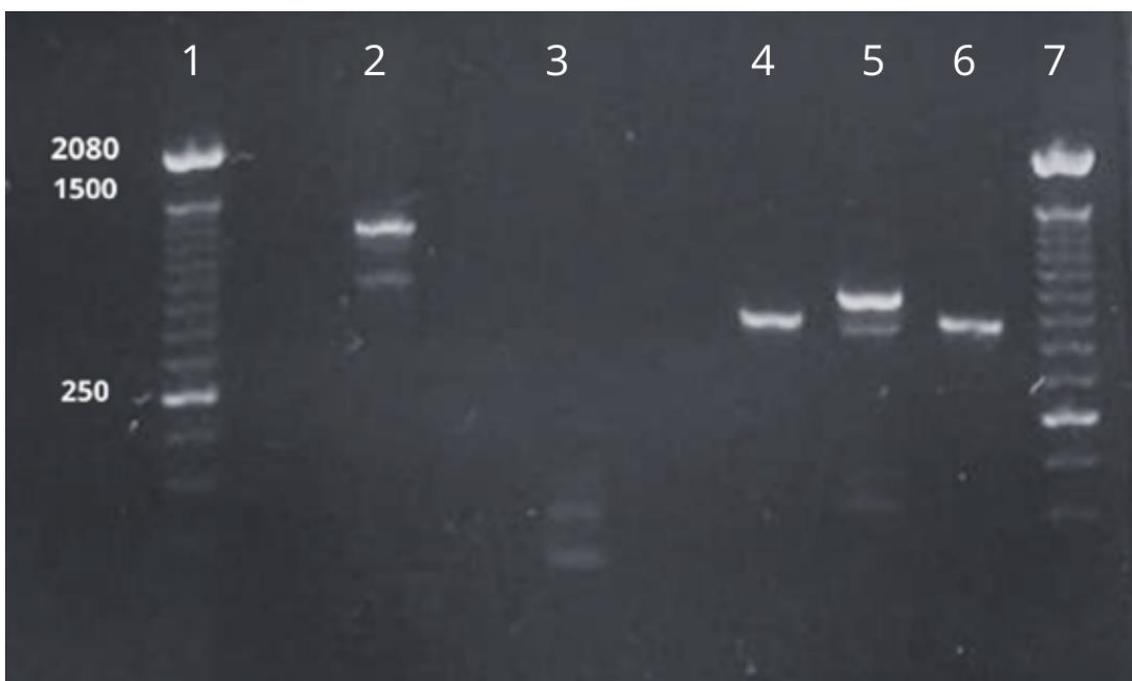


Figura 8: PCR dos genes PeAfpA, PeAfpB, PeAfpC presentes no DNA de *P. expansum* e *P. citrinum* e PAF hipotética de *A. flavus*; Poço 1 e 7 = Padrão Ludwig Ladder 100pb 5uL; Poço 2 = Amplificação do gene *A. flavus*; Poço 3 = Amplificação do gene hipotético de *A. flavus* Poço 4: Amplificação do gene PeAfpA em *P. citrinum*; Poço 5 = Amplificação do gene PeAfpB em *P. citrinum*; Poço 6 = Amplificação do gene PeAfpC em *P. citrinum*

No entanto ocorreram amplificações inespecíficas que foram eliminadas utilizando o PureLink® Quick Gel Extraction Kit, as bandas amplificadas do

genoma de *P. citrinum* foram extraídas do gel com um extrator estéril, de acordo com os protocolos do fabricante e posteriormente foram reamplificadas, confirmadas em gel e enviados para sequenciamento.

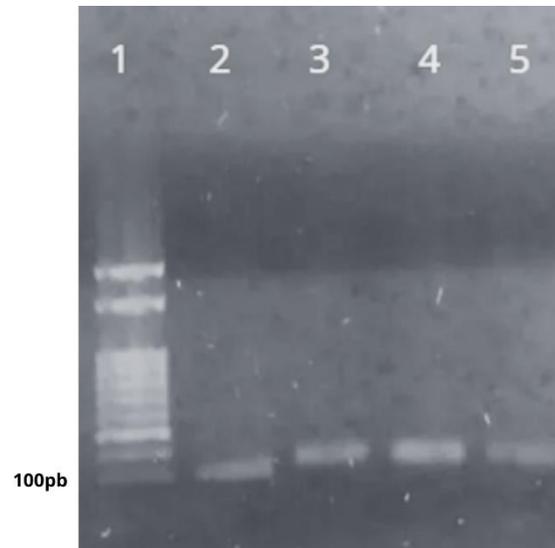


Figura 9: PCR reamplificação dos genes PeAfpA, PeAfpB, PeAfpC presentes no DNA de *P. citrinum* e PAF hipotética de *A. flavus*; Poço 1 = Padrão Ludwig Ladder 100pb 5uL Poço 2 = Amplificação do gene PAF hipotético de *A. flavus*; Poço 3 = Amplificação do gene PeAfpA em *P. citrinum* Poço 4 = Amplificação do gene PeAfpB em *P. citrinum* Poço 5 = Amplificação do gene PeAfpC em *P. citrinum*.

O *P. citrinum* possui relato de apenas um gene e uma proteína antifúngica caracterizada na literatura, essa proteína se diferencia de todas as PAFs descritas até o momento, análises de sequências não demonstraram semelhanças a outras proteínas existentes, a sequência N-terminal também não tem semelhança com qualquer proteína ou peptídeo codificados (WEN; GUO; CHEN, 2014).

O fato de ocorrer amplificações no genoma de *P. citrinum* com a utilização primers desenhados para os genes presentes em *P. expansum* poderia representar a descoberta de três novos peptídeos homólogos para o gênero *Penicillium*, visto que já é consolidado na literatura o uso dos mesmos primers para diferentes espécies para genes homólogos como ocorre no caso *Penicillium nalgiovense* que codifica um homólogo ao gene *faf* de *P. chrysogenum* cujo primers foram gerados com base na sequência deste peptídeo antifúngico

(GEISEN, 2000). No entanto as sequências gênicas obtidas não revelaram homologia com outros genes de PAFs descritos até o momento.

