

AÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E ISOLADOS DE FRUTOS DE
Capsicum annuum E *Capsicum chinense* SOBRE
MICROORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS

LAYRANA DE AZEVEDO DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2020

AÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E ISOLADOS DE FRUTOS DE
Capsicum annuum E *Capsicum chinense* SOBRE
MICROORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS

LAYRANA DE AZEVEDO DOS SANTOS

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.

Orientador: Prof^a. Valdirene Moreira Gomes

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S237

Santos, Layrana de Azevedo dos.

AÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E ISOLADOS DE FRUTOS DE *Capsicum annuum* E *Capsicum chinense* SOBRE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS / Layrana de Azevedo dos Santos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

130 f. : il.

Bibliografia: 86 - 108.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.
Orientadora: Valdirene Moreira Gomes.

1. pimentas. 2. proteína transportadora de lipídeos. 3. defensina. 4. fungos. 5. mecanismo de ação. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

**AÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E ISOLADOS DE FRUTOS DE
Capsicum annuum E *Capsicum chinense* SOBRE
MICROORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS**

LAYRANA DE AZEVEDO DOS SANTOS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas”.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:



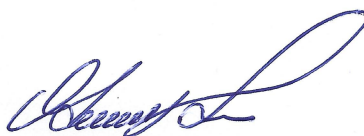
Prof.^a Adriana Ferreira Uchôa (D. Sc em Biociências e Biotecnologia) - UFRN



Prof.^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira (D.Sc em Biociências e Biotecnologia)
UENF



Prof. André de Oliveira Carvalho (D.Sc em Biociências e Biotecnologia) - UENF



Prof.^a Valdirene Moreira Gomes (D.Sc em Ciências) - UENF
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Deus, por me permitir mais essa conquista com muitos desafios e lutas, mas com muitas vitórias e aprendizados também. A ti, toda honra, glória e gratidão!

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e à Capes, pela oportunidade, apoio e suporte financeiro a esta pesquisa.

À minha orientadora Valdirene! É impossível chegar até aqui e não lembrar de todo o trajeto, da nossa primeira conversa até as etapas finais dessa tese. Eu só tenho a lhe agradecer pela oportunidade e confiança, pelos “puxões de orelha”, pelas cobranças, pelos abraços, pelas palavras positivas e carinhosas! Muito obrigada, Val!

À professora Rosana Rodrigues, pela colaboração nos cedendo as sementes e por ter disponibilizado o local para o plantio das pimentas.

Ao professor André de Oliveira Carvalho, por aceitar participar dessa banca, por ser o meu conselheiro no programa de Genética e Melhoramento de Plantas e conselheiro de todos nós no laboratório, sempre disposto a ajudar e compartilhar seu conhecimento. Muita obrigada, André!

À professora Antônia Elenir Amâncio Oliveira, por aceitar participar desta banca, pelas considerações nesta tese e por ser uma das responsáveis por eu estar aqui hoje. Muito obrigada!

À professora Adriana Ferreira Uchôa, por aceitar participar tão prontamente desta banca, pelas considerações e palavras de incentivo e motivação. Muito obrigada, professora!

À minha amiga Marciele Souza, pela amizade e colaboração neste trabalho. Obrigada por tudo!

Ao casal Érica Mello e Gabriel Taveira, meu muito obrigado por toda ajuda prestada durante todos esses anos, pela amizade e, principalmente, pelas palavras de conforto e motivação que me fizeram chegar até aqui! Muito obrigada por tudo!

Aos meus amigos de bancada, grupos Val e André! O caminho poderia ter sido muito mais longo e difícil se não fossemos UM GRUPO! Obrigada a todos, pelas risadas e histórias compartilhadas, abraços e almoços juntos! Grata a todos vocês.

Aos nossos técnicos, Noil, Zila, Luiz Carlos e Valéria Miguelote, não só pela manutenção e organização do laboratório, mas também pela amizade construída!

Aos meus familiares e amigos, pelo incentivo e torcida de sempre! Obrigada por compreenderem minha ausência durante esses anos. Amo vocês!

Ao meu companheiro Carlos Magno, por tantas coisas que nem cabe dizer aqui, mas, acima de tudo, por incentivar, apoiar e respeitar minhas escolhas e se orgulhar disso! Obrigada por tudo! Amo você!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS/ ESQUEMAS/TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos gerais	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Peptídeos antimicrobianos	6
3.2. Peptídeos antimicrobianos de plantas	9
3.3. Defensinas	10
3.4. Proteínas transportadoras de lipídeos	12
3.5. Fluconazol	15
3.6. Gênero <i>Capsicum</i>	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Materiais Biológicos	23
4.1.1. Obtenção dos frutos de pimenta	23
4.1.2. Obtenção dos peptídeos sintéticos C ₁₃ -C ₂₇ e N ₂₉ -T ₄₇	24
4.1.3. Microrganismos	24

4.2. Purificação e caracterização dos peptídeos dos frutos de pimenta	24
4.2.1. Extração de proteínas dos frutos	24
4.2.2. Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC	27
4.2.3. Quantificação de proteínas	28
4.2.4. Eletroforese por tricina-SDS-PAGE	28
4.2.4.1. Preparo das amostras e condições de corrida	28
4.2.4.2. Coloração e Descoloração do gel	28
4.2.5. Identificação de peptídeos por espectrometria de massas	29
4.3. Análise da atividade e mecanismo de ação dos peptídeos	30
4.3.1. Antibiograma	30
4.3.2. Obtenção dos esporos fúngicos e ensaio de inibição do crescimento de fungos filamentosos	30
4.3.3. Efeito dos peptídeos sobre a permeabilização de membrana fúngicas	31
4.3.4. Ensaio de determinação da indução de ROS intracelular	32
4.3.5. Ensaio de detecção da atividade de caspases em células fúngicas	32
4.3.6. Análise da funcionalidade mitocondrial em fungos filamentosos	33
4.3.7. Ensaio de sinergismo dos peptídeos com FLC sobre fungos do gênero <i>Fusarium</i>	33
4.3.8. Ensaio de inibição da atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina	34
4.3.9. Detecção da inibição de protease por zimografia reversa	34
4.3.10. Análise estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Purificação, caracterização parcial e mecanismo de ação das frações peptídicas dos frutos de <i>C. annuum</i>	36
5.1.1. Perfil eletroforético da fração FRP dos frutos de <i>C. annuum</i>	36
5.1.2. Efeito da fração FRP obtida dos frutos de <i>C. annuum</i> sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos	37
5.1.3. Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético das frações de <i>C. annuum</i>	38
5.1.4. Ensaio de inibição do crescimento de fungos filamentosos na presença das frações de <i>C. annuum</i>	40

5.1.5. Efeito das frações de <i>C. annuum</i> sobre a permeabilização de membranas fúngicas	41
5.1.6. Efeito das frações de <i>C. annuum</i> sobre a indução da produção endógena de ROS em fungos filamentosos	44
5.1.7. Atividade sinérgica da combinação do FLC com as frações F1, F2, F4 e F5 de <i>C. annuum</i> sobre o fungo <i>F. solani</i>	46
5.2. Purificação, caracterização e mecanismo de ação das frações peptídicas dos frutos de <i>C. chinense</i>	48
5.2.1. Perfil eletroforético da fração FRP dos frutos de <i>C. chinense</i>	48
5.2.2. Efeito da fração FRP obtida dos frutos de <i>C. chinense</i> sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos	49
5.2.3. Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético das frações de <i>C. chinense</i>	50
5.2.4. Ensaio de inibição do crescimento de fungos filamentosos na presença das frações peptídicas de <i>C. chinense</i>	53
5.2.5. Efeito das frações peptídicas de <i>C. chinense</i> sobre o crescimento bacteriano	55
5.2.6. Determinação da sequência de aminoácidos dos peptídeos das frações F4 e F5 de <i>C. chinense</i> por espectrometria de massas	56
5.2.7. Efeito das frações F4 e F5 de <i>C. chinense</i> sobre a permeabilização de membranas fúngicas	58
5.2.8. Efeito das frações F4 e F5 de <i>C. chinense</i> sobre o aumento da produção endógena de ROS em células fúngicas	59
5.2.9. Ensaio de detecção da atividade de caspases em células fúngicas induzida pelas frações F4 e F5 de <i>C. chinense</i>	60
5.2.10. Análise da funcionalidade mitocondrial em células fúngicas tratadas com as frações F4 e F5 de <i>C. chinense</i>	61
5.2.11. Efeito das frações peptídicas de <i>C. chinense</i> sobre a inibição da atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina	62
5.3. Atividade antimicrobiana, sinérgica e mecanismo de ação dos peptídeos sintéticos C ₁₃ -C ₂₇ e N ₂₉ -T ₄₇ sobre fungos filamentosos	63
5.3.1. Obtenção dos peptídeos sintéticos C ₁₃ -C ₂₇ e N ₂₉ -T ₄₇	63
5.3.2. Efeito dos peptídeos sintéticos C ₁₃ -C ₂₇ e N ₂₉ -T ₄₇ sobre o crescimento de fungos filamentosos	64

5.3.3. Efeito dos peptídeos sintéticos C ₁₃ -C ₂₇ e N ₂₉ -T ₄₇ sobre permeabilização de membranas fúngicas	66
5.3.4. Detecção de ROS em células fúngicas induzida pelos peptídeos sintéticos C ₁₃ -C ₂₇ e N ₂₉ -T ₄₇	67
5.3.5. Atividade sinérgica da combinação do FLC com os peptídeos sintéticos C ₁₃ -C ₂₇ e N ₂₉ -T ₄₇	68
6. DISCUSSÃO	71
6.1. Purificação, caracterização parcial e mecanismo de ação das frações peptídicas dos frutos de <i>C. annuum</i>	71
6.2. Purificação, caracterização e mecanismo de ação das frações peptídicas dos frutos de <i>C. chinense</i>	74
6.3. Atividade antimicrobiana, sinérgica e mecanismo de ação dos peptídeos sintéticos C ₁₃ -C ₂₇ e N ₂₉ -T ₄₇ sobre fungos filamentosos	80
7. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE FIGURAS / ESQUEMAS / TABELAS

- Esquema 1** – Representação esquemática da extração e fracionamento das proteínas dos frutos de pimenta da espécie *Capsicum annuum* L. (acesso UENF 1381) ou *C. chinense* (UENF 1755) (Taveira *et al.*, 2014)..... 26
- Figura 1** – Esquema mostrando os mecanismos de interação e permeabilização de AMPs em membrana plasmática bacteriana. Em (A) modelo aduela de barril, (B) modelo poro toroidal, (C) modelo tapete e em (D) modelo detergente (Adaptado de Kumar *et al.*, 2018)..... 8
- Figura 2** – Representação esquemática da estrutura terciária da defensina NaD1 de *Nicotiana glauca*. Estrutura em vermelho representa a α -hélice, em azul, as folhas- β , em amarelo, as pontes de dissulfeto, em que os números indicam os resíduos de cisteínas que as formam e em cinza as voltas. N e C indicam as regiões terminais (Adaptado de Shafee *et al.*, 2016) 11
- Figura 3** – Representação esquemática da estrutura espacial da LTP1 (A) e LTP2 (B) de *Oryza sativa*. Os números da identificação das α -hélices são especificados (H1–H4). Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos são mostrados em roxo; resíduos interagindo com ligantes lipídicos são mostrados em vermelho; as pontes de dissulfeto estão marcadas em amarelo; o resíduo central no fragmento $-C^VXC^{VI}-$, direcionado para fora ou para dentro da molécula de proteína, é mostrado em verde. Os oito resíduos de cisteínas conservados estão destacados em azul (Adaptado de Finkina *et al.*, 2016)..... 14

Figura 4 – Representação esquemática do modo de ação dos azóis. Azóis tais como o FLC inibem <i>ERG11p</i> , causando o bloqueio da produção de ergosterol e levando ao acúmulo de um esteroide intermediário tóxico para as células fúngicas (Adaptado de Cowen, 2008).....	16
Figura 5 – Imagens de pimentas do gênero <i>Capsicum</i> . (A) Frutos de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> (acesso UENF 1381), de origem mexicana e conhecidos como Jalapeño, e (B) <i>C. chinense</i> Jacq. (acesso UENF 1755), conhecidos como pimenta chocolate	20
Figura 6 – Visualização eletroforética da fração FRP dos frutos de <i>C. annuum</i> por tricina-SDS-PAGE. As proteínas totais da fração foram reduzidas com β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa), (FRP) fração rica em peptídeos obtida após fracionamento com sulfato de amônio (0-70% de saturação).....	37
Figura 7 – Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento de diferentes fungos filamentosos na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações da fração FRP, obtidas após extração proteica dos frutos de <i>C. annuum</i> . O crescimento dos fungos do gênero <i>Fusarium</i> foi observado até 24 h, enquanto os do gênero <i>Colletotrichum</i> , até 30 h. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e controle. Acima das barras é indicado o valor da inibição (%)......	38
Figura 8 – (A) Cromatograma da fração FRP dos frutos de <i>C. annuum</i> (acesso UENF 1381) em coluna de fase reversa C2/C18. Frações F1 – F6 obtidas após eluição da coluna com propanol. A cromatografia foi feita utilizando um fluxo $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ a $38 \text{ }^\circ\text{C}$. (B) Visualização eletroforética por tricina-SDS-PAGE das frações peptídicas obtidas da fração FRP dos frutos de <i>C. annuum</i> após cromatografia em sistema HPLC. Todas as frações foram tratadas com β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa)	39

- Figura 9** – Ensaio de inibição do crescimento de diferentes fungos filamentosos na presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações ricas em peptídeos, obtidas de *C. annuum* após cromatografia de fase reversa. O crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* foi observado até 24 h, enquanto os do gênero *Colletotrichum*, até 30 h. Os valores são médias ($\pm\text{SD}$) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras é indicado o valor da inibição (%)...... 41
- Figura 10** – Imagens de microscopia de fluorescência dos fungos incubados com o corante *Sytox Green*, após terem sido crescidos na ausência (controle) e na presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das diferentes frações de *C. annuum*. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 50 μm 43
- Figura 11** – Imagens de microscopia de fluorescência dos fungos filamentosos após serem incubados com o corante (2', 7' – diclorofluoresceína diacetato) para verificação de indução de ROS, após terem sido crescidos na ausência (controle) e na presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das diferentes frações de *C. annuum*. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 50 μm 45
- Figura 12** – Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento do fungo *F. solani* na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações de FLC. O ensaio foi avaliado em 24 h. Os valores são médias ($\pm\text{SD}$) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras é indicado o valor da inibição (%)...... 46
- Figura 13** – Visualização gráfica do ensaio do efeito das frações F1, F2, F4 e F5 (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *C. annuum* em combinação com o FLC (68 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre o crescimento do fungo *F. solani*. O ensaio foi avaliado por 24 h. Os valores são médias ($\pm\text{SD}$) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras é indicado o valor da inibição (%)...... 47

Figura 14 – Visualização eletroforética da fração FRP dos frutos de *C. chinense* por tricina-SDS-PAGE. As proteínas totais da fração foram reduzidas com β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa), (FRP) fração rica em peptídeos obtida após fracionamento com sulfato de amônio (0-70% de saturação)..... 48

Figura 15 – Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento de diferentes fungos filamentosos na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações da fração FRP obtida após extração proteica dos frutos de *C. chinense*. O crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* foi observado até 24 h, enquanto os do gênero *Colletotrichum*, até 30 h. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e controle. Acima das barras é mostrado a inibição (%)...... 50

Figura 16 – (A) Cromatograma da fração FRP de frutos de *C. chinense* em coluna de fase reversa C18. Frações F1 – F10 obtidas após eluição da coluna com propanol. A cromatografia foi feita utilizando um fluxo $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a 37°C . (B) Visualização eletroforética das frações enriquecidas em peptídeos dos frutos de *C. chinense* por tricina-SDS-PAGE após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. Todas as frações foram tratadas com β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa). F4b, F5b e F5c e F5a referem-se a bandas peptídicas selecionadas e submetidas à obtenção da sequência de aminoácidos..... 52

Figura 17 – Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento de diferentes fungos filamentosos na ausência (controle) e na presença de 100 e $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações de *C. chinense*, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. O crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* foi observado até 24 h, enquanto os do gênero *Colletotrichum*, até 30 h. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e controle. Acima das barras é mostrado a inibição (%)...... 54

Figura 18 – Antibiograma com a bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* na presença de 300 µg.mL⁻¹ das frações de *C. chinense* após 48 h de crescimento. A inibição do crescimento bacteriano é visualizada como uma zona clara ao redor do disco de papel contendo as frações. Inserções em A (2,08 mm), B (0,53 mm) e C (1,58 mm) indicam as diferentes zonas de inibição apresentadas pela fração F10..... 55

Figura 19 – Alinhamento dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos de *C. chinense* com similaridade a outros peptídeos descritos. As sequências foram obtidas por SWISS-PROT e alinhadas por Clustal Omega. (A) Os peptídeos F4b (*Cc-LTP4b*), F5b (*Cc-LTP5b*) e F5c (*Cc-LTP5c*) mostraram similaridade com as sequências: Non-specific lipid-transfer protein 1-like *Capsicum annuum* (NCBI Reference Sequence: XP 016559796.1); Nonspecific lipid-transfer protein 1 *Nicotiana tabacum* (NCBI Reference Sequence: pdb 1T12 A Chain A); Non-specific lipid-transfer protein 1 *Nicotiana glauca* (NCBI Reference Sequence: XP 009761744.1). (B) O peptídeo F5a (*Cc-Def5a*) mostrou similaridade com as sequências: Defensin-like protein *Capsicum baccatum* (NCBI Reference Sequence: PHT42128.1); Flower-specific defensin-like *Capsicum annuum* (NCBI Reference Sequence: XP 016579688.1); e Defensin-like protein *Capsicum chinense* (NCBI Reference Sequence: PHU10972.1). Resíduos idênticos são mostrados em azul (incluindo os resíduos de cisteínas). Os resíduos de cisteínas conservados foram sublinhados e os espaços (-) incluídos para melhorar o alinhamento..... 57

Figura 20 – Imagens de microscopia de fluorescência do ensaio de permeabilização de membrana dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* tratados com o corante *Sytox Green*, após terem sido crescidos na ausência (controle) e na presença de 200 µg.mL⁻¹ das frações F4 e F5. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 50 µm..... 58

- Figura 21** – Imagens de microscopia do ensaio de determinação da indução de ROS nas células dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* crescidos na ausência (controle) e presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F4 e F5 de *C. chinense*. As células foram incubadas por 2 h com H₂DCFDA para detecção do ROS, visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 50 μm 59
- Figura 22** – Imagens de microscopia do ensaio de detecção da atividade de caspases nas células dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* crescidos na ausência (controle) e presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F4 e F5 de *C. chinense*. Os controles e testes foram incubados com a sonda FITC-VAD-FMK.e analisados por fluorescência. Barras = 50 μm 60
- Figura 23** – Imagens de microscopia de fluorescência dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* após ensaio de funcionalidade mitocondrial, utilizando a sonda fluorescente Rodamina 123. Os fungos foram crescidos na ausência (controle) e na presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F4 e F5 de *C. chinense* e, em seguida, analisados quanto à funcionalidade mitocondrial. Os controles foram tratados apenas com a sonda Rodamina 123. Barras = 50 μm 61
- Figura 24** – Ensaio do efeito das frações de *C. chinense* após cromatografia em HPLC sobre a atividade residual da tripsina (A) e quimiotripsina (B). O ensaio foi feito em uma concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores representam as médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e controle. (C) Zimografia reversa das frações de *C. chinense* (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). C – O controle positivo (Soybean Kunitz). Acima das barras é indicado o valor da atividade (%). 62

Figura 25 – Estrutura primária dos peptídeos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ e suas características bioquímicas. (A) Sobreposição da estrutura primária da nsLTP, obtida do peptídeo Cc-LTP4b de *C. chinense*, com os dois peptídeos sintéticos. A região de aminoácidos em vermelho indica os resíduos selecionados para a síntese do C₁₃-C₂₇. A região de aminoácidos em azul indica a região selecionada para a síntese do N₂₉-T₄₇. Os números nos nomes dos peptídeos sintéticos representam a posição dos aminoácidos na nsLTP original. (B) Características bioquímicas dos peptídeos sintéticos..... 63

Figura 26 – Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento de diferentes fungos filamentosos na ausência (controle) e na presença de 100 e 200 µM peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇. O crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* foi observado até 24 h, enquanto os do gênero *Colletotrichum*, até 30 h. Os valores são médias (±SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e controle. Acima das barras é mostrado o valor da inibição (%)...... 65

Figura 27 – Imagens de microscopia de fluorescência dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* incubados com o corante Sytox Green, após terem sido crescidos na ausência (controle) e na presença de 200 µM dos peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 50 µm..... 66

Figura 28 – Imagens de microscopia de fluorescência dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* após serem incubados com o corante para verificação de indução de ROS (2', 7' – diclorofluoresceína diacetato), após terem sido crescidos na ausência (controle) e na presença de 200 µM dos peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm..... 67

Figura 29 – Visualização do ensaio de inibição do crescimento dos fungos *F. solani* (A) e *F. oxysporum* (B) na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações de FLC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). O ensaio foi analisado por 24 h. A partir destes dados de inibição do crescimento em função da concentração da substância usada, foram determinadas por normalidade as IC_{50} do FLC para *F. solani* (C) e *F. oxysporum* (D)..... 69

Figura 30 – Visualização gráfica do ensaio do efeito dos peptídeos sintéticos (C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇) e FLC (isolados e em combinação) sobre o crescimento dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum*. O ensaio foi avaliado por 24 h. Os valores são médias ($\pm\text{SD}$) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras é indicado o valor da inibição (%)..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS

- **AMPs** – peptídeos antimicrobianos (do inglês *antimicrobial peptides*)
- **BApNA** – N- Benzoil- DL-arginil- *p*- nitrianilida
- **BCA** – ácido bicinconínico (do inglês *bicinchoninic acid*)
- **DIC** – contraste de interferência diferencial (do inglês *differential interference contrast*)
- **DMSO** – dimetil sulfóxido
- **EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético
- **FRP** – fração rica em peptídeos
- **FLC** – fluconazol
- **HPLC** – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*)
- **IC₅₀** – concentração necessária para se obter 50% de inibição
- **LTP** – proteínas transportadoras de lipídeos (do inglês *Lipid Transfer Proteins*)
- **PAGE** – do inglês *Polyacrylamide gel electrophoresis*
- **ROS** – espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)
- **rpm** – rotações por minuto
- **SDS** – dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate*)
- **TEMED** – N", N"" ,N""", N""""- tetrametiletenodiamino
- **TFA** – ácido trifluoroacético (do inglês *trifluoroacetic acid*)
- **Tris** – tris (hidroximetil) amino etano

RESUMO

SANTOS, Layrana de Azevedo; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2020; "AÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E ISOLADOS DE FRUTOS DE *Capsicum annuum* E *Capsicum chinense* SOBRE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS"; Orientadora: Dr^a Valdirene Moreira Gomes; Conselheiros: Dr. André de Oliveira Carvalho e Dr^a Clícia Gravitol Gaspar de Matos

Nos últimos anos a caracterização e a atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos de diversos órgãos de diferentes espécies vegetais têm sido relatadas. No entanto, poucos estudos investigaram o potencial de peptídeos antimicrobianos (AMPs) encontrados em frutos, em especial de plantas do gênero *Capsicum*. Este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar peptídeos presentes nos frutos de pimenta das espécies *Capsicum annuum* (acesso UENF 1381) e *Capsicum chinense* (acesso UENF 1755), avaliar a atividade antimicrobiana e investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito contra fungos fitopatogênicos. Inicialmente, os peptídeos presentes nos frutos de *Capsicum* foram extraídos em tampão fosfato pH 5,4, precipitados com sulfato de amônio a 0-70% de saturação e fracionados por cromatografia de fase reversa em HPLC. As diferentes frações obtidas das duas espécies de pimenta foram testadas contra fungos fitopatogênicos. As frações de *C. annuum* apresentaram pouca ou nenhuma atividade significativa, diferentemente dos resultados observados para as frações de *C. chinense*. Em especial, as frações denominadas F4 e F5 de *C. chinense* mostraram alta atividade antimicrobiana sobre os fungos *Fusarium*

solani e *Fusarium oxysporum*. Os peptídeos contidos nas frações F4 e F5 foram sequenciados e revelaram identidade com proteínas transportadoras de lipídeos não específicas (nsLTPs) e peptídeos similares à defensina de plantas, respectivamente. As frações de *C. chinense* avaliadas neste trabalho também foram capazes de inibir o crescimento da bactéria *Xanthomonas euvesicatoria*, com exceção da fração F1, que não apresentou inibição. Quando analisados os mecanismos de ação das frações F4 e F5 sobre o crescimento dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum*, foram observados efeitos tóxicos sobre esses fungos, levando à permeabilização da membrana, aumento da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de metacaspase e perda da funcionalidade mitocondrial. Outro objetivo do presente estudo foi sintetizar peptídeos (a partir de fragmentos da LTP identificada na fração F4 de *C. chinense*) e avaliar sua possível atividade antimicrobiana e sinérgica com a droga comercial fluconazol sobre o crescimento de fungos. Os resultados mostraram que, dos dois peptídeos sintéticos (C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇) testados, apenas o peptídeo N₂₉-T₄₇, na concentração de 200 µM, foi capaz de inibir 35% do crescimento de *F. solani* e 21% de *F. oxysporum*, tendo este peptídeo ainda sido capaz de induzir ROS nestes fungos. Quando os peptídeos foram combinados com o fluconazol, não foi possível observar inibição do crescimento para nenhum dos fungos testados. Assim, este trabalho revela potenciais AMPs presentes nos frutos de *Capsicum* na defesa de plantas e visa a contribuir para o planejamento de novas drogas antifúngicas.

Palavras-chave: pimentas; proteína transportadora de lipídeos; defensina; fungos; fluconazol; mecanismo de ação.

ABSTRACT

SANTOS, Layrana de Azevedo; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2020; "ACTION OF SYNTHETIC AND ISOLATE PEPTIDES FROM FRUITS OF *Capsicum annuum* AND *Capsicum chinense* ON PHYTOPATHOGENIC MICRO-ORGANISMS"; Advisor: Dr^a Valdirene Moreira Gomes; Committee members: Dr. André de Oliveira Carvalho e Dr^a Clícia Gravitol Gaspar de Matos

In recent years, the characterization and antimicrobial activity of peptides obtained from different organs of different plant species have been reported. However, few studies have investigated the potential of antimicrobial peptides (AMPs) found in fruits, especially in plants of the genus *Capsicum*. This work aimed to purify and characterize peptides present in pepper fruits of the species of *Capsicum annuum* (access UENF 1381) and *Capsicum chinense* (access UENF 1755), evaluate the antimicrobial activity and investigate the possible mechanisms of action involved in the effect against phytopathogenic fungi. Initially, the peptides present in the *Capsicum* fruits were extracted in phosphate buffer pH 5.4, precipitated with ammonium sulfate at 0-70% saturation and fractionated by HPLC reverse phase chromatography. The different fractions obtained from the two pepper species were tested against phytopathogenic fungi. The fractions of *C. annuum* showed little or no significant activity, differently from the results observed for *C. chinense* fractions. In particular, the fractions denominated F4 and F5 of *C. chinense*, showed high antimicrobial activity on the fungi *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. The peptides contained in the F4 and F5 fractions were sequenced

and showed identity with non-specific lipid carrier proteins (nsLTPs) and plant defense-like peptides, respectively. The fractions of *C. chinense* evaluated in this work were also able to inhibit the growth of the *Xanthomonas euvesicatoria* bacteria, with the exception of the F1 fraction that did not show inhibition. When the mechanisms of action from F4 and F5 fractions on the growth of fungi *F. solani* and *F. oxysporum* were analyzed, toxic effects were observed on these fungi, leading to membrane permeabilization, increased endogenous production of reactive oxygen species (ROS), activation of metacaspase and loss of mitochondrial functionality. Another objective of the present study was to synthesize peptides (from fragments of the identified LTP in the F4 fraction of *C. chinense*) and to evaluate their possible antimicrobial and synergistic activity with the commercial drug fluconazole on the growth of fungi. The results showed that of the two synthetic peptides (C₁₃-C₂₇ and N₂₉-T₄₇) tested, only the peptide N₂₉-T₄₇, at a concentration of 200 µM, was able to inhibit 35% of the growth of *F. solani* and 21% of *F. oxysporum*, it was not possible to observe inhibition. When the peptides were combined with fluconazole, it was not possible to observe growth inhibition for any of the tested fungi. Thus, this work reveals potential AMPs present in the fruits of *Capsicum* in the defense of plants and aims to contribute to the planning of new antifungal drugs.

Keywords: peppers; lipid transfer protein; defensin; fungi; fluconazole; mechanism of action.

1. INTRODUÇÃO

As pimentas representam uma das hortaliças mais importantes do mundo em razão da sua múltipla versatilidade de uso e das aplicações nas indústrias farmacêutica e cosmética, na decoração e na culinária (Moreira *et al.*, 2018). As pimentas pertencem à família Solanaceae, gênero *Capsicum*, apresentando ampla diversidade genética, com 38 espécies já descritas, incluindo 22 espécies silvestres ou semidomesticadas e apenas cinco espécies domesticadas (*C. annuum* var. *annuum* L., *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. e *C. pubescens*) (García *et al.*, 2016). Embora o gênero *Capsicum* seja considerado um componente importante do mercado dos vegetais frescos, sua produção é limitada diante das inúmeras infecções que afetam seu cultivo, causando graves perdas quantitativas e qualitativas (Silvar e García, 2017). As estratégias utilizadas para o controle desses microrganismos fitopatogênicos envolvem o uso contínuo e indiscriminado de antimicrobianos químicos, levando resíduos tóxicos para as plantas de pimentas.

Além disso, o uso irrestrito desses produtos tornou-se cada vez mais ineficaz pela seleção de fatores de resistência nesses patógenos contra muitos desses agroquímicos (Di Maro *et al.*, 2010). Atualmente, existem sérias preocupações sobre o aumento da resistência de patógenos, o uso de pesticidas e os impactos negativos que eles causam à saúde humana e ao meio ambiente (Twardowski, 2010). Nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) parecem ser uma alternativa promissora para superar essa problemática. Estes

AMPs são pequenas moléculas produzidas por todos os organismos vivos que ganharam considerável atenção pela sua potente atividade antimicrobiana sobre uma ampla gama de microrganismos. Além disso, alguns matam microrganismos rapidamente em baixas concentrações (Guaní-Guerra *et al.*, 2010; Moguel-Salazar *et al.*, 2011).

Os AMPs de plantas compartilham algumas características em comum com outros AMPs, incluindo a baixa massa molecular (<10 kDa), propriedades anfipáticas, carga líquida positiva em pH fisiológico e presença de resíduos de cisteínas interconectados em pares, formando ligações dissulfeto, que conferem a essas moléculas alta estabilidade em extremos de pH e temperatura. Pelas características anfipáticas de muitos AMPs, eles têm capacidade de interagir eletrostaticamente com membranas biológicas (Nawrot *et al.*, 2014). Quanto ao mecanismo de ação, os AMPs podem atuar na permeabilização da membrana, alterando sua porosidade, conseqüentemente, interferindo em alvos intracelulares, como, por exemplo, na ativação de enzimas autolíticas, inibição da síntese do DNA e de proteínas (Li *et al.*, 2012). Os AMPs de plantas podem ser divididos em diferentes famílias, levando em consideração principalmente suas características estruturais. Entre as principais famílias, estão os ciclotídeos, inibidores de proteases, tioninas, proteínas transportadoras de lipídios (LTPs) e defensinas vegetais (Tam *et al.*, 2015).

As LTPs são pequenos peptídeos que compreendem duas famílias. As LTPs que formam a família mais estudada (família 1) têm uma estrutura primária de 90 a 95 resíduos de aminoácidos e são básicas, apresentando pontos isoelétricos (pI) entre 9 e 10 (Carvalho e Gomes, 2007). As defensinas vegetais são peptídeos pequenos, com estrutura primária de 45 a 54 resíduos de aminoácidos, altamente básicas, o que lhes confere uma carga positiva em pH neutro. Apresentam massa molecular de aproximadamente 6 kDa e são ricas em cisteínas (oito resíduos) (Carvalho e Gomes, 2011). Estudos recentes demonstraram que algumas espécies de pimenta têm peptídeos com forte atividade antimicrobiana sobre bactérias (Pereira *et al.*, 2018), leveduras (Taveira *et al.*, 2014), fungos filamentosos (Santos *et al.*, 2017), propriedade de inibir α -amilases (Bard *et al.*, 2014) e proteases (Ribeiro *et al.*, 2013). O Ca-LTP1, isolado de sementes de *C. annuum*, apresentou atividade antimicrobiana sobre *Colletotrichum lindemuthianum* e *Candida tropicalis*, causando várias alterações

morfológicas nas células (Diz *et al.*, 2011). A defensina J1-1/GST de *Capsicum* apresentou forte atividade inibitória contra fungos do gênero *Colletotrichum* (Seo *et al.*, 2014).

Esse estudo se fundamenta nestas mesmas perspectivas e pretende avaliar a participação de AMPs de *Capsicum* no controle de determinados patógenos, sobretudo de interesse agrônômico, visando a determinar o melhor uso e aplicação dessas moléculas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Purificar e caracterizar peptídeos obtidos de frutos de *Capsicum annuum* (acesso UENF 1381) e *Capsicum chinense* (acesso UENF 1755) e de peptídeos sintéticos, avaliar as atividades antimicrobianas dos peptídeos isolados e em combinação com fluconazol bem como investigar seus mecanismos de ação sobre fungos.

2.2. Objetivos específicos

- I – Purificar e caracterizar bioquimicamente peptídeos de frutos de *C. annuum* e *C. chinense*;
- II – Avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos sobre fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium* e *Colletotrichum* e sobre a bactéria *Xanthomonas euvesicatoria*;
- III – Analisar o efeito dos peptídeos sobre a atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina;
- IV – Determinar a atividade de caspases e a funcionalidade mitocondrial em células fúngicas tratadas com os peptídeos;
- V – Sintetizar peptídeos derivados das sequências obtidas dos peptídeos dos frutos e avaliar sua atividade antimicrobiana sobre fungos fitopatogênicos;
- VI – Estudar o efeito dos peptídeos sobre a permeabilização de membranas fúngicas;

VII – Verificar se os peptídeos estimulam a produção intracelular de ROS em células fúngicas;

VIII – Avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos em combinação com fluconazol sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são componentes essenciais do sistema de defesa e estão presente na maioria dos seres vivos, como animais vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos), animais invertebrados (insetos, crustáceos etc.), microrganismos (fungos e bactérias) e plantas (Zaslhoff, 2002; Figueira *et al.*, 2017). A produção destas moléculas corresponde a uma estratégia de defesa antiga e evolutivamente conservada, sendo eficiente e econômica para o organismo que a produz, pois são sintetizadas com um baixo consumo de energia. Um mesmo organismo pode produzir diferentes classes de AMPs e isso está relacionado à proteção do organismo contra a invasão por uma grande variedade de espécies microbianas. O processo de infecção ocasionado pelo patógeno caracteriza como será o tipo de expressão desses peptídeos, podendo ser uma resposta constitutiva ou induzida (Sels *et al.*, 2008). Os AMPs podem agir sozinhos ou em sinergismo com outras moléculas, atribuindo uma maior capacidade de sobrevivência em ambientes repletos de microrganismos. Além disso, os AMPs não apresentam um modo de ação único, eles apresentam diferentes atividades antimicrobianas e biológicas complementares, além de serem específicos para diferentes tipos de microrganismos. Logo, isso faz com que a ocorrência de seleção de resistência a esses peptídeos seja pouco comum (Perron *et al.*, 2006). Mesmo os peptídeos estruturalmente muito semelhantes

possuem microrganismos – alvos específicos (Belarmino e Benko-Iseppon, 2010; Odintsova e Egorov, 2012; Kumar *et al.*, 2018).

