

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
DE INIBIDORES DE PROTEASES DE SEMENTE DE *Capsicum*  
*chinense* Jacq. SOBRE O CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS  
FITOPATOGÊNICOS

**MARCIELE SOUZA DA SILVA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JUNHO/2020

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
DE INIBIDORES DE PROTEASES DE SEMENTE DE *Capsicum*  
*chinense* Jacq. SOBRE O CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS  
FITOPATOGÊNICOS

**MARCIELE SOUZA DA SILVA**

“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.”

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Valdirene Moreira Gomes

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JUNHO/2020

### FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S586

Silva, Marciele Souza da.

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE INIBIDORES DE PROTEASES DE SEMENTE DE *Capsicum chinense* Jacq. SOBRE O CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS / Marciele Souza da Silva. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

112 f.

Bibliografia: 71 - 91.

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. Defesa de plantas. 2. Inibidores de tripsina. 3. Inibidores de  $\alpha$ -amilase. 4. Fungos fitopatogênicos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
DE INIBIDORES DE PROTEASES DE SEMENTE DE *Capsicum  
chinense* Jacq. SOBRE O CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS  
FITOPATOGÊNICOS

**MARCIELE SOUZA DA SILVA**

“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 29 de junho de 2020.

Comissão Examinadora:




---

Prof.<sup>a</sup> Adriana Ferreira Uchoa (D.Sc. em Biociências e Biotecnologia - UFRN)



---

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



---

Prof.<sup>a</sup> Antônia Elenir Amâncio Oliveira (D.Sc em Biociências e Biotecnologia)  
UENF



---

Prof.<sup>a</sup> Valdirene Moreira Gomes (D.Sc. em Ciências) - UENF  
(Orientadora)

Aos meus pais, minha querida mãe, Ana Maria, e meu pai, Eloir de Almeida.

Aos meus irmãos, Erivaldo Souza, Maria da Penha de Souza e Thaís Souza.

Ao meu esposo, Jozimar Gomes dos Santos, por toda paciência em todas as horas que precisei, por sempre apoiar minhas decisões, estimular e acreditar em meu sonho.

À minha filha, Luna Souza dos Santos, o amor da minha vida.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar, por permitir que eu chegasse até aqui, por toda força, coragem e proteção;

À professora Valdirene Moreira Gomes, minha orientadora, minha eterna gratidão, pela orientação, por toda a dedicação, pelos conselhos, carinho, pela paciência e por todos os ensinamentos desde a minha graduação;

Ao meu conselheiro, Dr. André de Oliveira Carvalho, por todos os esclarecimentos e pela colaboração;

Aos membros da banca, Dr<sup>a</sup>. Adriana Ferreira Uchoa, Dr<sup>a</sup>. Antônia Elenir Amâncio Oliveira e Dr. André de Oliveira Carvalho, por aceitarem o convite;

Ao Dr. Gabriel Bonan Taveira e à Dr<sup>a</sup>. Érica de Oliveira Mello, por toda ajuda, contribuição nos experimentos e por sempre estarem dispostos a me auxiliar;

Aos amigos de laboratório e do grupo “Val-André”, agradeço a convivência agradável e toda a colaboração. Em especial, à minha amiga Layrana de Azevedo dos Santos, por todos os anos de amizade;

Aos demais membros do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), pelo agradável convívio, especialmente os técnicos Luís Carlos de Souza,

Valéria Miguelote e Noil Gomes, pela dedicação com a manutenção do nosso laboratório e por toda a ajuda;

Aos meus pais, esposo, filha, irmãos, sobrinhos, cunhados e amigos, por torcerem tanto por mim; obrigada por todo incentivo, compreensão, amor e constante motivação;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, e ao demais órgãos de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento de projetos de pesquisa;

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

Enfim, agradeço a todos os que, embora não mencionados aqui, foram importantes e contribuíram para o meu sucesso, crescimento e para a realização deste sonho.

A todos, o meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS/TABELAS</b> .....	viii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xiv
<b>RESUMO</b> .....	xvi
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	4
2.1 - Objetivo geral.....	4
2.2 - Objetivos específicos.....	4
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
3.1- Peptídeos antimicrobianos .....	5
3.2- Peptídeos antimicrobianos de plantas.....	7
3.3- Inibidores de protease serínica de plantas .....	14
3.4- O gênero <i>Capsicum</i> .....	17
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1- Materiais biológico.....	22
4.1.1- Sementes de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	22
4.1.2- Microrganismos.....	23
4.1.3- Insetos.....	23
4.2- Métodos.....	24
4.2.1- Extração proteica.....	24
4.2.2- Purificação das frações de <i>C. chinense</i> .....	24



4.2.3- Quantificação de proteínas.....	25
4.2.4- Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS.....	25
4.2.5- Identificação do peptídeo por espectrometria de massas.....	25
4.2.6- Ensaio de inibição da enzima tripsina usando as frações PEFs.....	26
4.2.7- Detecção da inibição de protease por zimografia reversa.....	26
4.2.8- Ensaio de inibição de $\alpha$ -amilases.....	26
4.2.8.1- Obtenção dos extratos contendo $\alpha$ -amilase.....	27
4.2.8.2-Curva para determinação de atividade das enzimas.....	27
4.2.8.3- Avaliação da atividade de inibição de $\alpha$ -amilase.....	27
4.2.9- Atividade antifúngica das frações PEF2, PEF2A, PEF2B e PEF3.....	28
4.2.9.1- Obtenção dos esporos dos fungos filamentosos .....	28
4.2.9.2- Análise da inibição do crescimento dos fungos filamentosos.....	28
4.2.10- Efeito das frações PEF2 e PEF3 sobre a permeabilização de membranas dos fungos filamentosos.....	28
4.2.11- Ensaio para verificação da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	29
4.2.12- Ensaio de determinação da funcionalidade mitocondrial .....	29
4.2.13- Detecção da atividade de caspases induzida em células fúngicas.....	30
4.2.14- Análise de viabilidade celular.....	30
4.2.15- Análise da inibição da germinação dos esporos fúngicos na presença da fração PEF3.....	31
4.2.16- Previsão dos sítios funcionais baseada no alinhamento de sequência.....	31
4.2.17- Análise estatística.....	31
<b>5- RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
PARTE I: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA FRAÇÃO PEF2 SOBRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	33
5.1- Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético.....	33
5.2- Efeito das frações PEF2, PEF2A e PEF2B sobre a inibição da atividade da enzima tripsina.....	36
5.3- Similaridade das sequências de inibidores depositados no banco de dados com as sequências do PEF2A e PEF2B.....	37

5.4- Efeito da fração PEF2 sobre a inibição de $\alpha$ -amilases.....	39
5.5- Efeito das frações PEF2, PEF2A e PEF2B sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos .....	39
5.6 - Efeito da fração PEF2 sobre a permeabilização de membranas de fungos filamentosos.....	41
5.7- Detecção da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) .....	42
5.8- Análise da Funcionalidade Mitocondrial em células fúngicas tratadas com a fração PEF2.....	44
5.9- Detecção da atividade de caspases induzida em células fúngicas....	45
<b>PARTE II: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA FRAÇÃO PEF3 SOBRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....</b>	<b>46</b>
5.10- Perfil eletroforético da fração PEF3.....	46
5.11- Análise da sequência de aminoácidos da fração PEF3.....	46
5.12- Efeito inibitório de PEF3 sobre a atividade da enzima tripsina.....	49
5.13- Efeito da fração PEF3 sobre a inibição de $\alpha$ -amilases.....	49
5.14- Efeito da fração PEF3 sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos.....	50
5.15- Efeito da fração PEF3 sobre a permeabilização de membranas de fungos filamentosos.....	51
5.16- Detecção da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) .....	52
5.17- Análise da funcionalidade mitocondrial em células fúngicas tratadas com a fração PEF3.....	53
5.18- Detecção da atividade de caspases induzida em células fúngicas...	54
5.19- Análise de viabilidade celular.....	55
5.20- Análise da inibição da germinação dos esporos fúngicos na presença da fração PEF3.....	56
<b>6- DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7- CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS/TABELAS

**Tabela 1** - Principais famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas incluindo: peptídeos representativos e suas fontes (Adaptada de Tang *et al.*, 2018) .....13

**Tabela 2** - Exemplos de famílias de inibidores de proteases serínicas de plantas, suas fontes e proteases alvo (Fonte: Adaptada de Habib e Fazili, 2007) .....15

**Figura 1** - Representação esquemática das principais classes estruturais de peptídeos incluindo: (A) Peptídeos que apresentam uma conformação  $\alpha$ -hélices na presença de micelas. (B) Peptídeos de estruturas estendidas. (C) Peptídeos contendo folha  $\beta$  (são tipicamente estabilizados por pontes dissulfeto). (D) Peptídeos contendo  $\alpha$ -hélices e folha  $\beta$ . (E) Peptídeos que apresentam configuração cíclica. ( $\alpha$ -hélices (laranja), folhas  $\beta$  (verde) e pontes dissulfeto (amarelo). (Adaptada de Koehbach e Craik, 2019) .....6

**Figura 2** - Modelos de interação entre peptídeos antimicrobianos e membranas citoplasmáticas. (A) No modelo aduela de barril, os AMPs se acumulam na superfície da membrana e suas inserções sucessivas formam um poro aquoso na membrana. (B) O colapso total da membrana provocado pelo mecanismo do carpete é a principal consequência da alta densidade de AMPs acumulados na superfície. (C) No modelo poro toroidal, os AMPs são inseridos nas membranas intercalados com os lipídeos, formando o poro (Adaptada de Corrêa *et al.*, 2019).....9

**Figura 3** - Mecanismos de ação de AMPs direcionados a patógenos microbianos. (A) Os AMPs ligam-se à membrana celular e causam a flutuação, despolarização, perturbação da estrutura ou grandes poros transmembranares. Os AMPs também podem interagir com importantes proteínas da membrana. +: carga positiva enriquecida, IMP: importante proteína da membrana. (B) Os AMPs inibem macromoléculas intracelulares ou extracelulares, incluindo síntese de DNA, enzimas, peptidoglicano, que é o precursor da parede celular e de outras macromoléculas. (C) Os AMPs aumentam a concentração de  $Ca^{2+}$  no citoplasma e nas mitocôndrias, interrompendo a homeostase; aumentam a proporção de  $NAD^+/NADH$ ; e, posteriormente, induzem a geração de ROS e a apoptose. (D) Os AMPs interagem diretamente com o ATP e depois diminuem a atividade das enzimas dependentes do ATP. Por outro lado, os AMPs bloqueiam as sínteses de ATP, interagindo com a ATP sintase ou bloqueando a cadeia transportadora de elétrons. Tudo isso resulta no bloqueio de processos dependentes de ATP (Adaptada de Zhang *et al.*, 2019) .....11

**Figura 4** - Imagens de plantas do gênero *C. chinense* Jacq. (acesso UENF 1755); (A) Plântulas de *C. chinense* mantidas em câmara de crescimento; (B) Plantas em vasos de 5 L; (C) Fruto de *C. chinense*; (D) Sementes de *C. chinense*. Fonte: A e B: Foto tirada no laboratório por Marciele Souza da Silva; C e D: <http://www.google.com.br>.....23

**Figura 5** - (A) Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC em coluna C8 do extrato rico em peptídeos de *C. chinense* (UENF 1755). A linha oblíqua representa o gradiente de propanol de 0 a 50%. As proteínas foram monitoradas por absorvância a 280 nm. O fluxo foi de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . (B) Imagem do gel de tricina na presença de SDS das frações enriquecidas em peptídeos (PEFs). (1) PEF1; (2) PEF2; (3) PEF3; M: marcadores de massa molecular (kDa).....34

**Figura 6** - Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC em coluna C2/C18 da fração PEF2. A linha oblíqua representa o gradiente de propanol de 0 a 34%. As proteínas foram monitoradas por absorvância a 280 nm. O fluxo foi de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . (B) Imagem do gel de tricina da fração PEF2. (1) PEF2A; (2) PEF2B; M: marcadores de massa molecular (kDa) .....35

**Figura 7** - (A) Efeito inibitório das diferentes frações de *C. chinense* sobre a atividade da enzima tripsina: PEF2 (67,7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), PEF2A (50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e PEF2B (50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os asteriscos indicam significância pelo teste ANOVA, e as diferenças nos valores médios foram consideradas significativas se  $P < 0,05$ . (B) Zimografia reversa para identificação de inibidores de tripsina nas frações PEF2, PEF2A e PEF2B. Foram aplicados 20  $\mu\text{g}$  de cada fração. Controle (inibidor comercial de tripsina Soybean Kunitz – Merck). As setas indicam bandas de inibidores de tripsina.....36

**Figura 8** - Comparação das sequências de PEF2A e PEF2B com o inibidor de protease do tipo Pin-II 48 de *C. annuum*. BLAST usando o alinhamento das duas sequências PEF2A (GICTNCCAGRKGCCNYFSAD) e PEF2B (QICTNCCAGRKGCCNYYSAD) .....38

**Figura 9** - Efeito da fração PEF2 de sementes de *C. chinense* na atividade de  $\alpha$ -amilases. (A)  $\alpha$ -amilase larval do inseto *T. molitor*. (B)  $\alpha$ -amilase salivar humana. Os valores representam as médias ( $\pm$  DP) das triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento. EDTA (controle positivo); BSA (controle negativo) ..... 39

**Figura 10** - Efeito do PEF2 sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos nas concentrações de 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e dos PEF2A e PEF2B na concentração de 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  por 24 h. Os valores são médias ( $\pm$  DP) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamentos e controle. (ns= não significativo) .....40

**Figura 11** - Ensaio de permeabilização de membranas. Imagens dos diferentes fungos filamentosos tratados com PEF2 e marcados com a sonda fluorescente SYTOX Green. Células controle (cultivadas na ausência do PEF2) e células testes (cultivadas na presença de 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF2) por 24 h. As setas apontam alterações estruturais diferentes das observadas no controle. Barras = 50  $\mu\text{m}$ .....42

- Figura 12** - Ensaio de estresse oxidativo para detecção de ROS. Imagens dos fungos filamentosos tratados com o PEF2 e marcados com a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA). Células controle (cultivadas na ausência do PEF2) e células testes (cultivadas na presença de 300 µg.mL<sup>-1</sup> do PEF2) por 24 h. Barras = 50 µm.....43
- Figura 13** - Ensaio de funcionalidade mitocondrial. Imagens dos fungos filamentosos tratados com o PEF2 e marcados com sonda de fluorescência Rodamina 123. As células foram tratadas com 300 µg.mL<sup>-1</sup> de PEF2 por 24 h e analisadas quanto à funcionalidade mitocondrial. As células controle foram tratadas apenas com a sonda Rodamina 123. Barras = 50 µm.....44
- Figura 14** - Ensaio de atividade de caspases. Imagens visualizadas após 24 h de incubação com 300 µg.mL<sup>-1</sup> de PEF2. As células controle e as células tratadas com PEF2 foram incubadas com a sonda FITC-VAD-FMK e analisadas por microscopia de fluorescência. Barras = 50 µm.....45
- Figura 15** - Imagem do gel de tricina na presença de SDS da fração PEF3. (1) PEF3; M: marcadores de massa molecular (kDa).....46
- Figura 16** - Alinhamento dos resíduos de aminoácidos do peptídeo de aproximadamente 5 kDa da fração PEF3 de sementes de *C. chinense* com outros peptídeos semelhantes a inibidores de protease. O peptídeo apresentou similaridade com as seguintes sequências: PEF3-B de sementes de *C. chinense*; Inibidor de Protease de *Capsicum annuum* (gi: 8948493); Inibidor de Protease de *Solanum melongena* (gi: 477995); Inibidor de Protease de *Solanum tuberosum* (gi: 15809084). Os resíduos de cisteínas conservadas estão destacados em vermelho. P% indica a porcentagem de resíduos positivos (que apresentam as mesmas características físico-bioquímicas) marcada em cinza. I% indica a porcentagem de resíduos idênticos marcada em negrito e itálico. A sequência foi obtida no SWISS-PROT e alinhada pelo Clustal Omega.....48