5.1 PURIFICAÇÃO EM COLUNA CROMATOGRÁFICA

Após a centrifugação dos extratos do cultivo líquido com corte de peso molecular de 3 kDa para a concentração dos peptídeos produzidos em cultivo líquido de *P. citrinum* e *A. flavus*. O extrato com elementos maiores que 3 kDa foi purificado por cromatografia de exclusão molecular Sephadex® G50. Amostras de 3-5ml aproximadamente foram colhidas e a leitura feita a 280nm o tampão utilizado foi fosfato 20mM pH6.6.

Considerando a faixa de fracionamento da coluna Sephadex G50 de 3.000Da a 30.000 o pico inicial presente nos dois perfis de purificação se remete a moléculas maiores que 30kDa de acordo com seu manual. O Perfil cromatográfico realizado com a Sephadex® G50 por exclusão molecular evidenciou a separação das moléculas com base no tamanho molecular. Um perfil típico de eluição pode ser observado nas amostras de *Aspergillus flavus* (Figura 10) e *Penicillium citrinum* (Figura 11) em cromatografias de exclusão molecular, onde as maiores moléculas são eluídas primeiro, seguido pelas moléculas menores que penetram os poros do gel.

Para o perfil de eluição de *A. flavus* a curva apresenta um pico principal significativo indicando a presença de uma fração majoritárias de macromoléculas possivelmente correspondendo as moléculas que não são alvo de nossa cromatografia, a queda rápida na absorbância após o pico indica uma separação eficiente das moléculas menores de interesse desse estudo, as frações 46 e 76 da amostra apresenta um pequeno pico.

No caso de *P. citrinum*, a eluição apresenta um pico mais definido e simétrico, indicando maior homogeneidade na fração principal. O volume de eluição dessa amostra também é concentrado em torno de 10-20 mL, consistente com o perfil observado para *A. flavus*. A partir da fração 20 a absorbância caiu drasticamente indicando que as moléculas menores que 30kDa começaram a ser colhidas, no entanto, a quantidade de amostras foi insuficiente uma vez que os PAFs possuem cerca de 10kDa.

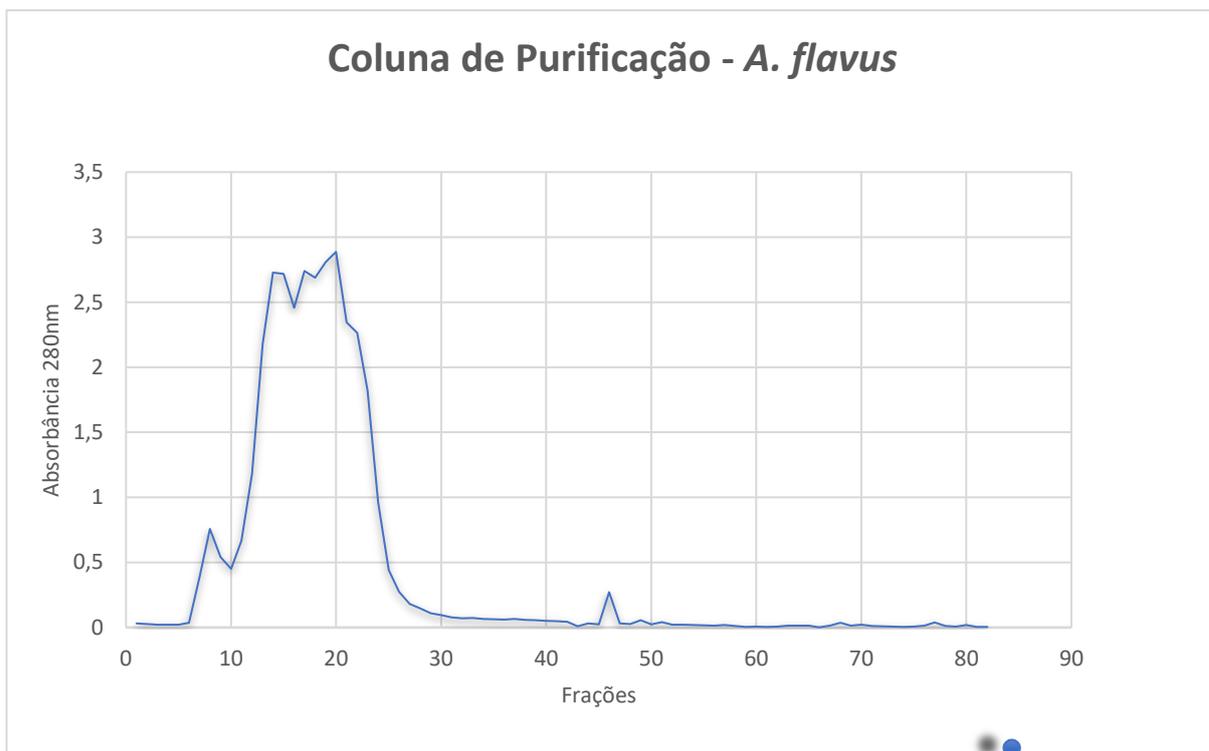


Figura 10: Perfil de purificação cromatográfica de *A. flavus* submetida em coluna de exclusão molecular Sephadex®G50.