Os AMPs compartilham algumas características importantes em comum, como o tamanho normalmente menor que 10 kDa (menos de 100 resíduos de aminoácidos), alta estabilidade físico-química, devido a presença de pontes dissulfeto, possuem carga líquida positiva em pH fisiológico e também apresentam uma parcela de resíduos hidrofóbicos, o que lhes confere caráter anfipático (Giuliani *et al.*, 2007; Adade *et al.*, 2013). Como a diversidade dos AMPs é vasta, a classificação é complexa. Eles podem ser caracterizados com base na sua estrutura secundária em quatro classes principais: α -hélice, que tem como exemplo, a cecropina (AMP de inseto) e a magainina (AMP de sapo); folhas β , como exemplo, a taquipleisia (AMP de caranguejo ferradura) e a tanatina (AMP de inseto); cíclicos, como exemplo, kalata (AMP de planta); e peptídeos de estrutura estendida, como exemplo, indolicitiona (AMP de mamífero), rico em resíduos de triptofano. As duas primeiras classes são as mais comuns na natureza (Hancock e Sahl, 2006; White e Craik, 2016).

O mecanismo exato pelo qual os AMPs exercem suas propriedades antimicrobianas ainda não é completamente conhecido, mas sabe-se que peptídeos carregados positivamente podem agir diretamente sobre membranas celulares carregadas negativamente, promovendo ruptura da membrana em alguns organismos (Guaní-Guerra *et al.*, 2010; Bahar e Ren, 2013). Em outros, a membrana não se rompe e o AMP pode atravessá-la e interagir com alvos intracelulares, podendo se ligar ao DNA, ao RNA e a proteínas no interior da célula, inibindo sua atividade. Eles podem também atuar inibindo a síntese da parede celular e ainda induzir um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) no interior da célula (Brogden, 2005; Li *et al.*, 2012; Mello *et al.*, 2014).

Vários modelos de interação com a membrana plasmática foram propostos, sendo os mais estudados o modelo aduela de barril, o modelo poro toroidal, o modelo tapete e o modelo detergente (Figura 1) (Kumar *et al.*, 2018). No modelo aduela de barril (Figura 1A), os AMPs são inicialmente orientados paralelamente à membrana, mas eventualmente se inserem perpendicularmente na bicamada lipídica, de modo que os domínios hidrofóbicos do AMP ficam alinhados com as caudas dos fosfolipídeos de membrana, enquanto a porção hidrofílica do AMP fica voltada para o interior do poro. No modelo poro toroidal (Figura 1B), os AMPs se

inserir na membrana perpendicularmente, de forma que o interior do poro na membrana seja formado pelos AMPs e pela cabeça polar dos fosfolipídeos da membrana, que são induzidos a formar uma curvatura mais positiva, estando ambos com a parte hidrofílica voltada para o poro. Este tipo de poro é induzido por AMPs como as magaininas, protegrinas e melitina (Teixeira *et al.*, 2012). Os AMPs também podem atuar sem formar poros específicos na membrana, sendo um desses modelos designado como modelo tapete, em que uma alta concentração de AMPs se liga paralelamente à membrana, cobrindo-a, formando um tapete, causando interações desfavoráveis na superfície da membrana (Figura 1C). Conseqüentemente, a integridade da membrana é perdida, produzindo um efeito semelhante ao detergente (modelo detergente), que, eventualmente, desintegra a membrana, formando micelas (Figura 1D).

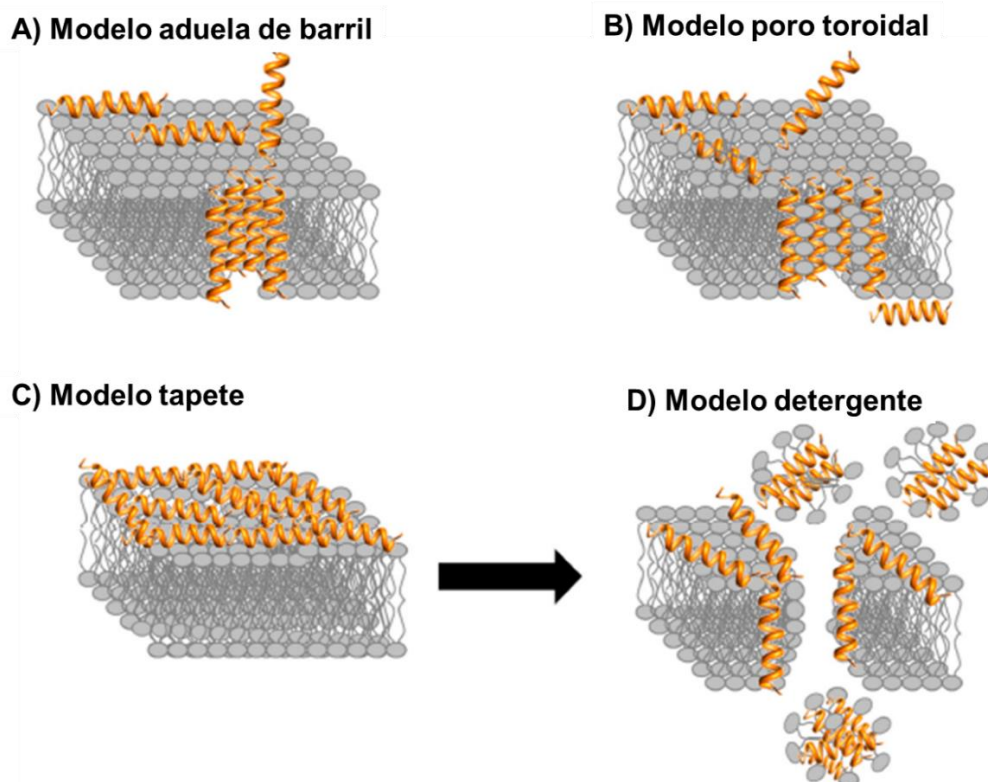


Figura 1 – Esquema mostrando os mecanismos de interação e permeabilização de AMPs em membrana plasmática bacteriana. Em (A) modelo aduela de barril, (B) modelo poro toroidal, (C) modelo tapete e em (D) modelo detergente (Adaptado de Kumar *et al.*, 2018).

3.2. Peptídeos antimicrobianos de plantas

Constantemente as plantas sofrem a ação de fatores físicos do ambiente, tais como temperatura, umidade, radiação ultravioleta e fatores mecânicos. Elas, assim com outros organismos naturais, também podem, em qualquer fase de seu desenvolvimento, ser atacadas por uma grande variedade de patógenos e predadores, incluindo vírus, bactérias, fungos, nematoides e insetos (Castro e Fontes, 2005; Campos *et al.*, 2018). Ao analisarmos a interação entre planta e patógeno, enquanto o parasita utiliza uma série de compostos químicos para o ataque como toxinas e enzimas hidrolíticas, as plantas utilizam diferentes formas de defesa, entre elas: a presença de barreiras físicas como camadas epiculares, suberizadas, cutinizadas, tecidos epidérmicos lignificados e presença de barreira química com produção de substâncias como metabólitos secundários pertencentes a diversas classes químicas como os terpenos, alcaloides, compostos fenólicos e moléculas proteicas como quitinases, lectinas, ânglucanases, inibidores de enzimas digestivas como proteases e amilases e diversos AMPs (Benko-Iseppon *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Birkenbihl *et al.*, 2017).

Os AMPs de plantas podem ser encontrados em diferentes órgãos vegetais como caules, flores, folhas, raízes, sementes e frutos e compartilham das características gerais dos demais AMPs como baixa massa molecular (inferior a 10 kDa), propriedades anfipáticas, tendo tanto uma região hidrofóbica (cerca de 30%), que interage com lipídeos, quanto uma região hidrofílica carregada positivamente (com alto conteúdo de lisina, arginina e/ou histidina), capaz de interagir com estruturas aniônicas. Muitos AMPs são ricos em resíduos de cisteínas, os quais se conectam aos pares (4, 6 ou 8), formando pontes dissulfeto, conferindo alta estabilidade (Zasloff, 2002; Benko-Iseppon *et al.*, 2010; Meneguetti *et al.*, 2017). Estas propriedades estruturais, em conjunto, permitem aos AMPs interagir com a membrana dos microrganismos diretamente ou utilizando alvos, atuando sobre a permeabilidade de membranas, fazendo dela seu principal alvo (Odintsova e Egorov, 2012; Ramirez-Prado *et al.*, 2018).

Baseando-se nas similaridades, os AMPs são classificados conforme suas características estruturais, sequência primária, resíduos de cisteínas e pontes dissulfeto. Os AMPs de plantas foram divididos em sete subgrupos: heveínas; knotinas; as proteínas transportadoras de lipídeos; as snakinas, inicialmente

isoladas de *Solanum tuberosum* (batata); as defensinas, inicialmente isoladas de sementes de *Hordeum vulgare* (cevada); as tioninas, sendo a purotionina, isolada de *Triticuma estivum* (trigo), o primeiro peptídeo cuja atividade contra patógenos de plantas foi detectada *in vitro*; os peptídeos circulares, conhecidos como ciclotídeos, encontrados nas famílias Rubiaceae e Violaceae; e os inibidores de proteinases, isolados de sementes de pimenta do gênero *Capsicum* (Ribeiro *et al.*, 2007; Benko-Iseppon *et al.*, 2010; Tam *et al.*, 2015). Entre as famílias citadas, as que mais apresentam trabalhos descritos são as tioninas, as defensinas e as LTPs (Egorov *et al.*, 2005; Carvalho e Gomes, 2009).

3.3. Defensinas

As defensinas de plantas representam a maior e mais estudada família dos AMPs (Pelegri e Franco, 2005; Suarez-Carmona *et al.*, 2015). Apresentam massa molecular de aproximadamente 6 kDa, estrutura primária de 45 a 54 resíduos de aminoácidos e são altamente básicas, o que lhes confere uma carga positiva em pH neutro. Possuem oito resíduos de cisteínas, que formam quatro pontes dissulfeto, com exceção de uma única defensina de flores da família Solanaceae, a *PhD₁*, que tem cinco pontes dissulfeto (Janssen *et al.*, 2003). As defensinas vegetais foram inicialmente isoladas de endosperma de *Triticum turgidum* (trigo) e *Hordeum vulgare* (cevada) (Colilla *et al.*, 1990; Mendez *et al.*, 1990), sendo primeiramente chamadas de γ -tioninas por se assemelharem às α - e β -tioninas em relação à sua carga básica, tamanho e número de resíduos de cisteínas (Broekaert *et al.*, 1995). Entretanto, trabalhos posteriores mostraram que as defensinas compartilhavam mais características das suas estruturas primárias e terciárias com defensinas de insetos e mamíferos do que com as tioninas, então, posteriormente, as γ -tioninas foram renomeadas por Terras *et al.*, (1995) como defensinas de plantas.

A estrutura terciária, de um modo geral, compreende três folhas β antiparalelas e uma α -hélice estabilizada por quatro pontes dissulfeto que ligam estes elementos estruturais. O principal elemento estrutural da molécula da defensina é o então chamado CS $\alpha\beta$ motif (cysteine-stabilized α -helix β -sheet motif), no qual dois resíduos de cisteínas localizados na α -hélice estão conectados a duas cisteínas localizadas na terceira folha β (Figura 2) (Thevissen *et al.*, 2007; Shafee *et al.*, 2016). As defensinas também são caracterizadas pela

ocorrência de um arranjo estrutural conservado, denominado γ -core ((X₁₋₃)GXC(X₃₋₉)C), entre os AMPs que contêm pontes dissulfeto e que são caracterizados pela presença de duas folhas β antiparalelas com uma pequena região de volta interposta (Yount e Yeaman, 2004; De Coninck *et al.*, 2013). Exceto pelos resíduos de cisteínas, as sequências de aminoácidos das defensinas são altamente variáveis entre as espécies de plantas.

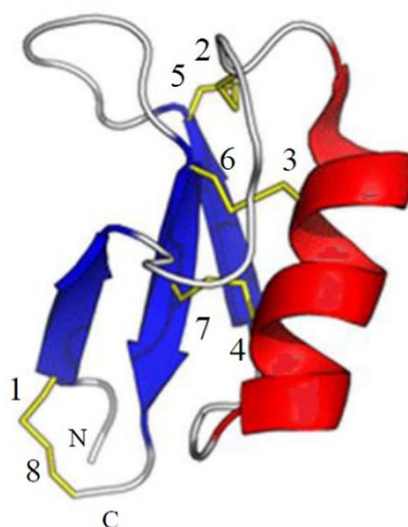


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura terciária da defensina NaD1 de *Nicotiana alata*. Estrutura em vermelho representa a α -hélice, em azul, as folhas- β , em amarelo, as pontes de dissulfeto, em que os números indicam os resíduos de cisteínas que as formam e em cinza as voltas. N e C indicam as regiões terminais (Adaptado de Shafee *et al.*, 2016).

A maioria das defensinas de plantas foi isolada de sementes, no entanto, elas também já foram encontradas em outros órgãos e partes da planta como folhas, flores, tubérculos, vagens e frutas. Elas estão localizadas na parede celular, no espaço extracelular de sementes e também nas camadas periféricas das células de frutos e órgãos florais de diferentes plantas como *Arabidopsis* (Penninckx *et al.*, 1996; Thomma *et al.*, 2002), *Pisum sativum* (Almeida *et al.*, 2000), *Spinacia oleracea* (Segura *et al.*, 1998), *Nicotiana alata* (Lay *et al.*, 2003) e *Raphanus sativus* (Terras *et al.*, 1992). Algumas são induzidas mediante ataque de agentes patogênicos, enquanto outras são expressas constitutivamente em tecidos ou órgãos específicos (Carvalho e Gomes, 2009; 2011).

Apesar de serem conhecidas e estudadas há vários anos, o exato mecanismo de ação das diferentes defensinas ainda não é totalmente compreendido. Muitas defensinas, como a *Dm-AMP1* de dália (*Dahlia merckii*) (Thevissen *et al.*, 2000), a *Rs-AFP2* de semente de *R. sativus* (rabanete) (Terras *et al.*, 1992) e a *Psd1* de *P. sativus* (ervilha) (Lobo *et al.*, 2007), possui alvos moleculares específicos na membrana plasmática. *Dm-AMP1* possui atividade antifúngica sobre o fungo filamentoso *Neurospora crassa* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo os esfingolipídeos essenciais para a sensibilidade da *Dm-AMP1* em *S. cerevisiae* (Thevissen *et al.*, 2000). Mello *et al.*, (2014) avaliaram a atividade de uma defensina recombinante de *P. vulgaris*, a *PvD1r*, sobre o crescimento de duas cepas da levedura *C. albicans*, uma cepa selvagem e outra mutante (com ausência de esfingolipídeo glicosilceramida). Foi visto que a *PvD1r* foi capaz de inibir o crescimento, causar permeabilização de membrana, induzir produção endógena de ROS nas células de *C. albicans* (cepa selvagem). No entanto, nenhum destes efeitos foi observado para a cepa mutante, tendo sido concluído que o esfingolipídeo glicosilceramida é o alvo membranar da defensina *PvD1r* na cepa selvagem de *C. albicans*.

3.4. Proteínas transportadoras de lipídeos

As LTPs são peptídeos que apresentam caráter básico em pH fisiológico, baixa massa molecular, ricos em cisteínas, sendo encontrados nas plantas, assim como outros tipos de AMPs, em todas as suas partes, desde a semente até as flores, frutos, raízes e folhas. Na maioria das vezes, são localizadas em tecidos embrionários (Quin *et al.*, 2011; Finkina *et al.*, 2016).

As LTPs vegetais foram descobertas na década 1970 em tubérculos de batata, sendo assim nomeadas por sua capacidade de se ligar e transportar fosfolipídeos de uma membrana doadora para uma aceptora *in vitro* (Kader, 1975). A localização das LTPs nas células é dependente da espécie vegetal, mas normalmente são sintetizadas com um peptídeo sinal que as direciona para o espaço extracelular onde podem se associar com a parede celular ou permanecer no ambiente extracelular (Carvalho e Gomes, 2007). Algumas LTPs fogem à regra e se estabelecem em diferentes organelas, como glioxissomos (Tsuboi *et al.*, 1992), inclusões de grânulos (Dubreil *et al.*, 1998), vacúolos, parede celular

(Carvalho *et al.*, 2004), cloroplasto (Nishimura *et al.*, 2008) e vesículas (Diz *et al.*, 2011).

As LTPs são subdivididas em duas famílias: a família do tipo 1 (LTP1s) e a família do tipo 2 (LTP2s). As LTPs do tipo 1 são as mais bem caracterizadas, têm aproximadamente 10 kDa, ponto isoelétrico entre 9 e 10, apresentando 90 a 95 resíduos de aminoácidos e oito resíduos de cisteínas em posições conservadas ao longo da cadeia polipeptídica. As LTPs do tipo 2 são menores, tendo aproximadamente 7 kDa em média, 70 resíduos de aminoácidos, quatro pontes dissulfeto conservadas e pI também entre 9 e 10. Ambas as LTPs têm padrões conservados de oito resíduos de cisteínas, que estabilizam a estrutura, porém o padrão de organização dos pareamentos dos resíduos de cisteínas é diferente entre as famílias (Kader, 1996) (Figura 3). A estrutura das LTPs de ambas as famílias é dominada por α -hélices, sendo quatro α -hélices nas LTP1s e três α -hélices e duas voltas simples nas LTP2s. Para ambos os peptídeos, destaca-se na estrutura tridimensional uma cavidade interna hidrofóbica que corresponde ao sítio de ligação de lipídeos, sendo que nas LTP1s ela apresenta forma de túnel com duas aberturas, uma maior e uma menor. Já nas LTP2s, esta cavidade é em forma de uma cadeia triangular, sendo, no entanto, mais flexível, permitindo a ligação de moléculas lipídicas maiores do que é possível para as LTP1s (Benko-Iseppon *et al.*, 2010; Cândido *et al.*, 2014).

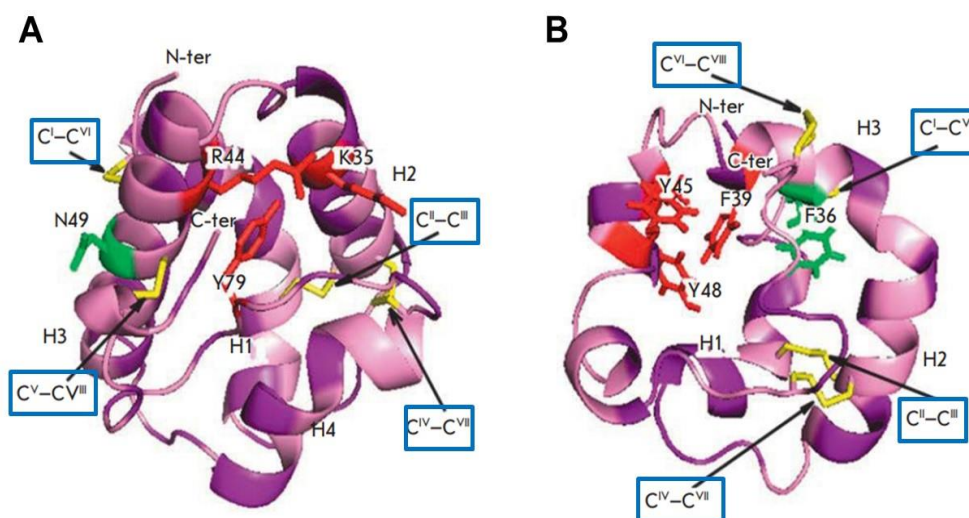


Figura 3 – Representação esquemática da estrutura espacial da LTP1 (A) e LTP2 (B) de *Oryza sativa*. Os números da identificação das α -hélices são especificados (H1–H4). Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos são mostrados em roxo; resíduos interagindo com ligantes lipídicos são mostrados em vermelho; as pontes de dissulfeto estão marcadas em amarelo; o resíduo central no fragmento $-C^VXC^VI-$, direcionado para fora ou para dentro da molécula de proteína, é mostrado em verde. Os oito resíduos de cisteínas conservados estão destacados em azul (Adaptado de Finkina *et al.*, 2016).

A função biológica das LTPs em plantas ainda não é clara, entretanto, devido à atividade de transporte de lipídeos associados a estudos de expressão e localização, já foi mostrado que estas proteínas estão relacionadas a diferentes funções, como síntese de cutina (Lee *et al.*, 2009), embriogênese somática (Coutos-Thevenot *et al.*, 1993), adaptação das plantas a várias condições ambientais (Jung *et al.*, 2003), atividade inibitória sobre α -amilase *in vitro* (Diz *et al.*, 2011) e atividades antimicrobiana (Segura *et al.*, 1993; Kristensen *et al.*, 2000). Entretanto, é por meio da atividade de ligação e transporte de lipídeos e das atividades antimicrobianas *in vitro* que melhor se compreende a relação estrutura-função destes peptídeos (Carvalho e Gomes, 2007).

Muitas LTPs de plantas têm atividade antimicrobiana e inibem o crescimento de bactérias e fungos como *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas solanacearum*, *P. syringae*, *Alternaria brassicola*, *Ascochyta pisi*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* etc.

(Finkina *et al.*, 2016). Apesar de vários trabalhos mostrarem a atividade antimicrobiana das LTPs, pouco se conhece do seu mecanismo de ação. Acredita-se que as LTPs interajam com membranas celulares. Regente *et al.*, (2005) mostraram pela primeira vez a capacidade de uma LTP de girassol, denominada *Ha-AP10*, permeabilizar a membrana do fungo *F. solani*, sugerindo, deste modo, ação das LTPs sobre membranas fúngicas, pois assim como outros AMPs, as LTPs devem se ligar à membrana do fitopatógeno por meio de interações eletrostáticas e causar desestabilização e permeabilização da membrana. Diz *et al.*, (2011) e Zottich *et al.*, (2011) isolaram duas LTPs de plantas. Uma de sementes de pimenta (*C. annuum*), a *CaLTP*, que apresentou atividade antimicrobiana sobre o fungo *C. lindemuthianum* e a levedura *Candida tropicalis*, e outra de sementes de café (*Coffea canephora*), a *Cc-LTP*, que foi ativa contra diferentes leveduras do gênero *Candida*, tendo ambas sido capazes de promover a permeabilização das membranas desses microrganismos. *CaLTP* e *Cc-LTP* foram também capazes de inibir a atividade da enzima α -amilase salivar humana *in vitro*, habilidade descrita pela primeira vez para as LTPs. Mais recentemente, Silva *et al.*, (2018) caracterizaram a atividade inibidora da α -amilase salivar humana e de α -amilases intestinais de *Callosobruchus maculatus* pela LTP, isolada de plantas de *Vigna unguiculata*, denominada *Vu-LTP*, bem como a atividade de cinco peptídeos sintetizados, oriundos da estrutura da *Vu-LTP*. Foi relatado que dois peptídeos, com estruturas específicas, são responsáveis pela inibição da α -amilase salivar humana.

3.5. Fluconazol

Os derivados azóis representam o grupo de medicamentos antifúngicos mais utilizados pelo mundo, sendo compostos totalmente sintéticos, caracterizados por um anel pentagonal na estrutura molecular, que contém átomos de carbono e hidrogênio, geralmente com ação fungistática sobre determinados fungos. O fluconazol (FLC), desenvolvido em 1982 e licenciado em 1990, é um fármaco antifúngico triazólico (contém três átomos de carbono e três de hidrogênio) de amplo espectro, com efeito contra uma variedade de fungos que causam tanto micoses superficiais quanto sistêmicas em humanos (Adams, 2003; Cha e Sobel, 2004).

O mecanismo de ação dos derivados azólicos se dá pelo bloqueio da incorporação do acetato de ergosterol, inibindo a lanosterol 14- α -esterol demetilase ou *ERG11p*, por interferência no citocromo P-450, levando ao acúmulo de um estero intermediário na via de biossíntese do ergosterol, o 14- α -metil-3,6-diol, que é tóxico à membrana do fungo (Figura 4). Este metilesterol não tem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol, e seu acúmulo na membrana plasmática do fungo leva à formação de uma membrana com propriedades alteradas, prejudicando as funções básicas, necessárias a seu desenvolvimento (Sheehan *et al.*, 1999; Cowen, 2008).

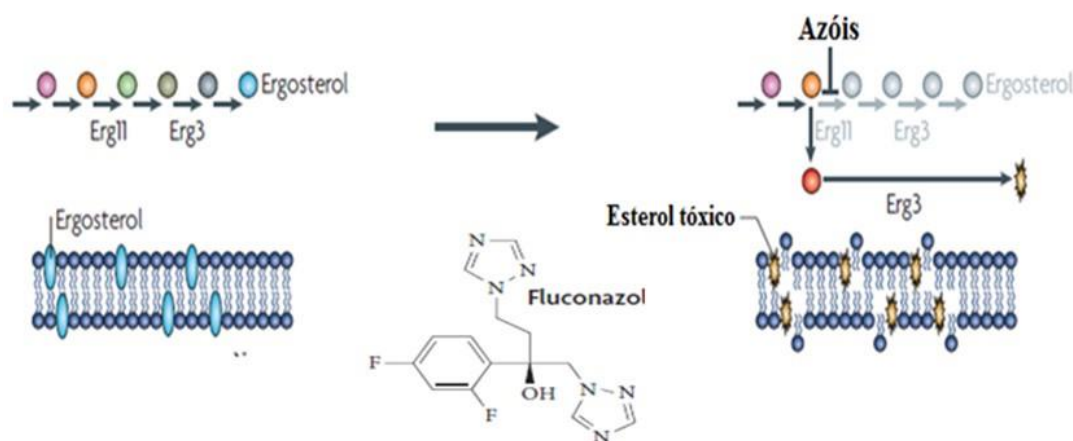


Figura 4 – Representação esquemática do modo de ação dos azóis. Azóis tais como o FLC inibem *ERG11p*, causando o bloqueio da produção de ergosterol e levando ao acúmulo de um estero intermediário tóxico para as células fúngicas (Adaptado de Cowen, 2008).

Entre as drogas de escolha, o FLC vem como o agente antifúngico preferido para o tratamento de infecções tanto tópicas quanto sistêmicas causadas por *Candida sp.* Esse fator pode ser atribuído à sua estabilidade metabólica, alta solubilidade em água, boa tolerabilidade, baixo custo, possibilidade de administração via oral (Grant e Clissold, 1990) e capacidade de penetrar no sistema nervoso central (Eschenauer *et al.*, 2013). Apesar de sua eficácia e segurança em comparação aos seus antecessores, o FLC tem limitações que, mesmo poucas, são extremamente importantes e vêm restringindo e defasando a eficácia deste medicamento. Essas limitações estão relacionadas à

sua interação com outros medicamentos, o que leva a efeitos colaterais graves, sua falta de atividade contra fungos filamentosos, e ao crescente aparecimento de cepas resistentes (Fica, 2004).

Devido ao seu mecanismo de ação, o FLC afeta o metabolismo de outros compostos pela sua interferência em diferentes isoenzimas do complexo citocromo P-450 humano, alterando seus níveis plasmáticos, levando ao surgimento de diversos efeitos colaterais. Sua combinação com certos medicamentos pode causar efeitos indesejáveis graves pelo aumento ou redução na sua biodisponibilidade (Colombo *et al.*, 2002; Moreira, 2010). Mas essa é uma das menores limitações do FLC, seu maior problema está no surgimento cada vez maior de cepas resistentes a este medicamento (Silva *et al.*, 2012). A resistência primária de leveduras aos derivados azóis é atribuída principalmente ao fenômeno de efluxo, em que a perda da droga no interior celular acontece pelo transporte ativo, sendo mediada pela glicoproteína P ou por outras proteínas como MFS (principal superfamília facilitadora) (Santos-Jr *et al.*, 2005; Cannon *et al.*, 2009). Mutações no gene *ERG11* podem causar resistência pela diminuição da ligação do FLC à enzima alvo (Kakeya *et al.*, 2003). Pode ocorrer também a síntese aumentada de 14- α -demetilase, em razão da amplificação do gene, desta forma, a transformação de lanosterol em ergosterol não é totalmente impedida quando sob a ação do derivado azólico (Nenoff *et al.*, 1999). A utilização profilática do FLC, seu uso prolongado, além da utilização inadequada, são fatores que contribuem para o aumento da ocorrência de resistência de diversos fungos a este antifúngico, destacando-se as espécies do gênero *Candida*, em especial, *C. albicans* (Spampinato e Leonardi, 2013; Cuenca-Estrella, 2014).

3.6 - Gênero *Capsicum*

As pimentas do gênero *Capsicum* pertencem à Divisão Spermatophyta, Filo Angiospermae, Classe Dicotiledoneae, Ordem Solanales e Família Solanaceae (Andrews, 1995). A pimenteira é uma planta arbustiva, no entanto, sua altura e forma de crescimento variam de acordo com a espécie e as condições de cultivo (Filgueira, 2013). As espécies são tradicionalmente identificadas e diferenciadas pelas suas características morfológicas. O sistema radicular é pivotante, com um número elevado de ramificações laterais, podendo chegar a profundidades de 70-120 cm. Suas folhas apresentam tamanho, coloração, formato e pilosidade

variáveis. A coloração é tipicamente verde, mas existem folhas violetas e variegadas; quanto ao formato, pode variar de ovalado, lanceolado a deltoide (Carvalho, 2007; Costa e Henz, 2007). A morfologia da flor, incluindo a cor, constrição do cálice e número de flores por axila, são as mais utilizadas nas descrições taxonômicas (Ince *et al.*, 2009). São autógamas, com flores hermafroditas, com 24 cromossomos, mas outras espécies, principalmente as silvestres, podem apresentar 26 cromossomos (Moscone *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2010). Diferenças no número de cromossomos podem ocorrer em plantas da mesma espécie ou plantas de espécies diferentes (Pozzobon *et al.*, 2006). Para uma descrição mais precisa do germoplasma, outras características são consideradas essenciais, tais como as indicadas pelo *Internacional Plant Genetic Resources Institute* (1995). Já o perfil químico da pimenta varia de acordo com as espécies, sazonalidade, condições ambientais e até mesmo com o ciclo de vida da planta. A pimenteira se adapta muito bem aos climas quentes, sendo sensível a baixas temperaturas, não tolerando geadas. Por isso deve ser cultivada nos meses de calor (Das *et al.*, 2016).

Neste gênero, nativo das Américas, 35 espécies já foram descritas, mas apenas cinco delas são consideradas domesticadas: *Capsicum annum* var. *annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*; *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, e *C. pubescens*. No entanto, espera-se que novas espécies de *Capsicum* sejam identificadas, especialmente em áreas de mata Atlântica no Brasil (Antonio *et al.*, 2018). Estima-se que a produção de pimentas no Brasil compreenda uma área cultivada anualmente de, aproximadamente, cinco mil hectares e produção em torno de 75 mil toneladas/ano (Reifschneider *et al.*, 2015). Em relação ao mercado internacional, de toda a área cultivada com pimentas, aproximadamente 89% está no Continente Asiático, sendo a Índia, Coreia, Tailândia, China, Vietnã, Sri Lanka e Indonésia as principais áreas de cultivo. Os Estados Unidos e o México compreendem cerca de 7% do total cultivado, enquanto 4% está nos países da Europa, África e Oriente Médio (Rufino e Pentead, 2006).

As múltiplas formas de uso dos frutos de pimenta estão relacionadas a aspectos multiculturais e étnicos e resultam, provavelmente, da diversidade genética observada em cada região do país, sendo neste aspecto o Brasil considerado um dos grandes centros de diversidade de *Capsicum* (Sudré *et al.*, 2010; Antonio *et al.*, 2018). Os frutos de pimenta fornecem um alto valor

nutricional e são uma rica fonte de vitaminas A, B e C, ferro, potássio, magnésio, beta-caroteno, ácido fólico e fibras. Além do mais, são utilizados como matéria-prima para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Bento *et al.*, 2007; Büttow *et al.*, 2010). São utilizados no preparo de alimentos, no processamento de conservas e na indústria de embutidos. Os frutos também são comercializados na forma de geleias, molhos e “*blends*” (vidros com misturas de frutos usados como peças para decoração) (Nascimento *et al.*, 2012; Hulse-Kemp *et al.*, 2016). Uma característica do gênero *Capsicum* é a pungência atribuída à presença de alcaloides, mais precisamente de dois capsaicinoides, a diidrocapsaicina e capsaicina. Tais alcaloides se acumulam na superfície da placenta e são liberados quando o fruto sofre qualquer dano físico (Rêgo *et al.*, 2012). A aplicação farmacêutica da capsaicina é atribuída a suas propriedades antioxidantes, anticancerígenas, antiartrites e analgésicas (Akbar *et al.*, 2010).

A espécie *C. annuum* compreende plantas de fácil cultivo, vigorosas e de ótima produtividade, representando uma das espécies de pimenta mais conhecidas e difundidas no mundo (EMBRAPA, 2012). A variedade *C. annuum* é largamente utilizada na indústria de alimentos em razão de suas propriedades corantes e aromatizantes (Romo-Hualde *et al.*, 2012). Dentro da espécie *C. chinense*, estão incluídas algumas das pimentas mais picantes do mundo. Foi originalmente encontrada na bacia do Rio Amazonas, estando comercialmente distribuída por todo o Sul e Norte do Brasil, em virtude de sua adaptabilidade a diferentes solos e climas e a seu popular aroma cítrico (Figura 5). Os frutos desta espécie apresentam uma enorme variabilidade em tamanho, forma e cor, com diferentes intensidades, indo desde o amarelo até o marrom, quando maduros. *C. chinense* apresenta três a cinco pedicelos por nó, folhas rugosas, corola branca opaca ou verde, com sementes onduladas nas margens (Jarret e Berke, 2008; Yamamoto *et al.*, 2014).



Figura 5 – Imagens de pimentas do gênero *Capsicum*. (A) Frutos de *Capsicum annuum* var. *annuum* (acesso UENF 1381), de origem mexicana e conhecidos como Jalapeño, e (B) *C. chinense* Jacq. (acesso UENF 1755), conhecidos como pimenta chocolate.