**Figura 17** - (A) Efeito do PEF3 ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sobre a atividade da enzima tripsina. O controle corresponde à atividade enzimática sem inibidor. O asterisco indica significância pelo teste ANOVA, e a diferença no valor médio foi considerada significativa se  $P < 0,05$ . (B) Zimograma reverso para identificação de inibidores de tripsina na fração PEF3. Foram aplicados  $20 \mu\text{g}$  da fração. Controle (inibidor comercial da tripsina Soybean Kunitz – Merck). A seta indica inibidor de tripsina da fração PEF3.....49

**Figura 18** - (A) Efeito de ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) da fração PEF3 de sementes de *C. chinense* na atividade de  $\alpha$ -amilases. (A)  $\alpha$ -amilase larval do inseto *T. molitor*. (B)  $\alpha$ -amilase salivar humana. Os valores representam as médias ( $\pm$  DP) das triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento. EDTA (controle positivo); BSA (controle negativo) ..... 50

**Figura 19** - Efeito do PEF3 nas concentrações de 100, 200 e  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  sobre o crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos. Os valores são médias ( $\pm$  DP) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamentos e controles. (ns= não significativo) .....51

**Figura 20** - Ensaio de permeabilização de membrana. Imagens dos diferentes fungos filamentosos tratados com PEF3 e marcados com a sonda fluorescente SYTOX *Green*. Células controle (crescidas na ausência do PEF3) e células testes (crescidas na presença de  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3) por 24 h. Barras =  $50 \mu\text{m}$ ..... 52

**Figura 21** - Ensaio de estresse oxidativo por detecção de ROS. Imagens dos fungos filamentosos tratados com PEF3 e marcados com a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ). Células controle (cultivadas na ausência do PEF3) e células testes (cultivadas na presença de  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do PEF3) por 24 h. Barras =  $50 \mu\text{m}$ .....53

**Figura 22** - Ensaio de funcionalidade mitocondrial. Imagens dos fungos filamentosos tratados com PEF3 e marcados com sonda de fluorescência Rodamina 123. As células foram tratadas com  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3 por 24 h e analisadas quanto à funcionalidade mitocondrial. As células controle foram tratadas apenas com a sonda Rodamina 123. Barras =  $50 \mu\text{m}$ .....54

<b>Figura 23</b> - Ensaio de atividade de caspases. Imagens visualizadas após 24 h de incubação com 300 µg.mL <sup>-1</sup> de PEF3. As células controle e as células tratadas com PEF3 foram incubadas com a sonda FITC-VAD-FMK e analisadas por microscopia de fluorescência. Barras = 50 µm.....	55
<b>Figura 24</b> - Viabilidade celular do fungo <i>F. oxysporum</i> . (A) Imagens de placa de Petri mostrando o crescimento de colônias no controle (sem adição da fração) e após o tratamento com 300 µg.mL <sup>-1</sup> de PEF3 durante 36 h. (B) Quantificação de células e de porcentagem de morte celular no controle e após o tratamento com o PEF3 durante 36 h. Os experimentos foram realizados em triplicata.....	56
<b>Figura 25</b> - Análise da inibição da germinação do <i>F. oxysporum</i> . (A) Imagens visualizadas após 8 h de incubação com 300 µg.mL <sup>-1</sup> de PEF3. Células controle e testes após o tratamento com 300 µg.mL <sup>-1</sup> de PEF3. (B) Determinação do número total de esporos e esporos germinados (no controle e testes) visualizados em 25 campos da câmera de Neubauer.....	57
<b>Figura 26</b> - Sumário esquemático dos possíveis mecanismos de ação dos inibidores de protease presentes nas frações PEF2 e PEF3 em células fúngicas levando o microrganismo à morte.....	67



## ABREVIATURAS

- **AMPs** – do inglês, *antimicrobial peptides*
- **BApNA** – do inglês, *N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide*
- **BSA** – do inglês, bovine serum albumin
- **DAD** – Detector de arranjo diodo
- **DAF<sub>2</sub>DA** – 3-amino, 4 aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato
- **DNS** - do inglês, *dinitrosalicylic acid*
- **EDTA** – do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*
- **HCl** – Ácido clorídrico
- **HPLC** – do inglês, *high-performance liquid chromatography*
- **H<sub>2</sub>DCFDA** – 2',7' diclorofluoresceína diacetato
- **LTPs** – do inglês, *lipid transfer proteins*
- **M** – Marcador de massa molecular
- **NaCl** – Cloreto de Sódio
- **NaOH** – Hidróxido de sódio
- **PEFs** – do inglês, *peptide-enriched fractions*
- **PIs** – do inglês, *protease inhibitors*
- **ROS** – do inglês, *reactive oxygen species*
- **SDS** – do inglês, *sodium dodecyl sulfate*
- **TFA** – do inglês, *trifluoroacetic acid*
- **Tris** – Tris (hidroximetil) aminometano

- **Z-VAD-FMK** – do inglês, *carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone*

## RESUMO

SILVA, Marciele Souza; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; junho de 2020; “CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE INIBIDORES DE PROTEASES DE SEMENTE DE *Capsicum chinense* Jacq. SOBRE O CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS”; orientadora: Dr<sup>a</sup>. Valdirene Moreira Gomes; conselheiros: Dr. André de Oliveira Carvalho e Dr<sup>a</sup>. Clícia Grativol Gaspar.

Inibidores de proteases (PIs, do inglês *protease inhibitors*) são moléculas reguladoras encontradas em animais, microrganismos e plantas, que reduzem e/ou inibem a atividade das proteases-alvo nos mais diversos organismos. Durante as últimas décadas, os inibidores de proteases têm chamado muito a atenção, devido ao seu importante papel na defesa das plantas como agentes bioinseticidas, nematocidas, antibacterianos e antifúngicos. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana de peptídeos da família dos inibidores de proteases serínicas isolados de sementes de *Capsicum chinense* Jacq. e sua ação sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos de interesse agrônomo. Inicialmente, os PIs foram extraídos a partir das sementes e submetidos à purificação por cromatografia. Este processo resultou na obtenção de três frações denominadas PEF1, PEF2 e PEF3 (do inglês, *peptides enriched fractions*). As frações PEF2 e PEF3 foram escolhidas para posterior purificação, caracterização e atividade antifúngica dos peptídeos. Posteriormente, a fração PEF2 foi submetida a uma nova cromatografia, resultando nas frações denominadas PEF2A e PEF2B. As frações PEF2 e PEF3 foram submetidas a

ensaios de inibição *in vitro* e zimografia reversa da enzima tripsina, ensaios de inibição da atividade de  $\alpha$ -amilase do inseto *Tenebrio molitor* e  $\alpha$ -amilase salivar humana. Todas as frações foram submetidas a ensaios para avaliar a sua atividade antimicrobiana sobre fungos fitopatogênicos e ensaios para determinação dos prováveis mecanismos de ação. Em relação à fração PEF2 e às suas frações derivadas, observou-se que PEF2, PEF2A e PEF2B inibiram a atividade da enzima tripsina, e que PEF2 inibiu a atividade da  $\alpha$ -amilase larval de *T. molitor* e  $\alpha$ -amilase salivar humana. Os resultados também mostraram que as frações PEF2, PEF2A e PEF2B foram capazes de inibir o crescimento de todos os fungos fitopatogênicos testados. PEF2 permeabilizou a membrana do fungo *Fusarium solani*, foi capaz de induzir espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) nos fungos *Fusarium oxysporum* e *F. solani* e capaz também de dissipar o potencial da membrana mitocondrial de todos os fungos testados. O peptídeo de ~6.0 kDa da fração PEF3 apresentou semelhança com peptídeos pertencentes a inibidores de proteases serínicas de plantas. PEF3 inibiu a atividade da enzima tripsina, da  $\alpha$ -amilase salivar humana e  $\alpha$ -amilase intestinal larval de *T. molitor*. PEF3 foi capaz de inibir o crescimento de todos os fungos fitopatogênicos testados e apresentou 83,7% de perda de viabilidade para o fungo *F. oxysporum*. Induziu também ROS nos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* e *F. oxysporum*. A fração PEF3 também foi capaz de dissipar o potencial da membrana mitocondrial de todos os fungos testados e causou a ativação de caspases apenas no fungo *C. lindemuthianum*. Os resultados relatados neste trabalho reforçam a importância dos PIs nos mecanismos de defesa de plantas contra fungos fitopatogênicos, bem como podem contribuir para a aplicação biotecnológica desses peptídeos no controle de microrganismos em plantas de importância agrônômica.

**Palavras-chave:** Defesa de plantas; Inibidores de tripsina; Inibidores de  $\alpha$ -amilase; Fungos fitopatogênicos.

## ABSTRACT

SILVA, Marciele Souza; *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro*; June 2020; "BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROTEASE INHIBITORS OF *Capsicum chinense* Jacq. SEEDS ON THE GROWTH OF PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS"; Advisor: Dr<sup>a</sup>. Valdirene Moreira Gomes; Counselors: Dr. André de Oliveira Carvalho e Dr<sup>a</sup>. Clícia Grativol Gaspar.

Protease inhibitors (PIs) are regulatory molecules found in animals, microorganisms, and plants that reduce and/or inhibit the activity of the target proteases in the most diverse organisms. During the last decades, protease inhibitors have drawn much attention because of their important role in the defense of plants as bioinsecticidal, nematicidal, antibacterial, and antifungal agents. The present work aimed at characterizing and evaluating the antimicrobial activity of peptides of the family of serine protease inhibitors isolated of *Capsicum chinense* Jacq. seeds and its action on the growth of phytopathogenic fungi of agronomic interest. Initially, the PIs were extracted from the seeds and subjected to purification by chromatography. This process resulted in obtaining three fractions called PEF1, PEF2 and PEF3 (peptides enriched fractions). The PEF2 and PEF3 fractions were chosen for further purification, characterization, and antifungal activity of the peptides. Subsequently, the PEF2 fraction was submitted to a new chromatography, resulting in the fractions called PEF2A and PEF2B. The PEF2 and PEF3 fractions were subjected to *in vitro* inhibition assays and reverse zymography of the trypsin enzyme, assays of inhibition of the  $\alpha$ -amylase activity of the insect *Tenebrio molitor*

of and human salivary  $\alpha$ -amylase. All fractions were subjected to tests to evaluate their antimicrobial activity on phytopathogenic fungi and tests to determine the likely mechanisms of action. Regarding the PEF2 fraction and its derived fractions, it was observed that PEF2, PEF2A, and PEF2B inhibited the activity of the enzyme trypsin, and that PEF2 inhibited the activity of *T. molitor* larval and human salivary  $\alpha$ -amylases. The results also showed that the PEF2, PEF2A, and PEF2B fractions were able to inhibit the growth of all phytopathogenic fungi tested. PEF2 permeated the membrane of the fungus *Fusarium solani*, was able to induce reactive oxygen species (ROS) in the fungi *Fusarium oxysporum* and *F. solani*, and was also able to dissipate the potential of the mitochondrial membrane of all the fungi tested. The peptide of ~6.0 kDa of the PEF3 fraction was similar to peptides belonging to plant serine protease inhibitors. PEF3 inhibited the activity of the enzyme trypsin, human salivary  $\alpha$ -amylase, and *T. molitor* larval  $\alpha$ -amylase. PEF3 was able to inhibit the growth of all phytopathogenic fungi tested and showed 83.7% loss of viability for the fungus *F. oxysporum*. It was also able to induce ROS in the fungi *Colletotrichum lindemuthianum* and *F. oxysporum*. The PEF3 fraction was also able to dissipate the potential of the mitochondrial membrane of all fungi tested and caused the activation of caspases only in the fungus *C. lindemuthianum*. The results reported in this work reinforce the importance of protease inhibitors in the defense mechanisms of plants against phytopathogenic fungi, as well as they can contribute to the biotechnological application of these peptides in the control of microorganisms in plants of agronomic importance.

**Keywords:** Plant defense; Trypsin inhibitors;  $\alpha$ -amylase inhibitors; Phytopathogenic fungi.

## 1. INTRODUÇÃO

O surgimento contínuo de doenças causadas por diversos patógenos como bactérias e fungos fitopatogênicos afeta as colheitas e é responsável por significantes perdas ou diminuição da qualidade dos produtos agrícolas (Pelegri *et al.*, 2008; Fones *et al.*, 2017). Nos últimos anos, têm sido crescentes os relatos da presença de proteínas tóxicas em diversas espécies vegetais cultivadas ou silvestres, as quais estão envolvidas nos mecanismos de defesa de plantas. A presença dessas proteínas suscita a possibilidade do uso biotecnológico dessas moléculas para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de doenças causadas, em especial, por fungos fitopatogênicos. Atualmente, o controle de doenças fúngicas é feito principalmente com agrotóxicos baseados em fungicidas químicos, cujo uso pode causar um impacto negativo sobre o meio ambiente e a saúde humana. Usos prolongados desses fungicidas químicos podem beneficiar a seleção de patógenos resistentes e, em longo prazo, tornar o uso deste método cada vez menos eficaz (Nordstrom e Malmsten, 2017; Talamini e Nunes, 2018). Entre os muitos produtos agrícolas afetados por esses patógenos, encontram-se o feijão, o milho, o amendoim, o tomate, o melão, o pepino, o trigo, a cevada, a soja, as pimentas e os pimentões (Tamm *et al.*, 2011).

As pimentas pertencem ao gênero *Capsicum* e à família Solanaceae. Este gênero é composto por 38 espécies, havendo evidências arqueológicas de que estas foram domesticadas há mais de 6.000 anos (Carrizo *et al.*, 2013; García *et al.*, 2016). O Brasil abriga uma grande variedade de espécies, incluindo *Capsicum*,

e seu cultivo predomina nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do País. Suas características atribuem aroma, cor e sabor aos alimentos, tornando-os mais atraentes (Nascimento *et al.*, 2012). Apesar do cultivo em grande escala, existem muitas perdas dessa cultura que podem estar relacionadas a vários problemas fitossanitários, os quais podem ser causados por fungos fitopatogênicos, como o *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose (Maracahipes *et al.*, 2016).

Vários estudos foram realizados com o objetivo de isolar proteínas e peptídeos de frutos do gênero *Capsicum* com atividade antimicrobiana possivelmente relacionada à defesa das plantas (Hill *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017). Dessa forma, vários genes também vêm sendo objeto de identificação dentro do gênero *Capsicum*, os quais estão relacionados à expressão de moléculas associadas ao controle de doenças e desenvolvimento de patógenos. Além de estarem envolvidas no mecanismo de defesa das plantas, essas proteínas constituem-se potenciais candidatas no desenvolvimento de novas estratégias para o controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos (Nordstrom e Malmsten, 2017).

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são encontrados no sistema de defesa em praticamente todas as formas de vida, estando presentes em muitas, se não todas, espécies de plantas. AMPs são pequenos grupos de polipeptídeos contendo aproximadamente de 10 a 100 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular menor que 10 kDa. O mecanismo de ação completo dos AMPs ainda não está totalmente esclarecido, mas, em geral, os AMPs apresentam um mecanismo de ação que envolve a interação com diferentes estruturas de membrana. Esta interação pode levar à formação de poros e, conseqüentemente, ao aumento da permeabilidade, ao desequilíbrio da homeostase iônica via inibição dos sistemas primários de transporte de H<sup>+</sup> e à indução de morte celular (Brogden *et al.*, 2005; Giuliani *et al.*, 2007; Andrés *et al.*, 2016).