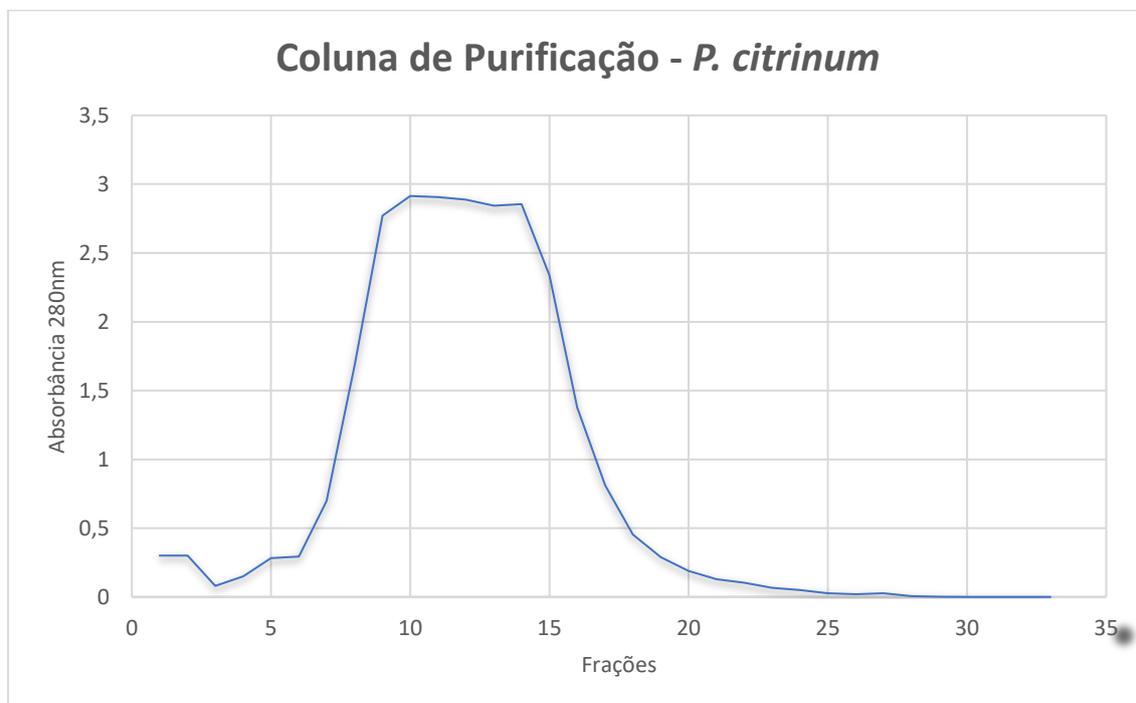


Figura 11: Perfil de purificação cromatográfica de *P. citrinum* submetida em coluna de exclusão molecular Sephadex®G50.

4.4 TESTES DE ATIVIDADE DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As amostras foram submetidas a testes de atividade biológica em placas de 96 poços. Após o cultivo durante 48 horas a 28 °C foram registradas fotos de 24 horas e 48 horas. Antes da realização do teste, sistemas de ultrafiltração de 5,000kDa foram utilizados para eliminar possíveis interferentes das amostras, pois alguns íons e sais podem inibir a atividade antifúngica das proteínas, conforme demonstrado NaCl e KCl quando adicionados concomitantemente a PAF, conferiram inatividade a ela, considerando a eletronegatividade da membrana sugeriu-se que a interação entre esses componentes contribua para a inibição de sua atividade antifúngica (Theis et al., 2003). O íon Ca^{2+} quando em abundância inibe a ação de PAF (BINDER et al., 2010).

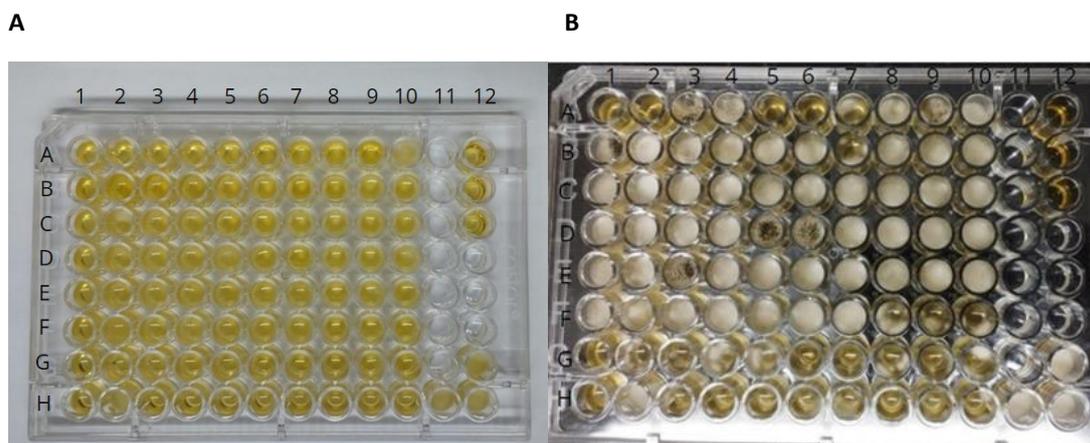


Figura 12: Teste de atividade em placa de 96 poços para frações purificadas de *Aspergillus flavus* (**A**- Pós imediato e **B**-após 48h). Amostras 1–10: A1–A10; Amostras 11–20: B1–B10; Amostras 21–30: C1–C10; Amostras 31–40: D1–D10; Amostras 41–50: E1–E10; Amostras 51–60: F1–F10; Amostras 61–70: G1–G10; Amostras 71–80: H1–H10. Controles positivos: G12, H10, H11; Controles negativos: A12, B12, C12. Fonte: dados da pesquisa.

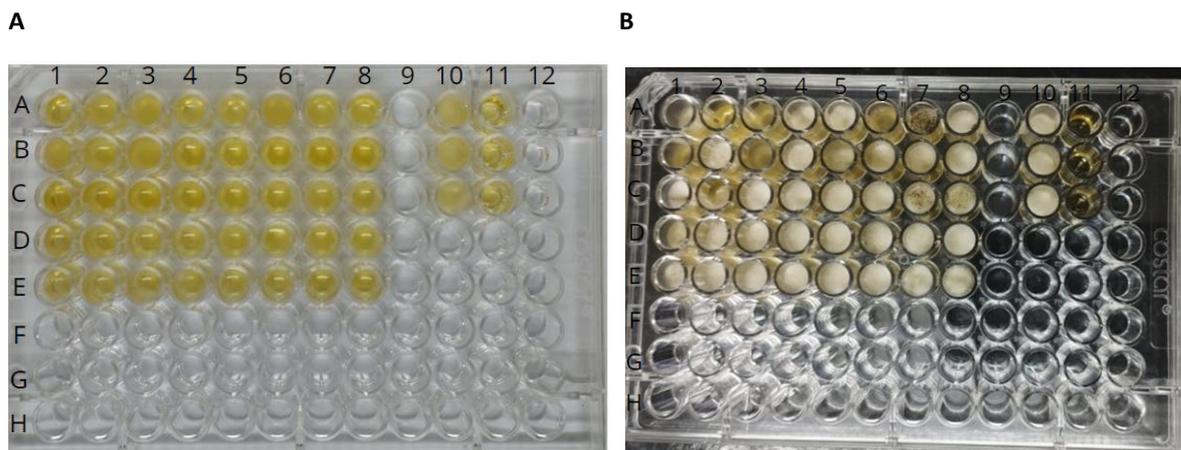


Figura 13: Teste de atividade em placa de 96 poços para frações purificadas de *P. citrinum* (**A**- Pós imediato e **B**-após 48h). (Amostras 1–8: A1–A8; Amostras 9–16: B1–B8; Amostras 17–24: C1–C8; Amostras 25–32: D1–D8; Amostras 33–40: E1–E8. Controles positivos: A10, B10, C10; Controles negativos: A11, B11, C11. Fonte: dados da pesquisa.