Um dos aspectos mais relevantes das espécies de *Capsicum*, incluindo *C. annuum* e *C. chinense*, está relacionado à sua ampla utilização, embora estas plantas estejam propensas a vários tipos diferentes de doenças que limitam sua produção. Alguns dos elementos que causam doenças nessas plantas são os fungos, bactérias e vírus. A maioria das doenças de *Capsicum* apresentam sintomas nas folhas e frutos, como podridão, murcha, escurecimento e manchas. A antracnose, por exemplo, é uma doença de etiologia complexa, causada por diferentes espécies de fungo do gênero *Colletotrichum*. Esta doença causa lesões circulares pequenas nos frutos, mas que podem aumentar e cobrir a maior parte da superfície do fruto. Essas lesões também podem ocorrer nas folhas e caules e aparecer manchas cinzentas com margens escuras, comprometendo, assim, a qualidade planta por completo (Blat *et al.*, 2005; Kleemann *et al.*, 2012). Fungos do gênero *Fusarium* também são causadores de muitos danos a esta cultura, como clorose e murchamento foliar, podridão do caule; na pós-colheita, o pedúnculo dos frutos é atacado pelo fungo, causando podridão, comprometendo o desenvolvimento e a qualidade visual dos frutos (EMBRAPA, 2009). Em relação ao controle desses microrganismos causadores de doenças, na maioria das vezes é feito com o uso intensivo de agrotóxicos. Com isso, vem aumentando a demanda por novas cultivares ou alternativas de controle que associem resistência às pragas e doenças com qualidade e produtividade, sobretudo para atender o processamento industrial (Bento *et al.*, 2007).

Atualmente vários são os genes identificados em plantas do gênero *Capsicum*, em especial *C. annuum*, relacionados à expressão de proteínas de defesa com atividade contra diferentes espécies de microrganismos. Em 2001, Shin e colaboradores mostraram que folhas de pimenta infectadas com o vírus do mosaico do tabaco apresentam maior expressão de genes de proteínas relacionadas à patogênese (PRs). Entre os genes de defesa sintetizados, foram detectados um gene para proteinase cisteínica, dois para inibidores de proteinases serínica e um para LTP. Em relação à atividade antimicrobiana *in vitro*, Ribeiro e colaboradores (2007) mostraram que AMPs isolados de sementes de *C. annuum* foram capazes de inibir o crescimento de leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Kluyveromyces*, além de provocar alterações morfológicas em suas estruturas. Diz *et al.*, (2011) caracterizaram uma LTP de sementes de *C. annuum*, presente na fração F1, denominada Ca-LTP1, localizada

em vesículas densas. Ca-LTP1 apresentou atividade inibitória sobre o crescimento do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* e principalmente sobre a levedura *Candida tropicalis*, levando a alterações morfológicas como a formação de pseudo-hifas.

Taveira *et al.*, (2014) isolaram e caracterizaram dois peptídeos similares à tionina de plantas, denominados de fração F1 e fração F3, de frutos de *C. annuum*. A fração F1 foi capaz de inibir aproximadamente 100% do crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e 100% do crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esta fração ainda inibiu a acidificação do meio induzido por glicose em células de *S. cerevisiae* em aproximadamente 78%. Já a fração F3 inibiu 100% do crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*. Foi mostrado ainda que ambos os peptídeos induziram alterações nas membranas de todas as cepas de leveduras testadas, conduzindo à sua permeabilização. Em 2016, Taveira e colaboradores renomearam a fração F1 para CaThi (*Capsicum annuum* thionin-like peptide) e mostraram sua atividade antimicrobiana sobre seis espécies de *Candida* patogênicas (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida buinensis* e *Candida mogii*). CaThi ainda foi capaz de causar dissipação do potencial da membrana mitocondrial, ativação de caspases e alteração do fluxo de H⁺ em células *C. tropicalis*. E quando testada em sinergismo com a droga, FLC inibiu o crescimento de todas as leveduras testadas, atingindo 100% de inibição em *C. parapsilosis*, com concentrações inferiores a IC₅₀. Já em 2017, Taveira *et al.*, demonstraram a capacidade da CaThi em inibir 83% o desenvolvimento do fungo *Fusarium solani*, e quando testada em sinergismo com o FLC, inibiu 100% do crescimento deste mesmo fungo. Dias *et al.*, (2013) mostraram o isolamento e a caracterização de peptídeos de sementes de *C. chinense* Jacq. analisados em relação às suas toxicidades sobre um conjunto diversificado de espécies de leveduras. Frações enriquecidas em peptídeos, denominadas PEF1, PEF2 e PEF3, exibiram atividade antifúngica contra diferentes leveduras. Sequências N-terminais de PEF2 e PEF3 foram mostradas ser altamente homólogas com sequências de inibidores de proteinases (IP) serínicas, quando analisados com base em bancos de dados comparativos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais Biológicos

4.1.1. Obtenção dos frutos de pimenta

As sementes de *Capsicum annuum* L. (acesso UENF 1381) e *Capsicum chinense* Jacq. (acesso UENF 1755) foram fornecidas pela prof^a. Dr^a. Rosana Rodrigues, responsável pelo banco de germoplasma do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

Para o plantio, as sementes foram semeadas em bandeja de isopor com 72 células (2310, Isoterm), contendo substrato comercial NPK 4/14/8, mantidas em câmara de crescimento por aproximadamente 21 dias, com temperatura controlada de 28 °C a 80% de umidade relativa, com fotoperíodo de 16 h para o dia e 8 h para a noite. Após o surgimento de dois pares de folhas definitivas, as mudas foram transplantadas em vasos de 5 L, contendo uma mistura de terra, areia e esterco bovino, na proporção de 1:1:1. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, utilizando espaçamento de 1,0 x 0,5 m entre os vasos.

Nós obtivemos os frutos completamente maduros (na coloração mostrada na Figura 5) de *C. annuum* com aproximadamente 30 dias após a antese, e para *C. chinense* os frutos foram colhidos com aproximadamente 50 dias após a antese. O experimento foi conduzido de agosto de 2016 a fevereiro de 2018, com as plantas sendo irrigadas uma vez ao dia com água.

4.1.2. Obtenção dos peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇

Ao identificarmos a sequência de aminoácidos correspondentes ao fragmento da LTP contida no peptídeo Cc-LTP4b de *C. chinense*, notamos que havia duas regiões desta sequência obtida, que eram similares a VuLTP, uma LTP de *Vigna unguiculata* com atividade sobre leveduras (resultados prévios obtidos pelo nosso grupo). Desta forma, selecionamos estas duas regiões similares a VuLTP, sintetizamos comercialmente e, assim, obtivemos os peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ (as letras e os números representam a região selecionada para a síntese). Ambos os peptídeos foram obtidos comercialmente pela empresa Aminotech (São Paulo). Um miligrama dos peptídeos sintéticos foi solubilizado em água ultrapura, filtrado (Millex-GV, Millipore) e avaliado nos ensaios de atividade antimicrobiana.

4.1.3. Microrganismos

Os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* (5845), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (3900) *Fusarium solani* (4014), *Colletotrichum lindemuthianum* (5771) e *Colletotrichum gloeosporioides* (5522) foram mantidos e cultivados em ágar Sabouraud (10 g/L de peptona, 2 g/L de glicose, 20 g/L de ágar) (Merck) no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

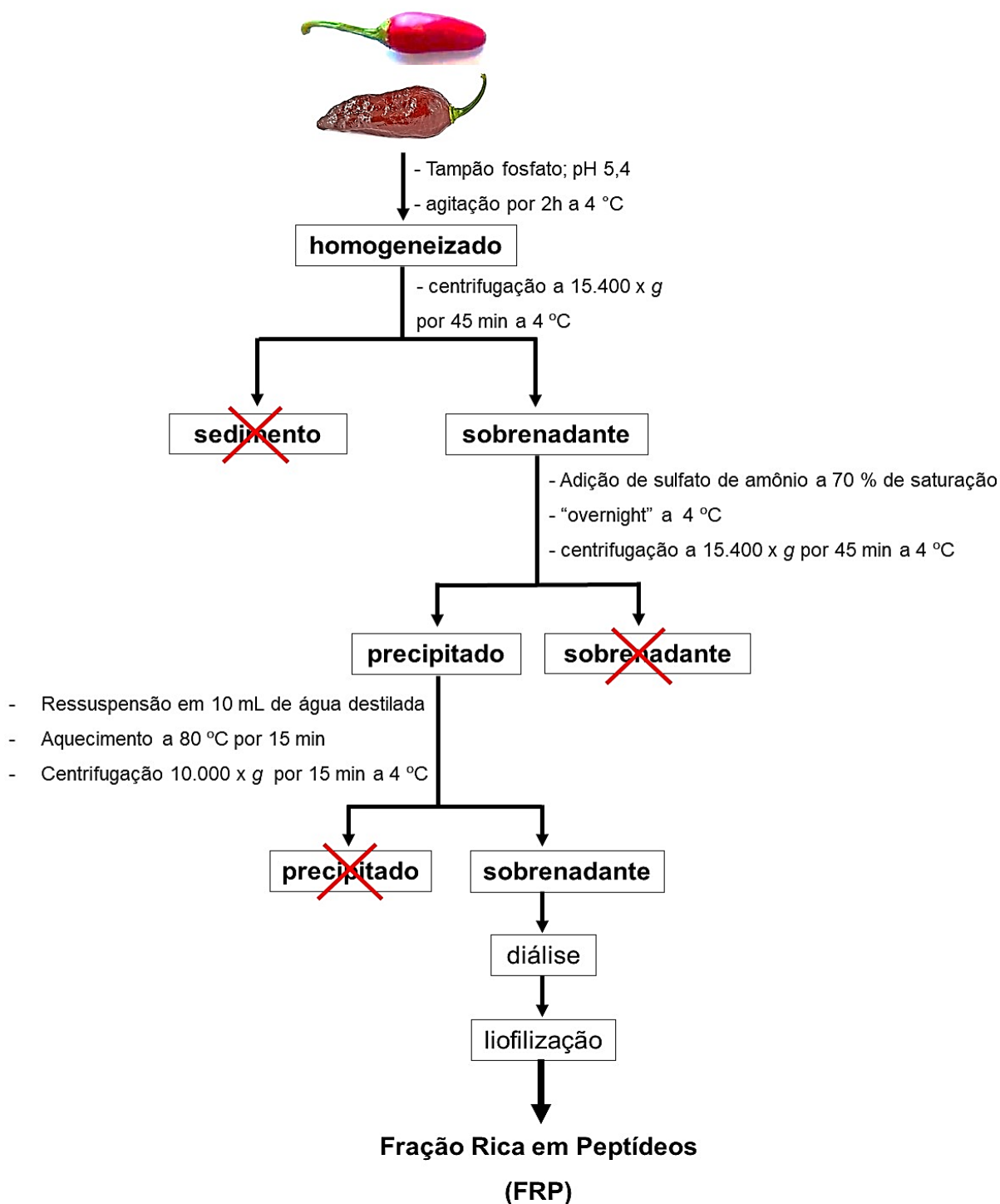
A bactéria *Xanthomonas euvesicatoria*, isolado T1P3 (ENA – 4135), foi cultivada e mantida em meio de cultura DYGS (2 g/L de glicose, 1,5 g/L de peptona, 1,5 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L K₂HPO₄, 1,5 g/L de ácido glutâmico, 0,5 g/L de MgSO₄, 18 g/L de ágar) no LMGV, no CCTA, UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

4.2. Purificação e caracterização dos peptídeos dos frutos de pimenta

4.2.1. Extração de proteínas dos frutos

A extração proteica dos frutos de *C. annuum* e *C. chinense* foi feita separadamente para cada espécie de fruto, conforme método descrito por Taveira *et al.*, (2014). Inicialmente, oitenta gramas de frutos maduros (sem sementes) foram triturados em 400 mL de tampão de extração (NaH₂PO₄ 15 mM; Na₂HPO₄

10 mM; KCl 100 mM; KCl 1,5 mM; EDTA 1,5% e pH 5,4) (Sigma-Aldrich), com auxílio de um multiprocessador (Mix 3x1, Philips), até obter um homogenato. Este homogenato foi mantido sob agitação por 2 h (a 4 °C) e depois centrifugado a 15.400 x g (5430R, Eppendorf) durante 45 min a 4 °C. Ao sobrenadante obtido, foi adicionado sulfato de amônio (Merck) a 0-70% de saturação. O material foi mantido por 16 h a 4 °C. Posteriormente, foi centrifugado (sob as mesmas condições), e o precipitado resultante foi ressuspenso em 10 mL de água destilada e aquecido a 80 °C por 15 min em banho maria (Quimis). A suspensão resultante foi clarificada por centrifugação (10.000 x g por 30 min a 4 °C), o sobrenadante foi extensivamente dialisado contra água destilada (membranas com poros de 1.000 Da, Sigma-Aldrich), liofilizado (K105, Liotop) e denominado fração rica em peptídeos (FRP) (Esquema 1).



Esquema 1 – Representação esquemática da extração e fracionamento das proteínas dos frutos de pimenta da espécie *Capsicum annuum* L. (acesso UENF 1381) ou *C. chinense* (UENF 1755) (Taveira *et al.*, 2014).

4.2.2. Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

Após a extração proteica dos frutos de pimenta, foi obtido a fração FRP, e o fracionamento dos peptídeos contidos nesta fração foi obtido por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (Promenence, Shimadzu).

Para os peptídeos extraídos dos frutos de *C. annuum*, a cromatografia ocorreu utilizando uma coluna C2/C18 (μ RPC C2C18, GE-Healthcare) acoplada a uma coluna guarda C8 (Pelliguard, 20 x 4,6 mm, Sigma- Aldrich), equilibrada com a solução A (0,1% de TFA). A fração FRP (400 μ g) foi solubilizada em 400 μ L da solução A, filtrada em filtro de 0,2 μ m (Millex-GV, Millipore), segundo metodologia descrita por Taveira *et al.*, (2014). A cromatografia foi desenvolvida utilizando um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, numa temperatura de 38 °C. A eluição das amostras foi feita em gradiente de solução B (propanol até 100% em 0,1% de TFA) do seguinte modo: 0% da solução B por 15 min, de 0 a 40% da solução B por 57 min, de 40 a 50% da solução B por 1 min, 50% da solução B por 1 min, 0% da solução B por 9 min. A coluna foi lavada com TFA 0,1% e água ultrapura (solução A), em seguida, um gradiente linear foi formado pela adição da solução B. A eluição das proteínas na coluna foi acompanhada por absorbâncias lidas a 220 \pm 4 nm em um detector de arranjo de diodo (SPD-M20A, Shimadzu).

Já os peptídeos contidos na fração FRP obtidos dos frutos de *C. chinense* foram fracionados em coluna de fase reversa C18 (Shim-pack VP-ODS, Shimadzu), acoplada a uma pré-coluna C8 (Pelliguard, Sigma- Aldrich), de acordo com o método descrito por Maracahipes *et al.*, (2019a), com modificações. A coluna foi equilibrada e eluída com solvente A (TFA 0,1%, Sigma-Aldrich), e água ultrapura, durante os primeiros 2 min, depois de 0 a 10% de solvente B (propanol 100%, Merck, em TFA 0,1%) por 8 min. Por 94 min, a concentração de solvente B aumentou de 10% para 50% e foi mantida nessa concentração por 2 min e, finalmente, a concentração de solvente B foi reduzida para 0% e mantida nessa concentração até o final da corrida a 110 min. A eluição da coluna foi acompanhada por um detector de arranjo de diodo (SPD-M20A, Shimadzu), sendo as absorbâncias lidas a 220 \pm 4 nm, utilizando um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, numa temperatura de 38 °C.

Após serem coletadas, as frações, tanto de *C. annuum* quanto as de *C. chinense*, foram concentradas por liofilização, separadamente.

4.2.3. Quantificação de proteínas

As determinações quantitativas das proteínas foram feitas conforme método descrito por Smith *et al.*, (1985) modificado. A ovalbumina (Sigma-Aldrich) foi utilizada como proteína padrão.

4.2.4. Eletroforese por tricina-SDS-PAGE

Todo o processo de purificação foi monitorado por eletroforese descontínua, sob condições desnaturantes, em tricina-SDS-PAGE (Schägger e Von Jagow, 1987). Foi utilizado o sistema de gel (Mini Protean Tetra System, Biorad) com placas de vidro de 8x10 cm e 7x10 cm, espaçadores de 0,75 mm. O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4% de acrilamida/bis-acrilamida e o gel de concentração, numa concentração de 3,9% de acrilamida/bis-acrilamida.

4.2.4.1. Preparo das amostras e condições de corrida

As amostras contendo as proteínas de interesse (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram acrescidas de tampão de amostra concentrado duas vezes (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 2,5%; sacarose 15%; azul de bromofenol 0,25%; β -mercaptoetanol 5%), aquecidas por 5 min a 100 °C e, posteriormente, centrifugadas a 16.000 x g por 5 min a temperatura ambiente. Após este procedimento, o volume correspondente das amostras foi aplicado no gel de concentração. Para a corrida, foram utilizados tampão catodo (Tricina 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M pH 8,31; SDS 0,1%) e tampão anodo (Tris-HCl 0,2 M pH 8,9; SDS 0,2%). A eletroforese transcorreu por 16 h, aproximadamente, em uma corrente de 24 V. Para estimar a massa molecular dos peptídeos, foi usado marcador de massa molecular em kDa: 26.6, 17.0, 14.2, 6.5, 3.4, 1.0 (Ultra low Ranger Molecular Weight Marker, Sigma-Aldrich).

4.2.4.2. Coloração e Descoloração do gel

Para a visualização das proteínas obtidas dos frutos de *C. annuum*, o gel foi corado com Coomassie Blue (Sigma-Aldrich), conforme instruções do fabricante. Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente colocado em uma solução de fixação (metanol 40% e ácido acético 10%) por 30 min, em seguida, colocado em uma solução de coloração (Coomassie Blue G 0,025%, ácido acético 10% em água destilada) sob agitação por aproximadamente 1 h. Após a

coloração, o gel foi transferido e mantido em solução descorante (ácido acético 10% em água destilada) até a visualização das bandas proteicas.

Para a visualização das proteínas obtidas dos frutos de *C. chinense*, o gel foi precipitado com nitrato de prata, segundo metodologia descrita por Morrissey (1981). Após o término da corrida, o gel foi incubado por 40 min na solução 1 (ácido acético 10%, etanol 4%). Após este período, o gel foi lavado por 2 min em água ultrapura, em seguida, incubado por 20 min na solução 2 (glutaraldeído 2%). O gel foi lavado por duas vezes de 10 min em água ultrapura e incubado na solução 3 (etanol 60%) por 20 min. Então, o gel foi incubado por 20 min na solução de coloração (etanol 20%, nitrato de prata 1%, hidróxido de amônio 30% e NaOH 40%), em seguida, lavado por duas vezes de 10 min na solução três. Posteriormente, o gel foi incubado na solução reveladora (etanol 20%, formaldeído 37%, ácido cítrico 5,75 mM) até ser obtida a coloração desejada. A coloração foi fixada com uma solução de fixação (ácido acético 10%, 0,5 mL de glicerol) por 10 min, em seguida, o gel foi armazenado em água destilada.

A digitalização dos géis foi feita por fotodocumentador (LAS 500, GE-Healthcare).

4.2.5. Identificação de peptídeos por espectrometria de massas

Foi feita a identificação da sequência de aminoácidos apenas para os peptídeos presentes nas frações obtidas dos frutos de *C. chinense*, em razão da maior atividade antimicrobiana apresentada por elas. Após a separação por eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Blue (Sigma- Aldrich), conforme descrito no item 4.2.4.2. Após a descoloração do gel, as bandas peptídicas do nosso interesse foram excisadas do gel e submetidas à digestão por tripsina, posteriormente, analisada por espectrometria de massas (León *et al.*, 2007). Em resumo, a digestão dos peptídeos pela tripsina foi primeiro cocristalizada com 0,3 μ L de matriz α -ciano-4-ácido hidroxí cinâmico (CHCA) antes de ser analisada por dessorção/ionização a laser assistida por matriz seguida de espectrometria de massas por tempo de voo (MALDI-TOF-MS). O instrumento utilizado foi um AB SCIEX TOF/TOFTM 5800 *System spectrometer* (AB SCIEX) em modo reflexão. A comparação da sequência de aminoácidos obtida e o alinhamento foram feitos utilizando o algoritmo do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.org/Blast>) e do Clustal (<http://www.expasy.org>) (Altschul *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1994).

4.3. Análise da atividade e mecanismo de ação dos peptídeos

As metodologias referentes à atividade e ao mecanismo de ação dos peptídeos, tanto obtidos dos frutos de *C. annuum* e *C. chinense* quanto dos peptídeos sintéticos, foram similares. Dessa forma, será apresentada de uma forma geral.

4.3.1. Antibiograma

Procedemos ao ensaio de antibiograma apenas com as frações obtidas dos frutos de *C. chinense* em razão da sua maior rentabilidade e disponibilidade. Primeiramente, para avaliar o efeito dessas frações sobre o crescimento da bactéria *X. euvesicatoria*, ela foi cultivada em 30 mL de meio líquido DYGS sob agitação de 100 rpm por um período de 24 h a 28 °C. Após este período, uma alíquota (100 µL) deste meio enriquecido com a bactéria foi transferida para um Erlenmeyer contendo 30 mL de meio DYGS semi-sólido (com ágar 0,8%) pré-aquecido a 40 °C. A mistura foi vertida em placas de Petri (60 × 15 mm) e, após a solidificação do meio, colocados discos de papel filtro (aproximadamente 6 mm de diâmetro) carregados com 5 µL das diferentes frações (na concentração que 300 µg.mL⁻¹). Em um dos discos, foram adicionados 5 µL de água para estabelecer um controle, uma vez que as frações também foram diluídas em água. A inibição do crescimento bacteriano foi visualizada como uma zona clara ao redor do disco de papel contendo as frações. As placas foram avaliadas após um período de 48 h, utilizando um paquímetro eletrônico digital (Stainless Hardened), conforme descrito por Filho e Romeiro (2009).

4.3.2. Obtenção dos esporos fúngicos e ensaio de inibição do crescimento de fungos filamentosos

Os fungos filamentosos foram transferidos do estoque e postos para crescer em placas de Petri contendo ágar Sabouraud (Merck) por 11 dias a 30 °C. Após o crescimento, 10 mL de caldo Sabouraud (10 g/L de peptona, 2 g/L de glicose) (Merck) foram vertidos sobre a placa contendo os fungos, e os esporos foram suavemente liberados com o auxílio de uma alça de Drigalski. Esta

suspensão foi filtrada em gase para evitar a passagem de restos miceliais. Os esporos foram quantificados em uma câmara de Neubauer (LaborOptik) com auxílio de um microscópio óptico (Axio Imager.A2, Zeiss). Posteriormente, os esporos fúngicos ($2000 \text{ células.mL}^{-1}$) foram incubados em 200 μL de caldo Sabouraud contendo diferentes concentrações da fração FRP (obtida após extração de proteínas), ou das frações peptídicas (obtidas após cromatografia em HPLC) dos frutos de pimenta ou dos peptídeos sintéticos (obtidos comercialmente). O ensaio foi feito em placas de cultura de células (96 poços) (NUNC, Nunclon Surface), incubadas a 30 °C por um período de 24 ou 30 h, dependendo do crescimento das espécies de fungos testadas. Para a observação da inibição do crescimento dos fungos, foi determinada a densidade óptica (DO), calculada por leituras em um leitor de microplacas (EZ Read 400, Research, Biochrom), num comprimento de onda de 620 nm.

Todo o ensaio foi feito em triplicata, em condições assépticas, em uma cobertura de fluxo laminar (Bioseg, Veco), de acordo com a metodologia descrita por Broekaert *et al.*, (1990).

4.3.3. Efeito dos peptídeos sobre a permeabilização de membrana fúngicas

A análise da capacidade de permeabilização de membrana fúngicas tratadas com as frações foi avaliada utilizando o corante fluorescente *Sytox Green* (Molecular Probes Invitrogen), conforme descrito por Thevissen *et al.*, (1999). Para *C. annuum*, todas as frações obtidas após cromatografia em sistema HPLC, que inibiram o crescimento dos fungos testados, foram analisadas quanto a seu efeito sobre a permeabilização da membrana. Já para *C. chinense*, fizemos este ensaio apenas com as frações que apresentaram maior atividade antimicrobiana sobre os fungos do gênero *Fusarium*. O experimento ocorreu da seguinte forma: após o ensaio de inibição do crescimento, os esporos dos fungos filamentosos foram avaliados através do *Sytox green*, um corante que tem alta afinidade por ácidos nucleicos e apenas penetra nas células quando sua membrana está comprometida. Assim, 100 μL da suspensão de células fúngicas crescidas na presença e na ausência de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações foram incubados ao abrigo de luz e sob agitação constante de 500 rpm por 15 min com o corante *Sytox green* (numa concentração final de 0,2 μM , de acordo com as instruções do fabricante). Em seguida, as células foram analisadas em microscópio óptico (Axio Imager.A2,

Zeiss), acoplado a uma câmera AxioCam MRc5 (Zeiss), e as imagens, analisadas pelo software Axiovision, versão 4.0 (Zeiss). O microscópio foi equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção de fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 e 490 nm e emissão de 500 nm). Todas as imagens de fluorescência foram obtidas com o mesmo tempo de exposição.

Para os peptídeos sintéticos, o efeito sobre a permeabilização da membrana foi observado apenas para os fungos *F. solani* e *F. oxysporum*, na concentração de 200 μM , conforme metodologia descrita acima.

4.3.4. Ensaio de determinação da indução de ROS intracelular

Investigamos se o mecanismo de ação das frações envolve a indução de estresse oxidativo. Após o ensaio de inibição do crescimento fúngico, 100 μL da suspensão de células fúngicas crescidas na presença e na ausência das frações obtidas dos frutos de pimenta (*C. annuum* ou de *C. chinense*) ou dos peptídeos sintéticos foram incubadas com 20 μM da sonda fluorescente H₂DCFDA, por 2 h, a 30 °C, com agitação constante de 500 rpm, como descrito por Mello *et al.*, (2011). A sonda H₂DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) (Calbiochem – EMD) é capaz de se difundir através da membrana plasmática das células e, ao ser hidrolisada por esterases intracelulares, forma uma molécula não fluorescente, entretanto, havendo aumento na produção de ROS, esta molécula irá reagir com o ROS intracelular, formando uma molécula fluorescente. Assim, após esse período, as células foram observadas e analisadas em microscópio como descrito no item 4.3.3, inclusive com o mesmo comprimento de onda de excitação e emissão.

4.3.5. Ensaio de detecção da atividade de caspases em células fúngicas

A detecção da atividade de caspases foi feita utilizando o Marcador *In Situ* CaspACE FITC-VAD-FMK (Promega), conforme descrito pelo fabricante. Este marcador é um análogo do inibidor de caspases Z-VAD-FMK (carbobenzoivalil-alanil-aspartil-[O-metil]-fluorometilcetona) que entra na célula e se liga irreversivelmente às caspases ativas. Após o ensaio de inibição, as células fúngicas (cultivadas na presença e na ausência de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações de *C. chinense*) foram ressuspensas e lavadas uma vez em 500 μL de PBS (NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 0.15 M) pH 7,4 e novamente ressuspensas em 50 μL de solução

de coloração (fornecida pelo kit), contendo 50 μM do marcador FITC-VAD-FMK. Após incubação por 20 min a 30 °C com agitação constante a 500 rpm, as células foram lavadas em 500 μL de PBS e ressuspensas em 20 μL de PBS. Em seguida, as células foram observadas e analisadas ao microscópio, como descrito no item 4.3.3.

4.3.6. Análise da funcionalidade mitocondrial em fungos filamentosos

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada pelo corante fluorescente Rodamina 123 (Sigma-Aldrich). A Rodamina 123 é um corante fluorescente, catiônico em pH fisiológico, que possui alta afinidade com o potencial elétrico de membranas. Por consequência, ele marca mitocôndrias ativas em células vivas, em razão do seu potencial de membrana, servindo como indicador de viabilidade celular, resultando em uma fluorescência vermelha brilhante, sendo a perda do potencial da membrana mitocondrial observada como uma diminuição da fluorescência. Após o ensaio de inibição do crescimento dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum*, as células fúngicas cultivadas na presença e na ausência das frações de *C. chinense* (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram ressuspensas e incubadas com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Rodamina 123 sob agitação constante a 500 rpm e ao abrigo de luz por 2 h, em seguida, analisadas por DIC num microscópio óptico equipado com um filtro de fluorescência (comprimento de onda de excitação de 506 nm, comprimento de onda de emissão de 530 nm). Todas as imagens de fluorescência foram obtidas com o mesmo tempo de exposição.

4.3.7. Ensaio de sinergismo dos peptídeos com FLC sobre fungos do gênero *Fusarium*

Após procedermos ao ensaio de mecanismo de ação, combinamos as frações peptídicas dos frutos de *C. annuum* com a droga FLC (Sigma-Aldrich) sobre o crescimento do fungo *F. solani* (selecionamos este fungo devido aos melhores resultados apresentados). Os peptídeos sintéticos também foram combinados com o FLC para a verificação de efeito sinérgico sobre fungos do gênero *Fusarium*.

Inicialmente, foi feita uma curva de concentração do FLC para a determinação da IC_{50} sobre os fungos. O ensaio foi feito como descrito no item 4.3.2, com as seguintes modificações: os esporos fúngicos foram incubados em

caldo Sabouraud contendo FLC (Sigma-Aldrich) nas concentrações da curva previamente definida de 256, 128, 64, 32, 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para o ensaio, o FLC foi utilizado na concentração de 3 mg.mL^{-1} , dissolvido em DMSO (Sigma-Aldrich) e filtrado (filtro de 0,2 μm , Millipore). Os cálculos para determinarmos a concentração de FLC capaz de inibir 50% do crescimento dos fungos (IC_{50}) foram feitos com o auxílio do programa estatístico GraphPrisma, conforme descrito no item 4.3.10.

Já para a determinação do efeito sinérgico, o ensaio foi feito como descrito no item 4.3.2, com as seguintes modificações: os esporos fúngicos foram incubados em caldo Sabouraud contendo FLC na concentração da IC_{50} , combinado com as frações de *C. annuum* (na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ou com os peptídeos sintéticos (na concentração de 200 μM). Os controles cresceram na ausência dos peptídeos e do FLC e na presença das concentrações individuais destas substâncias. Os experimentos foram feitos em triplicata.

4.3.8. Ensaio de inibição da atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina

A inibição da atividade proteolítica das enzimas tripsina e quimiotripsina pelas frações dos frutos de *C. chinense* foi determinada pela quantificação da atividade hidrolítica residual da tripsina e da quimiotripsina (Sigma-Aldrich) pelo uso dos substratos BApNA e BTPNA (Sigma-Aldrich), respectivamente, após pré-incubação com as diferentes frações (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), segundo método proposto por Macedo *et al.*, (2007). A atividade proteolítica foi medida pelo uso de um peptídeo sintético derivado da *p*-nitroanilida em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) a 37 °C, num volume final de 200 μL . A reação foi interrompida pela adição de 100 μL de ácido acético a 30% (v/v). Em seguida, a leitura fotométrica dos tratamentos foi mensurada com base na extensão da liberação de *p*-nitroanilida a partir dos substratos em uma absorvância de 405 nm (EZ Read 400, Research Biochrom).

4.3.9. Detecção da inibição de protease por zimografia reversa

Foi feito um ensaio zimográfico reverso para visualizar a inibição da tripsina, segundo metodologia descrita por Felicioli *et al.*, (1997). Inicialmente, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada fração rica em peptídeos foram misturados com 15 μL de tampão de amostra (sem a presença de SDS ou β -mercaptoetanol). As amostras foram corridas em gel de poliacrilamida (12% SDS-PAGE) por carga, conforme descrito

por Laemmli (1970), e copolimerizado com 0,1% de gelatina (Sigma-Aldrich). Após a corrida eletroforética em temperatura ambiente, o gel foi lavado (Tris/HCl 0,1 M pH 8,0 contendo Triton X-100 a 2,5%) por 60 min para remover o SDS. Posteriormente, o gel foi imerso em tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo CaCl_2 20 mM e $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de tripsina) a 37°C por 1 h. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada para remoção do excesso de tripsina e corado com uma solução de 0,2% de Coomassie Brilliant Blue G 250, 45% de metanol e 10% de ácido acético por 30 min, posteriormente descorado para visualização das bandas. Como controle positivo, foi utilizado o inibidor comercial de tripsina Soybean Kunitz (Merck), tendo 1 mg deste inibidor sido dissolvido em $500 \mu\text{L}$ de tampão e deste $15 \mu\text{L}$ foi aplicado no gel como controle.

4.3.10. Análise estatística

Todos os dados representados foram analisados usando o software GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows), expressos com média e desvio padrão ($\pm\text{SD}$). Todas as médias foram feitas em triplicata. As análises estatísticas foram feitas por ANOVA unidirecional, seguidas pelo teste de Tukey para determinar diferenças entre os tratamentos e controle. Diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,05$) foram indicadas por asteriscos.

Para calcularmos a concentração do FLC necessária para inibir 50% (IC_{50}) do crescimento dos fungos em 24 h (item 4.3.7), foi verificada a normalidade pelo teste K2 (Zarr, 1999), utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows). A curva de IC_{50} foi traçada da seguinte forma: no eixo X foram representadas as concentrações da droga e no eixo Y, os valores das absorbâncias do teste e controle (para $0 \mu\text{M}$ foram colocados os valores obtidos da triplicata do controle, ou seja, apenas os esporos fúngicos sem a droga). Os valores de X foram transformados por log e os valores de Y, analisados e normalizados. Os valores foram representados em escala percentual por regressão não linear.

5. RESULTADOS

5.1. Purificação, caracterização parcial e mecanismo de ação das frações peptídicas dos frutos de *C. annuum*

5.1.1. Perfil eletroforético da fração FRP dos frutos de *C. annuum*

A Figura 6 mostra o perfil eletroforético da fração FRP obtida após a extração proteica dos frutos de pimenta de *C. annuum*. Na segunda raia do gel, podemos observar predominantemente a presença de peptídeos com baixa massa molecular, sendo uma banda proteica majoritária entre 3,4 e 6,5 kDa (seta) e outras três bandas entre 3,4 e 14,2 kDa, aproximadamente.