Os AMPs podem ser encontrados constitutivamente em órgãos como sementes, tubérculos, órgãos reprodutivos, flores e frutos ou podem ser induzidos sistemicamente, por exemplo, em folhas, durante invasão ou lesão microbiana (Nawrot *et al.*, 2014). Os AMPs têm um amplo espectro de atividade antimicrobiana sobre vírus, bactérias, leveduras, protozoários e, especialmente, fungos (Schneider *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2018). Diferentes classes de AMPs foram identificadas



como componentes importantes da defesa das plantas. Entre esses AMPs, estão os inibidores de protease, encontrados em várias espécies de plantas e que desempenham uma variedade de funções, incluindo proteção contra patógenos e regulação da atividade enzimática (Cotabarren *et al.*, 2020). Os inibidores enzimáticos também incluem inibidores de  $\alpha$ -amilase, que possuem ampla especificidade e são conhecidos por obstruir a digestão de insetos, levando a atrasos no desenvolvimento, redução da fecundidade e mortalidade. Alguns inibidores estão presentes em uma forma bifuncional e podem interagir com ambas as enzimas (protease e  $\alpha$ -amilase) (Dayler *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa isolou e caracterizou diferentes AMPs presentes nas plantas de *Capsicum*, entre elas proteínas transportadoras de lipídios (Diz *et al.*, 2006), tioninas (Taveira *et al.*, 2013) e inibidores de protease (Ribeiro *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2013). No entanto, nenhum trabalho havia descrito a presença de AMPs em sementes do gênero *C. chinense* Jacq. Dias *et al.* (2013) descreveram, pela primeira vez, a presença de três diferentes frações enriquecidas em peptídeos, as quais foram denominadas PEF1, PEF2 e PEF3. Os peptídeos presentes nessas frações apresentaram similaridade de sequência com a família dos inibidores de proteases serínicas de plantas. A fração PEF2 exibiu atividade antifúngica contra diferentes leveduras, causando, por exemplo, alterações morfológicas em *Candida tropicalis*. Neste contexto, o presente trabalho visou à continuação do estudo das frações PEF2 e PEF3 de sementes de *C. chinense*, avaliando sua atividade inibitória e seu mecanismo de ação sobre diferentes fungos fitopatogênicos de importância agrônômica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1- Objetivo geral:

Purificar e caracterizar inibidores de proteases de semente de *C. chinense* Jacq. e avaliar a atividade inibitória sobre o crescimento de microrganismos fitopatogênicos de interesse agrônômico.

### 2.2- Objetivos específicos:

1- Purificar e caracterizar bioquimicamente os inibidores de proteases isolados de semente de *C. chinense* Jacq;

2- Avaliar o efeito dos inibidores de proteases sobre os fungos filamentosos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum lindemuthianum*; *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*;

3- Analisar o efeito dos inibidores de proteases sobre a permeabilização de membranas fúngicas;

4- Avaliar a indução da produção intracelular de ROS em células fúngicas na presença dos inibidores de proteases;

5- Verificar a funcionalidade mitocondrial em células fúngicas na presença dos inibidores de proteases;

6- Detectar a atividade de caspases em células de fungos filamentosos tratadas com os inibidores de proteases;

7- Determinar a viabilidade das células do fungo *F. oxysporum* na presença dos peptídeos presentes na fração PEF3.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

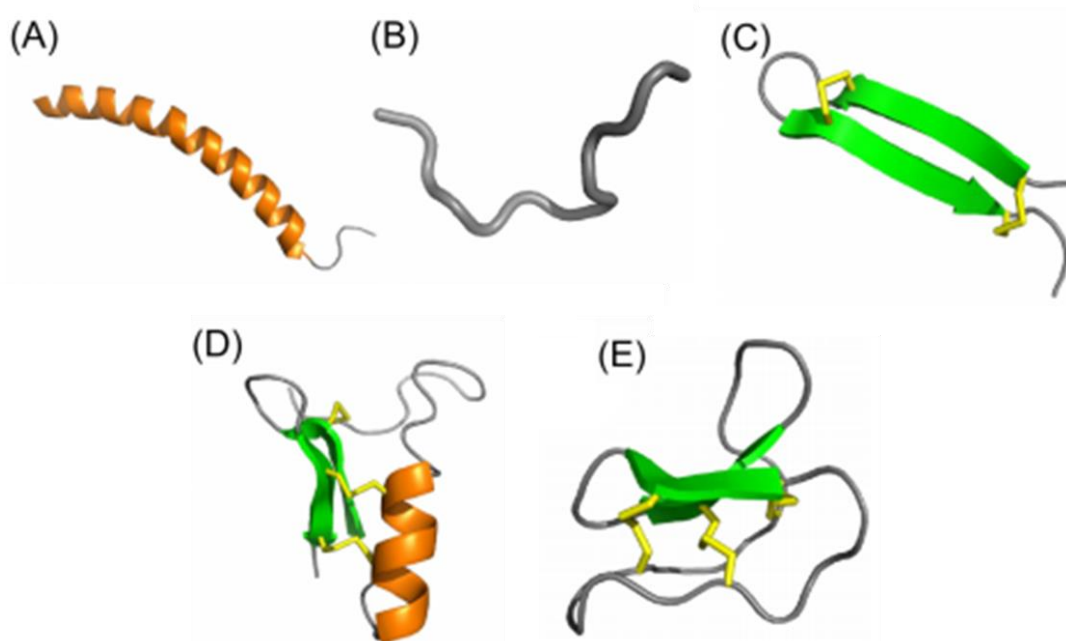
#### 3.1- Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são moléculas que exibem um amplo espectro de atividade inibitórias sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos, parasitas e até mesmo vírus (Dang *et al.*, 2015). Apresentam aproximadamente de 10 a 100 resíduos de aminoácidos e massa molecular inferior a 10 kDa. Geralmente, apresentam propriedades anfipáticas devido a uma porção de resíduos hidrofóbicos e muitos resíduos de lisina ou arginina carregados positivamente, conferindo uma carga líquida positiva em pH fisiológico (Giuliani *et al.*, 2007; Baumann *et al.*, 2010). A hidrofobicidade é determinada pela porcentagem de resíduos hidrofóbicos de um peptídeo, sendo responsável pela capacidade do AMP em interagir com a bicamada lipídica da membrana, desestabilizando-a (Andreev *et al.*, 2018). A anfipaticidade reflete a abundância e polarização dos domínios hidrofóbicos e hidrofílicos dentro do peptídeo. As propriedades de hidrofobicidade e anfipaticidade estão intimamente relacionadas ao seu mecanismo de ação. Teoricamente, todos os AMPs apresentam estruturas anfipáticas na interação com as membranas (Shao *et al.*, 2018).

Os AMPs podem ser classificados de algumas diferentes formas, como aqueles que possuem ou não pontes dissulfeto. Os peptídeos mais amplamente caracterizados são aqueles que as possuem, sendo possível observar a presença de cisteínas em número par (4, 6 ou 8) interconectadas formando pontes dissulfeto

e que confere alta estabilidade estrutural a condições físico-químicas extremas (Broekaert *et al.*, 1997; Campos *et al.*, 2018).

Com base na presença ou ausência dos dois principais elementos da estrutura secundária  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ , os AMPs são divididos em algumas classes principais: (i) peptídeos contendo  $\alpha$ -hélices (magainina, cecropina e catelicidina); (ii) peptídeos de estruturas lineares estendidas (desprovidas de elementos  $\alpha$  ou  $\beta$ , mas tipicamente ricas em um aminoácido específico, como Gly, Arg, Trp ou Pro) (indolicidinas); (iii) peptídeos contendo folhas  $\beta$ , frequentemente estabilizadas com uma ou mais pontes dissulfeto ( $\alpha$ -defensina 1 de humanos); (iv) peptídeos envolvendo  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$  (defensinas de humanos, mamíferos, invertebrados e plantas); e (v) podem ainda apresentar uma configuração cíclica (ciclotídeos) (Figura 1) (Nguyen *et al.*, 2011; Mojsoska e Jenssen, 2015; Wang, 2015).



**Figura 1. Representação esquemática das principais classes estruturais de peptídeos incluindo:** (A) Peptídeos que apresentam uma conformação  $\alpha$ -hélices na presença de micelas. (B) Peptídeos de estruturas estendidas. (C) Peptídeos contendo folha  $\beta$  (são tipicamente estabilizados por pontes dissulfeto). (D) Peptídeos contendo  $\alpha$ -hélices e folha  $\beta$ . (E) Peptídeos que apresentam configuração cíclica. ( $\alpha$ -hélices (laranja), folhas  $\beta$  (verde) e pontes dissulfeto (amarelo)). (Adaptada de Koehbach e Craik, 2019).

Devido à capacidade que os AMPs possuem de interagir com determinadas membranas celulares e conferir uma eficiente atividade antimicrobiana sobre vários agentes patogênicos, seja por interrupção, seja por formação de poros, levando à morte celular, tem-se observado, nos últimos anos, um grande interesse biológico em estudar esse grupo de proteínas (Holásková *et al.*, 2015; Corrêa *et al.*, 2019). Essa importância é decorrente do fato de serem importantes candidatos ao desenvolvimento de novas moléculas promissoras para o controle biológico sustentável de patógenos em plantas, bem como para a elaboração de novos antibióticos para o tratamento de várias infecções em humanos (Mahlapu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

### **3.2- Peptídeos antimicrobianos de plantas**

As plantas possuem um estilo de vida sedentário, suas extensas estruturas aéreas e subterrâneas que, por um lado, permitem que obtenham luz e nutrientes do ambiente, por outro, as tornam particularmente vulneráveis aos microrganismos invasores (Hammond-Kosack e Jones, 2000). Constantemente as plantas são expostas a vários patógenos e a diferentes alterações climáticas e, apesar de serem organismos incapazes de se locomover, ao longo da evolução, diversos mecanismos bioquímicos e morfológicos foram selecionados para responder a todas essas situações de estresse (Cushnie *et al.*, 2014; Dang *et al.*, 2015).

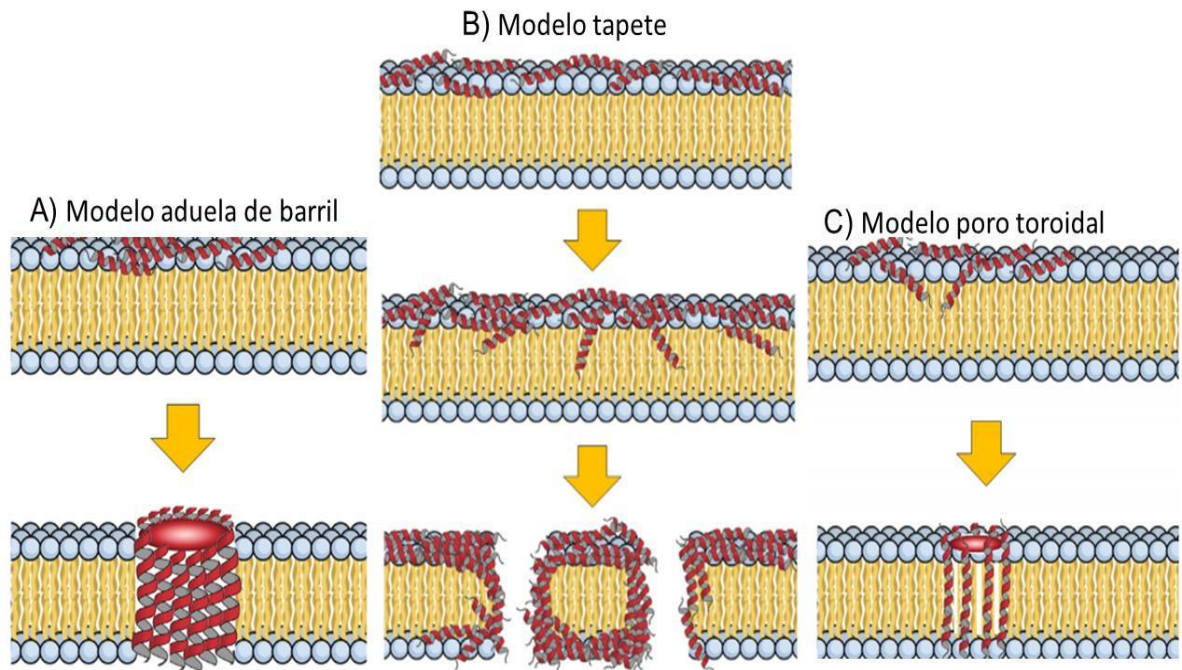
Essas defesas das plantas são agrupadas em duas principais categorias: as defesas constitutivas e as defesas induzidas. As defesas constitutivas ou pré-formadas são aquelas que fazem parte do desenvolvimento da planta e são produzidas continuamente durante sua formação. As defesas induzidas aparecem em resposta à invasão ou ao ataque do patógeno ou quando a planta sofre algum tipo injúria. Fazendo parte do arsenal proteico usado pelas plantas para se defenderem contra patógenos estão os AMPs (Benko-Iseppon *et al.*, 2010; Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2013; Haney *et al.*, 2019).

Os AMPs de plantas compartilham das características gerais dos AMPs encontrados em outros organismos, como carga líquida positiva, a presença de pontes dissulfeto, entre todas as outras propriedades citadas anteriormente. O primeiro AMP identificado e isolado de planta foi uma purotionina, a qual se mostrou ativa contra *Xanthomonas phaseoli*, *Pseudomonas solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Corynebacterium flaccumfaciens*, *C. michiganense* e *C. fascians* (De

Caley *et al.*, 1972). Vários outros AMPs de plantas foram posteriormente descobertos e caracterizados (Nawrot *et al.*, 2014). A grande maioria desses peptídeos age diretamente sobre o agressor e impede seu desenvolvimento, exibindo, assim, atividades antimicrobianas e/ou mesmo inseticida (Holaskova *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2019).

Os AMPs possuem um mecanismo de ação que ainda não está totalmente elucidado. De maneira geral, os AMPs de plantas apresentam um mecanismo de ação que envolve a interação com diferentes estruturas de membrana, levando à formação de poros permitindo a passagem de íons e outras moléculas, culminando no aumento da permeabilidade, o que pode levar à morte celular (Giuliani *et al.*, 2007). Vários modelos para a permeabilização da membrana pelos AMPs já foram descritos, sendo os três mais aceitos e melhores postulados: o modelo aduela de barril, o modelo tapete e o modelo poro toroidal (Figura 2) (Corrêa *et al.*, 2019). Esses modelos foram descritos para peptídeos em  $\alpha$ -helice e membrana de bactéria, porém funcionam muito bem para membranas fúngicas.

O modelo aduela de barril (Figura 2A) é responsável pela formação de poros transmembranares. Considerando a anfipaticidade dos AMPs, a região hidrofóbica das cadeias interage com o núcleo da membrana enquanto a região hidrofílica é virada para fora, formando um poro aquoso (Teixeira *et al.*, 2012). O modelo tapete (Figura 2B) é o mecanismo de permeabilização da membrana que se assemelha ao modo de ação dos detergentes. Nesse caso, não há inserção dos peptídeos na membrana, mas sim um acúmulo na superfície, formando um “tapete”. As interações eletrostáticas na membrana, em um dado momento, são tantas – por causa da alta densidade de AMPs – que a bicamada é desestabilizada por mudanças de fluidez e, assim, entra em colapso em várias micelas (Teixeira *et al.*, 2012). No modelo poro toroidal (Figura 2C), é essencial à presença de lipídios na membrana intercalando com os AMPs, provocando uma curvatura através da ligação de sua face polar com a cabeça polar do lipídeo, o que forma o poro toroidal (Perrin e Pastor, 2016).