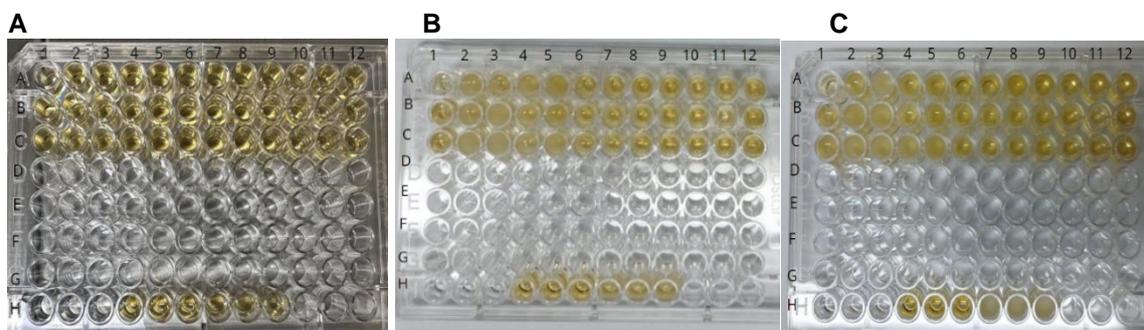


Figura 14: Teste de atividade em placa de 96 poços amostras de frações purificadas. (**A**- Pós imediato e **B**-após 48h **C**-após 72h). Amostra (C-) controle negativo = H4, H5 e H6; Amostra (C+) controle positivo = H7, H8 e H9; Amostra (P.C) A2 de *P. citrinum* = A1, B1 e C1; Amostra A1 de *A. flavus* = A2, B2 e C2; Amostra A2 de *A. flavus* = A3, B3 e C3; Amostra A5 de *A. flavus* = A4, B4 e C4; Amostra A6 de *A. flavus* = A5, B5 e C5; Amostra G1 de *A. flavus* = A6, B6 e C6; Amostra G6 de *A. flavus* = A7, B7 e C7; Amostra G7 de *A. flavus* = A8, B9 e C9; Amostra H1 de *A. flavus* = A9, B9 e C9; Amostra H4 de *A. flavus* = A10, B10 e C10; Amostra H5 de *A. flavus* = A11, B11 e C11; Amostra H8 de *A. flavus* = A12, B12 e C12.

A triagem e a visualização da inibição do crescimento fúngico deve ser descrita visualmente, conforme descritos nos manuais disponíveis (ARENDRUP et al., 2017). Após a realização da triagem observamos que dentre as amostras testadas de *P. citrinum* somente a amostra de número dois (A2) impediu o crescimento do fungo *A. niger*, já as amostras de *A. flavus* foram A1, A2, A5, A6, G1, G6, G7, H1, H4, H5, H8. Essas amostras foram submetidas a um novo teste

de atividade em triplicata e a leitura realizada a 600nm, como mostrado as absorvâncias na figura 15.

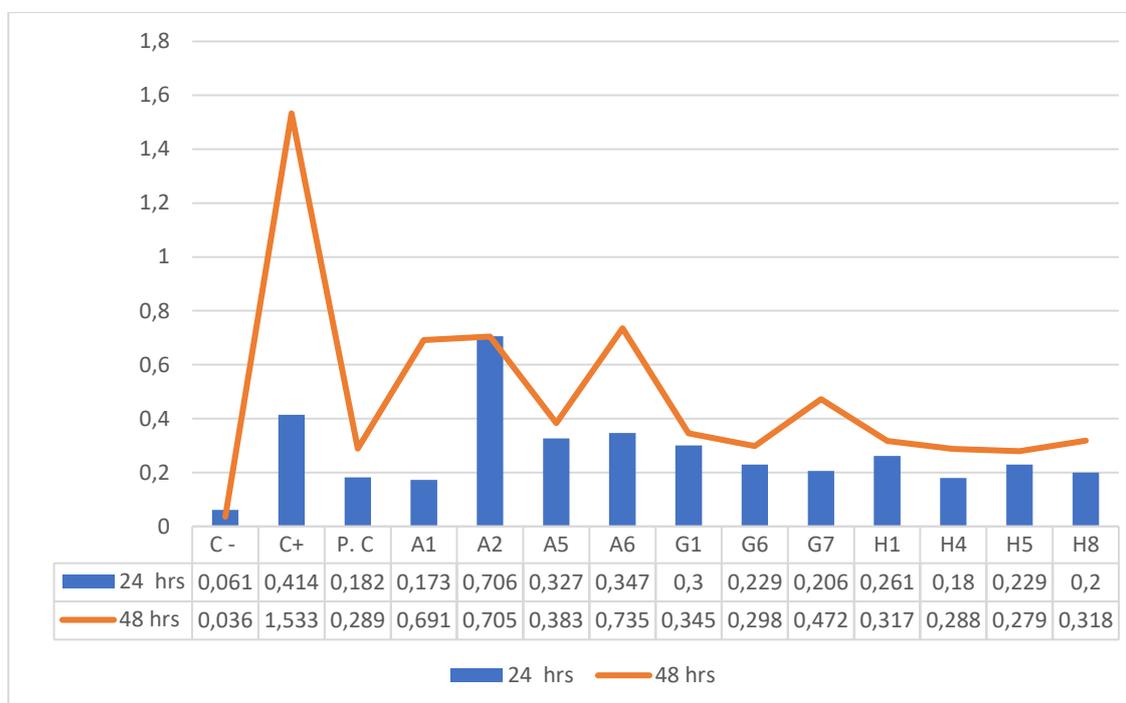


Figura 15: Tabela das leituras realizadas no teste de atividade entre 24 e 48 horas. Amostra (C-) controle negativo; Amostra (C+) controle positivo; Amostra (P.C) A2 de *P. citrinum*; Amostra A1 de *A. flavus*; Amostra A2 de *A. flavus*; Amostra A5 de *A. flavus*; Amostra A6 de *A. flavus*; Amostra G1 de *A. flavus*; Amostra G6 de *A. flavus*; Amostra G7 de *A. flavus*; Amostra H1 de *A. flavus*; Amostra H4 de *A. flavus*; Amostra H5 de *A. flavus*; Amostra H8 de *A. flavus*.