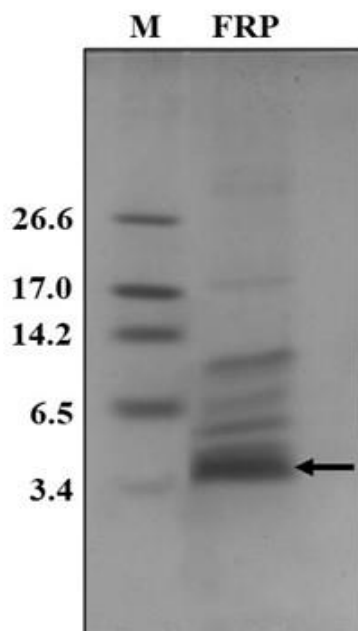


Figura 6 – Visualização eletroforética da fração FRP dos frutos de *C. annuum* por tricina-SDS-PAGE. As proteínas totais da fração foram reduzidas com β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa), (FRP) fração rica em peptídeos obtida após fracionamento com sulfato de amônio (0-70% de saturação).

5.1.2. Efeito da fração FRP obtida dos frutos de *C. annuum* sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos

A fração FRP obtida dos frutos de *C. annuum* após extração proteica foi testada contra diferentes fungos filamentosos, em diferentes concentrações. Na Figura 7, verifica-se que o fungo *C. lindemuthianum* apenas teve uma diminuição significativa no crescimento de 19 e 40% quando na presença de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração, respectivamente. Para *C. gloeosporioides*, utilizando 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração FRP, vimos uma diminuição de 23% sobre o crescimento, enquanto na concentração de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi observada redução de 33 e 45%, respectivamente. Ainda na Figura 7, observamos que a fração FRP apresentou alta atividade na inibição do crescimento do fungo *F. solani* de, aproximadamente, 33, 64 e 89% nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Já para o fungo *F. oxysporum phaseoli*, houve inibição de 30 e 58% apenas quando testado nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração FRP, respectivamente.

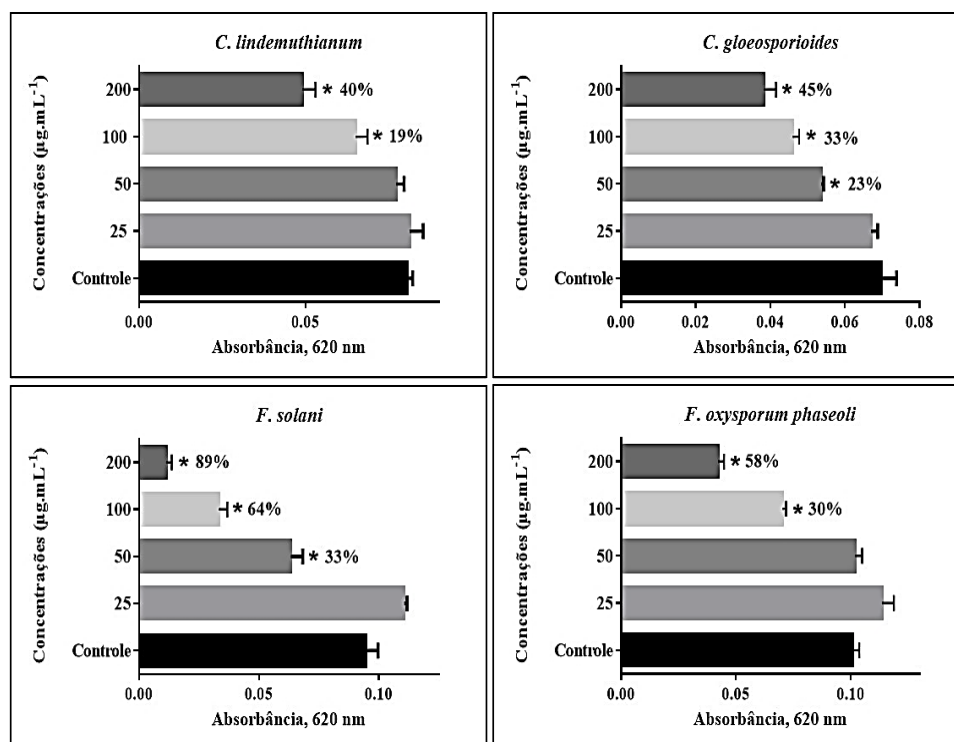


Figura 7 – Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento de diferentes fungos filamentosos na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações da fração FRP, obtidas após extração proteica dos frutos de *C. annuum*. O crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* foi observado até 24 h, enquanto os do gênero *Colletotrichum*, até 30 h. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e controle. Acima das barras é indicado o valor da inibição (%).

5.1.3. Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético das frações de *C. annuum*

Após verificarmos presença de peptídeos e atividade antimicrobiana na fração FRP de *C. annuum* sobre fungos fitopatogênicos, ela foi submetida a fracionamento por cromatografia de fase reversa em HPLC. O perfil cromatográfico da FRP apresentou seis diferentes frações, denominadas F1, F2, F3, F4, F5, F6, obtidas com os respectivos tempos de retenção de 33'83", 37'79", 39'97", 43'99", 46'01" e 51'18" (Figura 8A). A Figura 8B representa o perfil eletroforético destas frações, podendo ser observado que a fração F1 apresentou uma única banda de, aproximadamente, 5 kDa. A fração F2 apresentou três bandas proteicas entre 5 e 14,2 kDa, aproximadamente. Já a fração F3 apresentou duas bandas: uma em torno de 6,5 kDa e uma de 14,2 kDa. As frações F4 e F5 apresentaram dois peptídeos entre 5 e 14,2 kDa, enquanto a fração F6 apresentou três bandas entre 6,5 kDa e 26,6 kDa, aproximadamente.

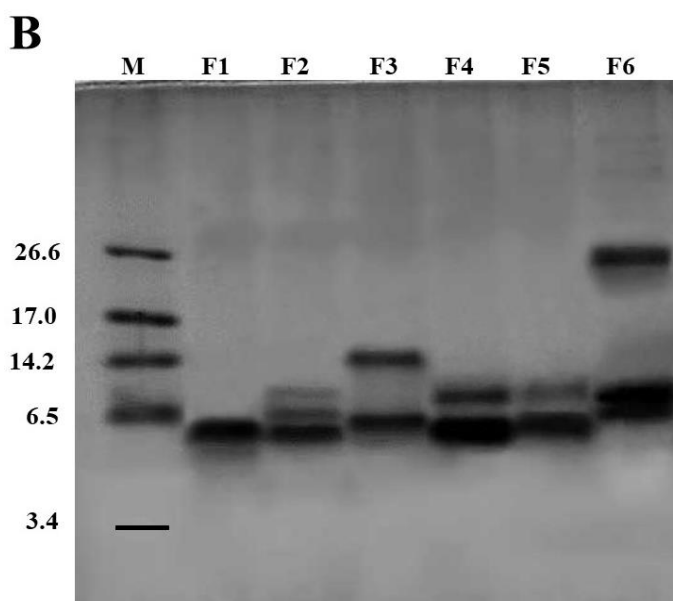
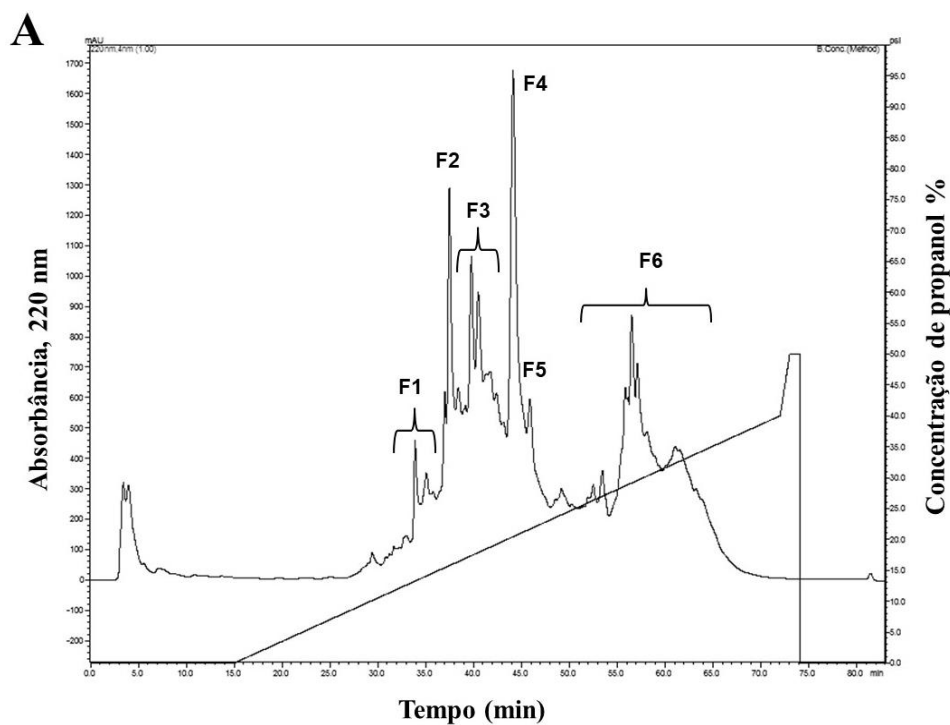


Figura 8 – (A) Cromatograma da fração FRP dos frutos de *C. annuum* (acesso UENF 1381) em coluna de fase reversa C2/C18. Frações F1 – F6 obtidas após eluição da coluna com propanol. A cromatografia foi feita utilizando um fluxo $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $38 \text{ }^\circ\text{C}$. (B) Visualização eletroforética por SDS-PAGE-TRICINA das frações peptídicas obtidas da fração FRP dos frutos de *C. annuum* após cromatografia em sistema HPLC. Todas as frações foram tratadas com β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa).

5.1.4. Ensaio de inibição do crescimento de fungos filamentosos na presença das frações de *C. annuum*

As seis diferentes frações de *C. annuum*, obtidas após cromatografia de fase reversa, foram testadas sobre o crescimento dos fungos *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides*, *F. solani* e *F. oxysporum phaseoli*, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Podemos notar na Figura 9 que apenas a fração F2 foi capaz de reduzir 21% do crescimento do fungo *C. lindemuthianum* nesta concentração testada. Já para o fungo *C. gloeosporioides*, as frações F1, F2 e F3 reduziram 17, 22 e 18% do crescimento, respectivamente. Contra *F. solani*, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a fração F4 foi a que apresentou melhor atividade, causando uma inibição de 54% no crescimento. As frações F1, F2 e F5 causaram uma redução significativa no crescimento deste fungo, em torno de 22, 36 e 18%, respectivamente. Para o fungo *F. oxysporum phaseoli*, nenhuma inibição significativa foi observada nesta concentração. Todas as frações de *C. annuum* capazes de reduzir significativamente o crescimento dos respectivos fungos foram selecionadas para ensaios posteriores.

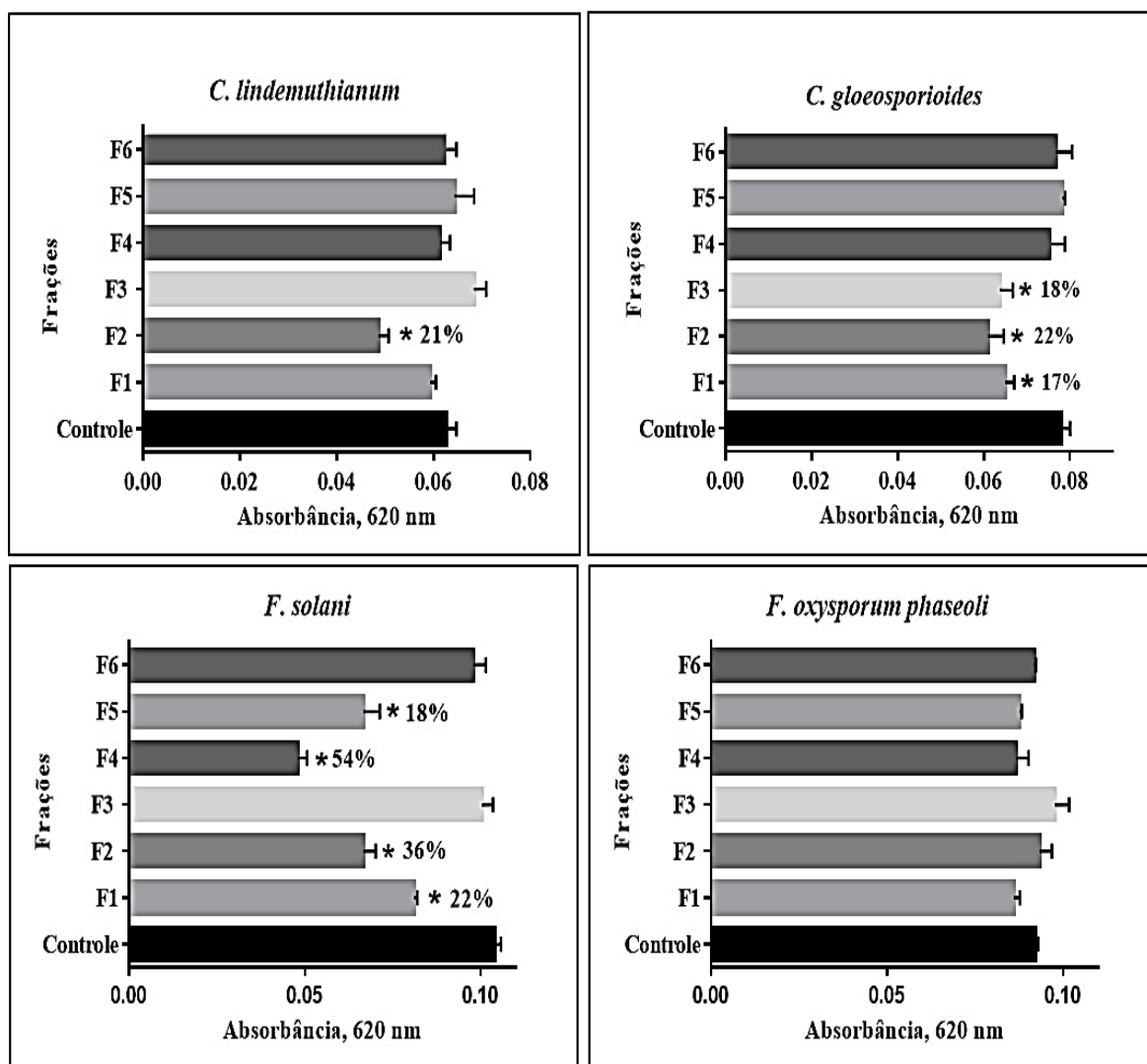


Figura 9 – Ensaio de inibição do crescimento de diferentes fungos filamentosos na presença de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações ricas em peptídeos, obtidas de *C. annuum* após cromatografia de fase reversa. O crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* foi observado até 24 h, enquanto os do gênero *Colletotrichum*, até 30 h. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras é indicado o valor da inibição (%).

5.1.5. Efeito das frações de *C. annuum* sobre a permeabilização de membranas fúngicas

Após 24 h do ensaio de inibição do crescimento, todas as frações de *C. annuum* capazes de reduzir significativamente o crescimento dos fungos *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides* e *F. solani* foram submetidas a ensaio de permeabilização de membrana pelo uso do corante *Sytox Green*. Na Figura 10, observamos que na concentração de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a fração F2 não foi capaz de

causar permeabilização de membrana no fungo *C. lindemuthianum*, não tendo sido observada nenhuma fluorescência, sugerindo que a integridade da membrana deste fungo foi mantida. Para o fungo *C. gloeosporioides*, podemos notar a marcação verde fluorescente do *Sytox* quando este fungo foi crescido na presença das frações F1 e F2, na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando que elas atuaram sobre a membrana plasmática deste fungo, permitindo a permeabilização e a marcação do corante. Este efeito pôde ser confirmado quando comparado às marcações entre as células crescidas na presença e na ausência das frações, já que nas células controle (ausente das frações) nenhuma marcação foi observada. O mesmo não foi visto para a fração F3, que, assim como o controle, não apresentou nenhuma marcação. Sobre o crescimento de *F. solani*, observamos que as frações F1, F2 e F5 apresentaram marcações fluorescentes, indicando terem atuado sobre a membrana plasmática deste fungo, permitindo, assim, a permeabilização. Assim como observado para o controle, a fração F4 não apresentou nenhuma marcação. Em geral, podemos notar nas imagens em DIC que as frações causaram alterações morfológicas sobre o padrão de crescimento das hifas fungicas, principalmente a fração F4 sobre *F. solani*, causando aglomeração celular, hifas curtas, com dificuldades de crescimento apical, e alterações não observadas nas imagens do controle. Apesar de observarmos inibição e alterações morfológicas no crescimento, vimos que não houve alteração da permeabilidade. Desta forma, na sequência, investigamos outro possível mecanismo envolvido na inibição fúngica.

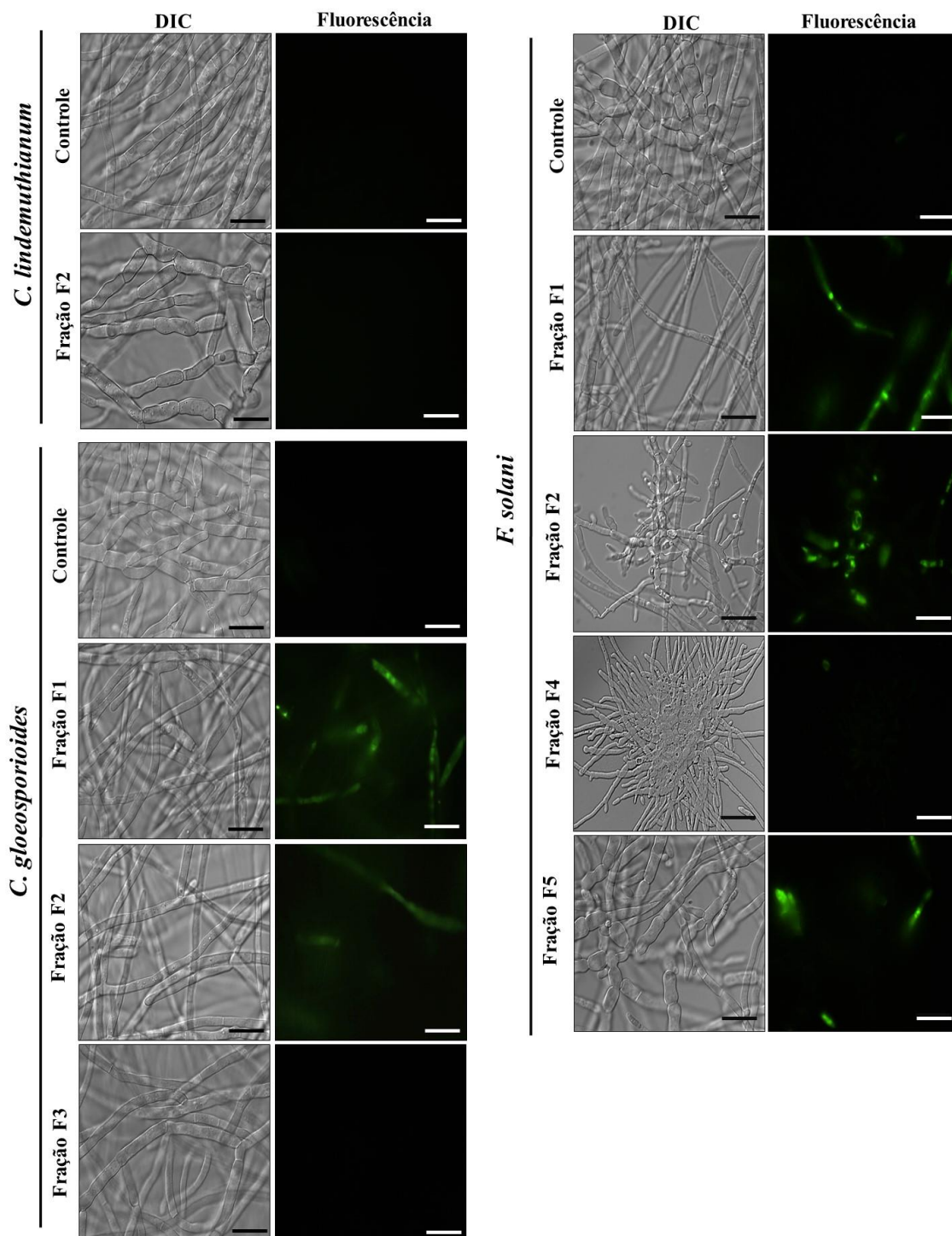


Figura 10 – Imagens de microscopia de fluorescência dos fungos incubados com o corante Sytox Green após terem sido crescidos na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das diferentes frações de *C. annuum*. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $50 \mu\text{m}$.

5.1.6. Efeito das frações de *C. annuum* sobre a indução da produção endógena de ROS em fungos filamentosos

Após 24 h do ensaio de inibição do crescimento, o aumento da produção endógena de ROS foi analisado com a utilização do corante H₂DCFDA para todas as frações de *C. annuum* capazes de reduzir significativamente o crescimento dos fungos filamentosos *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides* e *F. solani*. A Figura 11 mostra que o fungo *C. lindemuthianum*, quando crescido na presença da fração F2, não apresentou nenhuma marcação fluorescente, assim como as frações F1 e F2 para o fungo *C. gloeosporioides*, concluindo que estas frações não foram capazes de induzir aumento da produção de ROS sobre estes respectivos fungos, assim como mostrado para o controle crescido na ausência das frações. Ainda para o fungo *C. gloeosporioides*, quando comparado ao controle, notamos, pela intensa marcação fluorescente, a propriedade da fração F3 induzir estresse oxidativo sobre este fungo. Esta propriedade também foi observada para as frações F1, F2 e F5 sobre o crescimento do fungo *F. solani*, tendo sido notado que, quando crescido na presença das frações, houve marcação fluorescente com o corante, diferentemente do controle, em que nenhuma marcação foi observada. Já para a fração F4 (200 µg.mL⁻¹), este efeito não foi observado sobre *F. solani*, pois nenhuma marcação foi observada, semelhante ao controle. Diante dos resultados obtidos, selecionamos as frações F1, F2, F4 e F5 e o fungo *F. solani*, em razão da disponibilidade e dos resultados mais significativos, para testes posteriores.

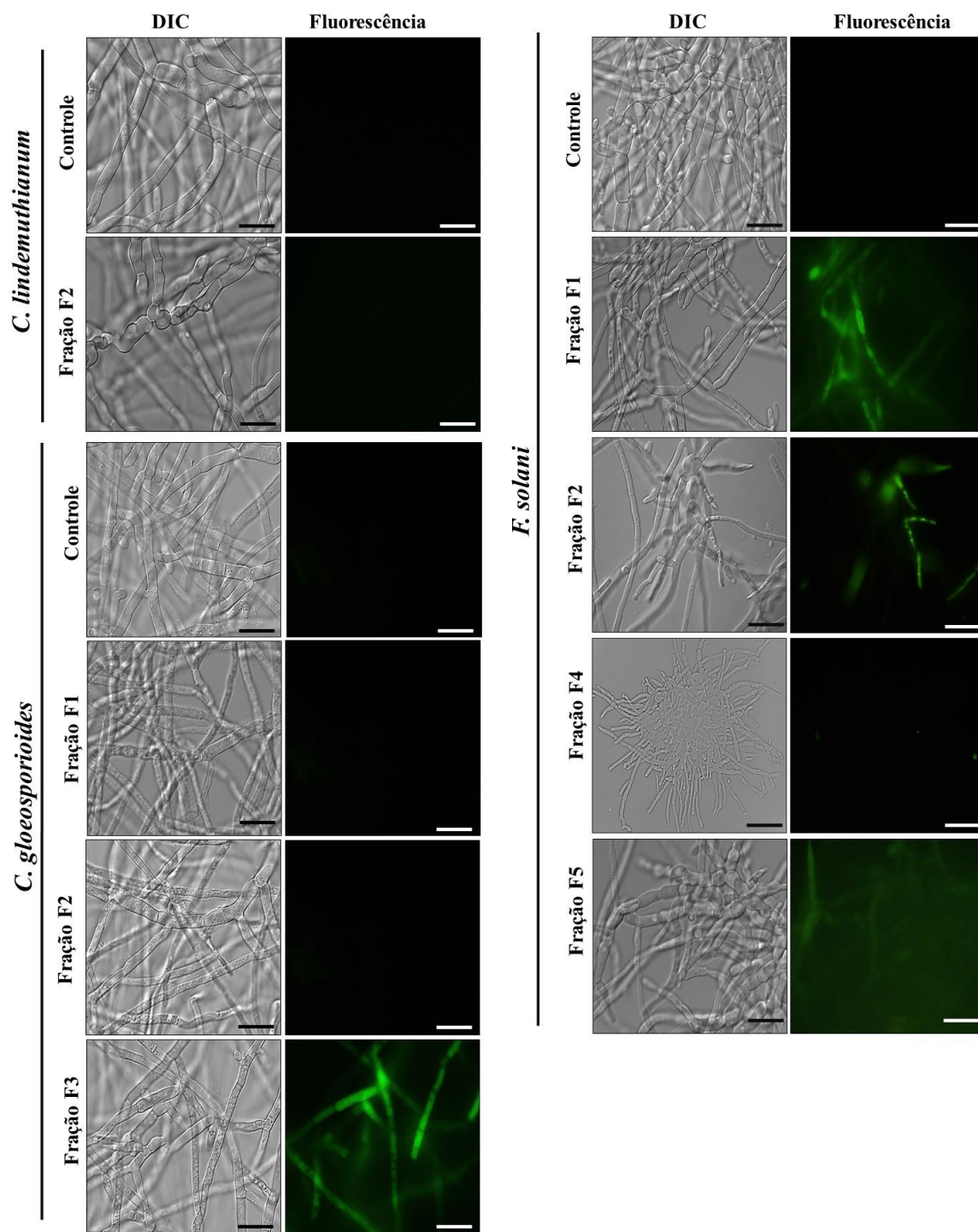


Figura 11 – Imagens de microscopia de fluorescência dos fungos filamentosos após serem incubados com o corante (2', 7' – diclorofluoresceína diacetato) para verificação de indução de ROS, após terem sido crescidos na ausência (controle) e na presença de 200 μg.mL⁻¹ das diferentes frações de *C. annum*. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 50 μm.

5.1.7. Atividade sinérgica da combinação do FLC com as frações F1, F2, F4 e F5 de *C. annuum* sobre o fungo *F. solani*

Avaliamos a atividade sinérgica entre as frações F1, F2, F4 e F5 de *C. annuum* em combinação com a droga comercial FLC sobre o crescimento do fungo *F. solani*. Primeiramente, foi feito um ensaio de inibição do crescimento do fungo *F. solani*, utilizando diferentes concentrações de FLC, para determinarmos a concentração capaz de causar 50% de inibição (IC_{50}). A Figura 12 mostra que na concentração de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não houve inibição do fungo, entretanto, na presença de 32, 64, 128 e $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de FLC, houve inibições de 36, 65, 87 e 100%, respectivamente. Diante deste resultado, selecionamos a concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de FLC (IC_{64}) para ser utilizada no ensaio de sinérgismo por ser a concentração mais próxima dos 50% de inibição que esperávamos.

Na Figura 13, podemos observar a combinação do FLC ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F1, F2, F4 e F5. Nota-se que a combinação dessas substâncias não apresentou aumento da atividade inibitória sobre o fungo *F. solani*, uma vez que, quando combinadas, não houve inibição ou a inibição causada foi inferior à das substâncias testadas individualmente.

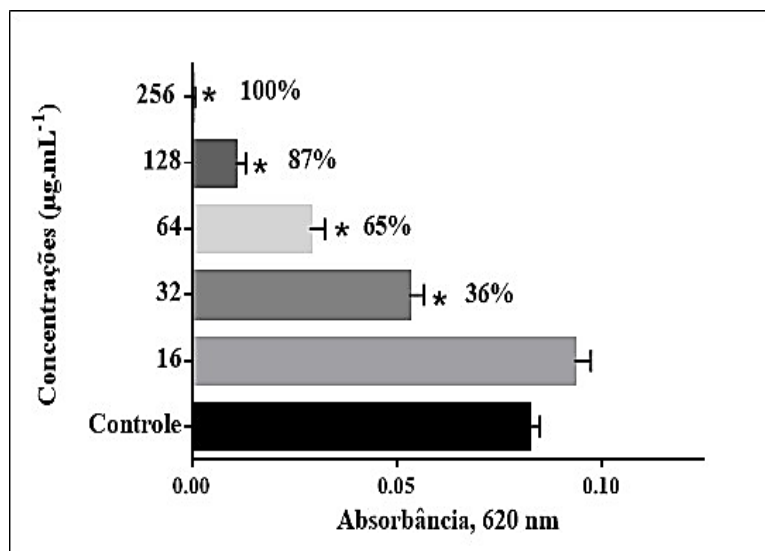


Figura 12 – Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento do fungo *F. solani* na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações de FLC. O ensaio foi avaliado em 24 h. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras é indicado o valor da inibição (%).

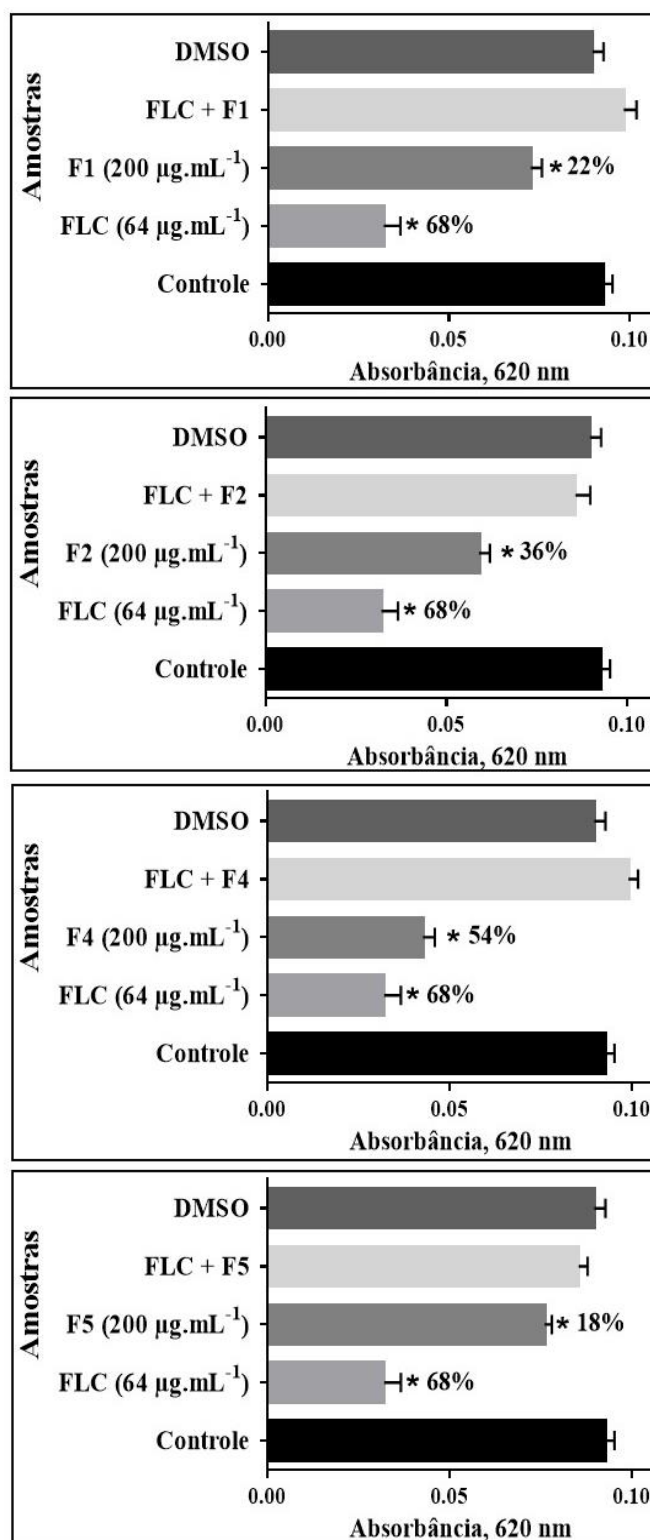


Figura 13 – Visualização gráfica do ensaio do efeito das frações F1, F2, F4 e F5 (200 µg.mL⁻¹) de *C. annuum* em combinação com o FLC (68 µg.mL⁻¹) sobre o crescimento do fungo *F. solani*. O ensaio foi avaliado por 24 h. Os valores são médias (±SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras é indicado o valor da inibição (%).

5.2. Purificação, caracterização e mecanismo de ação das frações peptídicas dos frutos de *C. chinense*

5.2.1. Perfil eletroforético da fração FRP dos frutos de *C. chinense*

A Figura 14 mostra o perfil eletroforético da fração FRP obtida após extração proteica dos frutos de *C. chinense*. Na segunda raia, é possível observar a presença de algumas proteínas com massa molecular acima de 17 kDa, mas, predominantemente, são visualizadas proteínas de menores massas moleculares, variando, aproximadamente, entre 5 e 14 kDa.

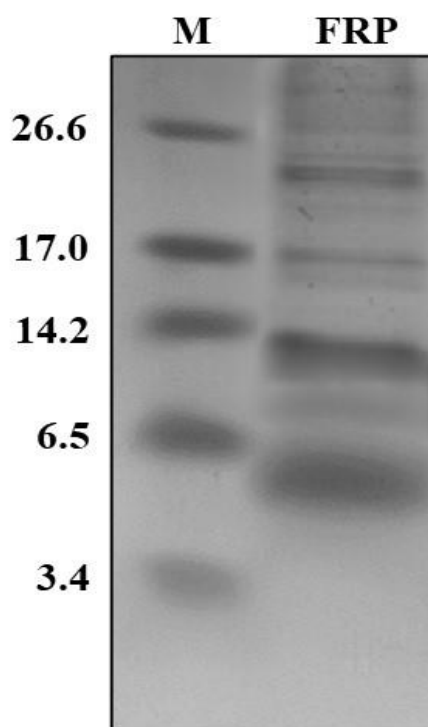


Figura 14 – Visualização eletroforética da fração FRP dos frutos de *C. chinense* por tricina-SDS-PAGE. As proteínas totais da fração foram reduzidas com β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa), (FRP) fração rica em peptídeos obtida após fracionamento com sulfato de amônio (0-70% de saturação).

5.2.2. Efeito da fração FRP obtida dos frutos de *C. chinense* sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos

Após a extração de proteínas dos frutos de *C. chinense*, a fração FRP obtida foi testada contra o crescimento dos fungos *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* e *F. solani*, em diferentes concentrações (Figura 15).

Foi observado para *C. lindemuthianum* que o tratamento com 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração FRP foi capaz de inibir ($p \leq 0,05$) o crescimento do fungo em 19, 41 e 63%, respectivamente. Já o *C. gloeosporioides* apresentou inibição de 29 e 58% nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Para *F. solani*, a fração FRP nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiu o crescimento do fungo em 22, 50 e 93%, respectivamente, entretanto, quando testado na presença de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração, nenhuma inibição significativa ($p \leq 0,05$) foi observada. Ainda na Figura 15, observamos que 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração FRP foi capaz de inibir aproximadamente 89% do crescimento do fungo *F. oxysporum*, todavia, quando utilizada em concentrações menores (25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), a inibição do crescimento observada foi de 25, 55 e 73%, respectivamente, em comparação com o controle.