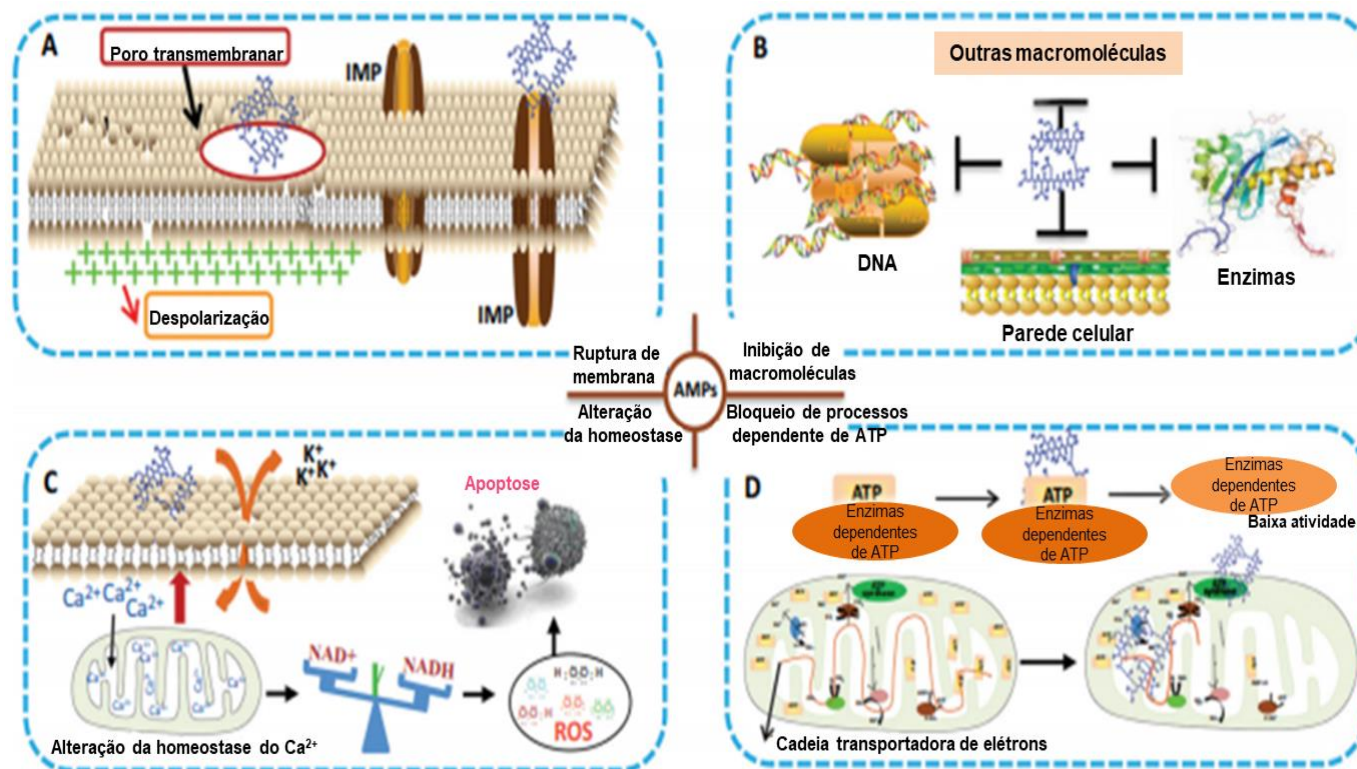


**Figura 2. Modelos de interação entre peptídeos antimicrobianos e membranas citoplasmáticas.** (A) No modelo aduela de barril, os AMPs se acumulam na superfície da membrana, e suas inserções sucessivas formam um poro aquoso na membrana. (B) O colapso total da membrana provocado pelo mecanismo do tapete é a principal consequência da alta densidade de AMPs acumulados na superfície. (C) No modelo poro toroidal, os AMPs são inseridos nas membranas intercalados com os lipídeos, formando o poro (Adaptada de Corrêa *et al.*, 2019).

Embora esse mecanismo geral seja relativamente amplo, estudos mostram que a formação de poros não é o único mecanismo de ação dos AMPs. Os AMPs matam microrganismos através de diferentes mecanismos de ação, e quatro deles estão detalhados na (Figura 3). Além da formação de grandes poros transmembranares, os AMPs podem interagir com importantes proteínas da membrana ou com algum membro externo, como proteínas e transportadores. Todas as interações entre AMPs e membranas causam a disfunção das membranas e, subsequentemente, levam à morte celular (Figura 3A) (Ma *et al.*, 2017; Omardien *et al.*, 2018; Pandit *et al.*, 2018). Os AMPs inibem a biossíntese de biomoléculas intracelulares ou extracelulares, como proteínas, ácidos nucleicos, ácidos lipoteicoicos e glicopeptídeos, depois bloqueiam a síntese da parede celular e levam a anormalidades do metabolismo, que finalmente induz à morte do microrganismo (Figura 3B) (Nan *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2017; Malekkhaiat *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2019). Os AMPs aumentam o efluxo  $K^+$  e desequilibram o  $Ca^{2+}$

celular no citoplasma e nas mitocôndrias. A acumulação de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta na interrupção da homeostase seguida da geração de ROS. A perturbação da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  e a geração de ROS levam à apoptose celular (Figura 3C) (Kim *et al.*, 2018). Os AMPs causam também a inibição da síntese de ATP, interrompendo a atividade da ATP sintase ou bloqueando a transferência de elétrons. A falha na síntese de ATP leva a uma perda de energia no metabolismo. Através dos danos no metabolismo energético ou na atividade enzimática, processos celulares dependentes de ATP são bloqueados (Figura 3D) (Kim *et al.*, 2018).





**Figura 3. Mecanismos de ação de AMPs direcionados a patógenos microbianos.** (A) Os AMPs ligam-se à membrana celular e causam a flutuação, despolarização, perturbação da estrutura ou grandes poros transmembranares. Os AMPs também podem interagir com importantes proteínas da membrana. +: carga positiva enriquecida, IMP: importante proteína da membrana. (B) Os AMPs inibem macromoléculas intracelulares ou extracelulares, incluindo síntese de DNA, enzimas, peptideoglicano, que é o precursor da parede celular e de outras macromoléculas. (C) Os AMPs aumentam a concentração de Ca<sup>2+</sup> no citoplasma e nas mitocôndrias, interrompendo a homeostase; aumentam a proporção de NAD<sup>+</sup>/NADH; e, posteriormente, induzem a geração de ROS e a apoptose. (D) Os AMPs interagem diretamente com o ATP e depois diminuem a atividade das enzimas dependentes do ATP. Por outro lado, os AMPs bloqueiam as sínteses de ATP, interagindo com a ATP sintase ou bloqueando a cadeia transportadora de elétrons. Tudo isso resulta no bloqueio de processos dependentes de ATP (Adaptada de Zhang *et al.*, 2019).

A variedade estrutural dos AMPs contribui para seus múltiplos papéis bioativos e diferentes mecanismos de ação. De acordo com sua estrutura terciária, os AMPs de planta podem ser classificados em diferentes famílias (Tabela 1). Entre estes, encontram-se as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs, do inglês *Lipid Transfer Proteins*), divididas em dois subgrupos de acordo com seus tamanhos (LTP1 e LTP2); as snakinas, inicialmente isoladas de *Solanum tuberosum* (batata); as defensinas de planta, inicialmente isoladas de sementes de *Hordeum vulgare* (cevada), que foram primeiramente agrupadas como  $\gamma$ -tioninas. No entanto, este grupo de AMPs vegetais foi posteriormente classificado como defensina, devido às suas propriedades estruturais; as tioninas, isoladas de *Triticum aestivum* (trigo), são subdivididas em dois grupos distintos,  $\alpha/\beta$  tioninas e tioninas; os peptídeos tipo-heveína são compostos por classes que diferem no número de pontes dissulfeto (3, 4 ou 5); os peptídeos tipo-knotinas, isolados inicialmente de sementes de *Mirabilis jalapa* (maravilha); os peptídeos MBP-1, isolados de *Zea mays* (milho); os peptídeos denominados Ib-AMPs, isolados de sementes de *Impatiens balsamina* (balsamina); os ciclotídeos, encontrados nas famílias das Rubiaceae e Violaceae, são classificados de acordo com suas propriedades estruturais em dois subgrupos principais (Kalata B1 e B2); e os inibidores de protease, isolados de sementes de *Capsicum annuum* L. (pimenta) (Benko-Iseppon *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2018).

**Tabela 1: Principais famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas incluindo:** peptídeos representativos e suas fontes (Adaptada de Tang *et al.*, 2018).

FAMÍLIA	NOME	ÓRGÃO VEGETAL	PLANTA	REFERÊNCIA
Proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs)	LTP1s e LTP2s	Sementes	<i>Zea mays</i>	(Nawrot <i>et al.</i> , 2014; Pelegrini <i>et al.</i> , 2007; Stec, 2006)
Snakinas	StSN1 e StSN2	Tubérculo	<i>Solanum tuberosum</i>	(Fujimura <i>et al.</i> , 2003; Nawrot <i>et al.</i> , 2014; Terras <i>et al.</i> , 1995)
Defensinas	Peptídeo PvD1 $\gamma$ -hordothionina	Sementes	<i>Hordeum vulgare</i>	(Games <i>et al.</i> , 2008; García-Olmedo <i>et al.</i> , 1998; Mendez <i>et al.</i> , 1990; Ramos <i>et al.</i> , 2014)
$\alpha/\beta$ Tioninas	$\alpha$ -1-purothionina	Endosperma	<i>Triticum aestivum</i>	(De Caleyra <i>et al.</i> , 1972; Nawrot <i>et al.</i> , 2014)
Tioninas	Crambina	Sementes	<i>Triticum aestivum</i>	(Schrande Fischer e Apel, 1994)
Peptídeos tipo-heveína	PMAPI	Folhas	<i>Broussonetia papyrifera</i> syn. <i>Morus papyrifera</i>	(Zhao <i>et al.</i> , 2011)
Peptídeos tipo-knotinas	PAFP-S	Sementes	<i>Mirabilis jalapa</i>	(Marcus <i>et al.</i> , 1999; Nawrot <i>et al.</i> , 2014; Terras <i>et al.</i> , 1995)
Milho-AMP	MBP-1	Sementes	<i>Zea mays</i>	(Duvick <i>et al.</i> , 1992)
Puroindolinas	PINA e PINB	Endosperma	<i>Triticum aestivum</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2000; Nawrot <i>et al.</i> , 2014; Tailor <i>et al.</i> , 1997)
Impatiens	Ib-AMPs	Sementes	<i>Impatiens balsamina</i>	(Steppek <i>et al.</i> , 2005; Tailor <i>et al.</i> , 1997)
Ciclotídeos	Kalata B1 e B2	Folhas e Flores	<i>Oldenlandia affinis</i>	(Craig, 2001; Nawrot <i>et al.</i> , 2014; Selitrennikoff, 2001; Stec, 2006)
Inibidores de proteases	CaTI	Sementes	<i>Capsicum annuum</i>	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2007)

São várias as famílias de AMPs de plantas, porém três delas foram melhor caracterizadas: as defensinas, as LTPs e as tioninas (Broekaert *et al.*, 1997; Egorov *et al.*, 2005; Carvalho e Gomes, 2007; 2009). Como este trabalho trata de inibidores de protease, apenas esta família será mais detalhada no tópico seguinte.

### **3.3- Inibidores de protease serínica de plantas**

Os inibidores de protease (PIs, do inglês *protease inhibitors*) são moléculas reguladoras encontradas em animais, plantas e microrganismos que reduzem e inibem a atividade das proteases alvo em diversas espécies de plantas, além de apresentarem outras funções, como armazenamento, mecanismos de defesa contra infecção por patógenos, protegendo as plantas contra insetos herbívoros inibindo as proteases digestivas. Nas plantas, eles estão presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos, podendo ser encontrados em maior nível em sementes e órgãos de reserva (Macedo *et al.*, 2011; Cotabarren *et al.*, 2020).

Os PIs são classificados de acordo com a classe de enzima inibida e podem ser da família dos inibidores de serino proteases, de cisteíno proteases, de metalo proteases e de proteases aspárticas (Martins *et al.*, 2018). As serino protease possuem um resíduo de serina em seu sítio ativo, as cisteíno proteases apresentam um aminoácido cisteína, as metalo proteases usam um íon metal e as proteases aspárticas têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. A inibição da atividade catalítica é alcançada pela interação entre o inibidor e os resíduos do sítio catalítico enzimático. A região molecular no inibidor responsável pela formação do complexo enzima-inibidor é chamada de sítio reativo e apresenta uma composição de aminoácidos diferentes para cada classe de inibidor (Fan *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011).

Os inibidores de serino protease são amplamente distribuídos e ocorrem em muitas espécies de plantas, embora a maioria tenha sido isolada das famílias Solanaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Poaceae e Cucurbitaceae (Fan *et al.*, 2005; Bendre *et al.*, 2018). Baseado nas homologias evidentes das suas estruturas primárias, a localização das pontes dissulfeto e a posição de seus sítios reativos, os inibidores de serino protease de plantas têm sido agrupados em diferentes famílias. Estas famílias diferem principalmente nas massas moleculares, no conteúdo das pontes dissulfeto e nas suas estruturas tridimensionais. As famílias conhecidas são: inibidor de tripsina da soja (Kunitz); inibidor Bowman-Birk; inibidor

de tripsina da cevada; inibidores I e II da batata e do tomate; inibidor da abóbora; entre outros (Tabela 2) (Ledoigt *et al.*, 2006; Hellinger e Gruber, 2019).

**Tabela 2-** Exemplos de famílias de inibidores de proteases serínicas de plantas, suas fontes e proteases alvo (Fonte: Adaptada de Habib e Fazili, 2007).

FAMÍLIA	EXEMPLO	FONTE	PROTEASE ALVO	REFERÊNCIA
Kunitz	Inibidor de tripsina de soja	<i>Glycine max</i>	Tripsina; Quimiotripsina	Laskowski e Kato (1980)
	Subtilisina de cevada	<i>Hordeum vulgare</i>	Subtilisina; $\alpha$ -amilase	Vallee <i>et al.</i> (1998)
	Inibidor de quimiotripsina de feijão	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	$\alpha$ -quimiotripsina	Habu <i>et al.</i> (1992)
Kunitz	Inibidor de subtilisina	<i>Sagittaria sagittifolia</i>	Tripsina; Quimiotripsina	Laskowski e Kato (1980)
	Inibidor de tripsina	<i>Acacia confusa</i>	Tripsina, $\alpha$ -quimiotripsina	Lin <i>et al.</i> (1991)
	Inibidor de cathepsina D	<i>Solanum tuberosum</i>	Cathepsina D; Tripsina	Strukelj <i>et al.</i> (1992)
Cereal	Inibidor de $\alpha$ -amilase e tripsina de trigo	<i>Triticum aestivum</i>	$\alpha$ -amilase; tripsina	Shewry <i>et al.</i> (1984)
	Inibidor de $\alpha$ -amilase e tripsina de cevada	<i>Hordeum vulgare</i>	$\alpha$ -amilase; tripsina	Lazaro <i>et al.</i> (1988)
Abóbora	Inibidor de tripsina macrocíclico de abóbora	<i>Momordica cochinchinensis</i>	Tripsina	Hernandez <i>et al.</i> (2000)
	Inibidor de tripsina CSTI-IV	<i>Cucumis sativus</i>	Tripsina	Wieczorek <i>et al.</i> (1985)
Batata tipo I	Inibidor de quimiotripsina I	<i>Solanum tuberosum</i>	Quimiotripsina; Tripsina	Poerio <i>et al.</i> (2003)
	Inibidor de quimiotripsina/subtilisina de trigo	<i>Triticum aestivum</i>	Subtilisina; $\alpha$ - quimiotripsina	Richardson (1974)
Mostarda	Inibidor de tripsina de mostarda	<i>Sinapis alba</i>	$\beta$ -tripsina	Menegatti <i>et al.</i> (1992)
	Inibidor de tripsina de canola	<i>Brassica napus</i>	Tripsina; Quimiotripsina	Cecilian <i>et al.</i> (1994)
Bowman-Birk	Inibidor de tripsina cíclico de girassol	<i>Helianthus annuus</i>	Tripsina; Quimiotripsina; Elastase	Mulvenna <i>et al.</i> (2005)
	Inibidor de tripsina/quimiotripsina	<i>Arachis hypogaea</i>	Tripsina; Quimiotripsina	Suzuki <i>et al.</i> (1987)
Batata tipo II	Inibidor de protease II	<i>Solanum tuberosum</i>	Tripsina; Quimiotripsina	Greenblatt <i>et al.</i> (1989)

Os Pis de plantas dos tipos Kunitz e Bowman-Birk são os mais estudados e são encontrados em membros da família das leguminosas. Os inibidores do tipo Kunitz são proteínas que geralmente exibem uma massa molecular de 18 a 24 kDa, mas alguns peptídeos menores (8 kDa) também já foram descritos. Apresentam uma ou duas cadeias polipeptídicas e quatro resíduos de cisteína, formando duas pontes dissulfeto. Por outro lado, os inibidores de Bowman-Birk são pequenas

proteínas (peso molecular de 4 a 8 kDa) com 14 resíduos de cisteína, formando sete pontes dissulfeto (Qi *et al.*, 2005; Bendre *et al.*, 2018).