Pode-se inferir que todos os extratos testados retardaram o crescimento fúngico nas primeiras 24 horas de teste, destoando das demais amostras A2 de *P. citrinum* apresentou crescimento maior que o próprio controle positivo, no entanto, após 48 horas manteve-se estático, sem apresentar crescimento indicando que seu pico foi atingido em 24 horas de teste.

As demais amostras continuaram a apresentar crescimento, levando em conta as absorvâncias apresentadas pelo controle positivo 0,414 (24h) e 1,533 (48h). O controle negativo contendo meio estéril manteve-se estático sem nenhum tipo de crescimento microbiológico indicando que o teste não sofreu interferências de contaminantes.

Alguns peptídeos antifúngicos não foram identificados em caldo, como é o caso de cepa PAFB e PAFC de *P. expansum* cuja produção só foi alcançada por meio de vetores de expressão (GARRIGUES et al., 2018). A produção dos

PAFs depende da cepa, análises de sequências reguladoras não revelaram as diferenças no nível de expressão (GANDÍA et al., 2020).

Considerando a composição, concentração e outros parâmetros apresentados em relação as condições de cultivo, não foram encontrados relatos de extratos ou proteínas purificadas e identificadas produzidas por *P. citrinum* com propriedades inibitórias contra qualquer microrganismo nos mesmos parâmetros usados neste trabalho. Levando em conta que as fontes de nutrientes são de suma importância para a regulação da expressão dos genes das PAFs (GUN LEE et al., 1999c). É possível que essas mudanças para promover o crescimento do fungo *P. citrinum* tenha corroborado para os resultados de nossos testes de atividade antifúngica.

O peptídeo purificado PcAFP de *Penicillium citrinum* W1 isolado do oeste do oceano Índico foi cultivado inicialmente em meio YTM (extrato de levedura 0,5%, triptona 0,3%, manitol 2,5%, glicose 1%) em 1L por apenas um dia a 28°C. Após esse período foi transferido para 4,5L de YTM sob agitação 200rpm por três dias (WEN; GUO; CHEN, 2014). Usando o mesmo meio, a cepa *P. citrinum* S1 isolada do solo de uma plantação de manga foi incubado a 28°C por 7 dias com agitação a 180 rpm, seu extrato antagonizou o fitopatógeno *colletrotrichum gloeosporioides* MC9 (SANDY; CHEN; SULISTYOWATI, 2022).

A frutose como fonte de carbono adicionada ao meio Vogel, se demonstrou mais eficiente no aumento da atividade antifúngica dos extratos de *P. citrinum* W1 em outro estudo, atingindo seu pico de atividade no 8º dia e ao 12º dia suas propriedades antifúngicas entraram em declínio (WU et al., 2016).

Em testes de crescimento realizados em meios sólidos para avaliar a expressão de peptídeos antifúngicos em *Aspergillus giganteus* houve alta interferência da composição do meio. Dentre os microrganismos desafiados estavam *Fusarium oxysporum* e *A. niger*, o primeiro modulou a transcrição do gene *afp* e o segundo suprimiu (MEYER; STAHL, 2003).

Um fato inédito em nosso trabalho a partir dos extratos *P. citrinum*, é a sensibilidade apresentada por *A. niger* uma vez que esse microrganismo nunca havia apresentado sensibilidade aos extratos produzidos por *P. citrinum*, em outro trabalho com a purificação de PcPAF de *P. citrinum* W1 os microrganismos que apresentaram sensibilidade a ele foram *Trichoderma viride*, *Fusarium*

oxysporum, *Paecilomyces variotii* e *Alternaria longipes*. (WEN; GUO; CHEN, 2014). *A. niger* é tido como um fungo altamente sensível aos peptídeos antifúngicos como relatado em trabalhos anteriores. (ACOSTA et al., 2009; BUGEDA et al., 2020; FLORENTINE; MARX et al., 1995; GARRIGUES et al., 2017b; HAJJI et al., 2010; HEREDERO et al., 2018; KAISERER et al., 2003b; RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010; SKOURI-GARGOURI; GARGOURI, 2008).

A sequência N-terminal de PcPAF não apresenta homologia com nenhuma das proteínas caracterizadas anteriormente a ele pelo gênero *Penicillium spp* (WEN; GUO; CHEN, 2014).

4.6 SDS-PAGE

Para verificar indícios da presença do peptídeo antimicrobiano, as amostras foram liofilizadas e concentradas aproximadamente dez vezes e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida Tricina SDS-PAGE na concentração de 16% com visualização por meio do corante Coomassie Brilliant Blue para confirmação da presença do peptídeo e estimativa da massa molecular do mesmo (SCHÄGGER, 2006).