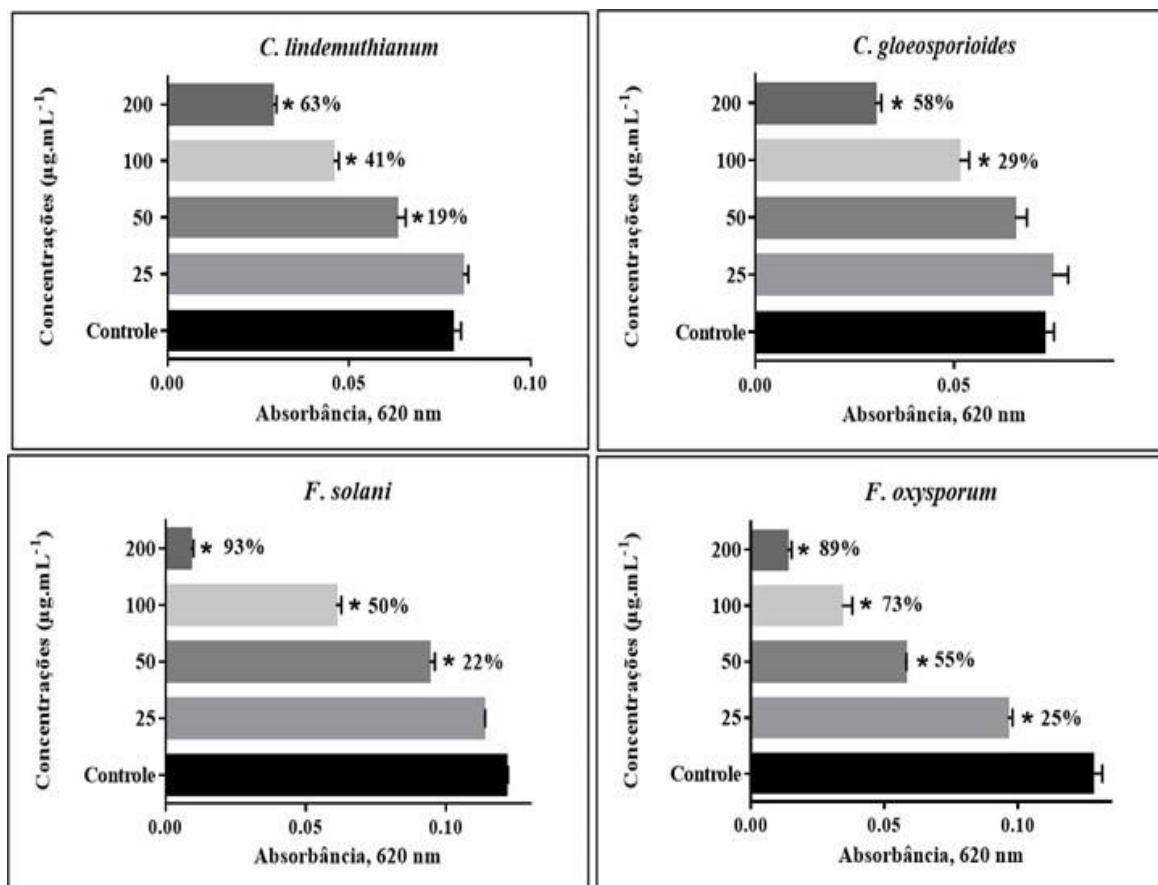


Figura 15 – Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento de diferentes fungos filamentosos na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações da fração FRP obtida após extração proteica dos frutos de *C. chinense*. O crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* foi observado até 24 h, enquanto os do gênero *Colletotrichum*, até 30 h. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e controle. Acima das barras é mostrado a inibição (%)

5.2.3. Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético das frações de *C. chinense*

Após observarmos que a fração FRP de *C. chinense* apresentava atividade contra fungos de interesse agrônômico, ela foi fracionada em coluna C18 em sistema HPLC, sendo mostrado na Figura 16 seu perfil cromatográfico e eletroforético.

Na Figura 16A, mostramos que, após o fracionamento da FRP por cromatografia em sistema HPLC, foram selecionadas dez frações majoritárias, denominadas F1, F2, F3, F4, F4, F5, F6, F7, F8, F9 e F10, obtidas com os respectivos tempos de retenção de 21'83", 24'63", 33'13", 36'13", 39'24", 54'20", 63'75", 66'39", 71'07" e 73'32", compostas predominantemente por peptídeos com

massas moleculares aproximadamente entre 5 e 14,2 kDa (Figura 16B). As frações F1 e F4 mostraram um perfil com dois peptídeos cada, com massas moleculares de, aproximadamente, 5 e 6,5 kDa. As frações F2 e F5 apresentaram três principais peptídeos, um com massa molecular de, aproximadamente, 5 kDa, e dois com massa molecular entre 6,5 e 14,2 kDa. As frações F3 e F6 mostraram um único peptídeo com massa molecular de, aproximadamente, 5 kDa. Já as frações F7, F8, F9 e F10 apresentaram um perfil mais complexo, com bandas proteicas entre 3,4 e até maiores que 26,6 kDa, aproximadamente, conforme observado após tricina-SDS-PAGE.

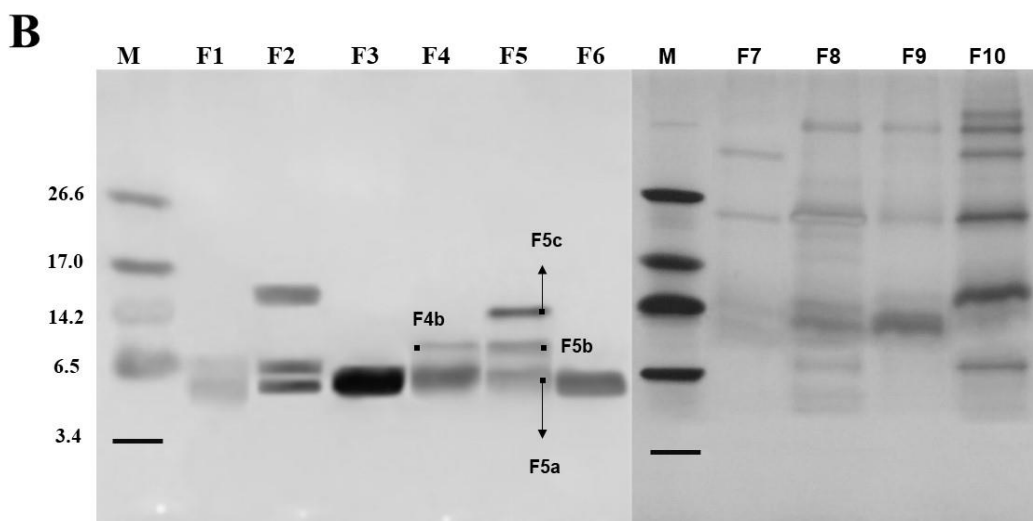
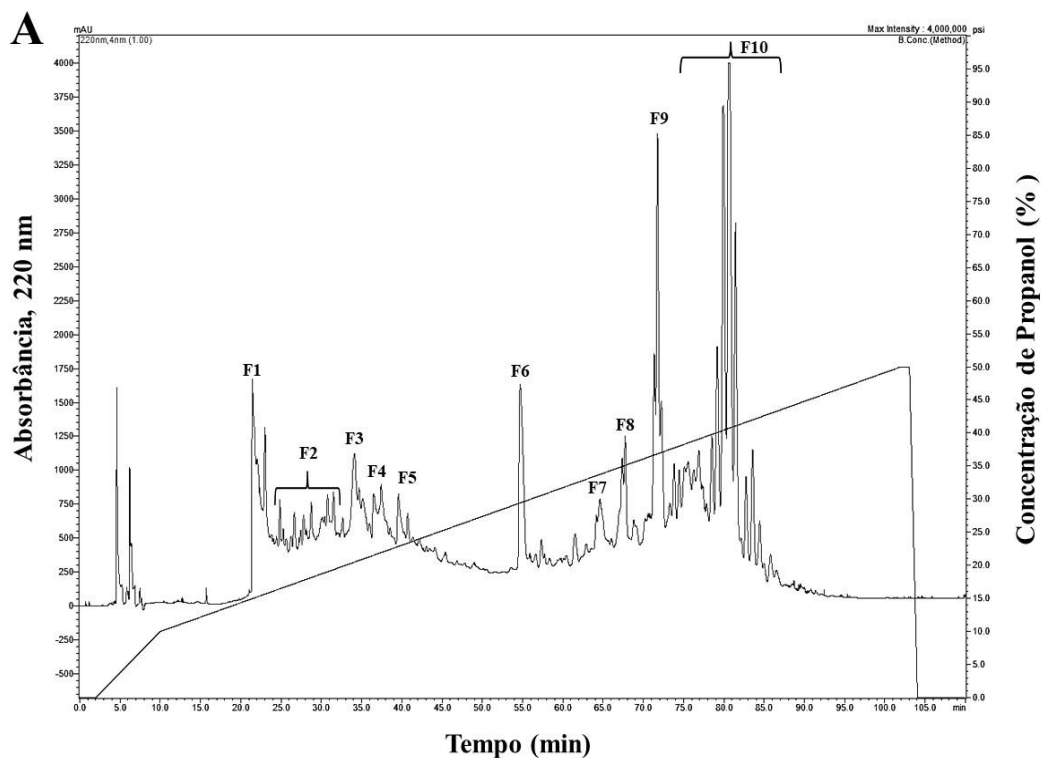


Figura 16 – (A) Cromatograma da fração FRP de frutos de *C. chinense* em coluna de fase reversa C18. Frações F1 – F10 obtidas após eluição da coluna com propanol. A cromatografia foi feita utilizando um fluxo $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. (B) Visualização eletroforética das frações enriquecidas em peptídeos dos frutos de *C. chinense* por tricina-SDS-PAGE após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. Todas as frações foram tratadas com β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa). F4b, F5b e F5c e F5a referem-se a bandas peptídicas selecionadas e submetidas à obtenção da sequência de aminoácidos.

5.2.4. Ensaio de inibição do crescimento de fungos filamentosos na presença das frações peptídicas de *C. chinense*

As dez diferentes frações obtidas da fração FRP de *C. chinense* após cromatografia de fase reversa em HPLC foram testadas contra os fungos *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* e *F. solani* (Figura 17). Como mostrado na Figura 17, não foi observada inibição do crescimento do fungo *C. lindemuthianum* para nenhuma das frações testadas na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Entretanto, quando aumentamos a concentração das frações para 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, as frações F1, F3, F4, F6 e F10 causaram reduções significativas ($p \leq 0,05$) de 20, 30, 25, 23 e 17%, respectivamente, sobre o crescimento desse fungo filamentoso. Para o fungo *C. gloeosporioides* na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, observamos que nenhuma das frações testadas foi capaz de inibir o crescimento. Já na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apenas as frações F3, F5 e F7 causaram inibições ($p \leq 0,05$) de 19, 17 e 22%, respectivamente. Para *F. solani*, um efeito inibitório significativo ($p \leq 0,05$) de 20, 39, 44 e 15% foi observado na presença de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F1, F4, F5 e F10, respectivamente. Na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram observadas inibições significativas ($p \leq 0,05$) de 30, 17, 88, 66, 19, 22, 19 e 32% para as frações F1, F2, F4, F5, F6, F8, F9 e F10, respectivamente. Quando analisamos o efeito inibitório das dez diferentes frações na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra o fungo *F. oxysporum*, observamos que as frações F1, F2, F4, F5 e F6 foram capazes de reduzir ($p \leq 0,05$) o crescimento do fungo em 17, 19, 26, 45 e 21%, respectivamente. Já em 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, essas mesmas frações foram capazes de inibir significativamente ($p \leq 0,05$) o crescimento em 31, 34, 53, 72 e 35%, respectivamente. As demais frações (F3, F7, F8, F9 e F10) não inibiram significativamente o crescimento de *F. oxysporum* em nenhuma das concentrações testadas.

Dessa forma, pudemos observar que as frações foram mais tóxicas contra fungos do gênero *Fusarium*, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, principalmente as frações F4 e F5.

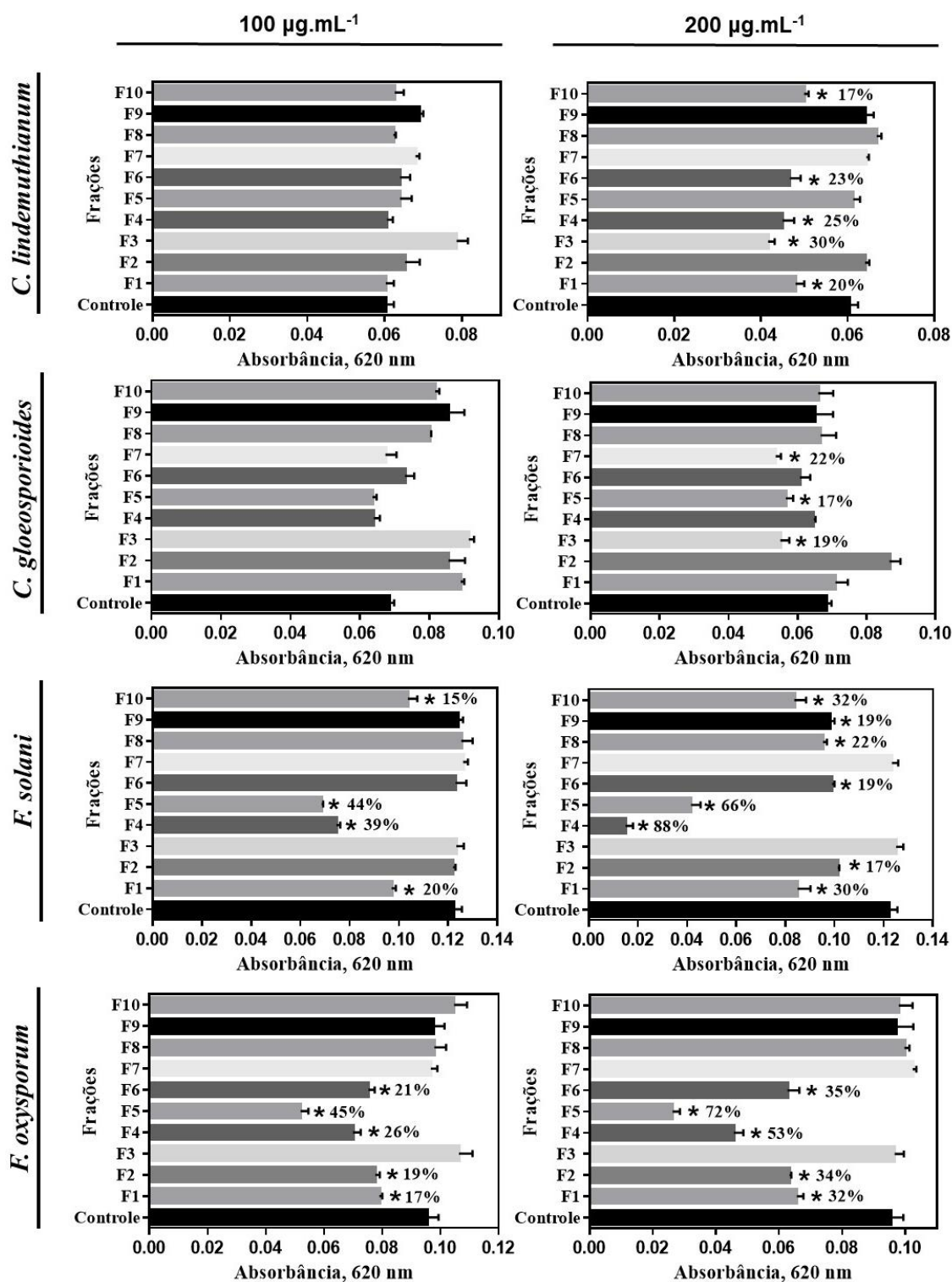


Figura 17 – Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento de diferentes fungos filamentosos na ausência (controle) e na presença de 100 e 200 µg.mL⁻¹ das frações de *C. chinense*, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. O crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* foi observado até 24 h, enquanto os do gênero *Colletotrichum*, até 30 h. Os valores são médias (±SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e controle. Acima das barras é mostrado a inibição (%).

5.2.5. Efeito das frações peptídicas de *C. chinense* sobre o crescimento bacteriano

Para testar a atividade antibacteriana das frações de *C. chinense*, avaliamos seu efeito sobre o crescimento da bactéria Gram-negativa *X. euvesicatoria*. As zonas de inibições foram medidas após 48 h de ensaio, na presença de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das diferentes frações. A Figura 18 mostra presença de zona de inibição ao redor do disco de papel para todas as frações testadas, com exceção da fração F1, que, assim como o controle, não apresentou inibição. As frações F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8 e F9 apresentaram zonas de 0,81; 4,05; 3,88; 3,57; 2,09; 0,44; 0,45 e de 0,79 mm de diâmetro, respectivamente. Observou-se ainda que a fração F10 apresentou várias zonas de inibição sobre o crescimento da *X. euvesicatoria*, sendo estas zonas de 2,08; 0,53 e de 1,58 mm (Figura 18B, inserção).

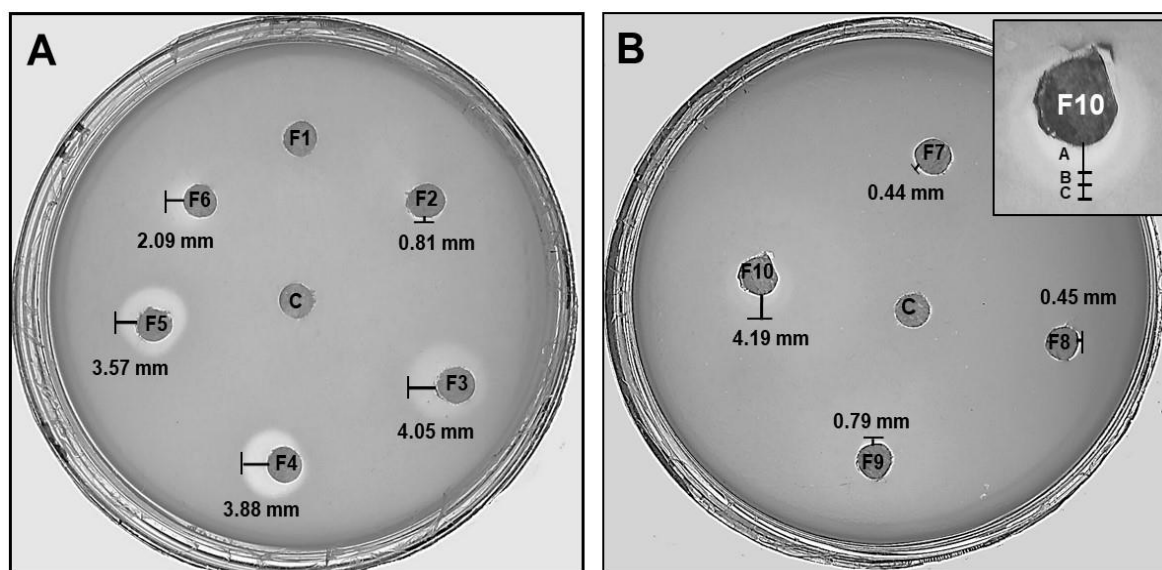


Figura 18 – Antibiograma com a bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* na presença de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações de *C. chinense* após 48 h de crescimento. A inibição do crescimento bacteriano é visualizada como uma zona clara ao redor do disco de papel contendo as frações. Inserções em A (2,08 mm), B (0,53 mm) e C (1,58 mm) indicam as diferentes zonas de inibição apresentadas pela fração F10.

5.2.6. Determinação da sequência de aminoácidos dos peptídeos das frações F4 e F5 de *C. chinense* por espectrometria de massas

Em razão da alta atividade antimicrobiana apresentada pelas frações F4 e F5 sobre os fungos do gênero *Fusarium* e sobre a bactéria *X. euvesicatoria*, os peptídeos contidos nessas frações, mostrados pontualmente na Figura 16B, foram submetidos a determinação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas (Figura 19). A análise de sequência dos peptídeos F4b, F5b e F5c revelou similaridade com proteínas transportadoras de lipídeo não específicas (nsLTP). Na Figura 19A, observamos que a análise do peptídeo F4b resultou em um fragmento de sequência com 80 resíduos de aminoácidos, e o alinhamento mostrou 80, 63 e 52% de similaridade com o peptídeo similar à nsLTP de *C. annuum*, nsLTP de *Nicotiana tabacum* e nsLTP de *Nicotiana sylvestris*, respectivamente. Por esse motivo, F4b foi renomeado para Cc-LTP4b (*Capsicum chinense* LTP P4b). O peptídeo F5b revelou uma sequência de 84 resíduos de aminoácidos com 84, 66 e 55% de similaridade com peptídeo similar à nsLTP de *C. annuum*, nsLTP de *Nicotiana tabacum* e nsLTP de *Nicotiana sylvestris*, respectivamente. Assim, renomeamos F5b para Cc-LTP5b (*Capsicum chinense* LTP P5b). Já para o peptídeo F5c, foram obtidos 80 resíduos de aminoácidos com similaridade de 79, 62 e 51% também para peptídeo similar à nsLTP de *C. annuum*, nsLTP de *Nicotiana tabacum* e nsLTP de *Nicotiana sylvestris*, respectivamente. O peptídeo F5c foi também renomeado para Cc-LTP5c (*Capsicum chinense* LTP P5c). Ao procedermos ao alinhamento das sequências, vimos que os peptídeos F4b e F5b apresentam 95% de similaridade entre si, os peptídeos F5b e F5c, 94%, e os peptídeos F4b e F5c apresentam 96% de similaridade entre suas sequências e oito resíduos de cisteínas conservados. O peptídeo F5a também foi selecionado e comparado em banco de dados, mostrando similaridade de 24, 25 e 24% com peptídeo similar à defensina de *Capsicum baccatum*, defensina de flor de *Capsicum annuum* e defensina de *Capsicum chinense*, respectivamente. Tendo em vista esses resultados, o peptídeo F5a foi renomeado para Cc-Def5a (*Capsicum chinense* LTP P5a). Os alinhamentos de sequências também revelaram que três resíduos de cisteínas se encontram conservados neste peptídeo (Figura 19B).

A Identificação	Sequência
Peptide F4b (<i>Capsicum chinense</i>)	-LTCGEVTSNVAPCINFLRNNGPLGICCCNGIRRLANAAKTTQDRQFTCNCLKA--NAIPGINFS-----KTCGVNIPYKISP-TDCSKV-
Peptide F5b (<i>Capsicum chinense</i>)	GLTCGEVTSNVAPCINFLRNNGPLGICCCNGIRRLANAAKTTQDRQFTCNCLKSAANAIPGINFSK-----TCGVNIPYKISPSTDCSKV-
Peptide F5c (<i>Capsicum chinense</i>)	-LTCGEVTSNVAPCINF-RNNGPLGICCCNGIRRLANAAKTTQDRQFTCNCLKA--NAIPAINFS-----KTCGVNIPYKISPSTDCSKV-
nsLTP 1-Like (<i>Capsicum annuum</i>)	GLTCGEVTSNVAPCINFLRNNGPLGICCCNGIRRLANAAKTTQDRQFTCNCLKSAANAIPGINFSKAAVLPRTCGVNIPYKISPSTDCSKVR
nsLTP 1 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	AITCGQVTSNLAPCLAYLRNTGPLGRCCGGVKALVNSARTTEDRQIACTCLKSAAGAI SGINLGKAAGLPSTTCGVNIPYKISPSTDCSKVQ
nsLTP 1 (<i>Nicotiana glauca</i>)	AITCGQVTSNLAPCLAYLRNTGPLGRCCGGVKALVNSARTTEDRQIACTCLKSAAGAI SGINLGKAAGLPSTTCGVNIPYKISPSTDCSKVQ

B Identificação	Sequência
Peptide F5a (<i>Capsicum chinense</i>)	SKYFTGLCWT DSSCRK-----DKFQDGHCSK
Defensin-like protein (<i>Capsicum baccatum</i>)	SKYFTGLCWADSSCRK VCIEK DKFQDGHCSK
Flower-specific defensin-like (<i>Capsicum annuum</i>)	SKYFTGLCWT DSSCRK VCIEK DKFQDGHCSK
Defensin-like protein (<i>Capsicum chinense</i>)	SKYFTGLCWT DSSCRK VCIEK DKFQDGHCSK

Figura 19 – Alinhamento dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos de *C. chinense* com similaridade a outros peptídeos descritos. As seqüências foram obtidas por SWISS-PROT e alinhadas por Clustal Omega. (A) Os peptídeos F4b (*Cc-LTP4b*), F5b (*Cc-LTP5b*) e F5c (*Cc-LTP5c*) mostraram similaridade com as seqüências: Non-specific lipid-transfer protein 1-like *Capsicum annuum* (NCBI Reference Sequence: XP 016559796.1); Nonspecific lipid-transfer protein 1 *Nicotiana tabacum* (NCBI Reference Sequence: pdb 1T12 A Chain A); Non-specific lipid-transfer protein 1 *Nicotiana glauca* (NCBI Reference Sequence: XP 009761744.1). (B) O peptídeo F5a (*Cc-Def5a*) mostrou similaridade com as seqüências: Defensin-like protein *Capsicum baccatum* (NCBI Reference Sequence: PHT42128.1); Flower-specific defensin-like *Capsicum annuum* (NCBI Reference Sequence: XP 016579688.1); e Defensin-like protein *Capsicum chinense* (NCBI Reference Sequence: PHU10972.1). Resíduos idênticos são mostrados em azul (incluindo os resíduos de cisteínas). Os resíduos de cisteínas conservados foram sublinhados e os espaços (-) incluídos para melhorar o alinhamento.

5.2.7. Efeito das frações F4 e F5 de *C. chinense* sobre a permeabilização de membranas fúngicas

Também testamos a capacidade de as frações F4 e F5 promoverem a permeabilização de membrana nos fungos *F. solani* e *F. oxysporum*, usando o corante fluorescente *Sytox Green* (Figura 20). Após 24 h do ensaio de inibição, os fungos cultivados na ausência (controle) e presença das frações ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram incubados com o *Sytox green*. A Figura 20 mostra a fluorescência para ambos os fungos quando cultivados na presença das frações F4 e F5. Por outro lado, o controle não mostrou fluorescência, sugerindo que essas frações atuam na membrana plasmática desses fungos, danificando sua estrutura e permitindo a marcação do corante, indicando, assim, permeabilização da membrana. Em geral, nas imagens de DIC da Figura 20, observamos crescimento diferenciado dos fungos tratados com as frações, com alterações morfológicas da seguinte forma: hifas mais ramificadas ou mais curtas, com deficiências de alongamento, e redução no número de hifas, características não observadas nos controles.

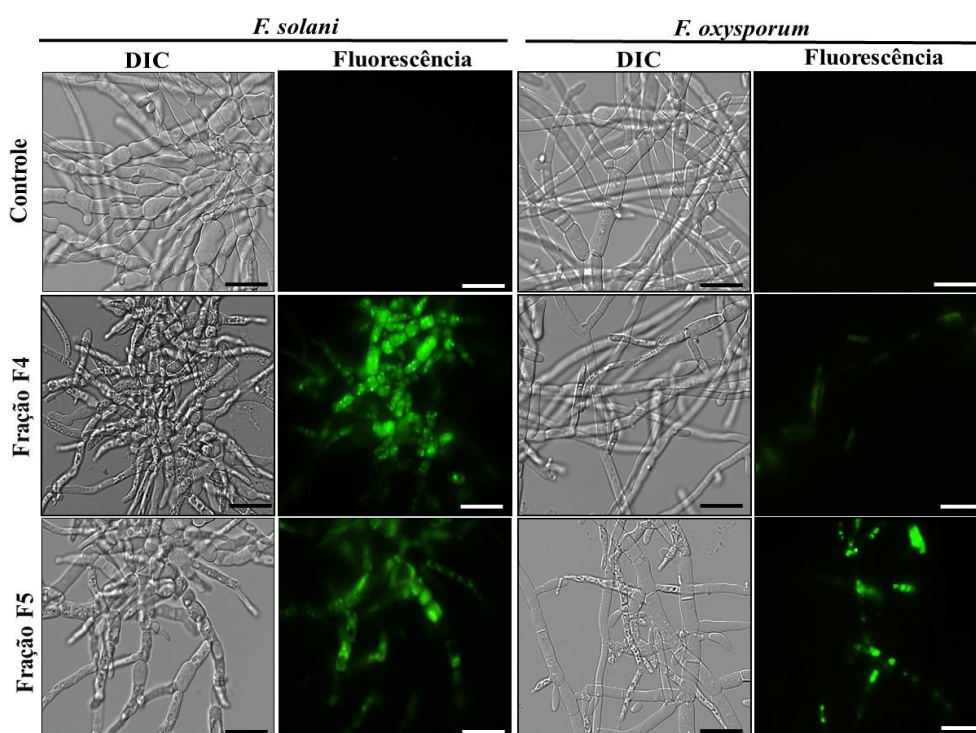


Figura 20 – Imagens de microscopia de fluorescência do ensaio de permeabilização de membrana dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* tratados com o corante *Sytox Green*, após terem sido crescidos na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações F4 e F5. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $50 \mu\text{m}$.

5.2.8. Efeito das frações F4 e F5 de *C. chinense* sobre o aumento da produção endógena de ROS em células fúngicas

Após o ensaio de inibição do crescimento, os fungos *F. solani* e *F. oxysporum* foram incubados com a sonda H₂DCFDA para detecção da produção endógena de ROS. Na Figura 21, podemos observar a marcação do corante nas células cultivadas na presença das frações F4 e F5 (200 µg.mL⁻¹), indicando que essas frações aumentaram a produção de ROS em *F. solani*. Já para *F. oxysporum*, foi demonstrado que, na concentração de 200 µg.mL⁻¹, as frações F4 e F5 não foram capazes de aumentar a produção de ROS nas condições estudadas. Nos controles cultivados na ausência das frações, não foi observada fluorescência.

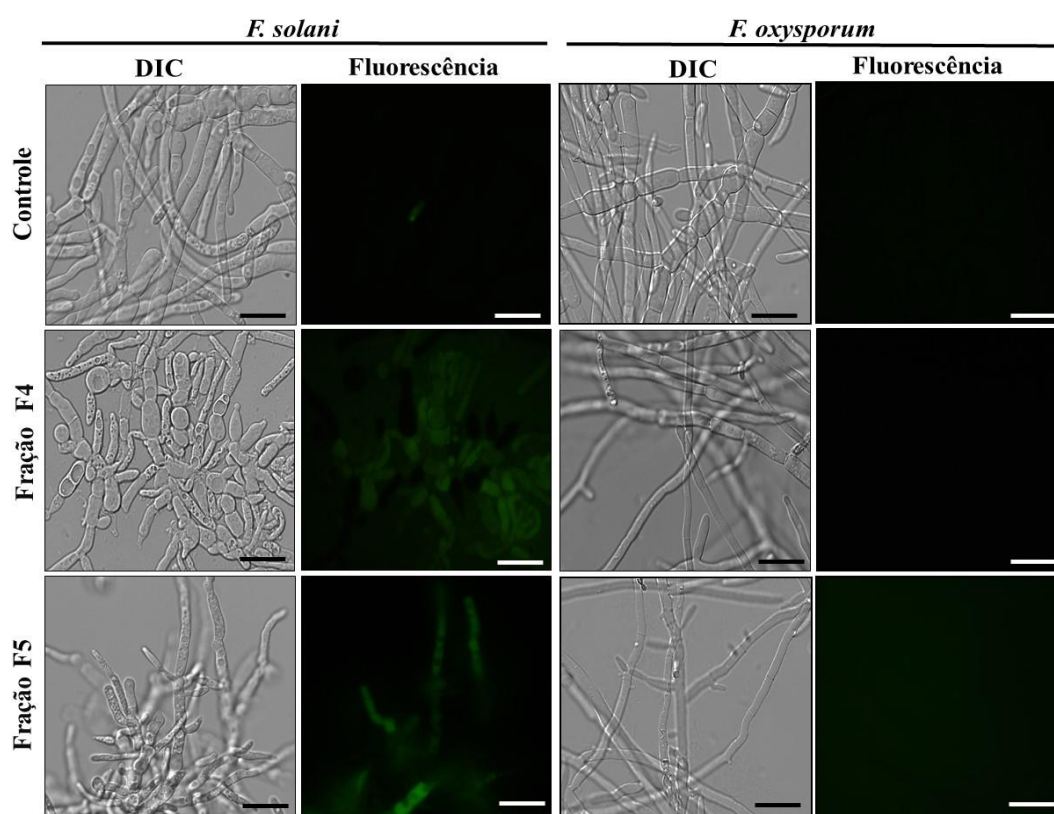


Figura 21 – Imagens de microscopia do ensaio de determinação da indução de ROS nas células dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* crescidos na ausência (controle) e presença de 200 µg.mL⁻¹ das frações F4 e F5 de *C. chinense*. As células foram incubadas por 2 h com H₂DCFDA para detecção do ROS, visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 50 µm.

5.2.9. Ensaio de detecção da atividade de caspases em células fúngicas induzida pelas frações F4 e F5 de *C. chinense*

Para analisar se as frações de *C. chinense* induzem eventos apoptóticos, foi avaliada a atividade das enzimas do tipo caspases (Figura 22). Após 24 h do ensaio de inibição, os fungos *F. solani* e *F. oxysporum* crescidos na ausência (controle) e na presença das frações F4 e F5 ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram incubados com o marcador FITC-VAD-FMK (Figura 22). Para o fungo *F. solani*, o tratamento com a fração F4 resultou na ativação de caspases, possibilitando-nos observar uma forte marcação dessas células. No entanto, quando tratado com a fração F5, a atividade da caspases não estava presente e, assim como observado para o controle, não houve marcação fluorescente. Já o fungo *F. oxysporum*, tratado com as frações F4 ou F5, mostrou fraca fluorescência, indicando ativação de caspases, diferentemente dos controles, que não apresentaram fluorescência.