Os PIs de planta de baixa massa molecular são pequenos peptídeos que possuem de 15 a 60 aminoácidos com alto teor de resíduos de cisteína, formando pontes dissulfeto. São caracterizados por apresentarem uma resistência notável ao tratamento térmico e uma alta estabilidade a alterações no pH, agentes desnaturantes, força iônica e proteólise. Estes são capazes de interagir específica e reversivelmente com diferentes enzimas proteolíticas, promovendo a sua inibição (Jamal *et al.*, 2013; Cotabarren *et al.*, 2020).

Entre os inibidores, ainda existem aqueles bifuncionais que inibem diferentes enzimas; podem, por exemplo, inibir tanto a enzima tripsina quanto a enzima  $\alpha$ -amilase. Em plantas, são relatados seis subtipos de inibidores  $\alpha$ -amilase (AAI, do inglês  *$\alpha$ -amylase inhibitors*): inibidores tipo defensina, tipo cereal, tipo knotina, tipo Kunitz, tipo taumatina e tipo lectina (Svensson *et al.*, 2004). Os inibidores de  $\alpha$ -amilase bifuncional têm baixa massa molecular, normalmente de tamanho entre 10 e 15 kDa e foram descobertos em plantas ricas em amido, como cevada, amaranto, trigo e milho. Geralmente, têm especificidade para amilases de insetos, portanto, são importantes na defesa de herbívoros (Tam *et al.*, 2015).

Nas plantas, os PIs que inibem serino proteases podem ser expressos em resposta ao ataque de insetos e patógenos inibindo a ação de proteases digestivas presentes, principalmente, nos mamíferos e insetos, assim como enzimas presentes nas bactérias e nos fungos (Clemente *et al.*, 2019). Estes PIs são expressos em resposta a diferentes agressões e fazem parte do grupo de proteínas relacionadas à patogênese chamadas de proteínas PR. Estas podem estar presentes em menores concentrações nos tecidos saudáveis durante o desenvolvimento normal da planta, mas podem ter seu nível de expressão aumentado sob várias condições de estresse (Salvaudon *et al.*, 2005; Bártoová *et al.*, 2019).

Os PIs ganharam muita atenção devido ao seu forte papel na defesa das plantas como agentes bioinseticidas, antifúngicos, nematicidas e antibacterianos (Shamsi *et al.*, 2016; Cotabarren *et al.*, 2020). São vários os trabalhos que demonstram a atividade antimicrobiana de PIs isolados de plantas. Silva *et al.* (2015) purificaram um inibidor de tripsina denominado RcTI, isolado de sementes de *Ricinus communis* L., que inibe a germinação de esporos do fungo *C.*

*gloeosporioides*. Já o IETI, um inibidor de tripsina do tipo Kunitz isolado de sementes de *Inga edulis*, exibiu atividade antimicrobiana sobre *Candida buinensis* e *Candida tropicalis*, causando permeabilização nas membranas dessas leveduras, diminuindo, assim, a viabilidade celular (Dib *et al.*, 2018). Isoformas de inibidores serino protease foram purificados de sementes de *Acacia plumosa* Lowe e denominados ApTIA, ApTIB e ApTIC. Estes possuem massa molecular de 20 kDa e foram testados contra diferentes fungos fitopatogênicos. Pode-se observar que estes inibem o crescimento de *Aspergillus niger*, *Thielaviopsis paradoxa* e *Colletotrichum* sp. Dabhade *et al.* (2016) isolaram um inibidor chamado API que possui atividade antifúngica sobre *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* e *Candida albicans*, além de atividade antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Em 2007, foi isolado de sementes de *C. annuum* um peptídeo denominado *CaTI* que apresentou atividade inibitória sobre o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida albicans*; também foi capaz de induzir severas alterações morfológicas, como desorganização da parede celular, aglomeração celular e liberação do conteúdo citoplasmático (Ribeiro *et al.*, 2007). Recentemente, *CaTI* foi testado sobre o crescimento de fungos filamentosos de interesse agrônomico, e este foi capaz de inibir o crescimento de fungos do gênero *Colletotrichum* (Silva *et al.*, 2017).

Desta forma, AMPs da família dos PIs apresentam um grande potencial para serem usados no melhoramento de plantas ou na produção de plantas geneticamente modificadas com maior resistência a patógenos. Também podem ser utilizados como marcadores bioquímicos para a seleção de plantas e no lançamento de novas cultivares (Quilis *et al.*, 2007; 2014).

### **3.4- O gênero *Capsicum***

A pimenta (Família Solanaceae; Gênero *Capsicum*) é um gênero de grande diversidade que varia de acordo com a cor, o tamanho, a forma e a composição química. Apresenta 38 espécies descritas, sendo que cinco *C. annuum* var. *annuum* L., *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. e *C. pubescens* são domesticadas, enquanto as outras são consideradas silvestres e semidomesticadas (Karlova *et al.*, 2014; García *et al.*, 2016). A subsequente domesticação das cinco espécies cultivadas de *Capsicum*, a partir do principal centro de cultivo, Bolívia e Peru, para os países da Europa, África, Índia e China,

resultou da diversificação da colheita, devido à atividade humana, e no desenvolvimento de frutos não decíduos (permanecem retidos nas plantas), maiores e não picantes (Van Zonneveld *et al.*, 2015; Barboza *et al.*, 2019).

Geneticamente, as espécies do gênero *Capsicum* são diploides e podem ser distinguidas em dois grupos de espécies – um com  $2n = 24$  e outro com  $2n = 26$  cromossomos (Moscone *et al.*, 2007). As espécies que compõem este gênero estão distribuídas em três complexos gênicos distintos. O complexo *C. annuum* reúne as espécies *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*; o complexo *C. baccatum* reúne *C. baccatum* var. *baccatum* (forma silvestres) e *C. baccatum* var. *pendulum* (forma cultivada); e o complexo *C. pubescens* reúne *C. pubescens* e algumas outras silvestres (Martins *et al.*, 2010).

A espécie *C. annuum*, cuja domesticação e diversidade genética está centrada no México, é a espécie mais amplamente cultivada e economicamente importante em todo o mundo (Hernández-Ortega *et al.*, 2012; Kraft *et al.*, 2014). A *C. chinense* é a mais difundida na América tropical, enquanto a *C. frutescens* está sendo naturalizada e se tornou popular na Ásia e na África e as *C. baccatum* e *C. pubescens* são distribuídas principalmente na América do Sul (Bosland *et al.*, 2012).

Com base na morfologia das flores, a cor da antera é muito importante para a identificação da espécie de *Capsicum*. *C. baccatum* é caracterizada por possuir antera amarela, enquanto as anteras de *C. annuum* são roxas; *C. chinense* e *C. frutescens* apresentam flores com pétalas de cor esverdeada a branca; e *C. pubescens* é caracterizada por suas flores com corola roxa distinta e sementes pretas ásperas (Sudré *et al.*, 2010; Van Zonneveld *et al.*, 2015).

O Brasil contempla o maior número de espécies silvestres e a região Sudeste apresenta-se como o principal centro de diversidade (Moreira *et al.*, 2018). O gênero *Capsicum* é de grande importância cultural e econômica no País, devido à sua alta versatilidade, pois possui potencial de uso agrônômico, farmacêutico, industrial, uso na culinária e na decoração (Silvar e García-González, 2017). Os frutos de pimenta também são usados como corantes naturais, podendo ser utilizados como tempero na preparação de pratos típicos regionais (Hulse-Kemp *et al.*, 2016). Além disso, existe um grande comércio internacional de pimenta vermelha, seca em pó, com ou sem sementes e com diversos níveis de pungência (Nascimento *et al.*, 2012).



Entre as espécies domesticadas, *C. chinense* é considerada a mais importante do Brasil, tendo a Bacia Amazônica como centro de domesticação (Moses e Umaharan, 2012; Moses *et al.*, 2014). Os frutos de *C. chinense* destacam-se por uma grande diversidade de tamanhos, cores, formas e níveis de pungência, além de ser considerada a pimenta mais picante do mundo (Moreira *et al.*, 2018).

A pungência dos frutos se deve à presença de substâncias conhecidas como capsaicinoides. A capsaicina, o principal capsaicinoide das pimentas, ocorre na placenta dos frutos e é ausente nas sementes. Quanto à importância nutricional, as pimentas são fonte de vários outros compostos, principalmente de vitaminas, como carotenoides (provitamina A), flavonoides, vitaminas (vitaminas C e E), produzindo uma alta quantidade de vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavida) e B3 (niacina) (Wahyuni *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2020). Em algumas partes do mundo, as pimentas são utilizadas como estimulante digestivo, afrodisíaco, no combate à disenteria e às infecções intestinais, além de seu uso como antiparasitário e cicatrizante (Spiller *et al.*, 2008; Anandakumar *et al.*, 2013; Olatunji *et al.*, 2019).

Globalmente, a maior parte da produção de pimenta é afetada por fatores bióticos, como fungos fitopatogênicos, bactérias, vírus, nemátodos e outras pragas incluindo pulgões (Franco *et al.*, 2019). Para que os frutos das pimenteiras possam crescer saudáveis, estas precisam se defender de inúmeras doenças. Entre essas doenças, podemos encontrar as causadas por fungos, como a Antracnose, uma das doenças fúngicas mais devastadoras e prejudiciais nos estágios de pré-colheita e pós-colheita, provocada pelo fungo *Colletotrichum* spp. A doença é transmitida através de sementes infectadas e provoca danos diretos aos frutos, o que inviabiliza sua comercialização. É causada por um complexo de espécies de *Colletotrichum*, tais como *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. capsici*. No Brasil, a espécie *C. gloeosporioides* parece ser a mais comum, e os sintomas da antracnose iniciam-se com pequenas áreas arredondadas e deprimidas (Reis *et al.*, 2011; Ridzuan *et al.*, 2018). *C. acutatum* é considerada a espécie mais agressiva de *Colletotrichum*, pois afeta os frutos maduros e verdes da pimenta, enquanto *C. gloeosporioides* afeta apenas os frutos maduros (Harp *et al.*, 2008). Sintomas dessa doença também já foram identificados em muitas outras plantas, como mamão, tomate e abóbora, e aparecem nas hastes, folhas, flores e nos frutos (Hyde *et al.*, 2009). Entre outras doenças importantes relacionadas a pimenta e pimentões no Brasil, estão o mosaico amarelo do pimentão (PepYMV, do inglês *Pepper yellow mosaic virus*); a

mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.); a podridão mole (*Pectobacterium* spp.); a mancha de cercospora (*Cercospora capsici*); e o oídio (*Oidiopsis taurica*), que apresenta um sintoma inicialmente observado na face superior das folhas e consiste de manchas cloróticas (Carvalho e Bianchetti, 2007).

Ainda vale ressaltar que o gênero *Capsicum* representa um valioso recurso genético. Além de toda a importância já descrita, os frutos e as sementes de *Capsicum* são significantes fontes de proteínas com atividade antimicrobiana. Diferentes trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa já isolaram e caracterizaram diversos peptídeos antimicrobianos (AMPs) de espécies do gênero *Capsicum* (Diz *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2013; Taveira *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017).

Diz *et al.* (2006) isolaram uma fração de sementes de *C. annuum* L., denominada F1, rica em peptídeos. Esta fração apresentou alta atividade inibitória sobre o crescimento das leveduras *Schizosaccharomyces pombe*, *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Um dos peptídeos presentes nessa fração apresentou similaridade de sequência com as proteínas pertencentes à família das LTPs de plantas, sendo denominada de CaLTP1. Posteriormente, foi observado que CaLTP1 exibe atividade antifúngica contra *C. lindemuthianum* e *C. tropicalis* (Diz *et al.*, 2011). Um inibidor de tripsina, denominado CaTI, foi isolado de sementes de *C. annuum*. Este inibidor demonstrou propriedades antifúngicas inibindo o crescimento das leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*, sendo também capaz de causar alterações morfológicas nas células das leveduras (Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2013). Posteriormente, CaTI inibiu o crescimento dos fungos filamentosos *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum*, apresentando a capacidade de causar a permeabilização das membranas destes fungos (Silva *et al.*, 2017). Bard *et al.* (2015) também isolaram um peptídeo a partir de extratos de sementes de um híbrido de *Capsicum* (Ikeda x UENF 1381). Este peptídeo, denominado HyPep, apresentou identidade com um inibidor de protease serínica e demonstrou atividade antifúngica sobre as leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus*. Outro peptídeo isolado de sementes de *C. annuum* foi uma albumina 2S, denominada Ca-Alb. A Ca-Alb inibiu o crescimento das leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *S. cerevisiae* e foi capaz de induzir o aumento da produção endógena de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) nestas leveduras (Ribeiro *et al.*, 2012).