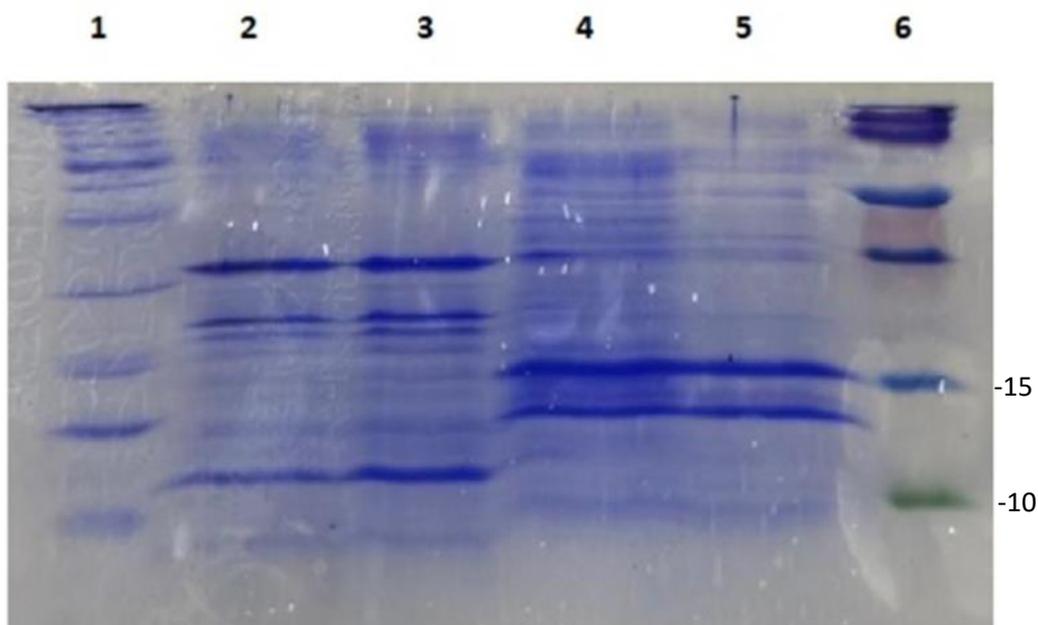


Figura 16: Tricina SDS-PAGE 16%. Poço 1 = Padrão Amersham LOW SDS-PAGE; Poço 2 = *P. citrinum* 7 dias; Poço 3 = *P. citrinum* 10 dias; Poço 4 = *A. flavus* 7 dias; Poço 5 = Co-cultivo *A. flavus* + *P. citrinum* 10 dias; Poço 6 = Thermo Scientific Page Ruler 10-250 kDa. Fonte: dados da pesquisa.

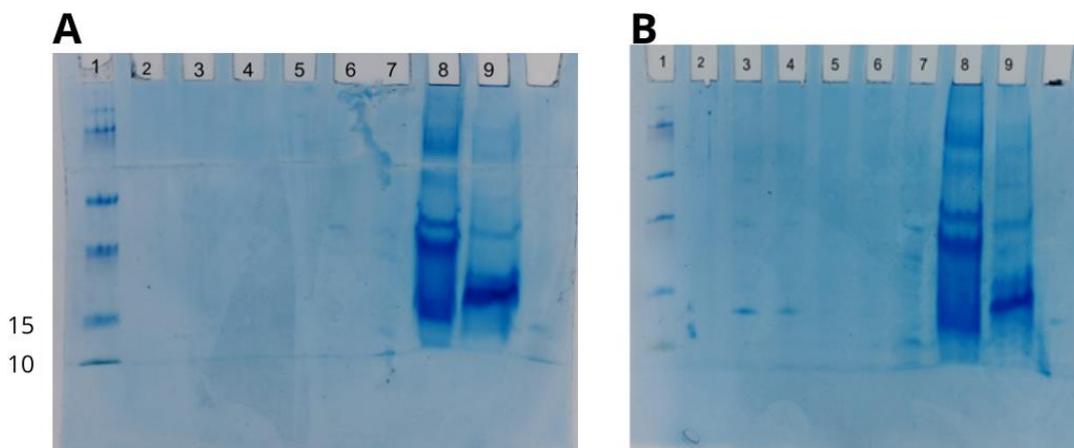


Figura 17: A: 1 = Padrão Thermo Scientific Page Ruler 10-250 kDa; 2 = Amostra A2 de *P. citrinum*; 3 = Amostra A1 de *A. flavus*; 4 = Amostra A2 de *A. flavus*; 5 = Amostra A5 de *A. flavus*; Amostra A6 de *A. flavus*; Amostra G1 *A. flavus*; ; 8 = Extrato bruto *P. citrinum* concentrado 10x; 9 = Extrato bruto *A. flavus* concentrado 10x **B:** 1 = Padrão; 2 = Amostra G6 *A. flavus*; 3 = Amostra G7 *A. flavus*; 4 = Amostra H1 *A. flavus*; 5 = Amostra H4 de *A. flavus*; 6 = Amostra H5 *A. flavus*; 7 = Amostra H8 de *A. flavus*; 8 = Extrato bruto *P. citrinum* concentrado 10x; 9 = Extrato bruto *A. flavus* concentrado 10x. Fonte: dados da pesquisa.

A massa molecular do PcPAF é de aproximadamente 10kDa (WU et al., 2015), no gel bandas muito fracas um pouco abaixo de 10 kDa foram visualizadas nas amostras de *P. citrinum* e *A. flavus*. Bandas peptídicas mais fortes estão um pouco acima de 10 kDa nas amostras de *P. citrinum*, e com aproximadamente 13 kDa em amostras de *A. flavus*.

Os dados apresentados juntamente com a atividade apresentada pelos extratos podem sugerir que *P. citrinum* esteja expressando outras moléculas antifúngicas que ainda precisam ser confirmadas em estudos futuros.

CONCLUSÃO

Buscamos neste estudo realizar a identificação molecular de fungos e análises *in silico* de peptídeos antifúngicos hipotéticos, purificação e teste de atividade a partir das frações obtidas da purificação de *Penicillium citrinum* e *Aspergillus flavus*. O sucesso na extração do material genético dos fungos juntamente com as análises filogenéticas inferidas nos permitiu confirmar as identidades das cepas estudadas, corroborando com a importância do uso das

ferramentas de bioinformática e moleculares para a identificação correta dos microrganismos.

As análises *in silico* na cepa AF70 de *Aspergillus flavus* revelaram a presença de um peptídeo antifúngico hipotético, no qual essas sequências foram utilizadas para a confecção dos primers. Esses primers juntamente com os desenhados com base no genoma de *Penicillium expansum* para aplicação em *Penicillium citrinum*, amplificaram bandas no qual seus produtos se aproximavam do tamanho estimado pelas ferramentas de bioinformática utilizados nesta trabalho, o que nos levou a crer que de fato poderíamos estar prestes a caracterização e descoberta de novos peptídeos antifúngicos.

A purificação dos extratos de *A. flavus* e *P. citrinum* por cromatografia de exclusão molecular juntamente com os testes de atividade antifúngica, mostrou que as frações possuem atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*. Esses dados são relevantes, pois indicam o potencial das cepas estudadas para a produção de biomoléculas potencialmente relevantes para futuras aplicações biotecnológicas e na agricultura.