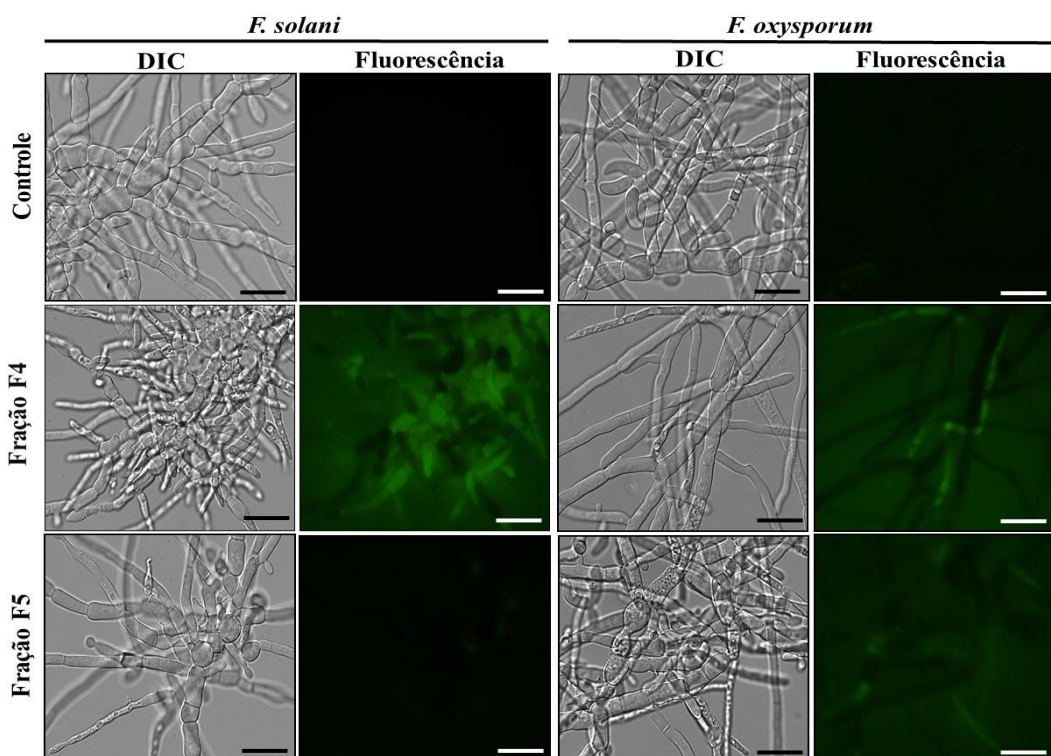


Figura 22 – Imagens de microscopia do ensaio de detecção da atividade de caspases nas células dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* crescidos na ausência (controle) e presença de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F4 e F5 de *C. chinense*. Os controles e testes foram incubados com a sonda FITC-VAD-FMK e analisadas por fluorescência. Barras = $50 \mu\text{m}$.

5.2.10. Análise da funcionalidade mitocondrial em células fúngicas tratadas com as frações F4 e F5 de *C. chinense*

Neste trabalho, também procedemos a um ensaio de funcionalidade mitocondrial usando o corante fluorescente Rodamina 123 (Figura 23). Após 24 h do ensaio de inibição, o fungo *F. solani*, tratado com $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F4 e F5, apresentou mitocôndrias funcionais, observadas pela forte fluorescência do corante Rodamina 123, assim como mostrado para as células do controle, cultivadas na ausência das frações. Entretanto, para *F. oxysporum*, observamos que ambas as frações (F4 e F5) ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) causaram diminuição da atividade mitocondrial, conforme indicado pela coloração fluorescente vermelha mais fraca em comparação com o controle.

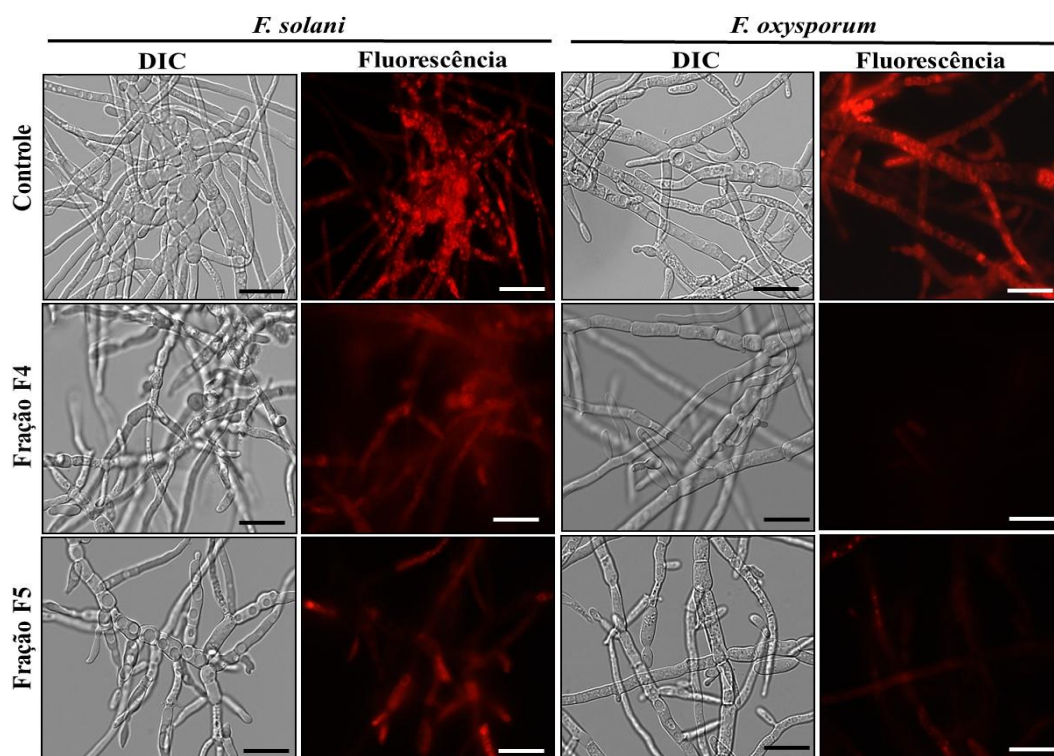


Figura 23 – Imagens de microscopia de fluorescência dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* após ensaio de funcionalidade mitocondrial, utilizando a sonda fluorescente Rodamina 123. Os fungos foram crescidos na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F4 e F5 de *C. chinense* e, em seguida, analisados quanto à funcionalidade mitocondrial. Os controles foram tratados apenas com a sonda Rodamina 123. Barras = 50 μm .

5.2.11. Efeito das frações peptídicas de *C. chinense* sobre a inibição da atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina

Neste trabalho, avaliamos quantitativamente o efeito inibitório das frações de *C. chinense* sobre a atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina. A Figura 24A mostra que, das dez frações testadas na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, apenas as frações F1 e F2 foram capazes de inibir significativamente ($p \leq 0,05$) a atividade da enzima tripsina, mostrando inibição de 84 e 67%, respectivamente. Para a enzima quimiotripsina, nenhuma das frações foi capaz de inibir sua atividade (24B). A Figura 24C mostra qualitativamente o resultado do ensaio de zimografia reversa, podendo-se notar que apenas as frações F1 e F2 mostraram bandas coradas onde a gelatina não foi digerida pela tripsina, confirmando, assim, a presença de inibidor de tripsina nessas frações.

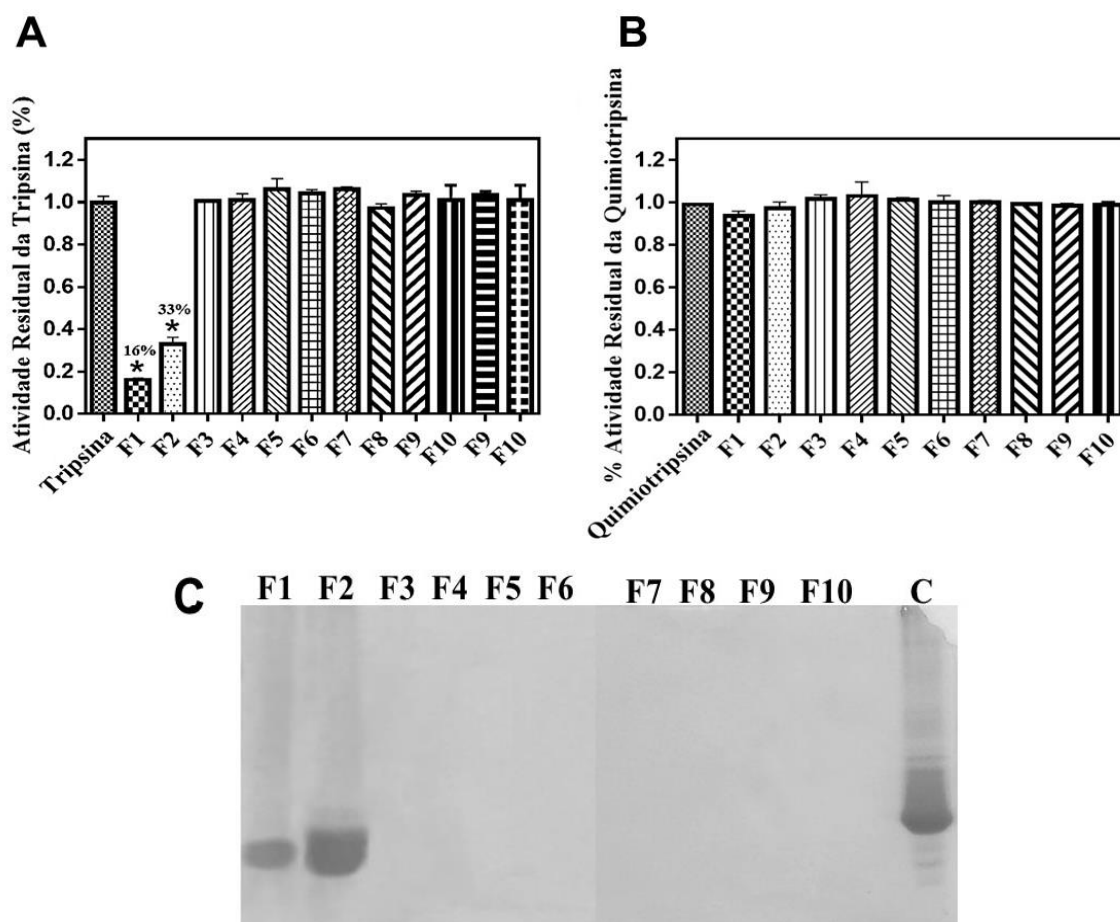


Figura 24 – Ensaio do efeito das frações de *C. chinense* após cromatografia em HPLC sobre a atividade residual da tripsina (A) e quimiotripsina (B). O ensaio foi feito em uma concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os valores representam as médias ($\pm\text{SD}$) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e controle. (C) Zimografia reversa das frações de *C. chinense* (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). C – O controle positivo (Soybean Kunitz). Acima das barras é indicado o valor da atividade (%).

5.3. Atividade antimicrobiana, sinérgica e mecanismo de ação dos peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ sobre fungos filamentosos

5.3.1. Obtenção dos peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇

Tendo em vista a atividade apresentada pela fração F4 de *C. chinense* contra os fungos do gênero *Fusarium* e a obtenção da sequência da estrutura primária da LTP obtida para o peptídeo Cc-LTP4b de *C. chinense*, com base nesta sequência foram escolhidas duas regiões (destacadas em vermelho e azul) (Figura 25A) e os peptídeos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ (com 14 e 19 resíduos, respectivamente), Figura 25B, foram desenhados, sintetizados e avaliados.

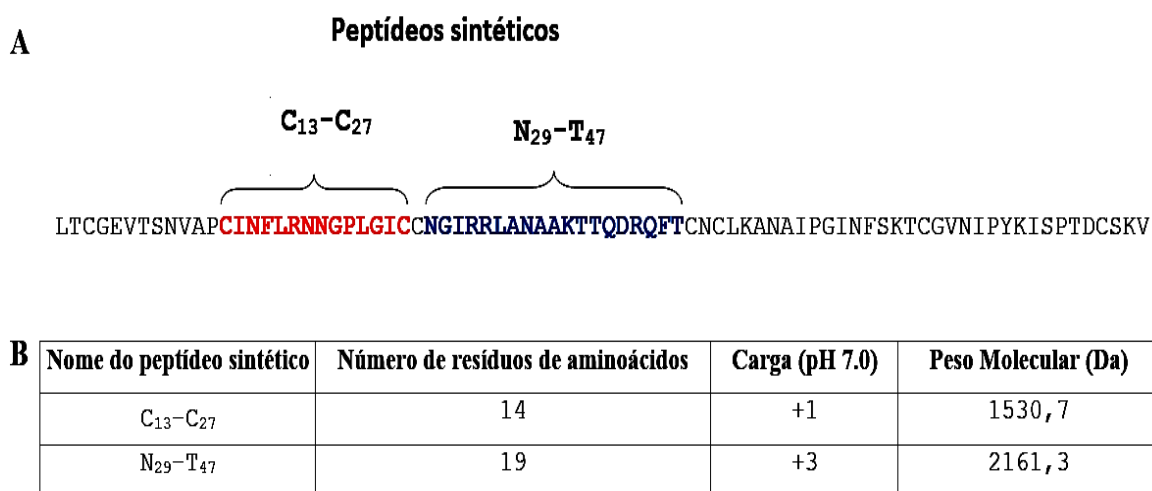


Figura 25 – Estrutura primária dos peptídeos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ e suas características bioquímicas. (A) Sobreposição da estrutura primária da nsLTP, obtida do peptídeo Cc-LTP4b de *C. chinense*, com os dois peptídeos sintéticos. A região de aminoácidos em vermelho indica os resíduos selecionados para a síntese do C₁₃-C₂₇. A região de aminoácidos em azul indica a região selecionada para a síntese do N₂₉-T₄₇. Os números nos nomes dos peptídeos sintéticos representam a posição dos aminoácidos na nsLTP original. (B) Características bioquímicas dos peptídeos sintéticos.

5.3.2. Efeito dos peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ sobre o crescimento de fungos filamentosos

A atividade dos peptídeos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ foi avaliada sobre o crescimento dos fungos *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides*, *F. solani* e *F. oxysporum*. Na Figura 26, podemos observar que, na concentração de 100 µM, os peptídeos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ não foram capazes de inibir nenhum dos fungos testados. Na concentração de 200 µM, os peptídeos também não inibiram o crescimento de *C. lindemuthianum* e *C. gloeosporioides*. Podemos observar ainda na Figura 26 que o peptídeo N₂₉-T₄₇ foi capaz de inibir significativamente ($p \leq 0,05$) 35% do crescimento do fungo *F. solani* e 21% do crescimento do fungo *F. oxysporum*, o mesmo não pôde observado para o peptídeo C₁₃-C₂₇, que, na concentração de 200 µM, não foi capaz de inibir nenhum dos fungos testados, quando comparado com os controles.

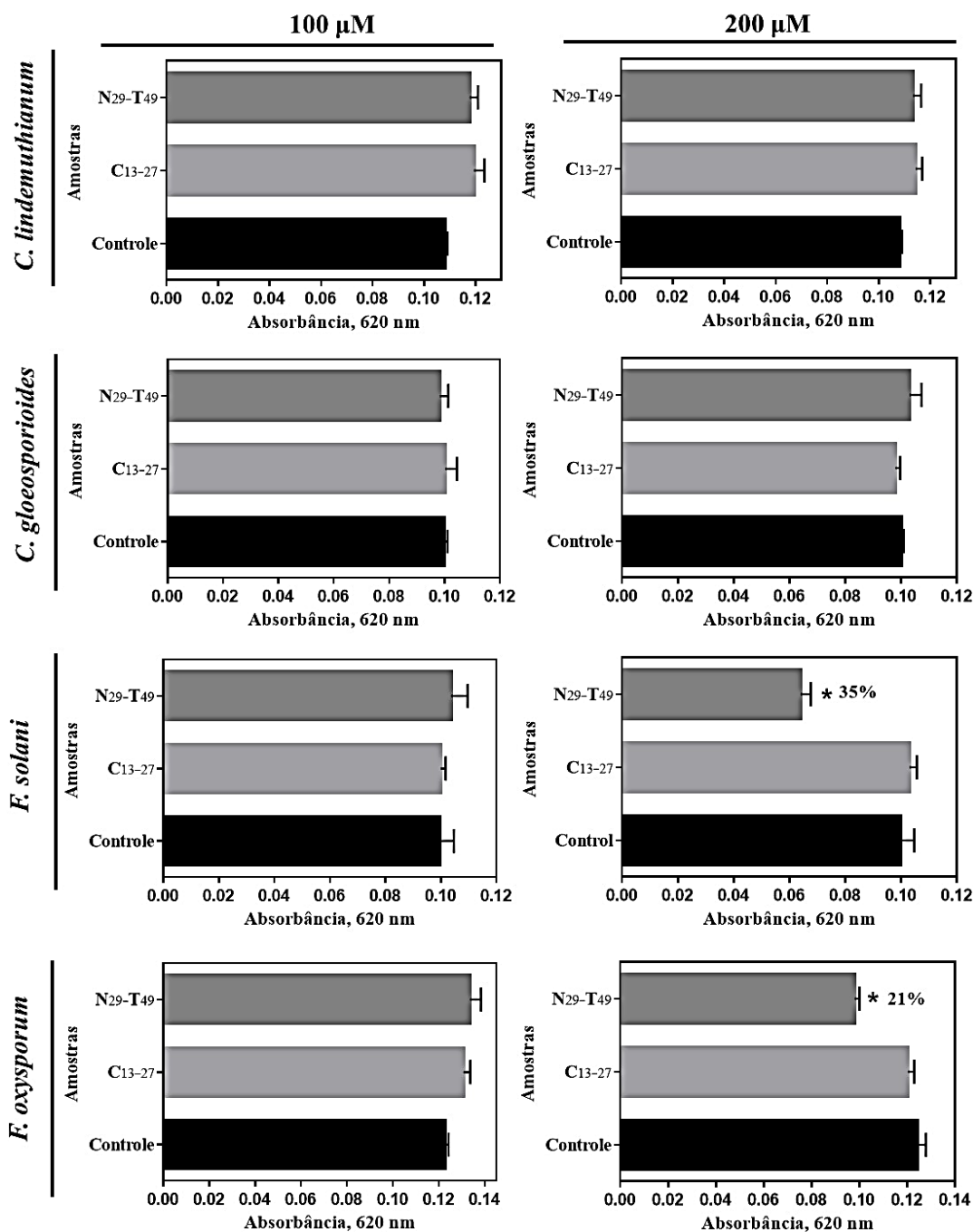


Figura 26 – Visualização gráfica do ensaio de inibição do crescimento de diferentes fungos filamentosos na ausência (controle) e na presença de 100 e 200 μM peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇. O crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* foi observado até 24 h, enquanto os do gênero *Colletotrichum*, até 30 h. Os valores são médias (±SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e controle. Acima das barras é mostrado o valor da inibição (%).

5.3.3. Efeito dos peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ sobre permeabilização de membranas fúngicas

Após 24 h do ensaio de inibição, avaliamos se os peptídeos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ têm capacidade de permeabilizar membranas. A Figura 27 mostra que, na presença dos peptídeos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇, os fungos *F. solani* e *F. oxysporum* não apresentaram fluorescência, assim como observado nos controles crescidos na ausência dos peptídeos, concluindo que estes peptídeos não foram capazes de agir sobre a membrana plasmática destes fungos e causar permeabilização, nas condições testadas.

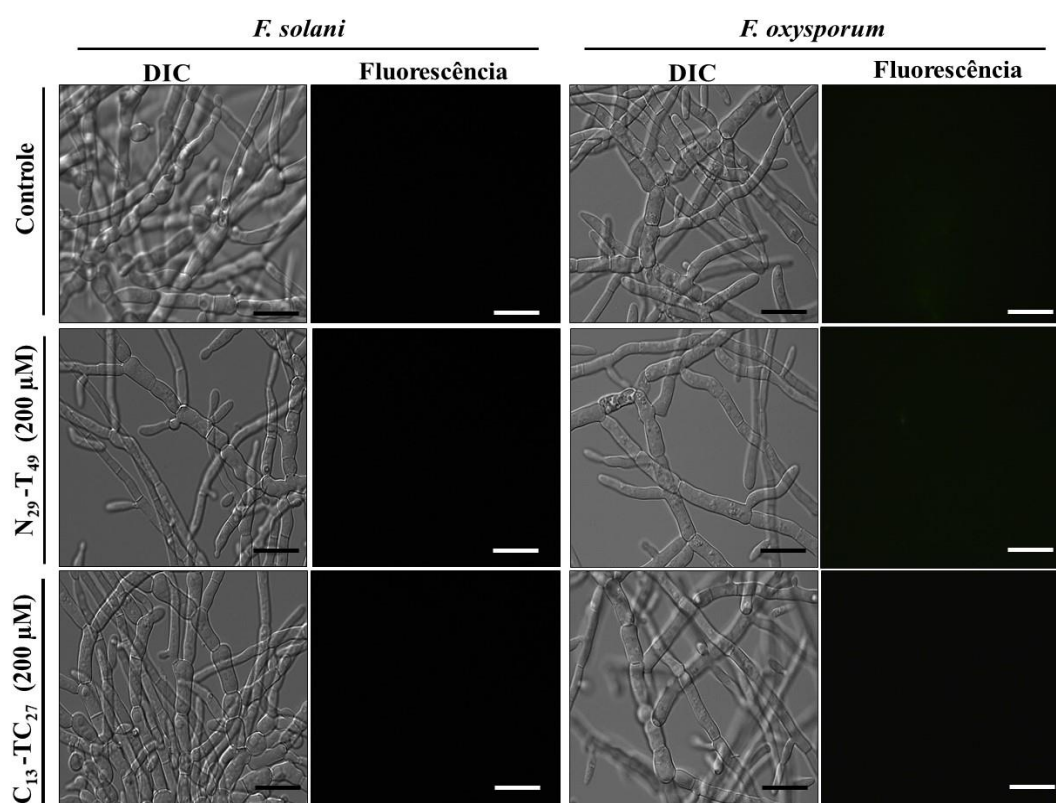


Figura 27 – Imagens de microscopia de fluorescência dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* incubados com o corante *Sytox Green*, após terem sido crescidos na ausência (controle) e na presença de 200 μM dos peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 50 μm.

5.3.4. Detecção de ROS em células fúngicas induzido pelos peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇

A Figura 28 mostra os fungos *F. solani* e *F. oxysporum* após 24 h de ensaio de inibição do crescimento, incubados com a sonda específica para ROS. Observa-se que, na concentração de 200 μ M, apenas o peptídeo N₂₉-T₄₇ apresentou marcação para o corante, indicando ser este peptídeo capaz de induzir aumento da produção de ROS nos fungos *F. solani* e *F. oxysporum*. O mesmo comportamento não foi visto nos respectivos controles.

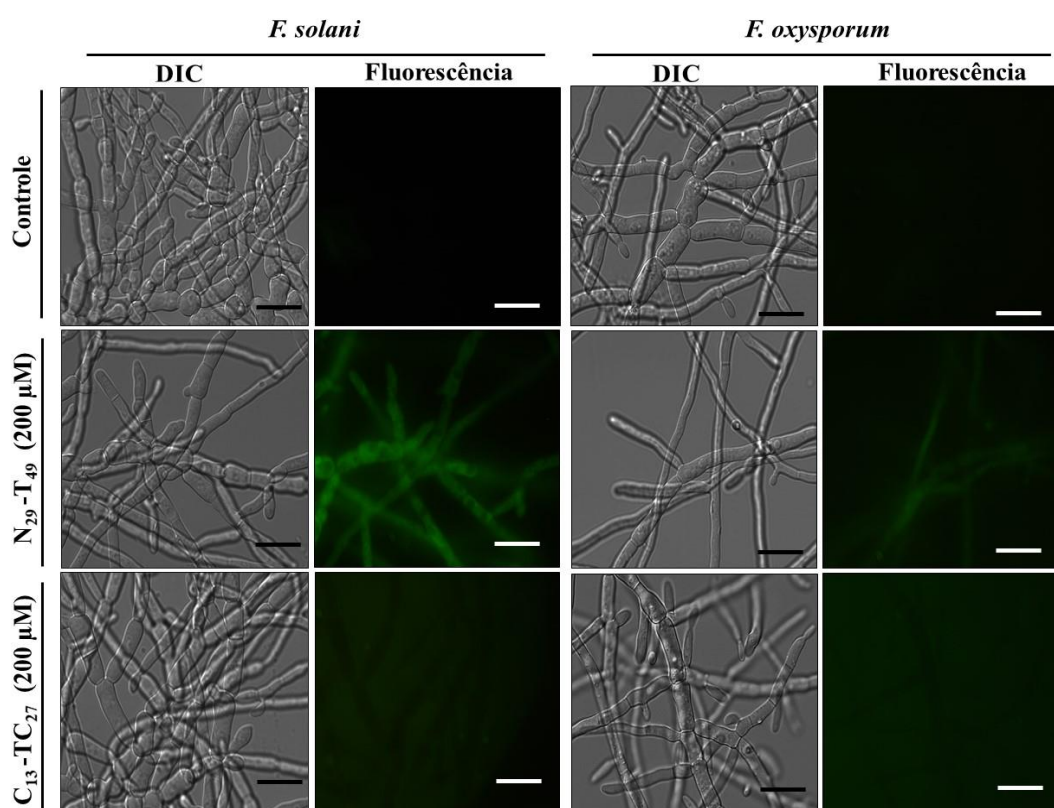


Figura 28 – Imagens de microscopia de fluorescência dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* após serem incubados com o corante para verificação de indução de ROS (2', 7' – diclorofluoresceína diacetato), após terem sido crescidos na ausência (controle) e na presença de 200 μ M dos peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μ m.

5.3.5. Atividade sinérgica da combinação do FLC com os peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇

Avaliamos se os peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇, combinados com a droga FLC, apresentavam atividade sinérgica sobre os fungos *F. solani* e *F. oxysporum*.

Foram conduzidos ensaios de inibição do crescimento dos fungos *F. solani*, Figura 29A, e *F. oxysporum*, Figura 29B, utilizando diferentes concentrações de FLC para determinar sua IC₅₀. Tendo estes resultados de inibição como referência, foi calculada a IC₅₀ dos respectivos fungos (Figuras 29C e 29D). Para *F. solani*, a concentração de 37 µg.mL⁻¹ de FLC foi suficiente para causar 52% de inibição, enquanto para *F. oxysporum*, foram necessários 100 µg.mL⁻¹ de FLC para alcançar 50% de inibição. Na Figura 30, podemos observar a combinação do FLC (na concentração das respectivas IC₅₀) com 200 µM dos peptídeos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ sobre o crescimento dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum*. Notamos que não houve atividade sinérgica sobre os fungos testados, pois quando as substâncias foram combinadas não houve inibição ou a inibição causada foi inferior àquela das substâncias testadas individualmente.

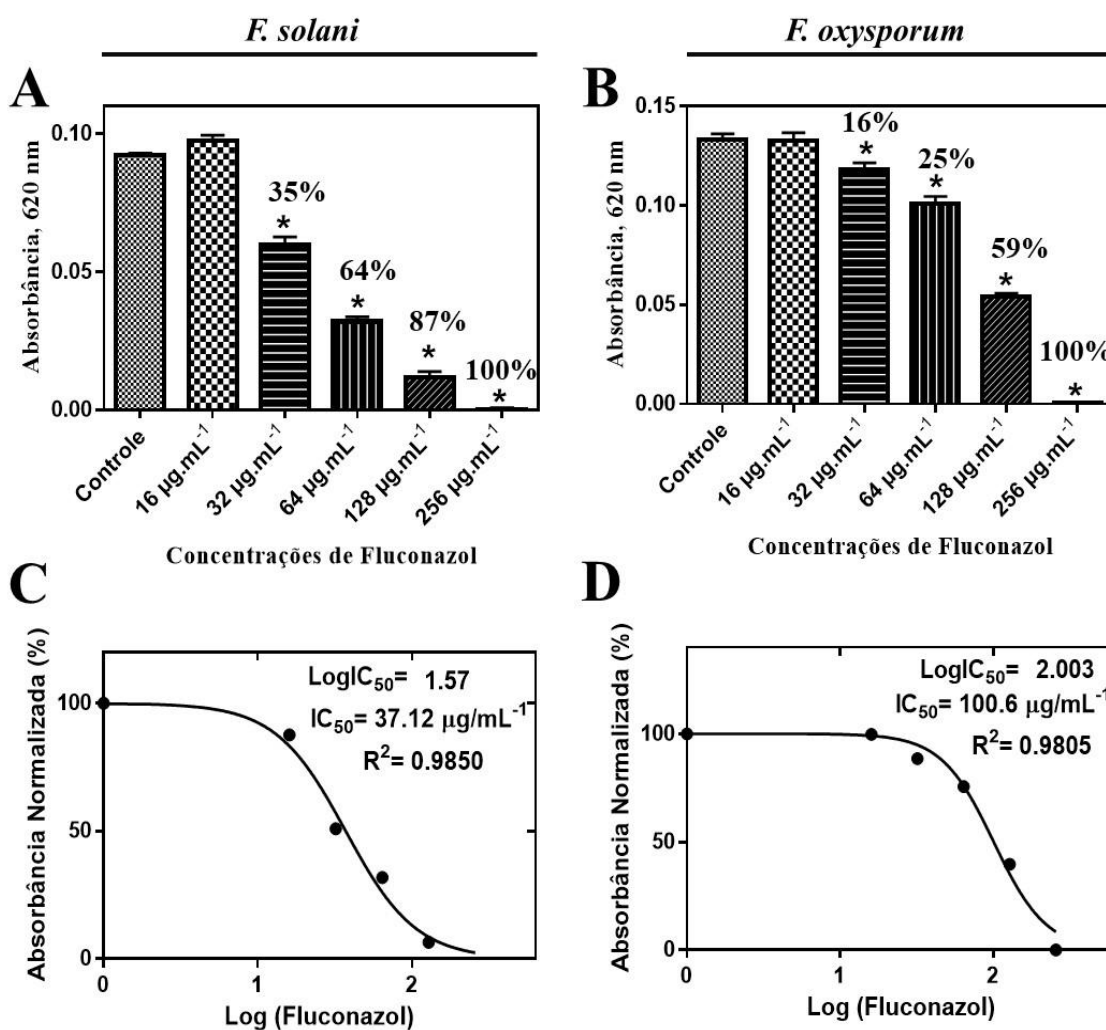


Figura 29 – Visualização do ensaio de inibição do crescimento dos fungos *F. solani* (A) e *F. oxysporum* (B) na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações de FLC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O ensaio foi analisado por 24 h. Considerando estes dados de inibição do crescimento em função da concentração da substância usada, foram determinadas por normalidade as IC_{50} do FLC para *F. solani* (C) e *F. oxysporum* (D).

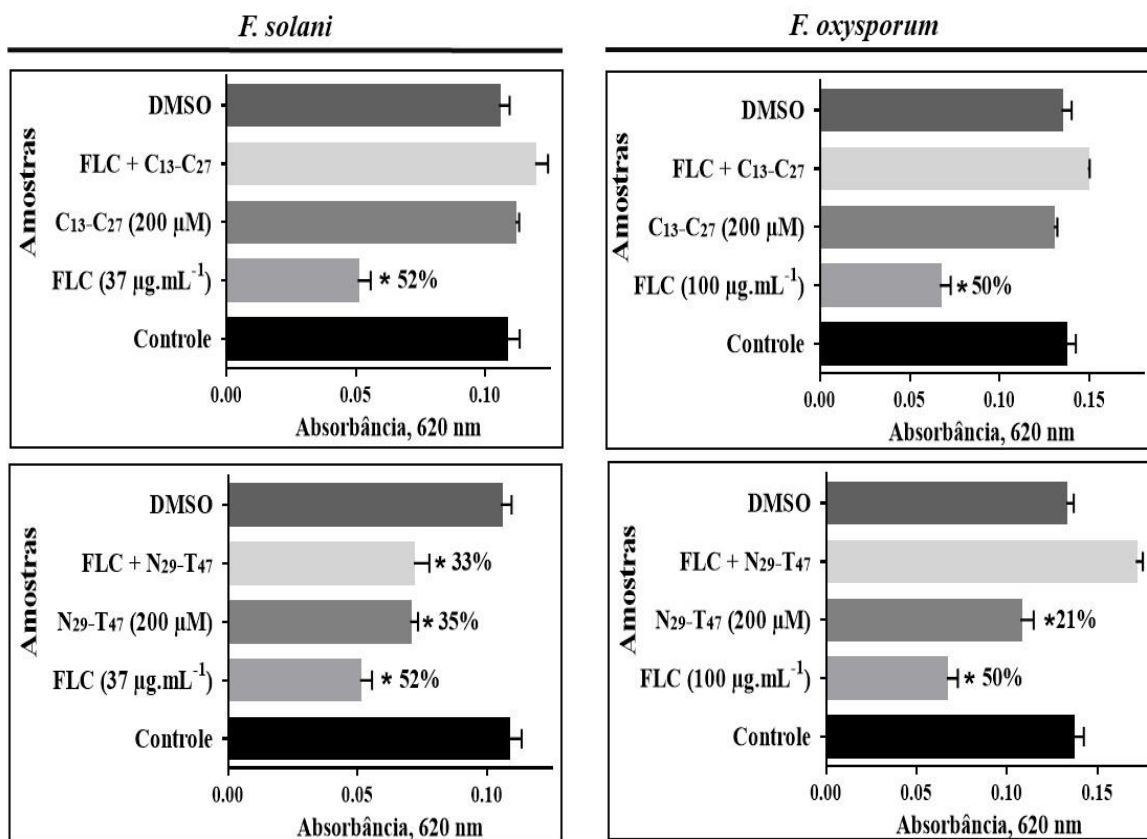


Figura 30 – Visualização gráfica do ensaio do efeito dos peptídeos sintéticos (C13-C27 e N29-T47) e FLC (isolados e em combinação) sobre o crescimento dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum*. O ensaio foi avaliado por 24 h. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras é indicado o valor da inibição (%).

6. DISCUSSÃO

6.1. Purificação, caracterização parcial e mecanismo de ação das frações peptídicas dos frutos de *C. annuum*

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas de baixa massa molecular que podem ser encontrados em praticamente todos os organismos, desde procariotos até seres humanos. Essas moléculas apresentam atividade inibitória contra vírus, bactérias, fungos, insetos, entre outros, desempenhando importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções e predação (Li *et al.*, 2012; Meneguetti *et al.*, 2017). A atividade antimicrobiana apresentada pelos AMPs de plantas e sua capacidade de permeabilizar membrana plasmática têm despertado o interesse de muitos pesquisadores, que vêm isolando esses componentes de diferentes espécies vegetais no intuito de investigar o papel dessas moléculas na defesa e estudá-las como uma possível alternativa no controle de microrganismos que vêm se tornando cada vez mais resistentes aos antibióticos clássicos, como o FLC, usado comercialmente para combater infecções fúngicas (Liu *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014). Com base nestes estudos, este trabalho teve como objetivo isolar e estudar as atividades antimicrobianas e os mecanismos de ação de peptídeos dos frutos de *C. annuum* bem como sua atividade sinérgica com a droga FLC.