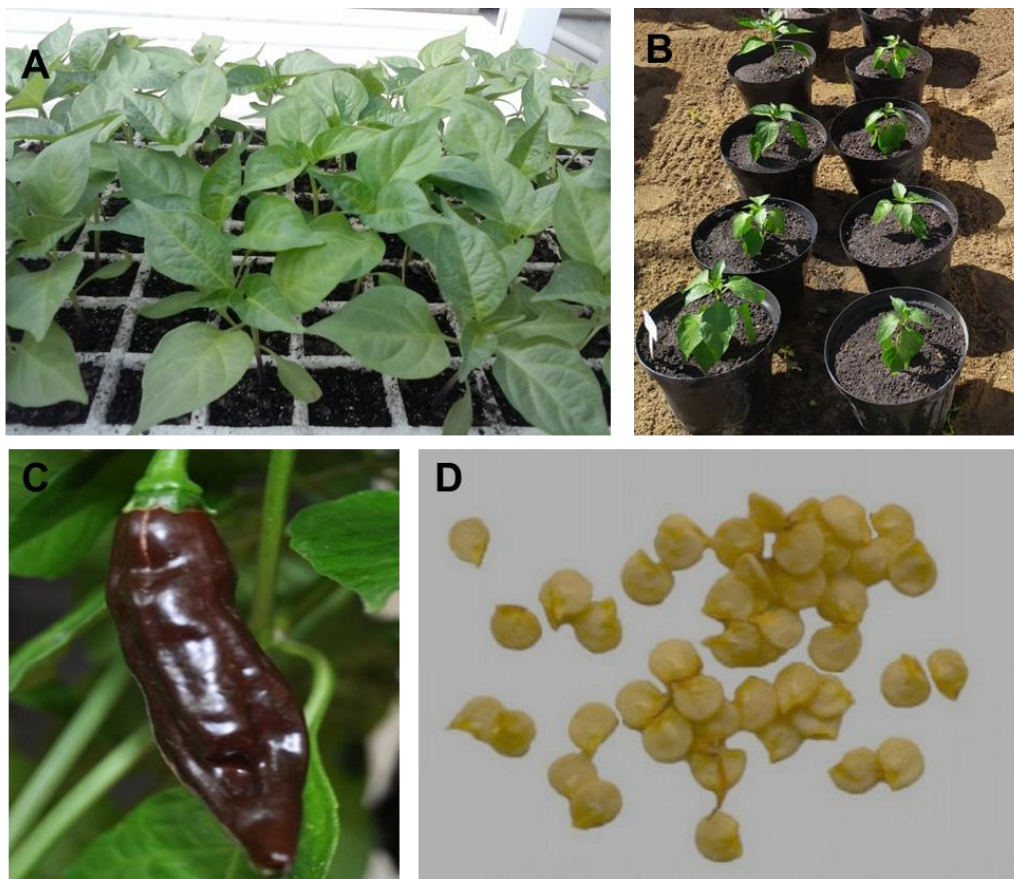
AMPs também já foram isolados de frutos de *Capsicum*. Taveira *et al.* (2013) isolaram um peptídeo similar às tioninas, o qual foi chamado de CaThi e apresentou atividade inibitória sobre as leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis*. Este peptídeo também foi capaz de causar redução do crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Uma fração denominada Fa5 apresentou um peptídeo com similaridade às defensinas de plantas. Este peptídeo exibiu atividade antimicrobiana sobre espécies do gênero *Fusarium*. A fração Fa5 também foi capaz de permeabilizar as membranas de todos os fungos testados e induziu o aumento na produção endógena de ROS (Santos *et al.*, 2017). Frações isoladas de frutos de *C. annuum* apresentaram atividade inibitória sobre as espécies de *Candida* e *Mycobacterium tuberculosis*. Os peptídeos presentes nessas frações apresentaram similaridade com a família já bem caracterizada das defensinas vegetais (Gebara *et al.*, 2020). AMPs similares a inibidores de proteases presentes nas folhas e raízes de *C. annuum* apresentaram atividades inibitórias contra os fungos fitopatogênicos *C. lindemuthianum* e *C. gloeosporioides*, além da bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* (Pereira *et al.*, 2018).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Material biológico

#### 4.1.1- Sementes de *Capsicum chinense* Jacq.

As sementes de *C. chinense* Jacq. (acesso UENF 1755) foram fornecidas pelo Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Posteriormente, foram semeadas em bandeja de poliestireno de 128 células contendo substrato comercial Vivatto®, fertilizadas com a formulação N-P-K (4-14-8) e mantidas em câmara de crescimento com temperatura controlada de 28 °C e fotoperíodo de 12 h. Após as mudas apresentarem mais de 10 cm de altura (aproximadamente 20 dias), foram transplantadas para vasos de 5 L contendo substrato comercial Vivatto® e levadas para casa de vegetação onde foram irrigadas com água uma vez ao dia. De 45 a 50 dias após a antese, os frutos maduros foram coletados e abertos com o auxílio de um estilete para a retirada das sementes. O experimento foi conduzido de agosto de 2016 a julho de 2018. As sementes foram mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) sob refrigeração.



**Figura 4.** Imagens de plantas do gênero *C. chinense* Jacq. (acesso UENF 1755); **(A)** Plântulas de *C. chinense* mantidas em câmara de crescimento; **(B)** Plantas em vasos de 5 L; **(C)** Fruto de *C. chinense*; **(D)** Sementes de *C. chinense*. Fonte: A e B: Foto tirada no laboratório por Marciele Souza da Silva; C e D: <http://www.google.com.br>.

#### 4.1.2- Microrganismos

Os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* (5522), *Colletotrichum lindemuthianum* (5771), *Fusarium oxysporum* (5845) e *Fusarium solani* (4014) foram mantidos em ágar Sabouraud (1% peptona, 2% glicose e 1,7% ágar-ágar; Merck) no LFBM, Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

#### 4.1.3- Insetos

Os insetos da espécie *Tenebrio molitor* foram cedidos pela prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antônia Elenir Amâncio Oliveira, do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), CBB, UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

## 4.2- Métodos

### 4.2.1- Extração proteica

Sementes da pimenta *C. chinense* foram maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de uma farinha de granulação fina. Após a obtenção desta farinha, as proteínas foram extraídas e purificadas conforme descrito por Dias *et al.* (2013). Nesta extração, a farinha foi delipidada em éter de petróleo na proporção de 1:4 (farinha/éter) por 1 h sob agitação a 4 °C, e, posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 15.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco utilizando papel de filtro. Em seguida, o precipitado foi colocado em tampão de extração [ácido trifluoroacético (TFA, do inglês *trifluoroacetic acid*) 1%, HCl 1 M, ácido fórmico 5%, NaCl 1%, pepstatina A 1 µg.mL<sup>-1</sup>]. A solução ficou sob agitação por 1 h a 4 °C e foi submetido a centrifugação a 14.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi denominado extrato rico em peptídeos.

### 4.2.2- Purificação das frações de *C. chinense*

O extrato proteico de *C. chinense* foi inicialmente submetido à cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC (do inglês, *high-performance liquid chromatography*) seguindo metodologia descrita por Dias *et al.* (2013). Primeiramente, a amostra foi diluída em 0,1% (v/v) TFA e submetida a uma coluna µRPC C18 (Shim-pack CLC-ODS, Shimadzu, Japão) acoplada a uma coluna guarda C8 (Shimadzu-Japão). A cromatografia foi desenvolvida a um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> com 100% de solvente A (0,1% TFA em água) até 8 min, seguido de um gradiente crescente até 50% do solvente B (0,1% TFA em 100% de propanol – Merck) até 47 min. O volume de amostra injetado foi 500 µL. A eluição dos peptídeos foi acompanhada por um detector do tipo DAD (detector de arranjo diodo), sendo monitorado por absorbância a 280 nm e acompanhada por técnicas de eletroforese.

A fração PEF2 foi submetida a uma nova cromatografia. Primeiramente, esta foi diluída em 0,1% (v/v) TFA e submetida à coluna de fase reversa µRPC C2C18 (ST 4.6/100) (GE Healthcare). A cromatografia foi desenvolvida a um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> com 100% de solvente A (0,1% TFA em água) até 8 min, seguido de um gradiente crescente até 34% do solvente B (0,1% TFA em 100% de propanol) até 55 min e, finalmente, 100% do solvente A pelo restante da corrida de 65 min. O

volume de amostra injetado foi 200  $\mu$ L. A eluição dos peptídeos foi acompanhada por um detector do tipo DAD, sendo monitorado por absorvância a 280 nm e acompanhada por técnicas de eletroforese.

#### **4.2.3- Quantificação de proteínas**

As determinações quantitativas de proteínas foram feitas pelo método do ácido bicinconínico, segundo Smith *et al.* (1985), sendo a ovalbumina (Sigma) utilizada como proteína padrão.

#### **4.2.4- Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS**

A eletroforese em gel de tricina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Schägger e von Jagow (1987). Para a montagem do gel, foram usadas placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 mm. O gel de separação foi preparado na concentração de 16,4% de acrilamida/bis-acrilamida e o gel de concentração em 3,9%. As amostras foram aquecidas por 5 min a 100 °C e centrifugadas a 15.000 x *g* por 5 min. Após estes procedimentos 20  $\mu$ g das amostras foram aplicadas no gel. A corrida foi realizada a uma voltagem constante de 24 V, por aproximadamente 16 h. MW 1,060-26,600 (Sigma-Aldrich) foi utilizado como marcador de massa molecular de proteínas.

#### **4.2.5- Identificação do peptídeo por espectrometria de massas**

A identificação dos peptídeos presentes na fração PEF3 foi realizada em colaboração com Laboratório de Bioquímica Marinha (BioMar-Lab), Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Após a tricina-SDS-PAGE (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*), as duas bandas presentes no PEF3 foram extraídas e digeridas com tripsina. Os peptídeos digeridos com tripsina foram analisados por espectrometria de massa por dessorção a laser assistida por matriz (ESI-Quad-ToF). A interpretação dos espectros foi realizada utilizando o programa Mascot, e os peptídeos sequenciados foram submetidos a alinhamento utilizando a ferramenta BLASTp. As sequências com alto percentual de identidade foram escolhidas e submetidas a alinhamento múltiplo usando o programa CLUSTAL Multiple Sequence Alignment by MUSCLE (3.8).

#### 4.2.6- Ensaio de inibição da enzima tripsina usando as frações PEFs

A atividade inibitória da tripsina na presença das frações enriquecidas com peptídeos (PEFs, do inglês *peptide-enriched fractions*) foi medida com base na atividade hidrolítica da tripsina bovina comercial (Sigma-Aldrich) sobre o substrato BApNA (do inglês, *N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide*) (Sigma-Aldrich) após incubação com as frações. Para o ensaio, foi utilizado o tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0), 25 µL de substrato BApNA (Sigma-Aldrich), 10 µL de tripsina (1 µg.mL<sup>-1</sup>) e alíquotas das diferentes frações (67,77 µg.mL<sup>-1</sup> de PEF2 e 50 µg.mL<sup>-1</sup> de PEF2A, PEF2B e de PEF3) em um volume final de 200 µL. As amostras foram incubadas em banho-maria (Quimis) a 37 °C por 30 min. Para interromper a reação, foram adicionados 100 µL de ácido acético a 30%. Posteriormente, as leituras das absorbâncias foram realizadas a 405 nm com base na p-nitroanilida liberada, usando um (espectrofotômetro Pharo 100, Merck) (Ribeiro *et al.*, 2013).

#### 4.2.7- Detecção da inibição de protease por zimografia reversa

A inibição de tripsina em gel foi realizada utilizando a metodologia de Felicioli *et al.* (1997), na qual o equivalente a 20 µg das amostras foram separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 12%) (Laemmili, 1970) polimerizado com gelatina a 0,1%, em condições não desnaturantes (o tampão da amostra não continha SDS e β-mercaptoetanol). Após a corrida, os géis foram colocados em tampão de lavagem (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo Triton X-100 a 2,5%) duas vezes por 60 min para remover o SDS presente no tampão de corrida. Após a remoção do SDS, os géis foram imersos em tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM e tripsina a 50 µg.mL<sup>-1</sup>) a 37 °C por 1 h. Em seguida, os géis foram lavados com água destilada para a remoção do excesso de tripsina. As proteínas não digeridas foram coradas por uma solução de 0,2% de Coomassie Brilliant Blue G por 30 min e, posteriormente, descoradas. As bandas no gel mostram a presença de inibidores de protease indicando a incapacidade da tripsina de digerir a gelatina nessas regiões onde os inibidores estão presentes. Como controle, utilizamos 15 µl do inibidor comercial de tripsina (Soybean Kunitz – Merck), que foi preparado na proporção de 1 mg do inibidor para 500 µl do tampão de amostra.

#### 4.2.8- Ensaio de inibição de α-amilases



O ensaio de atividade enzimática para  $\alpha$ -amilases intestinais de *Tenebrio molitor* e  $\alpha$ -amilases salivar humana foi realizado como descrito por Da Silva *et al.* (2018), com algumas modificações.

#### **4.2.8.1- Obtenção dos extratos contendo $\alpha$ -amilase**

Larvas de *T. molitor* com aproximadamente 16 dias de idade tiveram seus intestinos dissecados e o conteúdo luminal coletado. Os intestinos larvais foram macerados a 4 °C em soro fisiológico estéril e submetidos à centrifugação por 10 min a 12.000 *g*. O sobrenadante foi quantificado usando o método do ácido bicinchonínico descrito por Smith *et al.* (1985).

A enzima  $\alpha$ -amilase salivar humana foi coletada de um voluntário saudável em microtubos e centrifugadas a 12.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante também foi submetido à quantificação de proteínas.

#### **4.2.8.2- Curva para determinação de atividade das enzimas**

Do estoque inicial de  $\alpha$ -amilase intestinal de *T. molitor* (5,8 mg.mL<sup>-1</sup>), foram utilizados 5,8; 11,6; 17,4; 23,2; 29; 34,8; 40,6; 46,4; 52,2 e 58  $\mu$ g no ensaio. O estoque de  $\alpha$ -amilase salivar humana continha (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) e foram utilizados 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 e 5  $\mu$ g. A hidrólise do amido foi quantificada pela redução da liberação de açúcar com base no ensaio colorimétrico com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, do inglês, *dinitrosalicylic acid*). Uma mistura de reação contendo as diferentes concentrações de extrato de  $\alpha$ -amilase intestinal de *T. molitor* e  $\alpha$ -amilase salivar humana mais 25  $\mu$ L de amido a 1% (Sigma-Aldrich) em um volume final de 200  $\mu$ L foi incubada a 37 °C por 30 min. Após a incubação, 400  $\mu$ L de solução DNS foram adicionados à reação e aquecidos a 100 °C por 5 min. Após o resfriamento, as leituras foram feitas a 540 nm (Spectroquant Pharo 100, Merck). A atividade unitária (U) foi definida como a quantidade do extrato enzimático (em  $\mu$ g) que aumentou a absorbância a 540 nm em 0,1 unidade de absorbância durante 30 min.

#### **4.2.8.3- Avaliação da atividade de inibição de $\alpha$ -amilase**

Para o ensaio de inibição 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do PEF2 e do PEF3, foram previamente incubados com extrato de  $\alpha$ -amilase intestinal 10 U (4  $\mu$ L) e (3  $\mu$ L) da  $\alpha$ -amilase salivar humana a 37 °C por 30 min. A atividade enzimática residual foi determinada

como descrito acima. Como controle positivo de inibição, foi utilizado o ácido etilenodiamino tetra-acético 5 mM (EDTA, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) (Sigma-Aldrich) e, como controle negativo, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de albumina sérica bovina (BSA, do inglês, bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich). A porcentagem de inibição foi calculada considerando o controle (só enzima) como 100% da atividade. Todos os ensaios de inibição foram realizados em triplicata.

#### **4.2.9- Atividade antifúngica das frações PEF2, PEF2A, PEF2B e PEF3**

##### **4.2.9.1- Obtenção dos esporos dos fungos filamentosos**

Os diferentes fungos filamentosos foram transferidos do estoque e crescidos em placas de Petri contendo ágar Sabouraud por cerca de 15 dias a 30 °C. Após esse período, 10 mL de meio de cultura estéril (caldo Sabouraud, peptona a 1%, glicose a 2%; Merck) foi adicionado sobre cada placa contendo os fungos, e os esporos foram liberados com o auxílio de uma alça de *Drigalski*. Essas suspensões foram filtradas em gazes para impedir a passagem de hifas que pudessem estar em suspensão juntamente com os esporos. Estes esporos foram quantificados em uma câmara de Neubauer (Labor Optik) em microscópio óptico (Axioplan Imager.A2, Zeiss).

##### **4.2.9.2- Análise da inibição do crescimento dos fungos filamentosos**

Um ensaio quantitativo para inibição do crescimento de fungos foi realizado seguindo o protocolo descrito por Silva *et al.* (2017) com algumas modificações. Para verificar o efeito das frações sobre o crescimento dos diferentes fungos,  $2 \times 10^3$  esporos. $\text{mL}^{-1}$  em caldo Sabouraud foram incubados a 30 °C em um volume final de 200  $\mu\text{L}$  (microplaca de 96 poços, Nunc) na presença de PEF2 e PEF3 em diferentes concentrações (100, 200 e 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e na presença de PEF2A e PEF2B na concentração de 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As leituras ópticas a 620 nm (EZ Read 400, Biochrom) foram realizadas no tempo de 24 h. O crescimento dos fungos sem a adição das frações também foi determinado (controle). Todo o ensaio foi realizado em triplicata e sob condições de assepsia em capela de fluxo laminar.