No entanto, as ampliações inespecíficas e a falta de homologia nas sequências obtidas de *P. citrinum* com os genes do gênero *Penicillium* sugerem que mais estudos devem ser realizados para compreender melhor a diversidade e a funcionalidade dos PAFs entre diferentes espécies. A investigação de possíveis peptídeos homólogos no genoma de *P. citrinum* abre caminho para pesquisas futuras, visando a caracterização e o estudo dos mecanismos de ação dos trás desses compostos.

Em resumo, este trabalho contribui para o conhecimento sobre a diversidade genética e as potenciais aplicações de *A. flavus* e *P. citrinum*, reforçando a importância de estudos integrados que combinam técnicas moleculares, bioinformática e biotecnologia. Os dados aqui apresentados poderão servir como base para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, com impacto na saúde humana e animal além da proteção de culturas agrícolas.

7. REFERÊNCIAS

AKKAM, Y. A review of antifungal peptides: Basis to new era of antifungal drugs. **Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.9, n.1, 2016. Disponível < <https://platform.almanhal.com/Files/2/92183> > acesso em Mai. 15, 2022.

ACOSTA, R. et al. Selection of antifungal protein-producing molds from dry-cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 39–46, 30 set. 2009.

ARENDRUP, M. C. et al. **Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para fungos filamentosos formadores de conídios**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.EUCAST.org>>.

BARNA, B. et al. Effect of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) on barley powdery mildew and wheat leaf rust pathogens. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 516–520, dez. 2008.

BATTA, G. et al. Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF - A highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. **FEBS Journal**, v. 276, n. 10, p. 2875–2890, maio 2009.

BINDER, U. et al. The antifungal activity of the *penicillium chrysogenum* protein PAF disrupts calcium homeostasis in *neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 9, p. 1374–1382, set. 2010.

BORUTA, T. et al. Confrontation between *Penicillium rubens* and *Aspergillus terreus*: Investigating the production of fungal secondary metabolites in submerged co-cultures. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 130, n. 5, p. 503–513, 2020a.

BORUTA, T. et al. Confrontation between *Penicillium rubens* and *Aspergillus terreus*: Investigating the production of fungal secondary metabolites in submerged co-cultures. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 130, n. 5, p. 503–513, 1 nov. 2020b.

BUGEDA, A. et al. The Antifungal Protein AfpB Induces Regulated Cell Death in Its Parental Fungus *Penicillium digitatum*. **mSphere**, v. 5, n. 4, 26 ago. 2020.

CHEN, Z. et al. Purification and characterization of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium chrysogenum* from an Arctic sediment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 24, p. 10381–10390, 2013.

DELGADO, J. et al. Impact of the antifungal protein PgAFP from *Penicillium chrysogenum* on the protein profile in *Aspergillus flavus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 20, p. 8701–8715, 22 out. 2015.

DELGADO, J. et al. Increased chitin biosynthesis contributes to the resistance of *Penicillium polonicum* against the antifungal protein PgAFP. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 371–383, 1 jan. 2016.

FERREIRA, M. V. C.; PAES, V. R.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos. **Revista de Medicina**, v. 87, n. 4, p. 272, 2008.

FLORENTINE; MARX et al. Cloning , structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* pafgene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. **GENE**, v. 167, p. 167–171, 1995.

GALGÓCZY, L. et al. Sensitivity of different Zygomycetes to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF). **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 136–141, 2005.

GALGÓCZY, L. et al. Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive Zygomycetes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, n. 1, p. 109–115, maio 2007.

GALGÓCZY, L. et al. In vitro activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 463–470, 2008.

GALGÓCZY, L. et al. Investigation of the antimicrobial effect of neosartorya fischeri antifungal protein (NFAP) after heterologous expression in *aspergillus nidulans*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. 2, p. 411–419, fev. 2013.

GANDÍA, M. et al. Novel insights in the production , activity and protective effect of *Penicillium expansum* antifungal proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3922–3931, 2020.

GANDÍA, M. et al. Development of a FungalBraid *Penicillium expansum*-based expression system for the production of antifungal proteins in fungal biofactories. **Microbial Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 630–647, 2022.

GARRIGUES, S. et al. Efficient production and characterization of the novel and highly active antifungal protein AfpB from *Penicillium digitatum*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017a.

GARRIGUES, S. et al. Efficient production and characterization of the novel and highly active antifungal protein AfpB from *Penicillium digitatum*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017b.

GARRIGUES, S. et al. Three antifungal proteins from *penicillium expansum*: Different patterns of production and antifungal activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 1–15, 2018a.

GARRIGUES, S. et al. Three antifungal proteins from *penicillium expansum*: Different patterns of production and antifungal activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, 5 out. 2018b.

GARRIGUES, S. et al. A novel secreted cysteine-rich anionic (SCA) protein from the citrus postharvest pathogen *penicillium digitatum* enhances virulence and modulates the activity of the antifungal protein b (AFPB). **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–17, 1 out. 2020.

GARRIGUES, S.; GANDÍA, M.; MARCOS, J. F. Occurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2243–2256, 2016.

GEISEN, R. P. *nalgiovense* carries a gene which is homologous to the *paf* gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 95–101, 2000.

GUN LEE, D. et al. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, n. 3, p. 646–651, 1999a.

GUN LEE, D. et al. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, n. 3, p. 646–651, 1999b.

GUN LEE, D. et al. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, n. 3, p. 646–651, 1999c.

HAJDU, D. et al. Solution structure and novel insights into phylogeny and mode of action of the *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungal protein (NFAP). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 511–522, 15 maio 2019.

HAJJI, M. et al. A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: Biochemical and molecular characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 805–813, 2010.

HEREDERO, M. et al. Rational design and biotechnological production of novel afpb-paf26 chimeric antifungal proteins. **Microorganisms**, v. 6, n. 4, 1 dez. 2018.

HOLZKNECHT, J. et al. The penicillium chrysogenum Q176 antimicrobial protein pafc effectively inhibits the growth of the opportunistic human pathogen *Candida albicans*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 1–21, 2020.

HUBER, A. et al. New antimicrobial potential and structural properties of PAFB: A Cationic, cysteine-rich protein from penicillium chrysogenum Q176. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018a.