Iniciamos nosso trabalho pela extração proteica dos frutos de pimenta para obtenção de uma fração rica em peptídeos (FRP), conforme metodologia descrita por Taveira *et al.*, (2014). Após a tricina-SDS-PAGE, verificamos na fração FRP

presença de bandas proteicas com massa molecular abaixo de 10 kDa, confirmando o enriquecimento em peptídeos (Figura 6). Alguns AMPs já foram detectados em frutos de diferentes espécies de plantas (Liu *et al.*, 2006; Mandal *et al.*, 2009; Taveira *et al.*, 2014, Santos *et al.*, 2017). A fração FRP apresentou atividade inibitória contra todos os fungos testados (Figura 7), e, então, só assim foi submetida à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (Figura 8A), técnica amplamente utilizada por pesquisadores para a purificação de peptídeos, que tem se mostrado bastante eficiente (Odintsova *et al.*, 2008; Zottich *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2013). Após o processo de fracionamento e constatarmos presença de peptídeos nas seis diferentes frações obtidas (Figura 8B), foi visto que a fração F2 foi a mais eficiente em reduzir significativamente o crescimento de todos fungos testados (Figura 9). Inúmeros são os trabalhos que mostram atividade antimicrobiana relacionada às pimentas, seja de extratos, proteínas ou peptídeos purificados. Carvalho *et al.*, (2010) relataram inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* por extratos de diferentes espécies de pimenta (*C. annuum*, *C. frutescens* e *C. baccatum*). Frações peptídicas isoladas de sementes de *C. annuum* também foram capazes de inibir o crescimento de sete diferentes espécies de leveduras (Ribeiro *et al.*, 2007). No entanto, estudos revelam que a atividade antimicrobiana exercida por tais moléculas é diferencial, dependendo do microrganismo, do AMP e da concentração utilizada (Carvalho e Gomes, 2009; Vriens *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação de vários AMPs está envolvido na permeabilização de membranas biológicas (Mello *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012), uma vez que a natureza catiônica e anfipática dos AMPs lhes confere capacidade de interagir com os elementos estruturais negativos nas paredes celulares e com os fosfolípidios das membranas dos microrganismos, provocando desorganização da membrana e aumento da permeabilização, incluindo a formação de poros, que podem ou não estar relacionados à atividade antimicrobiana do peptídeo e à morte do microrganismo, sendo estes fenômenos não obrigatoriamente relacionados (Jenssen *et al.*, 2006, Bard *et al.*, 2016). Neste trabalho, foi demonstrada a propriedade de as frações F1 e F2 induzirem danos na membrana plasmática do fungo *C. gloeosporioides*. As frações F1, F2 e F3 também causaram danos na membrana do fungo *F. solani* (Figura 10), e sua permeabilização foi visualizada pelo uso do corante *Sytox Green*, corante que tem

afinidade por ácidos nucleicos e que penetra apenas em células que apresentam a membrana comprometida. Neste mesmo ensaio, ainda foi possível observarmos outro aspecto importante quanto à atividade destas frações frente ao crescimento do fungo *F. solani*, que foi a indução de alterações morfológicas. Essa habilidade de permeabilizar membrana e induzir alterações na morfologia já foi vista em diferentes famílias de peptídeos (Thevissem *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2018). Zottich *et al.*, (2013) demonstraram que os fungos *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum*, quando crescidos na presença de Cc-GRP (*glycine rich protein* isolada de sementes de *Coffea canephora*), apresentaram permeabilização de membrana e alterações nos padrões de crescimento normal dos fungos.

Estudos sugerem que a capacidade de permeabilização de membrana pode ser um evento secundário ao aumento da produção endógena de ROS (Maiese *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2017). ROS são moléculas reativas, geradas naturalmente durante o metabolismo celular (Kowaltowski *et al.*, 2009), e a falha na detoxificação de ROS leva direta ou indiretamente a danos no DNA, oxidação de proteínas, carboidratos e lipídeos (Kowaltowski *et al.*, 2009). Ensaios de fluorescência demonstraram que a fração F3 causou aumento dos níveis de ROS nas células do fungo *C. gloeosporioides*, assim como F1, F2 e F5 induziram este processo em células de *F. solani* (Figura 11). Kulkarni *et al.*, (2009) mostraram que o aumento na produção de ROS nos organismos alvo é um mecanismo de ação intimamente relacionado a eventos de morte celular programada. Este mecanismo tem sido bem caracterizado, em especial, para a família das defensinas, mas também para outros AMPs (Aert *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012).

Uma característica muito marcante descrita para os AMPs é sua capacidade de atuar em sinergismo com outras moléculas naturais ou sintéticas, porém, para AMPs de plantas, poucos ainda são os trabalhos relacionados (Matsuzaki, 2009). Em vista dos resultados obtidos e da baixa atividade inibitória apresentada pelas frações F1, F2, F4 e F5 sobre o fungo *F. solani*, estas frações foram testadas em combinação com a droga FLC com o intuito de potencializar os efeitos sobre este mesmo fungo. Bard *et al.*, (2018) mostraram que os peptídeos Cc-LTP2 e Cc-GRP, em combinação com FLC, foram capazes de inibir o crescimento do fungo *F. solani*, promover a permeabilização de membrana e induzir a produção de ROS, sugerindo que eles agem sinergicamente,

promovendo a potencialização da ação antimicrobiana. Em outro trabalho, Taveira *et al.*, (2016) mostraram que a combinação entre o peptídeo da família das tioninas CaThi e o FLC inibiu em 100% o crescimento do fungo *F. solani*. Entretanto, nossos resultados mostram que, em sinergismo, as substâncias não apresentaram aumento da atividade inibitória sobre o fungo *F. solani* (Figura 13). É importante ressaltar que poucos são os estudos feitos em sinergismo com drogas comerciais para tentar combater fungos patogênicos de plantas. Muitos estudos envolvem a combinação de antifúngicos clássicos como FLC e anfotericina B com diferentes compostos para combater organismos resistentes na área de patógenos humanos (Silva, 2008; Khara *et al.*, 2015). Estudos feitos neste trabalho para tentar combater fungos fitopatogênicos, muitos deles resistentes, principalmente os representantes do gênero *Fusarium*, são importantes alternativas agronômicas que podem ser utilizadas no controle destes patógenos.

6.2. Purificação, caracterização e mecanismo de ação das frações peptídicas dos frutos de *C. chinense*

Atualmente, as doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos limitam constantemente a produção agrícola (Pereira *et al.*, 2011). Com o objetivo de melhorar e aumentar a produção, o uso de compostos produzidos naturalmente pelos vegetais parece ser uma alternativa sustentável e promissora contra esses patógenos vegetais, como, por exemplo, vírus, bactérias e fungos, que desenvolveram resistência a muitos bactericidas e fungicidas utilizados no controle de doenças de plantas (Pane *et al.*, 2013). Nesse contexto, devido a importância das propriedades medicinais e principalmente pelo nosso interesse pelas atividades antimicrobianas já mostradas na literatura para *Capsicum* spp., neste trabalho, isolamos e caracterizamos AMPs de frutos de *C. chinense* e avaliamos seu mecanismo de ação contra microrganismos de interesse agrônomo.

Inicialmente, em razão da presença de peptídeos na fração FRP de *C. chinense* (Figura 14) e da atividade antifúngica (Figura 15), essa fração foi submetida à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (Figura 16A), e as dez frações obtidas (Figura 16B) foram testadas quanto a seus efeitos sobre crescimento dos fungos *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. solani* e *F.*

oxysporum (Figura 17). Nos últimos anos, nosso grupo relatou vários AMPs de plantas como potentes inibidores do crescimento de microrganismos (Games *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2017; Maracahipes *et al.*, 2019b). Games *et al.*, (2008) purificaram uma defensina das sementes *Phaseolus vulgaris*, denominadas PvD1, que mostrou atividade inibitória contra leveduras e fungos fitopatogênicos na concentração de 100 µg.mL⁻¹. Taveira *et al.*, (2014) observaram, em diferentes concentrações, a potente atividade de um peptídeo isolado de frutos *C. annuum*, denominado CaThi, contra as leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis* e as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Neste estudo, verificamos que as frações peptídicas de *C. chinense* apresentaram maior atividade inibitória sobre crescimento dos fungos quando testadas na concentração de 200 µg.mL⁻¹, tendo apresentado inibições mais eficientes sobre os fungos do gênero *Fusarium* do que sobre os fungos do gênero *Colletotrichum*, principalmente as frações F4 e F5. Santos *et al.*, (2017) isolaram a fração Fa5 de frutos de *C. annuum*, que apresentou alta atividade antimicrobiana apenas contra espécies do gênero *Fusarium*. Por outro lado, Silva *et al.*, (2017) mostraram que CaTI, um inibidor de protease isolado de sementes de *C. annuum*, foi capaz de inibir apenas o crescimento de fungos do gênero *Colletotrichum*. Slazak *et al.*, (2018) isolaram várias citotoxinas de *Viola odorata*, denominadas cyO2, cyO3, cyO13 e cyO19, e mostraram que todas elas apresentaram atividade inibitória contra todos os fungos testados (*F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *Mycosphaerella fragariae* e *Botrytis cinerea*). Esses resultados mostram que, em geral, os AMPs podem inibir alguns patógenos, mas não outros, o que dependerá não apenas da concentração aplicada, mas também do AMP, das espécies de fungos testadas, da composição lipídica da membrana e dos alvos no fungo, incluindo a capacidade de resposta do fungo aos efeitos do AMP (Gonorazky *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006). Além disso, a capacidade de interações sinérgicas entre peptídeos vegetais presentes em diferentes frações envolvidas na defesa contra patógenos tem sido relatada na literatura, sendo tais interações de sinergismo frequentes e de grande valor para a ação antimicrobiana dos AMPs (Carvalho e Gomes, 2011). Carvalho *et al.*, (2001) mostraram interações de sinergismo entre uma LTP e uma defensina, ambas isoladas de sementes de *Vigna unguiculata*, que, em combinação, inibiram fortemente o crescimento de *F. oxysporum* e *F. solani*. Chen *et al.*, (2006) relataram que o tomate transformado

com os genes β -1,3-glucanase e defensina apresentou maior resistência à bactéria *Ralstonia solanacearum*. Fardin *et al.*, (2016) avaliaram o sinergismo entre duas frações obtidas de sementes de *Bertholletia excelsa* e observaram que as frações isoladas eliminaram 27,9% (fração H3) e 27,7% (fração H4) das células de *Leishmania amazonensis*, mas combinadas, as frações eliminaram 97,7% dessas células.

Além da atividade antifúngica dos AMPs vegetais, sua atividade antibacteriana foi descrita para uma grande variedade de bactérias Gram-negativas e/ou Gram-positivas (Raaijmakers *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2013). Mostramos que, na concentração de $300 \mu\text{g/mL}^{-1}$, todas as frações de *C. chinense* apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento da bactéria *X. euvesicatoria*, com exceção da fração F1, que assim como o controle não apresentaram zona de inibição (Figura 18). Teixeira *et al.*, (2006) mostraram que frações enriquecidas de peptídeos isolados de folhas de pimenta apresentaram atividade antimicrobiana sobre as bactérias fitopatogênicas *R. solanacearum* e *C. michiganensis* sp. *michiganensis*. Bard *et al.*, (2016) mostraram que $75 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de Cc-LTP2, uma proteína isolada de *C. canephora*, foi capaz de causar uma zona de inibição de 0,25 mm sobre o crescimento da *X. euvesicatoria*. Pereira *et al.*, (2018) também mostraram que no ensaio de antibiograma com a *X. euvesicatoria*, $320 \mu\text{g/mL}^{-1}$ do extrato proteico isolado de raízes de *C. annuum* foi capaz de causar zonas de inibição de 2,42 mm e 4,37 mm sobre esta mesma bactéria. O antibiograma é uma técnica amplamente utilizada, porém, não há consenso sobre os critérios para a interpretação dos valores obtidos. Vários métodos e escalas automatizadas são usadas para interpretar essa técnica, mas muitos desses métodos precisam ser aprimorados para melhor esclarecimento dos resultados. Portanto, neste estudo nos detemos em apenas elucidar se as frações de *C. chinense* apresentavam atividade antibacteriana.

Diante da atividade apresentada pelas frações F4 e F5, mostramos por análise de banco de dados que os peptídeos purificados eram nsLTP de plantas (Cc-LTP4b, Cc-LTP5b e Cc-LTP5c), com alta similaridade de sequência entre si (isoformas fracionadas com pequena diferença de hidrofobicidade), e um peptídeo similar à defensina (Cc-Def5a), com alto grau de similaridade com outros peptídeos isolados de *Capsicum* (Figura 19). Diz *et al.*, (2006) e Maracahipes *et al.*, (2019a) relataram a sequência de aminoácidos de uma LTP e de uma

defensina de planta, respectivamente pelo método de identificação de peptídeos por espectrometria de massas. Nestes dois artigos, esses autores mostraram a LTP e a defensina presentes em *C. annuum* e suas atividades antimicrobianas contra fungos. Bard *et al.*, (2014) isolaram dois peptídeos com similaridade às vicilinas presentes em uma única fração de *C. baccatum*, que exibiram forte atividade antifúngica contra várias leveduras. Taveira *et al.*, (2014) isolaram dois peptídeos similares à tionina em duas frações de frutos de *C. annuum*, com 42% de similaridade entre si.

Em função da alta concentração das frações necessárias para inibir a bactéria *X. euvesicatoria*, o baixo rendimento das frações e a dificuldade em purificá-las, nós optamos por dar continuidade ao nosso trabalho apenas com fungos do gênero *Fusarium*, na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, devido aos melhores resultados apresentados pelas frações F4 e F5. Assim, começamos a investigar o possível mecanismo de ação das frações F4 e F5 sobre *F. solani* e *F. oxysporum*. O mecanismo exato de ação exercido pelos AMPs ainda não está totalmente esclarecido, mas observações experimentais sugerem que a maioria dos AMPs inibe ou mata os microrganismos por meio de interações com a membrana, não sendo está uma regra (Carvalho e Gomes, 2007; Senyurek *et al.*, 2009). Demonstramos que as frações F4 e F5 comprometeram estruturalmente as membranas dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum*, causando sua permeabilização (Figura 20). Um peptídeo pertencente à família das tioninas, a viscotoxina A3 (VtA3), demonstrou ser capaz de alterar a permeabilidade da membrana plasmática, tendo sido também observado que esse peptídeo é internalizado pelas células de *F. solani* (Giudici *et al.*, 2006).

Ao analisar o mecanismo de permeabilização de membrana, é conhecido que várias alterações ocorrem como consequência dessa permeabilização, como, por exemplo, a perda de potencial de membrana. No entanto, as células necessitam desse potencial para desempenhar suas funções fisiológicas vitais, sendo a restauração obrigatória, com gasto de energia celular. Como consequência, as mitocôndrias produzem ROS pelo processo de redução de oxigênio, como, por exemplo, durante a produção de ATP na cadeia transportadora de elétrons (Maiese *et al.*, 2010; Vriens *et al.*, 2014). Maracahipes *et al.*, (2019b) mostraram que IIFF7Ca, um peptídeo isolado de frutos de *C. annuum*, pertencente à família das defensinas de plantas, apresentou forte

atividade antimicrobiana sobre *C. gloesporioides*, causando inibição do crescimento, permeabilização da membrana plasmática e aumento da produção intracelular de ROS. Neste trabalho, o aumento da produção de ROS foi observado apenas em *F. solani*, sugerindo que o aumento do estresse oxidativo induzido pelas frações F4 e F5 pode estar subjacente ao efeito inibitório do crescimento desse fungo. No entanto, não foram detectados estresses oxidativos para *F. oxysporum* nas condições estudadas, não sendo possível associar o papel destas frações na produção de ROS à inibição do crescimento desse fungo (Figura 21). Alguns autores mostram que o aumento da produção de ROS nos organismos alvo é um mecanismo de ação recorrente associado aos AMPs (Giudici *et al.*, 2006; Mello *et al.*, 2011). No entanto, a morte celular pode ser um evento independente, que ocorre individual ou complementarmente a outros mecanismos de ação (Straus e Hancock, 2006), conforme observado neste trabalho. Vieira *et al.*, (2015) mostraram que a defensina *Lp-Def1*, isolada de sementes de *Lecythis pisonis*, inibiu o crescimento de *C. albicans*, provocou permeabilização de membrana e perda de funcionalidade mitocondrial nesta levedura. No entanto, nenhum aumento endógeno de ROS foi observado.

Trabalhos mostraram que ROS são moléculas que aparecem nos momentos iniciais do processo apoptótico e que seu acúmulo no meio pode ser tóxico aos organismos, levando à destruição de vários tipos celulares, como, por exemplo, as mitocôndrias que, durante o processo de apoptose, sofrem colapso do potencial de membrana, sendo sua funcionalidade perdida (De Coninck *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2017). Neste trabalho, analisamos a presença de caspases ativas e a dissipação do potencial de membrana mitocondrial nos fungos *F. solani* e o *F. oxysporum*, tratados com as frações peptídicas de *C. chinense*. A apoptose é um tipo de morte celular programada, caracterizada por alterações bioquímicas e físicas que ocorrem no citoplasma e nos componentes celulares, sendo regulada por uma complexa rede de proteínas e vias metabólicas. O núcleo central desse processo é regulado por uma família de proteínas, denominadas caspases (Maiese *et al.*, 2010). As caspases são proteases específicas de aspartato contendo cisteína, normalmente ativadas nos estágios iniciais da apoptose (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010). Verificamos que apenas a fração F4 ativou caspases (Figura 22), mas não causou dissipação do potencial da membrana mitocondrial em *F. solani* (Figura 23). Para *F. oxysporum*, observou-se

que ambas as frações (F4 e F5) ativaram caspases (Figura 22) e causaram perda de funcionalidade mitocondrial nesse fungo (Figura 23). Uma defensina de rabanete, *HsAFP1*, também foi capaz de induzir acúmulo intracelular de ROS, sendo necessárias caspases no processo para causar apoptose em células de *C. albicans* (Aerts *et al.*, 2011). Uma defensina sintética ($\gamma_{33-41}\text{PvD1}^{++}$) também foi capaz de ativar metacaspases em células de *C. buinensis* e ainda causar colapso do potencial da membrana mitocondrial nessas células (Mello *et al.*, 2019). Taveira *et al.*, (2018) mostraram que o *CaThi* também desencadeou eventos que levaram à morte da levedura *C. tropicalis*, como o aumento da produção endógena de ROS, presença de caspases ativas, dissipação do potencial da membrana mitocondrial e regulação do pH externo das células da levedura. Sendo assim, podemos assumir que, apesar de as frações F4 e F5 num primeiro momento causarem alterações morfológicas e interagirem com a membrana causando danos e permeabilização nos fungos *F. solani* e *F. oxysporum*, estas frações peptídicas possui alvos e vias de mecanismos distintos sobre estes fungos. Após as frações F4 e F5 terem permeabilizado as células de *F. oxysporum*, observamos que elas atuam nas mitocôndrias, exercendo suas funções tóxicas ao fungo. Já em *F. solani*, as frações F4 e F5 permeabilizaram a membrana, aumentaram a produção de ROS, porém foi observada ativação de caspases apenas pela fração F4, sendo necessários mais estudos para elucidar os eventos que conduzem à morte celular neste microrganismo alvo.

Várias classes de AMPs já foram implicadas no mecanismo de resistência das plantas contra patógenos, incluindo inibidores de protease (IPs) (Sels *et al.*, 2008). As plantas desenvolveram genes que codificam IPs, que são expressos como componentes constitutivos em diferentes estágios do desenvolvimento da planta (sementes, tubérculos, flores e frutos) ou são expressos em resposta aos ataques de pragas e patógenos que dependem de várias proteases como fatores de virulência (Gomes *et al.*, 2011). Os IPs podem inibir a atividade proteolítica de enzimas de diferentes fontes e competem com substratos para acessar os locais ativos das enzimas (Ribeiro *et al.*, 2012; Clemente *et al.*, 2019). Com base nisso, concluímos nosso estudo avaliando a capacidade de as frações de *C. chinense* inibirem a atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina, enzimas da classe serino protease, que podem ser encontradas em organismos patogênicos que colonizam tecidos vegetais. Mostramos que apenas as frações F1 e F2 foram

capazes de inibir significativamente ($p \leq 0,05$) a atividade da enzima tripsina (Figura 24A) e confirmamos a presença desses inibidores nessas frações com um ensaio de zimografia reversa (Figura 24C), mas estas frações não foram capazes de inibir a atividade hidrolítica da enzima quimotripsina na concentração avaliada (Figura 24B). Silva *et al.*, (2015) mostraram que um peptídeo isolado de mamona inibiu apenas a atividade da enzima tripsina. Ribeiro *et al.*, (2012) estudaram o efeito de um peptídeo isolado de sementes de *C. annuum*, que foi capaz de inibir a atividade das enzimas tripsina e quimotripsina, inibir o crescimento de várias leveduras e ainda causar permeabilização da membrana nesses microrganismos. Assim, este trabalho revela o grande potencial presente nos frutos de *C. chinense* na resposta de defesa, visando a contribuir para o planejamento de novos antifúngicos.

6.3. Atividade antimicrobiana, sinérgica e mecanismo de ação dos peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ sobre fungos filamentosos

Os AMPs são moléculas naturais, consideradas uma promissora classe de terapêuticos por uma série de fatores, como o amplo espectro antimicrobiano, têm atividade em baixas concentrações, muitos têm baixa toxicidade em células eucarióticas, têm propriedades imunomoduladoras, pois alertam o hospedeiro da ação do patógeno e estimulam o sistema de defesa, e podem atuar em sinérgico com as classes de antibióticos já existentes, visto que seu mecanismo de ação difere significativamente dos antibióticos convencionais (Giuliani *et al.*, 2007; Upton *et al.*, 2012). E ainda se acredita que, em razão de seu mecanismo de ação (aumento da permeabilidade de membrana), o aparecimento de resistência a essas moléculas é praticamente improvável (Hancock e Sahl, 2006). Entretanto, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos em relação a uma possível aquisição de resistência aos AMPs por parte dos microrganismos, como descrito por Giuliani *et al.*, (2007). Estudos feitos com bactérias mostraram que elas podem adquirir resistência quando expostas a elevados níveis de AMPs, alterando a carga negativa de moléculas da superfície e alterando a fluidez da membrana, por exemplo, de modo a evitar interação com o AMP (Peschel, 2002; Bader *et al.*, 2005; Marr *et al.*, 2012). Além do mais, para estudos estruturais e biológicos, é requerida uma grande quantidade de AMPs com elevada qualidade,

e a obtenção destes peptídeos de fontes naturais é, em alguns casos, inviável, pois o processo é trabalhoso e demorado, ocasionando num baixo rendimento.

Na seção anterior, foi mostrado a obtenção da sequência de aminoácidos para o peptídeo Cc-LTP4b, referente a uma LTP de plantas, e com base nesta sequência primária, dois peptídeos sintéticos foram obtidos comercialmente e nomeados de C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ (Figura 25). Neste trabalho em questão, nós testamos a atividade antimicrobiana desses peptídeos contra fungos filamentosos, avaliamos seu possível mecanismo de ação e sinergismo com a droga fluconazol. Inicialmente, testamos isoladamente a atividade dos peptídeos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ em diferentes concentrações, mas apenas N₂₉-T₄₇ foi capaz de reduzir o crescimento dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* (Figura 26). Bard *et al.*, (2018) mostraram que Cc-LTP2, uma LTP isolada de sementes de *C. canephora*, não apresentou atividade contra nenhum dos fungos testados. Com base nos nossos resultados obtidos, especulamos que esta região selecionada, sequência de aminoácidos correspondente ao peptídeo sintético N₂₉-T₄₇, contribui para a atividade, porém não é esta região sozinha a responsável pela atividade, uma vez que, quando testamos a fração F4 de *C. chinense* sobre os fungos *F. solani* e *F. oxysporum*, a atividade inibitória observada foi maior. Mello *et al.*, (2019) mostraram que a defensina sintética γ_{31-45} PvD1⁺⁺ foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* e *C. buinensis* em todas as concentrações testadas quando a carga líquida positiva deste peptídeo foi aumentada. Neste caso, substituindo dois resíduos de ácido aspártico por dois de arginina, visto que as células fúngicas têm estruturas carregadas negativamente em suas paredes celulares (como os fosfomanolipídios), que podem servir como locais mais propícios de ancoragem primária para os peptídeos carregados positivamente.

Embora o mecanismo de toxicidade das LTPs não seja totalmente claro, sabe-se que ele depende, ao menos em parte, da sua capacidade de promover a permeabilização da membrana do patógeno (Carvalho e Gomes, 2007). Dessa forma, a permeabilidade de membrana também foi investigada e foi visto que os peptídeos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ não são eficientes em promover a permeabilização da membrana dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* (Figura 27). Sagaram *et al.*, (2011) mostraram que o peptídeo sintético MsDef1 γ_4 foi capaz de permeabilizar a membrana de *F. graminearum*. Em outro trabalho, Islam *et al.*, (2017) descobriram que os resíduos de aminoácidos catiônicos, presentes na região γ -

core da defensina *MtDef5*, são responsáveis pela atividade antifúngica e pela permeabilização de membrana nos fungos *F. graminearum* e *N. crassa*. No entanto, em alguns casos, o AMP atravessa a membrana sem afetar sua integridade e interage com alvos intracelulares (Zhu *et al.*, 2017). Li e colaboradores (2019) mostraram que o peptídeo CF-14 apresentou atividade sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, não tendo sido verificada nenhuma lise em sua membrana, sugerindo que este peptídeo interaja com a membrana mais discretamente e atue se ligando ao DNA. É importante ainda frisar que, embora ocorra em muitos casos, a inibição do crescimento pode ocorrer sem permeabilização da membrana e vice-versa (Teixeira *et al.*, 2012), como observado neste trabalho.

Estudos recentes vêm demonstrando que a permeabilização de membranas não é a única causa da morte de um microrganismo, uma vez que os AMPs podem ter vários alvos. O ROS, por exemplo, tem sido considerado um regulador primário da morte celular e está ligado a muitas vias apoptóticas. Nós observamos que o peptídeo N₂₉-T₄₇ causou aumento da produção de ROS em *F. solani* e *F. oxysporum* (Figura 28). Hwang *et al.*, (2011) mostraram que um peptídeo semelhante à tionina mostrou capacidade de aumentar o nível de ROS endógeno em células de *C. albicans*. Em outro estudo, Soares *et al.*, (2017) mostraram que a defensina *ApDef1*, isolada de sementes de *Adenantha pavonina*, causou aumento na produção e acúmulo de ROS, que levaram à permeabilização da membrana plasmática e, conseqüentemente, à morte de células de *S. cerevisiae* através de um processo apoptótico. Em relação aos resultados obtidos, podemos sugerir que o aumento da produção de ROS seja parte do mecanismo de ação envolvido na defesa do peptídeo N₂₉-T₄₇ sobre *F. solani* e *F. oxysporum*, havendo, provavelmente, outros mecanismos envolvidos na morte, mas precisaríamos investigar com mais cautela.

Alguns AMPs têm demonstrado potencializar o efeito de drogas comerciais quando atuando em conjunto visando à redução da dose aplicada (Feng *et al.*, 2014). No entanto, ao combinarmos os peptídeos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ com a droga FLC (IC₅₀), não houve aumento na inibição dos fungos testados (Figura 30). Taveira *et al.*, (2016) mostraram ocorrer sinergismo entre o FLC e o peptídeo *CaThi* contra seis leveduras de importância médica, tendo essa combinação ainda causado drásticas mudanças morfológicas nas células das leveduras. Silva *et al.*,

(2014) mostraram que um flavonoide, quando combinado com o FLC, induziu a externalização da fosfatidilserina, um importante marcador de apoptose, e a produção endógena de ROS. Alguns resultados semelhantes foram observados neste trabalho, porém apenas quando os compostos foram utilizados separadamente, não quando testados em combinação. Podemos sugerir um possível antagonismo dessas substâncias sobre o efeito de inibição do crescimento, ou seja, não houve nenhuma inibição quando as duas substâncias atuaram concomitantemente; ou ainda sugerir que este efeito de antagonismo da combinação pode não estar relacionado à interação das substâncias entre si, mas, sim, com o alvo de ligação como a composição da membrana dos fungos testados. Mais estudos são necessários para desvendar o possível alvo de ligação destes peptídeos sintéticos C₁₃-C₂₇ e N₂₉-T₄₇ e os mecanismos pelos quais eles e o FLC desenvolvem sobre *F. solani* e *F. oxysporum*. Vale ainda ressaltar que características do microrganismo alvo, espécie a ser estudada, a classe do microrganismo, são fatores muito importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. Substâncias que apresentam efeitos fungistáticos ou fungicidas podem apresentar especificidades, dependendo do organismo testado bem como da planta da qual o AMP foi isolado e da família à qual pertence (Nett e Andes, 2016; Lee *et al.*, 2016). Os peptídeos aqui testados foram desenhados com base na estrutura primária de um AMP, pertencente à família das LTPs. Embora as LTPs sejam conhecidas por sua atividade antimicrobiana, existem relatos na literatura de LTPs que apresentaram pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana como Ns-LTP1, isolado de *Triticum aestivum* (Dubreil *et al.*, 1998). A LTP, denominada Ace-AMP1, isolada de *Allium cepa*, é a LTP com atividade antimicrobiana mais forte já descrita, não tem nenhuma atividade quanto à transferência de lipídeos e não apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram negativas, porém exibe alta atividade contra fungos e bactérias Gram positivas (Cammue *et al.*, 1995). Assim, pretendemos ampliar os microrganismos alvo testados, como bactérias Gram positivas e patógenos fúngicos e leveduras. Estes microrganismos deverão ser testados da mesma forma, com os peptídeos sintéticos e também em combinação com FLC e/ou outras drogas comerciais. Esta etapa será fundamental para compreendermos a ação e os mecanismos antimicrobianos dos peptídeos derivados de AMPs de plantas.

7. CONCLUSÕES

- Mostramos que os frutos de *C. annuum* e *C. chinense* são ricos em proteínas e peptídeos e inibem o crescimento de fungos fitopatogênicos;
- Diversas frações foram obtidas após fracionamento dos extratos de *C. annuum* e *C. chinense*, tendo sido obtidas seis e dez frações ricas em peptídeos, respectivamente;
- A fração F2 de *C. annuum* foi a mais eficiente em reduzir o crescimento dos fungos *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides* e *F. solani*;
- As frações F1, F2 e F5 de *C. annuum* causaram permeabilização das membranas dos fungos *C. gloeosporioides* e *F. solani*;
- A fração F3 de *C. annuum* induziu a produção de ROS em *C. gloeosporioides*, assim como F1, F2 e F5 induziram ROS em *F. solani*;
- As frações de *C. annuum* em combinação com fluconazol não apresentaram atividade sinérgica sobre o crescimento de *F. solani*;

- As frações obtidas de *C. chinense* foram capazes de inibir o crescimento bacteriano e fúngico;
- Duas famílias de AMPs foram caracterizadas em frutos de *C. chinense*, família das defensinas e família das LTPs;
- As frações F4 e F5 de *C. chinense* causaram permeabilização da membrana, indução da produção endógena de ROS, ativação de caspases e colapso funcional de mitocôndrias em fungos de gênero *Fusarium*;
- As frações F1 e F2 de *C. chinense* mostraram-se específicas para inibição de tripsina;
- Peptídeos sintéticos desenhados a partir da sequência primária da LTP de *C. chinense* mostraram atividades inibitórias e indução da produção de ROS em fungos do gênero *Fusarium*;
- Peptídeos sintéticos não apresentaram sinergismo com o fluconazol sobre o crescimento dos fungos do gênero *Fusarium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adade, C.M., Oliveira, I.R., Pais, J.A., Souto-padrón, T. (2013) Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon*. 69:227–239.
- Adams, H.R. (2003) Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. *Guanabara Koogan*. 8:776–778.
- Aerts, A.M., François, I.E., Meert, E.M., Li, Q.T., Cammue, B.P., Thevissen, K. (2007) The antifungal activity of *RsAFP2*, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *World J Microbiol Biotechnol*. 13:243–247.
- Aerts, A.M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B.P., Thevissen, K. (2011) The antifungal plant defensin *HsAFP1* from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. *Front Microbiol*. 47:188–195.
- Akbar, N., Ahmad, H., Ghafoor, S., Begum, K., Afridi, S.G, Muhammad, I., Khan, I.A. (2010) Estimativa da diversidade genética no germoplasma de *Capsicum* usando DNA polimórfico amplificado aleatoriamente. *Asian J Agric Sei*. 2:53–56.

- Almeida, M.S., Cabral, K.M., Zingali, R.B., Kurtenbach, E. (2000) Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Arch Biochem Biophys.* 378:278–286.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res.* 25:3389–3402.
- Andrews, J. (1995) Peppers: the domesticated Capsicums. *New Edition*, University of Texas, 1:170.
- Antonio, A.S., Wiedemann, L.S.M., Junior, V.V. (2018) The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. *RSC Advances.* 8:25767-25784.
- Bader, M.W., Sanowar, S., Daley, M.E., Schneider, A.R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R.E., Le Moual, H., Miller, S.I. (2005) Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell.* 122:461–472.
- Bahar, A.A., Ren, D. (2013) Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals.* 6:1543–1575.
- Bard, G.C.V., Nascimento, V.V., Oliveira, A.E.A., Rodrigues, R., Da Cunha, M., Dias, G.B., Vasconcelos, I.M., Carvalho, A.O. Gomes, V.M. (2014) Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are α -amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology. *Pept Sci.*102:335–343.
- Bard, G.C.V., Zottich, U., Souza, T.A.M., Ribeiro, S.F., Dias, G.B., Pireda, S., Da Cunha, M., Rodrigues, R., Pereira, L.S., Machado, O.L.T., Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2016) Purification, biochemical characterization, and antimicrobial activity of a new lipid transfer protein from *Coffea canephora* seeds. *Genet Mol Res.*15:1–16.
- Bard, G.C., Taveira, G.B., Souza, T.A., Mello, E.O., Souza, S.B., Ramos, A.C., Carvalho, A.O., Pereira, L.S., Zottich, U., Rodrigues, R., Gomes, V.M. (2018) *Coffea canephora* Peptides in combinatorial treatment with fluconazole: Antimicrobial activity against phytopathogenic fungus. *Int J Microbiol.* 2018:10.

- Belarmino, L.C., Benko-Iseppon, A.M. (2010) Databank based mining on the track of antimicrobial weapons in plant genomes. *Curr Protein Pept Sci.* 11:195–198.
- Benko-Iseppon, A.M., Galdino, S.L., Calsa Júnior, T., Kido, E.A., Tossi, A., Belarmino, L.C., Crovella, S. (2010) Overview of plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci.* 11:181–188.
- Bento, C.S., Sudré, C.P., Rodrigues, R., Riva, E.M., Pereira, M.G. (2007) Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. *Sci Agrar.* 8:146–153.
- Birkenbihl, R.P., Liu, S., Somssich, I.E. (2017) Transcriptional events defining plant immune responses. *Curr Opin Plant Biol.* 38:1–9.
- Blat, S.F., Costa, C.P.D., Vencovsky, R., Sala, F.C. (2005) Reação de acessos de pimentão e pimentas ao oídio (*Oidiopsis taurica*). *Hortic Bras.* 23:72–75.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R., Cammue, B.P., Vanderleyden, J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol Lett.* 69:55–59.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A., Osborn, R.W. (1995) Plant Defensins: Nine antimicrobial peptides as components of the host defense system. *J Plant Physiol.* 108:1353–1358.
- Brogden, K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 3:238–250.
- Büttow, M.V., Barbieri, R.L., Neitzke, R.S., Heiden, G., Carvalho, F.I.F. (2010) Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. *Ciencia Rural.* 40:1264–1269.
- Cammue, B.P.A., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I.J., Proost, P., Van Damme, J., Osborn, R.W., Guerbet, F., Kader, J.C. (1995) A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* 109:445–455.
- Campos, M.L., Souza, C.M., Oliveira, K.B.S., Dias, S.C., Franco, O.L. (2018) The role of antimicrobial peptides in plant immunity. *J Exp Bot.* 69:4997–5011.