##### **4.2.10- Efeito das frações PEF2 e PEF3 sobre a permeabilização de membranas dos fungos filamentosos**

A permeabilização da membrana plasmática fúngica foi avaliada através da utilização do corante fluorescente *SYTOX Green* (Thermo Fisher Scientific), como descrito por Thevissen *et al.* (1999). *SYTOX Green* é um corante que penetra nas células apenas quando a membrana plasmática está estruturalmente comprometida. Uma vez dentro do citoplasma fúngico, se liga aos ácidos nucleicos e emite uma fluorescência verde. Após 24 h do ensaio de inibição do crescimento dos diferentes fungos, alíquotas da suspensão de células foram incubadas com 0,2  $\mu\text{M}$  de *SYTOX Green* por 30 min a 30 °C sob agitação constante. Após esse período, as células foram observadas em microscópio óptico (Axioplan Imager.A2, Zeiss), e as imagens foram analisadas pelo software Axiovision versão 4.0 (Zeiss). O microscópio foi equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção de fluoresceína do comprimento de onda de excitação entre 450-490 nm e emissão de 500 nm. Todas as imagens foram obtidas com o mesmo tempo de exposição. As células do controle tiveram o mesmo tratamento das células tratadas com as frações PEF2 e PEF3. Os resultados representam experimentos em triplicata.

#### **4.2.11- Ensaio para verificação da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Para avaliar se o mecanismo de ação das frações PEF2 e PEF3 envolve a indução de estresse oxidativo, foi utilizada a sonda fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína diacetato ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ), de acordo com a metodologia descrita por Mello *et al.* (2011). Primeiramente, este corante penetra nas células, é desacetilado por esterases intracelulares e, ao ser oxidado pelo ROS presente nas células, se torna fluorescente. Após 24 h de incubação com 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de PEF2 e PEF3 200  $\mu\text{L}$  de células das diferentes espécies de fungos, foram incubadas com 20  $\mu\text{M}$  da sonda  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (CalBiochem) por 2 h a 30 °C sob agitação constante a 500 rpm. Após esse período, as células foram observadas em microscópio óptico (Axioplan Imager.A2, Zeiss), conforme descrito na seção 4.2.10. Todas as imagens foram obtidas com o mesmo tempo de exposição. Os resultados representam experimentos em triplicata.

#### **4.2.12- Ensaio de determinação da funcionalidade mitocondrial**

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada pelo corante fluorescente Rodamina 123 (Sigma), de acordo com uma metodologia descrita por Taveira *et al.*

(2018). A Rodamina 123 é um corante catiônico, fluorescente, que marca mitocôndrias ativas em células vivas. Após ensaio de inibição do crescimento, as células incubadas com as frações PEF2 e PEF3 foram ressuspensas, e foram adicionados  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de Rodamina 123, sob agitação constante a 500 rpm por 2 h, protegidas da luz. Após esse período, as células foram observadas em microscópio óptico (Axioplan Imager.A2, Zeiss), 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 foram obtidas com o mesmo tempo de exposição. As células do controle tiveram o mesmo tratamento das células tratadas com PEF2 e PEF3. Os resultados representam experimentos em triplicata.

#### **4.2.13- Detecção da atividade de caspases induzida em células fúngicas**

A detecção da atividade da Caspase foi realizada usando o marcador CaspACE FITC-VAD-FMK (Promega). Esse marcador é análogo ao inibidor de caspase Z-VAD-FMK (do inglês, *carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone*) e cria uma marcação fluorescente para o processo de apoptose. Após 24 h de incubação com o PEF2 e o PEF3, as células fúngicas foram ressuspensas, lavadas uma vez em 500  $\mu\text{L}$  de PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM, NaCl 0,15 M) pH 7,4 e ressuspensas em 50  $\mu\text{L}$  de solução de coloração (fornecida pelo kit) contendo 50  $\mu\text{M}$  do marcador FITC-VAD-FMK, de acordo com Taveira *et al.* (2018). Após 20 min de incubação a 30 °C sob agitação constante a 500 rpm, as células fúngicas foram lavadas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS e ressuspensas em 20  $\mu\text{L}$  de PBS. Em seguida, foram observadas em microscópio óptico (Axioplan Imager.A2, Zeiss), conforme descrito na Seção 4.2.10. As células do controle tiveram o mesmo tratamento das células tratadas com as frações. Os resultados representam experimentos em triplicata.

#### **4.2.14- Análise de viabilidade celular**

Para analisar o efeito da fração PEF3 sobre a viabilidade celular de *F. oxysporum*, foi feito o mesmo procedimento descrito no item 4.2.9.1. para a obtenção de esporos. O ensaio foi realizado como descrito no item 4.2.9.2 com pequenas modificações. Neste ensaio, foram usados  $1 \times 10^7$  esporos. $\text{mL}^{-1}$  em água destilada estéril e incubados a 30 °C em um volume final de 200  $\mu\text{L}$  (microplaca de 96 poços, Nunc) na presença do PEF3 ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e sacarose 20%. Para o

plaqueamento, após 8 h de incubação, as células controle (sem a fração PEF3) e o teste (com a fração PEF3) foram diluídas 1.000 X. Uma alíquota foi espalhada com uma alça de *Drigalski* sobre a superfície de uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud e cultivadas a 30 °C durante 36 h a temperatura de 30 °C. Como foi utilizado um meio de crescimento diferente dos ensaios anteriores, foi realizada uma padronização, e o tempo de 36 h foi o melhor para visualização da relação esporos germinados que ainda não são hifas. No final desse período, as unidades formadoras de colônias foram determinadas, e as placas de Petri, fotografadas (Vermelho *et al.*, 2006). Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados são mostrados assumindo que o controle representa 100% de viabilidade celular.

#### **4.2.15- Análise da inibição da germinação dos esporos fúngicos na presença da fração PEF3**

Para analisar o efeito da fração PEF3 sobre a inibição da germinação dos esporos do fungo *F. oxysporum*, foi feito o mesmo procedimento descrito nos itens 4.2.9.1. e 4.2.9.2. Neste ensaio, foram usados  $1 \times 10^{10}$  esporos.mL<sup>-1</sup> em água destilada estéril incubados a 30 °C em um volume final de 200 µL (microplaca de 96 poços, Nunc) na presença do PEF3 (300 µg.mL<sup>-1</sup>) e sacarose 20%. Após 8 h, os esporos germinados ou não germinados foram quantificados em uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (Axioplan Imager.A2, Zeiss).

#### **4.2.16- Previsão dos sítios funcionais baseada no alinhamento de sequência**

Para identificação dos sítios funcionais, as sequências obtidas para os peptídeos foram alinhadas com inibidores de proteases depositados no banco de dados no NCBI BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), que apresentam similaridade de sequência com a fração PEF2A e PEF2B.

#### **4.2.17- Análise estatística**

Os dados dos ensaios de inibição de tripsina, de inibição de  $\alpha$ -amilases e dos ensaios de inibição do crescimento dos fungos filamentosos foram avaliados por ANOVA One way. As diferenças das médias de  $p < 0,05$  foram consideradas

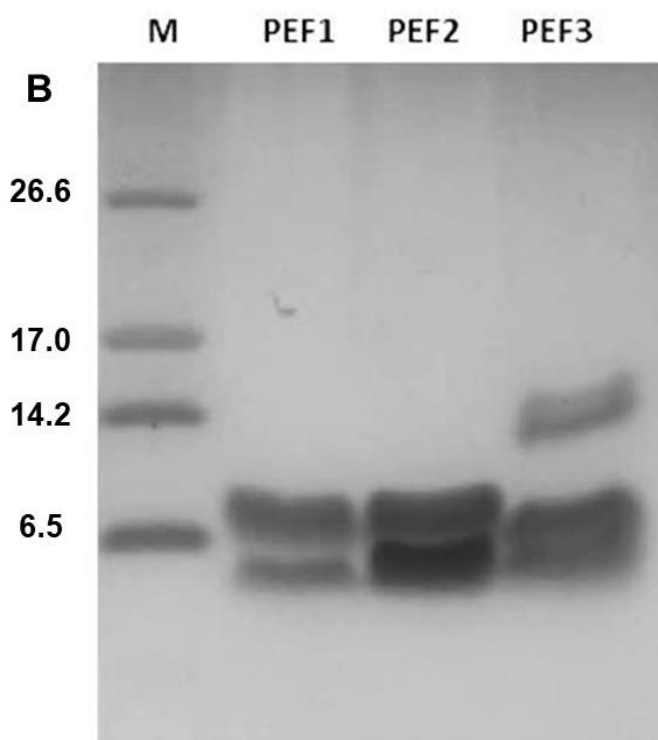
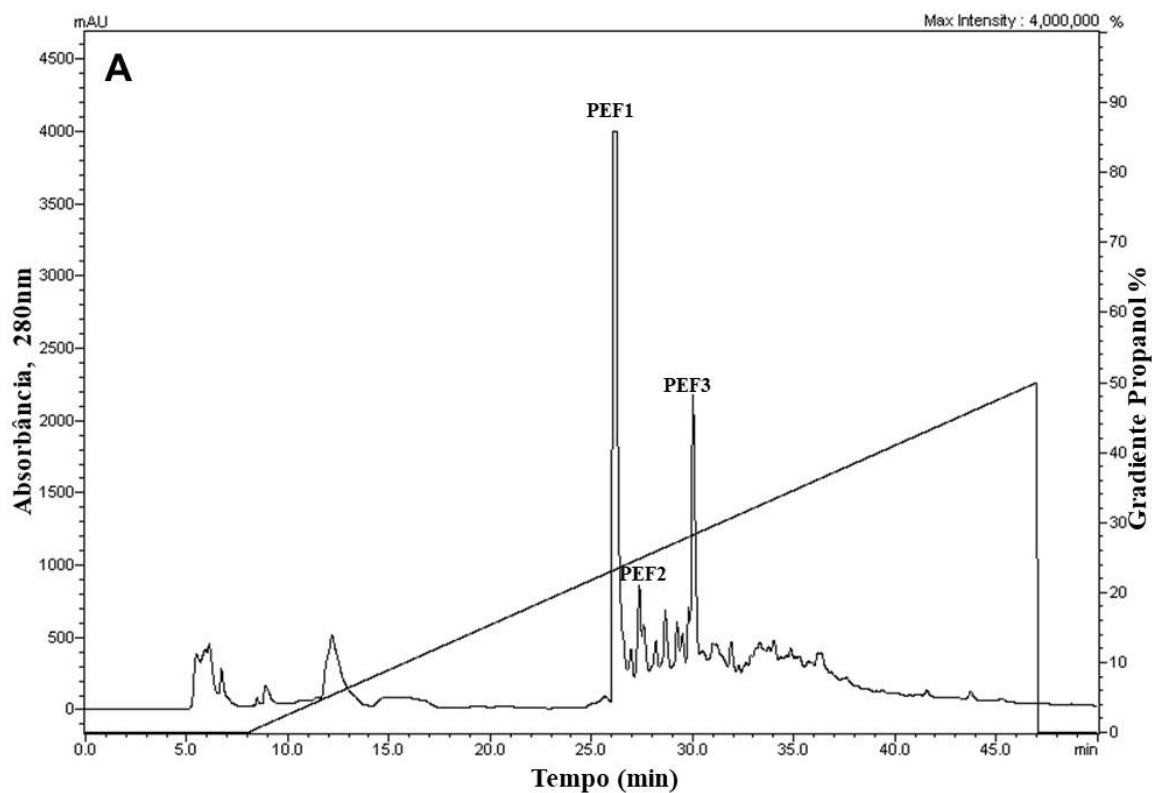
significativas. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows).

## 5. RESULTADOS

### PARTE I: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA FRAÇÃO PEF2 SOBRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

#### 5.1- Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético

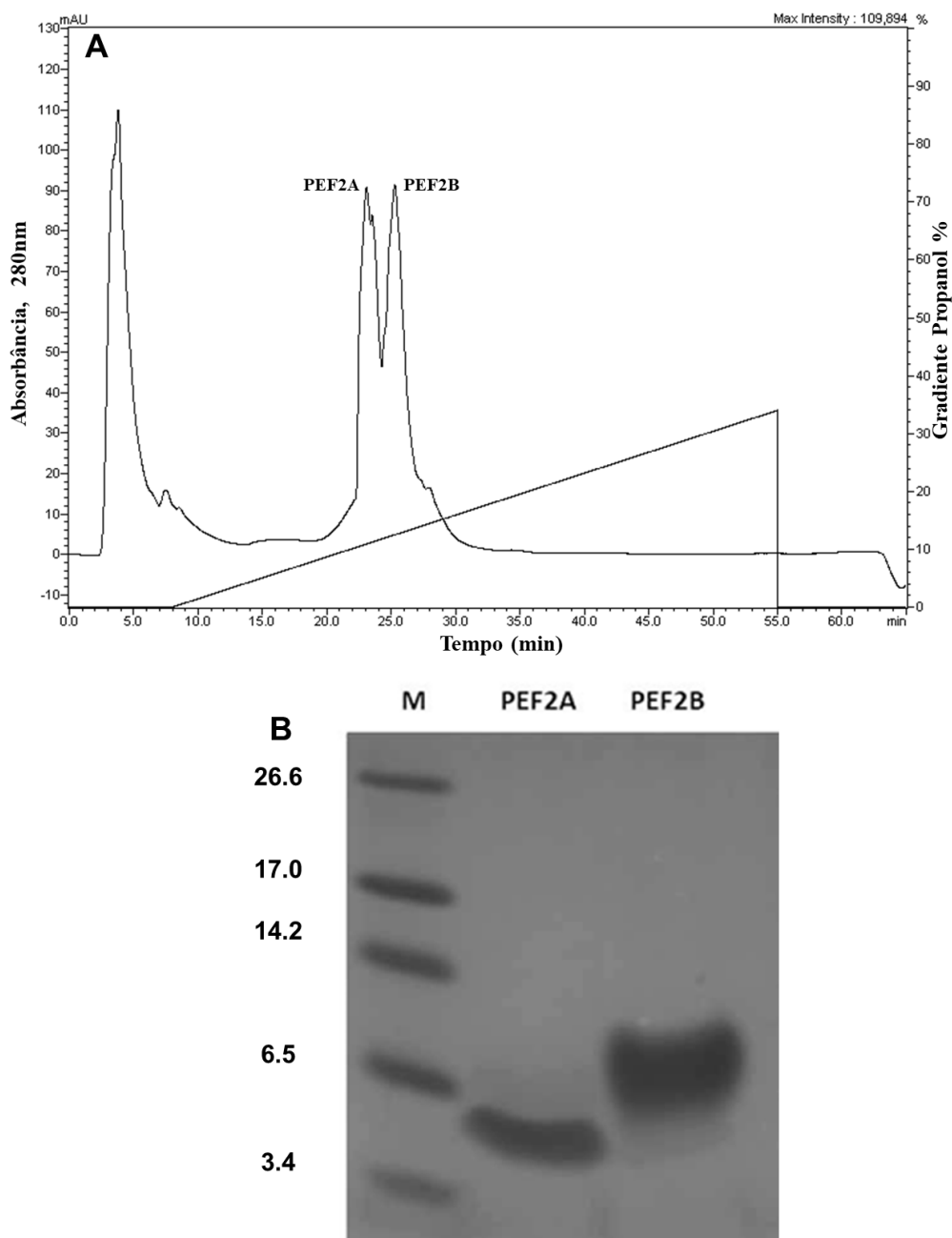
O extrato rico em peptídeos de *C. chinense* foi fracionado através de cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC utilizando uma coluna C18. O cromatograma mostra que o extrato foi fracionado em três picos majoritários denominados PEF1, PEF2 e PEF3 (Figura 5A). O perfil eletroforético das frações obtidas na cromatografia é observado na (Figura 5B). Como pode ser analisado pela eletroforese em SDS-PAGE, as frações PEF1 e PEF2 apresentam duas bandas majoritárias com massas moleculares abaixo de 6,5 kDa, aproximadamente 5,0 kDa, e uma acima de 6,5 kDa, aproximadamente 8,0 kDa. A fração PEF3 também apresentou duas bandas majoritárias com massas moleculares abaixo de 6,5 kDa e uma acima de 6,5 kDa. Além dessas duas bandas, observamos uma terceira com massa molecular em torno de 14 kDa. Os resultados obtidos foram os mesmos descritos por Dias *et al.*, 2013.