HUBER, A. et al. New antimicrobial potential and structural properties of PAFB: A Cationic, cysteine-rich protein from penicillium chrysogenum Q176. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018b.

HUBER, A.; LERCHSTER, H.; MARX, F. Nutrient excess triggers the expression of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAFB. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, 1 dez. 2019.

JEAN-FRANÇOIS, Frantz; ELEZGARAY, Juan; BERSON, Pascal; VACHER, Pierre; DUFOURC, Erick J. Pore Formation Induced by an Antimicrobial Peptide: Electrostatic Effects. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 12, p. 5748-5756, 2008. DOI: 10.1529/biophysj.108.136655.

KAISERER, L. et al. Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. **Archives of Microbiology**, v. 180, n. 3, p. 204–210, 1 set. 2003a.

KAISERER, L. et al. Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. **Archives of Microbiology**, v. 180, n. 3, p. 204–210, 1 set. 2003b.

KARUPPIAH, V. et al. Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 Causes Differential Gene Expression and Improvement in the Wheat Growth and Biocontrol Activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 1–16, 2019.

KOVÁCS, L. et al. Isolation and characterization of Neosartorya fischeri antifungal protein (NFAP). **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1724–1731, ago. 2011.

LEITER, É. et al. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2445–2453, 2005a.

LEITER, É. et al. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like

phenotype. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2445–2453, 2005b.

MARTÍNEZ DEL POZO, Á. et al. The antifungal protein AFP of *Aspergillus giganteus* is an oligonucleotide/oligosaccharide binding (OB) fold-containing protein that produces condensation of DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46179–46183, 29 nov. 2002a.

MARTÍNEZ DEL POZO, Á. et al. The antifungal protein AFP of *Aspergillus giganteus* is an oligonucleotide/oligosaccharide binding (OB) fold-containing protein that produces condensation of DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46179–46183, 29 nov. 2002b.

MARX, F. et al. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* paf gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. **Gene**, v. 167, n. 1–2, p. 167–171, 1995.

MEYER, V.; STAHL, U. **The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus***. **J. Basic Microbiol.** [s.l.: s.n.].

MYGLANDER, H.; SCHNEIDER, T.; SASS, V.; et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 975–980, 2005. DOI: 10.1038/nature04051.

NAKAYA, K. et al. Amino acid sequence and disulfide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 193, n. 1, p. 31–38, 1990.

OBERPARLEITER, C. et al. Active Internalization of the *Penicillium chrysogenum* Antifungal Protein PAF in Sensitive *Aspergilli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3598–3601, nov. 2003.

PALICZ, Z. et al. In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 269, n. 1, p. 8–16, 15 maio 2013.

RODRÍGUEZ-MARTÍN, A. et al. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. **Peptides**, v. 31, n. 4, p. 541–547, abr. 2010.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, Carmen; MOLARES-VILA, Alberto; SÁNCHEZ-CÁRDENAS, Carlos Daniel; VELÁSQUEZ-BÁMACA, Jimmy Steven; MARTÍNEZ-HERRERA, Erick. Bioinformatics Approaches Applied to the Discovery of Antifungal Peptides. **Antibiotics**, Basel, v. 12, n. 3, p. 566, 2023. DOI: [10.3390/antibiotics12030566](https://doi.org/10.3390/antibiotics12030566).

SANDY, Y. A.; CHEN, Y. C.; SULISTYOWATI, L. Purification and Identification of an Antifungal Protein from an Isolated Fungus with Antagonism to *Colletotrichum gloeosporioides* MC9. **Agrivita**, v. 44, n. 2, p. 332–343, 2022.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In: MASHIDA, M.; GOMI, K. (Ed.). *Aspergillus: molecular biology and genomics*. London: Caister Academic, 2010. p. 19-40.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.

SEIBOLD, M. et al. Properties of the bubble protein, a defensin and an abundant component of a fungal exudate. **Peptides**, v. 32, n. 10, p. 1989–1995, out. 2011.

SHARMA, Ritesh; SHRIVASTAVA, Sameer; SINGH, Sanjay Kumar; KUMAR, Abhinav; SAXENA, Sonal; SINGH, Raj Kumar. Deep-AFPpred: identifying novel antifungal peptides using pretrained embeddings from seq2vec with 1DCNN-BiLSTM. *Briefings in Bioinformatics*, v. 23, n. 1, p. 1–16, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bib/bbab422>.

SKOURI-GARGOURI, H.; GARGOURI, A. First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. **Peptides**, v. 29, n. 11, p. 1871–1877, nov. 2008.

SONDEREGGER, C. et al. A *Penicillium chrysogenum*-based expression system for the production of small, cysteine-rich antifungal proteins for structural and functional analyses. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2016.

SONDEREGGER, C. et al. The evolutionary conserved γ -core motif influences the anti-*Candida* activity of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, 20 jul. 2018.

THEIS, T. et al. The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 588–593, 1 fev. 2003.

TÓTH, L. et al. NFAP2, a novel cysteine-rich anti-yeast protein from *Neosartorya fischeri* NRRL 181: isolation and characterization. **AMB Express**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2016.

VIRÁGH, M. et al. Production of a defensin-like antifungal protein NFAP from *Neosartorya fischeri* in *Pichia pastoris* and its antifungal activity against filamentous fungal isolates from human infections. **Protein Expression and Purification**, v. 94, p. 79–84, 2014.

WEN, C.; GUO, W.; CHEN, X. Purification and identification of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium citrinum* from the Southwest Indian Ocean. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1337–1345, 1 out. 2014.

WHITE, T. J. et al. “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics” in “PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications” (M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White, eds.). **Academic Press, Inc., New York**, v. 64, n. February, p. 315–322, 1990.

WU, C. W. et al. Exogenous glycine and serine promote growth and antifungal activity of *Penicillium citrinum* W1 from the south-west Indian Ocean. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 8, 1 abr. 2015.

WU, C. WEN et al. **Fructose promotes growth and antifungal activity of *Penicillium citrinum***. **Protein and Cell** Higher Education Press, , 1 jul. 2016.

YUAN, X.; CHEN, F. Cocultivation Study of *Monascus* spp. and *Aspergillus niger* Inspired From Black-Skin-Red-Koji by a Double-Sided Petri Dish. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. June, p. 1–12, 2021.