- Cândido, E.S., Cardoso, M.H.S., Sousa, D.A., Viana, J.C., Oliveira-Júnior, N.G., Miranda, V., Franco, O.L. (2014) The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. *Peptides*. 55:65–78.
- Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi, K., Baret, P.V., Keniya, M.V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A., Monk, B.C. (2009) Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 22:291–321.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F. (2010) Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ*. 17:763–773.
- Carvalho, A.O., Machado, O.L.T., Da Cunha, M., Santos, I.S., Gomes, V.M. (2001) Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol Biochem*. 39:137–146.
- Carvalho, A.O., Teodoro, C.E. S., Da Cunha, M., Okorokova-Façanha, A.L., Okorokov, L.A., Fernandes, K.V., Gomes, V.M. (2004) Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. *Physiol Plant*. 122:328–336.
- Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2007) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology – A concise review. *Peptides*. 28:1144–1153.
- Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2009) Plant defensins-Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*. 30:1007–1020.
- Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2011) Plant defensins and defensin-like peptides-biological activities and biotechnological applications. *Curr Pharm Des*. 17:4270–4293.
- Carvalho, H.H., Wiest, J.M., Cruz, F.T.D. (2010) Atividade antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. *Rev Bras Plantas Med*. 12:8–12.
- Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B. (2007) Sistema de produção de pimentas (*Capsicum* spp.). *Embrapa Hortaliças*. 21:18–20.

- Castro, M.S., Fontes, W. (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett.* 12:11–16.
- Cha, R., Sobel, J.D. (2004) Fluconazole for the treatment of candidiasis: 15 years experience. *Expert Rev Anti-infect Ther.* 2:57–366.
- Chen, S.C., Liu, A.R., Zou, Z.R. (2006) Overexpression of glucanase gene and defensin gene in transgenic tomato enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Russ J Plant Physiol.* 53:671– 677.
- Clemente, M., Corigliano, M.G., Pariani, S.A., Sánchez-López, E.F., Sander, V.A., Ramos-Duarte, V.A. (2019) Plant serine protease inhibitors: Biotechnology application in agriculture and molecular farming. *Int J Mol Sci.* 20:1324–1345.
- Colilla, F.J., Rocher, A., Mendez, E. (1990) γ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS J.* 270:191–194.
- Colombo, A.L., Matta, D., Almeida, L.P., Rosas, R. (2002) Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. *Int J Infect Dis.* 6:118–23.
- Costa, C.S.R., Henz, G.P. (2007) Pimenta (*Capsicum* spp.). Distrito Federal: Embrapa Hortaliças. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 10 nov. 2019.
- Coutos-Thevenot, P., Jouenne, T., Maes, O., Guerin, F., Grobois, M., Le Caer, J.P., Boulay, M., Deloire, A., Kader, J.C., Guerin, J. (1993) Four kDa proteins excreted by somatic embryos of grapevine are isoforms of lipid transfer proteins. *Eur J Biochem.* 217:885-889.
- Cowen, L.E. (2008) The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol.* 6:187–198.
- Cuenca-Estrella, M. (2014) Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect.* 20:54–59.
- Das, S., Teja, K.C., Duary, B., Agrawal, P.K., Bhattacharya, S.S. (2016) Impact of nutrient management, soil type and location on the accumulation of capsaicin in

- Capsicum chinense* (Jacq.): One of the hottest Chili in the world. *Sci Hort.* 213:354–366.
- De Coninck, B., Cammue, B.P.A., Thevissen, K. (2013) Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biol Rev.* 26:109–120.
- Di Maro, A., Terracciano, I., Sticco, L., Fiandra, L., Ruocco, M., Corrado, G. Parente, A., Rao, R. (2010) Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco. *J Biotechnol.* 147:1–6.
- Dias, G.B., Gomes, V.M., Zottich, U., Ribeiro, S.F.F., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S., Ferreira, A.T.S., Perales, J., Da Cunha, M. (2013) Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. seeds. *Protein J.* 32:15–26.
- Diz, M.S., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A.G.C., Da Cunha, M., Alves, E.W., Lokorokova-Façanha, A., Oliveira, M.A., Perales, J., Machado, O.L.T., Gomes, V.M. (2006) Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochim Biophys Acta.* 1760:1323–1332.
- Diz, M.S., Carvalho, A.O., Ribeiro, S.F., Da Cunha, M., Beltramini, L., Rodrigues, R., Nascimento, V.V., Machado, O.L.T., Gomes, V.M. (2011) Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds, with novel α -amylase inhibitory properties. *Physiol Plant.* 142:233–246.
- Dubreil, L., Gaborit, T., Bouchet, B., Gallant, D.J., Broekaert, W.F., Quillien, L., Marion, D. (1998) Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1e1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their *in vitro* antifungal properties. *Plant Sci.* 138:121–135.
- Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Pukhalsky, V.A., Grishin, E.V. (2005) Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides.* 26:2064–2073.

- EMBRAPA (2009) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007. Sistema de produção. Pimenta (*Capsicum* spp.). Disponível em: <http://sistemasdeprodução.cnpti.embrapa.br/> Acesso: 14/05/2019.
- EMBRAPA (2012) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema de produção. Pimenta (*Capsicum* spp.). Disponível em <http://pimenta/pimenta_capsicum_spp /importanciaeconomica.html> Acesso em 01 de novembro de 2019.
- Eschenauer, G.A., Carver, P.L., Lin, S.W., Klinker, K.P., Chen, Y.C., Potoski, B.A., Shields, R.K., Clancy, C.J., Nguyen, M.H., LAM, S.W. (2013) Fluconazole versus an echinocandin for *Candida glabrata* fungaemia: a retrospective cohort study. *J Antimicrob Chemother.* 68:922–926.
- Fardin, J.M., Carvalho, L.P., Nascimento, V.V., Melo, E.J.T., Gomes, V.M., Machado, O.L.T. (2016) Biochemical purification of proteins from *Bertholletia excelsa* seeds and their antileishmanial action *in vitro*. *World J Pharm Res.* 5:273–300.
- Felicioli, R., Garzelli, B., Vaccari, L., Melfi, D., Balestrieri, E. (1997) Activity staining of protein inhibitors of proteases on gelatin containing polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 244:176–178.
- Feng, Q., Huang, Y., Chen, M., Li, G., Chen, Y. (2014) Functional synergy of α -helical antimicrobial peptides and traditional antibiotics against Gram-negative and Gram-positive bacteria *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 34:197–204.
- Fica, C.A. (2004) Tratamento de infecções fúngicas sistêmica, primeira parte: fluconazol, itraconazol e voriconazol. *Rev Chilena Infectol.* 2:26–38.
- Figueira, T.N., Oliveira, F.D., Almeida, I., Mello, E.O., Gomes, V.M., Castanho, M.A.R.B. (2017) Challenging metastatic breast cancer with the natural defensin PvD1. *Nanoscale.* 9:16887–16899.
- Filgueira, F.A.R. (2013) Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. *Ver Ampl*, Viçosa:UFV, 1:421.

- Filho, R.L., Romeiro, R.S. (2009) Sensibilidade de *Xanthomonas vesicatoria* a antibióticos para desenvolvimento de um meio semisseletivo. *Rev Tróp Ciênc Agric Biol.* 3:28–39.
- Finkina, E.I., Melnikova, D.N., Bogdanov, I.V. (2016) Lipid transfer proteins as components of the plant innate immune system: structure, functions, and applications. *Acta Naturae.* 8:29.
- Games, P.D., Santos, I.S., Mello, E.O., Diz, M.S.S, Carvalho, A.O., Souza-Filho, G.A., Da Cunha, M., Vasconcelos, I. M., Gomes, V. (2008) Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides.* 29:2090–2100.
- García, C.C., Barfuss, M.H.J., Sehr, E.M., Barboza, G.E., Samuel, R., Moscone, E.A., Ehrendorfer, F. (2016) Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, *Solanaceae*). *Ann Bot.* 118:35–51.
- Giudici, M., Poveda, J.A., Molina, M.L., De la Canal, L., Gonzalez-Ros J.M, Pfüller K., Pfüller, U., Villalain, J. (2006) Antifungal effects and mechanism of action of viscotoxin A3. *The FEBS J.* 273:72–83.
- Giuliani, A., Pirri, G., Nicoletto, S.F. (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol.* 2:1–33.
- Gomes, M.T.R., Oliva, M.L., Lopes, M.T.P., Sala, C.E. (2011) Plant proteinases and inhibitors: An overview of biological function and pharmacological activity. *Curr Protein Pept Sci.* 12:417–436.
- Gonorazky, A.G., Regente, M.C., De La Canal, L. (2005) Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *J Plant Physiol.* 162:618–24.
- Grant, S., Clissold, S. (1990) Fluconazole – A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. *Drugs.* 39:877–916.

- Guaní-Guerra, E., Mendoza, T.S., Reyes, S.O.L., Terán, L.M. (2010) Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *J Clin Immunol.* 135:1–11.
- Hancock, R.E., Sahl, H.G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 24:1551–1557.
- Hulse-Kemp, A.M., Ashrafi, H., Plieske, J., Lemm, J., Stoffel, K., Hill, T., Luerssen, H., Pethiyagoda, C.L., Lawley, C.T., Ganai, M.W., Deynze, A.V. (2016) A HapMap leads to a *Capsicum annuum* SNP Infinium array: a new tool for pepper breeding. *Hortic Res.* 3:16036.
- Hwang, B., Hwang, J.S., Lee, J., Lee, D.G. (2011) The antimicrobial peptide, psacothasin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 405:267–71.
- Ince, A.G., Karaca, M., Onus, A.N. (2009) Development and utilization of diagnostic DAMD-PCR markers for *Capsicum* accessions. *Genet Resour Crop Evol.* 56:211–221.
- International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) (1995) Descriptores para *Capsicum* (*Capsicum* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Islam, K.T., Velivelli, S.L.S., Berg, R.H., Oakley, B., Sahah, D.M. (2017) A novel bi-domain plant defensin *MtDef5* with potent broad spectrum antifungal activity binds to multiple phospholipids and forms oligomers. *Sci Rep.* 7:1–13.
- Janssen, B.J., Schirra, H.J., Lay, F.T., Anderson, M.A., Craik, D.J. (2003) Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. *Biochem.* 42:8214–8222.
- Jarret, R.L., Berke, T. (2008) Variation for fruit morphological characteristics in a *Capsicum chinense* Jacq. germplasm collection. *Int J Hort Sci.* 43:1694-1697.
- Jenssen, H., Hamil, P., Hancock, R.E.W. (2006) Peptides antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 19:491–511.

- Jung, H.W., Kim, W. Hwang, B.K. (2003) Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant Cell Environ.* 26:915-928.
- Kader, J.C. (1975) Proteins and the intracellular exchange of lipids. I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. *Biochim Biophys Acta.* 380:31-44.
- Kader, J.C. (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 47:627-654.
- Takeya, H., Miyazaki, T., Miyazaki, Y., Kohno, S. (2003) Azole resistance in *Candida* spp. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 44:87-92.
- Khara, J.S., Lim, F.K., Wang, Y., Ke, X.Y., Voo, Z.X., Yang, Y.Y., Lakshminarayanan, R., Ee, P.L.R. (2015) Designing α -helical peptides with enhanced synergism and selectivity against *Mycobacterium smegmatis*: Discerning the role of hydrophobicity and helicity. *Acta Biomaterialia.* 28:99-108.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L.J., Takahara, H., Neumann, U., Van Themaat, E.V.L., Van der Does, H.C., Hacquard, S., Stüber, K., Will, I., Schmalenbach, W., Schmelzer, E., O'Connell, R.J. (2012) Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog.* 8:e1002643.
- Kowaltowski, A.J., Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 47:333-343.
- Kristensen, A.K., Brunstedt, J., Nielsen, K.K., Roepstorff, P., Mikkelsen, J.D. (2000) Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar-beet leaves. *Plant Sci.* 155:31-40.
- Kulkarni, M.M., McMaster, W.R., Kamysz, W., McGwire, B.S. (2009) Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *J Biol Chem.* 284:15496-15504.

- Kumar, P., Kizhakkedathu, J.N., Straus, S.K. (2018) Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. *Biomolecules*. 8:1–24.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685.
- Lay, F.T., Schirra, H.J., Scanlon, M.J., Anderson, M.A., Craik, D.J. (2003) The Three-dimensional Solution Structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. *J Mol Biol*. 325:175–188.
- Lee, S.B., Go, Y.S., Bae, H.J., Park, J.H., Cho, S.H., Cho, H.J., Lee, S.D., Park, O. K., Hwang, I., Suh, M. C. (2009) Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol*. 150:42–54.
- Lee, T.H., Hall, K.N., Aguilar, M.I. (2016) Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. *Curr Top Med Chem*. 16:25–39.
- León, I.R., Neves-Ferreira, A.G., Valente, R.H., Mota, E.M., Lenzi, H.L., Perales, J. (2007) Improved protein identification efficiency by mass spectrometry using N-terminal chemical derivatization of peptides from *Angiostrongylus costaricensis*, a nematode with unknown genome. *Int J Mass Spectrom*. 42:781–792.
- Li, T., Liu, Q., Wang, D., Li, J. (2019) Characterization and antimicrobial mechanism of CF-14, a new antimicrobial peptide from the epidermal mucus of catfish. *Fish Shellfish Immunol*. 92:881–888.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., Su, Z. (2012) Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. 37:207–215.

- Liu, W., Liu, J., Ning, Y., Ding, B., Wang, X., Wang, Z., Wang, G.L. (2013) Recent progress in understanding PAMP-and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant*. 6:605–620.
- Liu, W., Li, L.P., Zhang, J.D., Li, Q., Shen, H., Chen, S.M., Jiang, Y.Y. (2014) Synergistic antifungal effect of glabridin and fluconazole. *PloS one*. 9:e103442.
- Liu, Y.J., Cheng, C.S., Lai, S.M., Hsu, M.P., Chen, C.S., Lyu, P.C. (2006) Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. *Proteins*. 63:777–786.
- Lobo, D.S., Pereira, I.B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L.N., Cabral, L.M., Faria, J., Bellio, M., Campos, R.C., Linden, R.E., Kurtenbach, E. (2007) Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin related to the cell cycle. *Biochemistry*. 46:987–996.
- Macedo, M.L., Garcia, V.A., Freire, M., Richardson, M. (2007) Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*. 68:1104–1111.
- Maiese, K., Chong, Z.Z., Hou, J., Shang, Y.C. (2010) Oxidative stress: biomarkers and novel therapeutic pathways. *Exp Gerontol*. 45:217–234.
- Mandal, S.M., Dey, S., Mandal, M., Sarkar, S., Maria-Neto, S., Franco, O.L. (2009) Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. *Peptides*. 30:633–637.
- Maracahipes, Á.C., Taveira, G.B., Mello, E.O., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Perales, J., Teixeira-Ferreira, A., Silva, M.S., Gustavo, L.R., Fernandes, K.V.S., Gomes, V.M. (2019a) Biochemical analysis of antimicrobial peptides in two different *Capsicum* genotypes after fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biosci Rep*. 1:BSR20181889.
- Maracahipes, Á.C., Taveira, G.B., Sousa-Machado, L.Y., Machado, O.L. T., Rodrigues, R., Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2019b). Characterization and antifungal activity of a plant peptide expressed in the interaction between *Capsicum annum* fruits and the anthracnose fungus. *Biosci Rep*. 39:12.

- Marr, A.K., McGwire, B.S., McMaster, W.R. (2012) Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. *Future Microbiol.* 7:1047–1059.
- Martins, K.C., Pereira, T.N.S., Souza, S.A.M., Costa, F.R. (2010) Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. *Ciência Rural.* 40:1746–1751.
- Matsuzaki, K. (2009) Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 1788:1687–1692.
- Mello, E.O., Ribeiro, S.F.F., Carvalho, A.O., Santos, I.S., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., Gomes, V.M. (2011) Antifungal activity of *PvD1* defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. *Curr Microbiol.* 62:1209–1217.
- Mello, E.O., Santos, I.S., Carvalho, A.O., Souza, L.S., Souza-Filho, G.A., Machado, O.L.T., Zottich, U., Gomes, V.M. (2014) Functional expression and activity of the recombinant antifungal defensin *PvD1_r* from *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) seeds. *BMC Biochem.* 15:7.
- Mello, E.O., Taveira, G.B., Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2019) Improved smallest peptides based on positive charge increase of the γ -core motif from *PvD1* and their mechanism of action against *Candida* species. *Int J Nanomedicine.* 14:407–420.
- Mendez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G.G., Mendez, R., Soriano, F., Salinas, M., Haro, C. (1990) Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, α -hordothionin, from barley endosperm. *Eur J Biochem.* 194:533–9.
- Meneguetti, B.T., Machado, L.D.S., Oshiro, K.G., Nogueira, M.L., Carvalho, C. M., Franco, O.L. (2017) Antimicrobial peptides from fruits and their potential use as biotechnological tools – a review and outlook. *Front Microbiol.* 7:2136.
- Moguel-Salazar, F., Brito-Argáez, L., Díaz-Brito, M., Islas-Flores, I. (2011) A review of a promising therapeutic and agronomical alternative: antimicrobial peptides from *Capsicum* sp. *Afr J Biotechnol.* 10:19918–19928.

- Moreira, A.F.P., Ruas, P.M., Fátima, R.C., Baba, V.Y., Giordani, W., Arruda, I.M., Rodrigues, R., Gonçalves, L.S.A. (2018) Genetic diversity, population structure and genetic parameters of fruit traits in *Capsicum chinense*. *Sci Hortic.* 236:1–9.
- Moreira, M.I. (2010) Azois: Farmacologia e interações medicamentosas. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) – Cidade do Porto – Portugal, Universidade Fernando Pessoa, 65p.
- Morrissey, JH. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem.* 117:307–310.
- Moscone, E.A., Scaldaferrro, M.A., Grabiele, M., Cecchini, N.M., Sánchez García, Y., Jarret, R., Daviña, J.R., Ducasse, D.A., Barboza, G.E., Ehrendorfer, F. (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum*-Solanaceae): a cytogenetic perspective. In *VI International Solanaceae Conference: Genomics Meets Biodiversity.* 745:137–170).
- Nascimento, K.O., Vicente, J., Saldanha, T., Barbosa Júnior, J.L., Barbosa, M.I.M.J. (2012) Caracterização química e informação nutricional de geleia de pimenta cambuci orgânica (*Capsicum baccatum* L.). *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável.* 7:283–288.
- Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., Goździcka-Józefiak, A. (2014) Plant antimicrobial peptides. *Folia microbiol.* 59:181–196.
- Nenoff, P., Oswald, U., Hausteil, U.F. (1999) *In vitro* susceptibility of yeasts for fluconazole and itraconazole. Evaluation of a microdilution test. *Mycoses.* 42:629–639.
- Nett, J.E., Andes, D.R. (2016) Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin North Am.* 30:1557–9824.
- Nishimura, S., Tatano, S., Gomi, K., Ohtani, K., Fukumoto, T., Akimitsu, K. (2008) Chloroplast-localized nonspecific lipid transfer protein with anti-fungal activity from rough lemon. *Physiol Mol Plant Pathol.* 72:134–140.

- Odintsova, T., Egorov, T. (2012) Plant antimicrobial peptides. *In*: Irving, H.R., Gehring, C. (Eds.) *Plant Signaling Peptides*. 16. ed. Austrália: Springer Nature, p. 107–133.
- Odintsova, T.I., Rogozhin, E.A., Baranov, Y., Musolyamov, A.K., Yalpani, N., Egorov, T.A., Grishin, E.V. (2008) Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv *Biochimie*. 90:1667–1673.
- Pane, C., Piccolo, A., Spaccini, R., Celano, G., Vilecco, D., Zaccardelli, M. (2013) Agricultural waste-based composts exhibiting suppressivity to diseases caused by the phytopathogenic soil-borne fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Appl Soil Ecol*. 65:43–51.
- Pelegriani, P.B., Franco, O.L. (2005) Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 37:2239–2253.
- Penninckx, I.A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.P., Manners, J.M. e Broekaert, W.F. (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*. 8:2309–2323.
- Pereira, L.S., Nascimento, V.V., Ribeiro, S.F.F., Rodrigues, R., Fernandes, K.V.S., Carvalho, A.O., Vasconcelos, I.M., Bento, C.S., Sudré, C.P. , Zottich, U., Gomes, V.M. (2018) Characterization of *Capsicum annum* L. leaf and root antimicrobial peptides: antimicrobial activity against phytopathogenic microorganisms. *Acta Physiol Plant*. 40:107.
- Pereira, M.J.Z., Massola-Junior, N.S., Sussel, A.A.B., Sala, F.C., Costa, C.P., Boiteux, L.S. (2011) Reação de acessos de *Capsicum* e de progênies de cruzamentos interespecíficos a isolados de *Colletotrichum acutatum*. *Horticultura Brasileira*. 29:569–576.
- Perron, G.G., Zasloff, M., Bell, G. (2006) Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc Biol Sci*. 273:251–256.

- Peschel, A. (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* 10:179–186.
- Pozzobon, M.T., Schifino-Wittmann, M.T., De Bem Bianchetti, L. (2006) Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do $x=12$ and $x=13$ represent two evolutionary lines? *Bot J Linn Soc.* 151:259–269.
- Qin, X., Liu, Y., Mao, S., Li, T., Wu, H., Chu, C., Wang, Y. (2011) Genetic transformation of lipid transfer protein encoding gene in *Phalaenopsis amabilis* to enhance cold resistance. *Euphytica.* 177:33–43.
- Raaijmakers, J.M., Bruijn, I., Kock, M.J.D. (2006) Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* ssp: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol Plant Microbe Interact.* 19:699–710.
- Ramirez-Prado, J.S., Abulfaraj, A.A., Rayapuram, N., Benhamed, M., Hirt, H. (2018) Plant immunity: from signaling to epigenetic control of defense. *Trends Plant Sci.* 23:833–844.
- Regente, M.C., Giudici, A.M., Villalaín, J., De la Canal, L. (2005) The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Lett Appl Microbiol.* 40:183–189.
- Rêgo, E.R., Finger, F.L., Rêgo, M.M. (2012) Consumption of pepper in Brazil and its implications on nutrition and health of humans and animals. *Pepper: Nutrition, Consumption and Health.* 1:159–170.
- Reifschneider, F.J.B., Nass, L.L., Henz, G.P., Heinrich, A.G., Ribeiro, C.S.C., Filho, K.E., Boiteux, L.S., Ritschel, P., Ferraz, R.M., Quecini, V. (2015) Uma pitada de biodiversidade na mesa dos brasileiros. 1. ed. Brasília: Editora LTDA, 156p.
- Ribeiro, S.F., Carvalho, A.O., Da Cunha, M., Rodrigues, R., Cruz, L.P., Melo, V.M.M., Vasconcelos, I.M., Melo, E. J.T., Gomes, V.M. (2007) Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon.* 50:600–611.

- Ribeiro, S.F.F., Silva, M.S., Da Cunha, M., Carvalho, A.O., Dias, G.B., Rabelo, G., Mello, E.O., Santa-Catarina, C., Rodrigues, R., Gomes, V.M. (2012) *Capsicum annuum* L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek* .101:657–670.
- Ribeiro, S.F.F., Fernandes, K.V.S., Santos, I.S, Taveira, G.B., Carvalho, A.O., Lopes, J.L.S., Beltramini, L.M., Rodrigues, R., Vasconcelos, I.M., Cunha, M., Souza-Filho, G.A., Gomes, V.M. (2013) New small proteinase inhibitors from *Capsicum annuum* seeds: characterization, stability, spectroscopic analysis and a cDNA cloning. *Peptide Sci.*100:132–140.
- Romo-Hualde, A., Yetano-Cunchillos, A.I., González-Ferrero, C., Sáiz-Abajo, M.J., González-Navarro, C.J. (2012) Supercritical fluid extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red pepper (*Capsicum annuum* L.) by-products. *Food Chem.* 133:1045–1049.
- Rufino, J.L.S., Penteadó, D.C.S., (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. *Informe Agropecuário.* 27:7–15.
- Sagaram, U.S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T.J., Shah, D.M. (2011) Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *PLoS One.* 6:e18550.
- Santos, L.A., Taveira, G.B., Ribeiro, S.F.F., Pereira, L.S., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Oliveira, A.E.A., Machado, O.L.T., Araújo, J.S., Vasconcelos, I.M., Gomes, V.M. (2017) Purification and characterization of peptides from *Capsicum annuum* fruits which are α -amylase inhibitors and exhibit high antimicrobial activity against fungi of agronomic importance. *Protein Expr Purif.* 132:97–107.
- Santos-JR, I.D., Souza, I.A.M., Borges, R.G., Souza, L.B.S., Santana, W.J., Coutinho, H.D.M. (2005) Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. *Sci Med.* 15:189–197.
- Schägger, H., Von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166:368–379.

- Segura, A., Moreno, M., García-Olmedo, F. (1993) Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Lett.* 332:243–246.
- Segura, A., Moreno, M.A., Molina, A., García-Olmedo, F. (1998) Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett.* 435:159–162
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M., Cammue, B.P., De Bolle, M.F. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem.* 46:941–950.
- Senyurek, I., Paulmann, M., Sinnberg, T., Kalbacher, H., Deeg, M., Gutschmann, T., Hermes, M., Kohler, T., Götz, F., Wolz, C., Peschel, A. (2009) Dermcidin-derived peptides show a different mode of action than the Cathelicidin LL-37 against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:2499–2509.
- Seo, H.H., Park, S., Park, S., Oh, B.J., Back, K., Han, O., Kim, J., Kim, Y.S. (2014) Overexpression of a defensin enhances resistance to a fruit-specific anthracnose fungus in pepper. *PloS One.* 9:e97936.
- Shafee, T.M., Lay, F.T., Hulett, M.D., Anderson, M.A. (2016) The defensins consist of two independent, convergent protein superfamilies. *Mol Biol Evol.* 33:2345–2356.
- Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., Sibley, C.M. (1999) Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev.* 12:40–79.
- Shin, R., Lee, G.J., Park, C.J., Kim, T.Y., You, J.S., Nam, Y.W., Paek, K.H. (2001) Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a proteinase inhibitor gene. *Plant Sci.* 161:727–737.
- Silva, C.R., Andrade Neto, J.B., Sousa Campos, R., Figueiredo, N.S., Sampaio, L.S., Magalhães, H.I.F., De Barros Viana, G.S. (2014) Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:1468–1478.

- Silva, F.C.V., Nascimento, V.V., Machado, O.L.T., Pereira, L.D.S., Gomes, V.M., Carvalho, A.O. (2018) Insight into the α -Amylase Inhibitory Activity of Plant Lipid Transfer Proteins. *J Chem Inf Model.* 58:2294–2304.
- Silva, F.D. (2008) Mecanismo de ação da microplusina, um peptídeo quelante de cobre com atividade antimicrobiana. Tese (Doutorado Ciências) – São Paulo – SP, Universidade de São Paulo, 31 pg.
- Silva, M.S., Ribeiro, S.F.F., Taveira, G.B., Rodrigues, R., Fernandes, K.V.S., Vasconcelos, I.M., Mello, E.O., Gomes, V.M. (2017) Application and bioactive properties of CaTI, a trypsin inhibitor from *Capsicum annuum* seeds: membrane permeabilization, oxidative stress and intracellular target in phytopathogenic fungi cells. *J Sci Food Agric.* 97:3790–3801.
- Silva, R.G., Vasconcelos, I.M., Acrísio, F.J.U.B., Carvalho, A.F., Souza, T.M., Gondim, D.M., Varela, A.L.N., Oliveira, J.T.A. (2015) Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. *Ind Crop Prod.* 70:48–55.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., Azeredo, J. (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 36:288–305.
- Silvar, C., García-González, C.A. (2017) Screening old peppers (*Capsicum* spp.) for disease resistance and pungency-related traits. *Sci Horti-Amsterdam.* 218:249–257.
- Slazak, B., Kapusta, M., Strömstedt, A.A., Słomka, A., Krychowiak, M., Shariatgorji, M. Per E. A., Bohdanowicz, J., Kuta, E., Göransson, U. (2018) How does the sweet violet (*Viola odorata* L.) fight pathogens and pests—cyclotides as a comprehensive plant host defense system. *Front Plant Sci.* 9:1296.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Maallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Osion, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150:76–85.

- Soares, J.R., Melo, J.T., Da Cunha, M., Fernandes, K.V.S., Taveira, G.B., Pereira, L.D.S. (2017) Interaction between the plant *ApDef1* defensin and *Saccharomyces cerevisiae* results in yeast death through a cell cycle and caspase-dependent process occurring via uncontrolled oxidative stress. *Fungal Biol Rev.* 1861:3429–3443.
- Souza, G.S., de Carvalho, L.P., de Melo, E.J.T., Gomes, V.M., Carvalho, A.O. (2018) The toxic effect of *Vu-Defr*, a defensin from *Vigna unguiculata* seeds, on *Leishmania amazonensis* is associated with reactive oxygen species production, mitochondrial dysfunction, and plasma membrane perturbation. *Can J Microbiol.* 64:455–464.
- Spampinato, C., Leonardi, D. (2013) *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int.*13:2314–6133.
- Straus, S.K., Hancock, R. (2006) Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim Biophys Acta.* 1758:1215–1223.
- Suarez-Carmona, M., Hubert, P., Delvenne, P., Herfs, M. (2015) Defensins: “Simple” antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 26:361–370.
- Sudré, C.P., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.D., Riva-Souza, E.M., Bento, C.D.S. (2010) Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp. as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genet Mol Res.* 9:283–294.
- Tam, J.P., Wang, S., Wong, K.H., Tan, W.L. (2015) Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals.* 8:711–757.
- Taveira, G.B., Mathais, L.S., Vieira-da-Motta, O., Machado, O.L.T., Rodrigues, R., Carvalho, A.O., Teixeira-Ferreira, A., Perales, J., Vasconcelos, I.M., Gomes, V.M. (2014) Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Peptide Sci.* 102:30–39.

- Taveira, G.B., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Trindade, F.G., Da Cunha, Gomes, V.M. (2016) Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. *BMC Microbiol.* 16:1.
- Taveira, G.B., Mello, É.O., Carvalho, A.O., Regente, M., Pinedo, M., de La Canal, L., Rodrigues, R., Gomes, V.M. (2017) Antimicrobial activity and mechanism of action of a thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits and combinatorial treatment with fluconazole against *Fusarium solani*. *Peptide Sci.* 108:e23008.
- Taveira, G.B., Mello, E.O., Souza, S.B., Monteiro, R.M., Ramos, A.C, Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Okorokov, L. A., Gomes, V.M. (2018) Programmed cell death in yeast by thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits involving activation of caspases and extracellular H⁺ flux. *Biosci Rep.* 2:BSR20180119.
- Teixeira, F.R., Lima, M.C.O.P., Almeida, H.O., Romeiro, R.S., Silva, D.J.H., Pereira, P.R.G., Fontes, E.P.B., Baracat-Pereira, M.C. (2006) Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. *J Phytopathol.* 154:418–421.
- Teixeira, V., Feio, M.J., Bastos, M. (2012) Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog Lipid Res.* 51:149–177.
- Terras, F.R., Schoofs, H.M., De Bolle, M.F., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem.* 267:15301–15309.
- Terras, F.R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S., Leuven, F.V., Vanderleyden, J. (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell.* 7:573–588.
- Thevissen, K., Terras, F.R.G., Broekaert, W.F. (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol.* 65:5451–5458.

- Thevissen, K., Osborn, R.W., Acland, D.P., Broekaert, W.F. (2000) Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Mol Plant Microbe Interact.* 13:54–61.
- Thevissen, K., Kristensen, H.H., Thomma, B.P., Cammue, B.P., Francois, I. E. (2007) Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discov Today.* 12:966–971.
- Thomma, B.P., Cammue, B.P., Thevissen, K. (2002) Plant defensins. *Plant.* 216:193–202.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- Tian, A., Jiang, J., Cao, J. (2013) Functional analysis of a novel male fertility lipid transfer protein gene in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Plant Mol Biol Rep.* 31:775–782.
- Tsuboi, S., Osafune, T., Tsugeki, R., Nishimura, M., Yamada, M. (1992) Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. *J Biochem.* 111:500–508.
- Twardowski, T. (2010) Chances, perspectives and dangers of GMO in agriculture. *J Fruit Ornament Plant Res.* 18:63–69.
- Upton, M., Cotter, P., Tagg, J. (2012) Antimicrobial peptides as therapeutic agents. *Int J Food Microbiol.* 2012:1–2.
- Vieira, M.E.B., Vasconcelos, I.M., Machado, O.L.T., Gomes, V.M., Carvalho, A.O. (2015) Isolation, characterization and mechanism of action of an antimicrobial peptide from *Lecythis pisonis* seeds with inhibitory activity against *Candida albicans*. *Acta Biochim Biophys Sin.* 47:716–729.
- Vriens, K., Cammue, B.P., Thevissen, K. (2014) Antifungal plant defensins: Mechanisms of action and production. *Molecules.* 19:12280–12303.

- White, A.M., Craik, D.J. (2016) Discovery and optimization of peptide macrocycles. *Expert Opin Drug Deliv.* 11:1151–1163.
- Yamamoto, S., Djarwaningsih, T., Wiriadinata, H. (2014) History and Distribution of *Capsicum chinense* in Indonesia. *Trop Agric Dev.* 58:94-101.
- Yang, X., Li, J., Li, X., She, R., Pei, Y. (2006) Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. *Peptides.* 27:3122–3128.
- Yount, N.Y., Yeaman, M.R. (2004) Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci.* 101:7363–7368.
- Zarr, J.H. (1999) Biostatistical analysis. *Prentice Hall*, New Jersey, 4–929.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415:389–395.
- Zhu, M., Liu, P., Niu, Z.W. (2017) A perspective on general direction and challenges facing antimicrobial peptides. *Sci China Chem.* 28:703–708.
- Zottich, U., Da Cunha, M., Carvalho, A.O., Dias, G.B., Silva, N. C., Santos, I.S., Nascimento, V.V., Miguel, C.E., Machado, O.L.T., Gomes, V.M. (2011) Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochim Biophys Acta.* 1810:375–383.
- Zottich, U., Da Cunha, M., Carvalho, A.O., Dias, G.B., Casarin, N., Vasconcelos, I.M., Gomes, V.M. (2013) An antifungal peptide from *Coffea canephora* seeds with sequence homology to glycine-rich proteins exerts membrane permeabilization and nuclear localization in fungi. *Biochim Biophys Acta.* 1830:3509–3516.