**Figura 5-** (A) Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC em coluna C8 do extrato rico em peptídeos de *C. chinense* (UENF 1755). A linha oblíqua representa o gradiente de propanol de 0 a 50%. As proteínas foram monitoradas por absorvância a 280 nm. O fluxo foi de  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . (B) Imagem do gel de tricina na presença de SDS das frações enriquecidas em peptídeos (PEFs). (1) PEF1; (2) PEF2; (3) PEF3; M: marcadores de massa molecular (kDa).



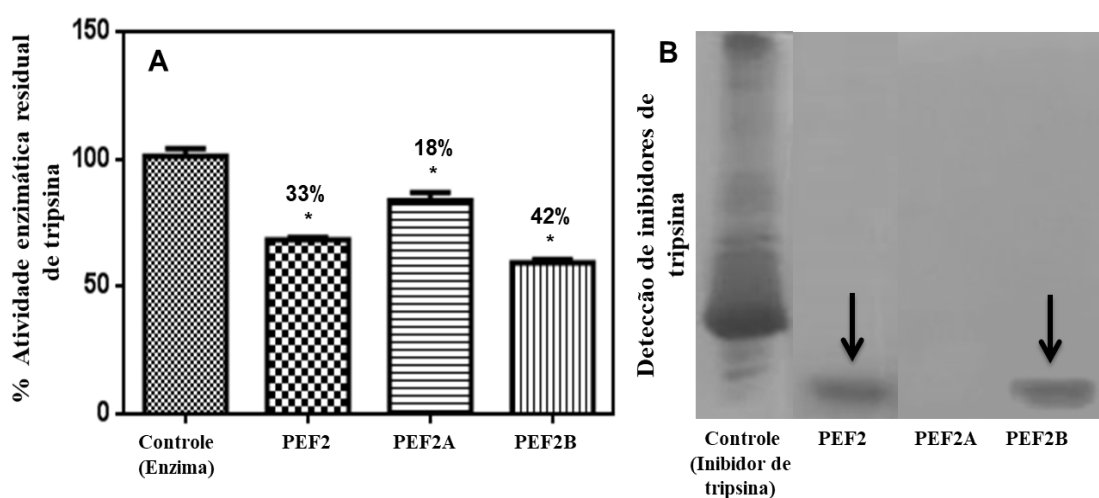
Para purificar os peptídeos presentes na fração PEF2 obtida após cromatografia de fase reversa, esta foi submetida a nova cromatografia usando uma coluna C2/C18 e foi separada em dois picos distintos, denominados PEF2A e PEF2B, como pode ser visto na Figura 6A. A eletroforese em gel de tricina revelou uma banda abaixo de 6,5 kDa no PEF2A e, no PEF2B, uma banda acima de 6,5 kDa, como observado na (Figura 6B).



**Figura 6-** (A) Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC em coluna C2/C18 da fração PEF2. A linha oblíqua representa o gradiente de propanol de 0 a 34%. As proteínas foram monitoradas por absorbância a 280 nm. O fluxo foi de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. (B) Imagem do gel de tricina da fração PEF2. (1) PEF2A; (2) PEF2B; M: marcadores de massa molecular (kDa).

## 5.2- Efeito das frações PEF2, PEF2A e PEF2B sobre a inibição da atividade da enzima tripsina

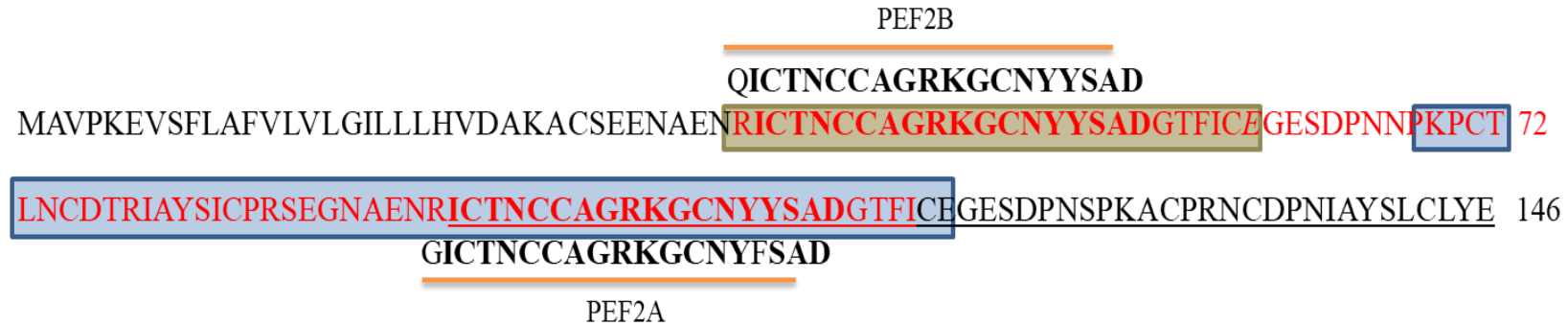
O efeito das frações na inibição da atividade da enzima tripsina é mostrado na Figura 7A. É possível observar que o PEF2, na concentração de  $67,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , inibiu significativamente a tripsina em 33% ( $p < 0,05$ ); PEF2A ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) inibiu significativamente a tripsina em 18% ( $p < 0,05$ ); enquanto o PEF2B ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) inibiu 42% da atividade enzimática ( $p < 0,05$ ). A zimografia reversa foi realizada para confirmar a presença de inibidor de tripsina nessas frações. A Figura 7B mostra uma região marcada em PEF2 e PEF2B, indicando que, nestas frações, encontrava-se presente a atividade inibitória para tripsina. Nenhuma marcação foi visualizada em PEF2A, ratificando o resultado de baixa atividade *in vitro* e sugerindo que a atividade inibitória de tripsina desta fração se encontra majoritariamente em PEF2B.



**Figura 7- (A) Efeito inibitório das diferentes frações de *C. chinense* sobre a atividade da enzima tripsina:** PEF2 ( $67,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), PEF2A ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e PEF2B ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os asteriscos indicam significância pelo teste ANOVA, e as diferenças nos valores médios foram consideradas significativas se  $P < 0,05$ . **(B) Zimograma reverso para identificação de inibidores de tripsina nas frações PEF2, PEF2A e PEF2B.** Foram aplicados  $20 \mu\text{g}$  de cada fração. Controle (inibidor comercial de tripsina Soybean Kunitz - Merck). As setas indicam bandas de inibidores de tripsina.

### 5.3- Similaridade das sequências de inibidores depositados no banco de dados com as sequências do PEF2A e PEF2B

Devido à baixa atividade do PEF2A no ensaio de inibição de tripsina, foram investigados, através do programa BLAST, inibidores depositados no banco de dados que apresentam similaridade de sequência com a fração PEF2A (GICTNCCAGRKGCCNYFSAD) e PEF2B (QICTNCCAGRKGCCNYYSAD) (Dias *et al.*, 2013). Um inibidor denominado Pin II de *C. annuum* com número de acesso (AFR54405) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Mishra *et al.*, 2012) apresentou uma sequência de aminoácidos com similaridade para as duas sequências de PEF2A e PEF2B em locais diferentes, seguida por dois sítios funcionais conservados: primeiro sítio funcional (NR**ICTNCCAGRKGCCNYYSAD**GTGFICEG) e segundo sítio funcional (KPCTLNCDTRIAYSICPRSEGNAENR**ICTNCCAGRKGCCNYYSAD**GTGFICEG). Por dedução, prevemos o tamanho de PEF2A e PEF2B. O PEF2A é consistente com uma proteína de massa molecular de 5 kDa (aproximadamente mais de 50 aminoácidos) e o PEF2B, de 8 kDa (aproximadamente mais de 80 aminoácidos) (Figura 8).

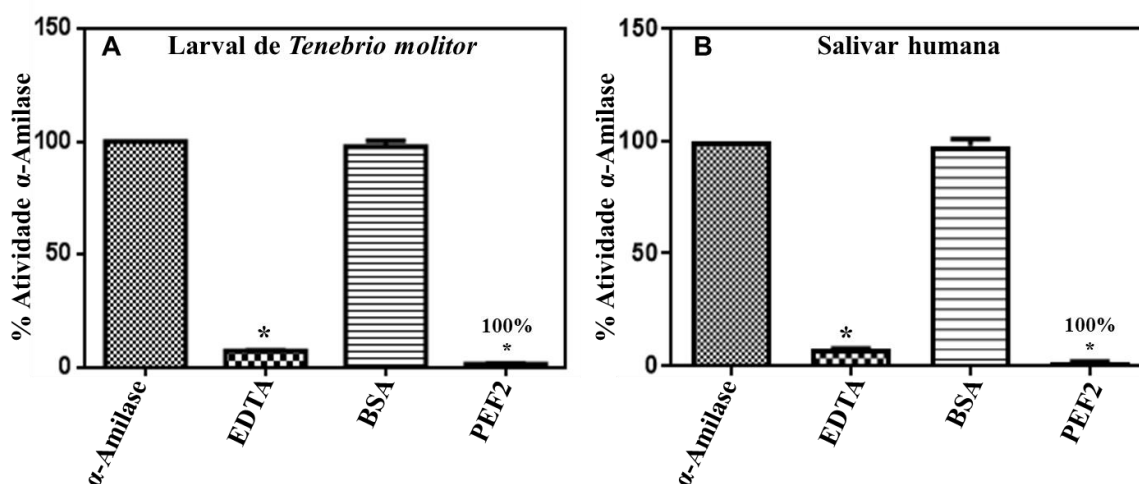


- Primeiro sítio funcional (35-61) aminoácidos
- Segundo sítio funcional (69-119 ) aminoácidos
- Tamanho por dedução do PEF2A
- Tamanho por dedução do PEF2B

**Figura 8- Comparação das sequências de PEF2A e PEF2B com o inibidor de protease do tipo Pin-II 48 de *C. annuum*.** BLAST usando o alinhamento das duas sequências PEF2A (GICTNCCAGRKGKGCNYFSAD) e PEF2B (QICTNCCAGRKGKGCNYYSAD).

#### 5.4- Efeito da fração PEF2 sobre a inibição de $\alpha$ -amilases

A fração PEF2 foi testada na concentração de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  quanto à sua capacidade de inibir a atividade das  $\alpha$ -amilases larval do inseto *T. molitor* e  $\alpha$ -amilases salivar humana (Figura 9A e 9B). Em ambos os ensaios, a fração PEF2 foi capaz de inibir significativamente ( $p < 0,05$ ) em 100% a atividade das enzimas testadas.



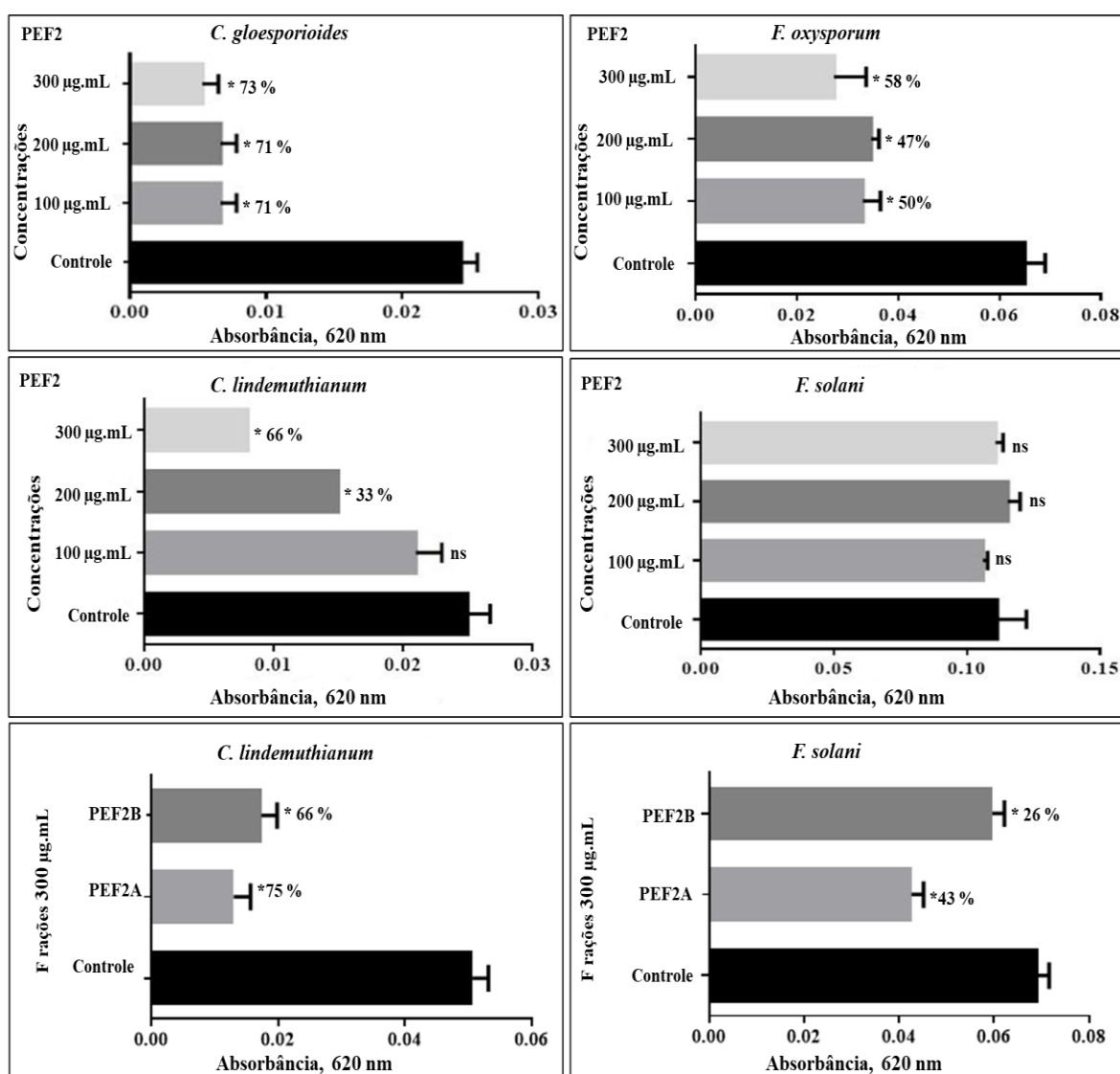
**Figura 9- Efeito da fração PEF2 de sementes de *C. chinense* na atividade de  $\alpha$ -amilases. (A)  $\alpha$ -amilase larval do inseto *T. molitor*. (B)  $\alpha$ -amilase salivar humana. Os valores representam as médias ( $\pm$  DP) das triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento. EDTA (controle positivo); BSA (controle negativo).**

#### 5.5- Efeito das frações PEF2, PEF2A e PEF2B sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos

Inicialmente, foi realizado um ensaio quantitativo do efeito da fração PEF2 sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos na presença de 100, 200 e 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  no tempo de 24 h (Figura 10). O crescimento de *C. gloeosporioides* na presença de 100 e 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de PEF2 foi significativamente reduzido em 71% ( $p < 0,05$ ) e em 73% ( $p < 0,05$ ) quando crescido na presença de 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para *C. lindemuthianum*, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de PEF2 não foi suficiente para causar uma inibição significativa do crescimento ( $p < 0,05$ ); na presença de 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a inibição do crescimento foi de 33% ( $p < 0,05$ ); e, em 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a inibição foi de 66% ( $p < 0,05$ ). Para o fungo *F. oxysporum*, quando crescido em meio contendo 100, 200 e 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de PEF2, as taxas de inibição foram de cerca de 50%, 47%

e 58%, respectivamente. O PEF2 não foi capaz de inibir o crescimento do fungo *F. solani* em nenhuma das concentrações testadas.

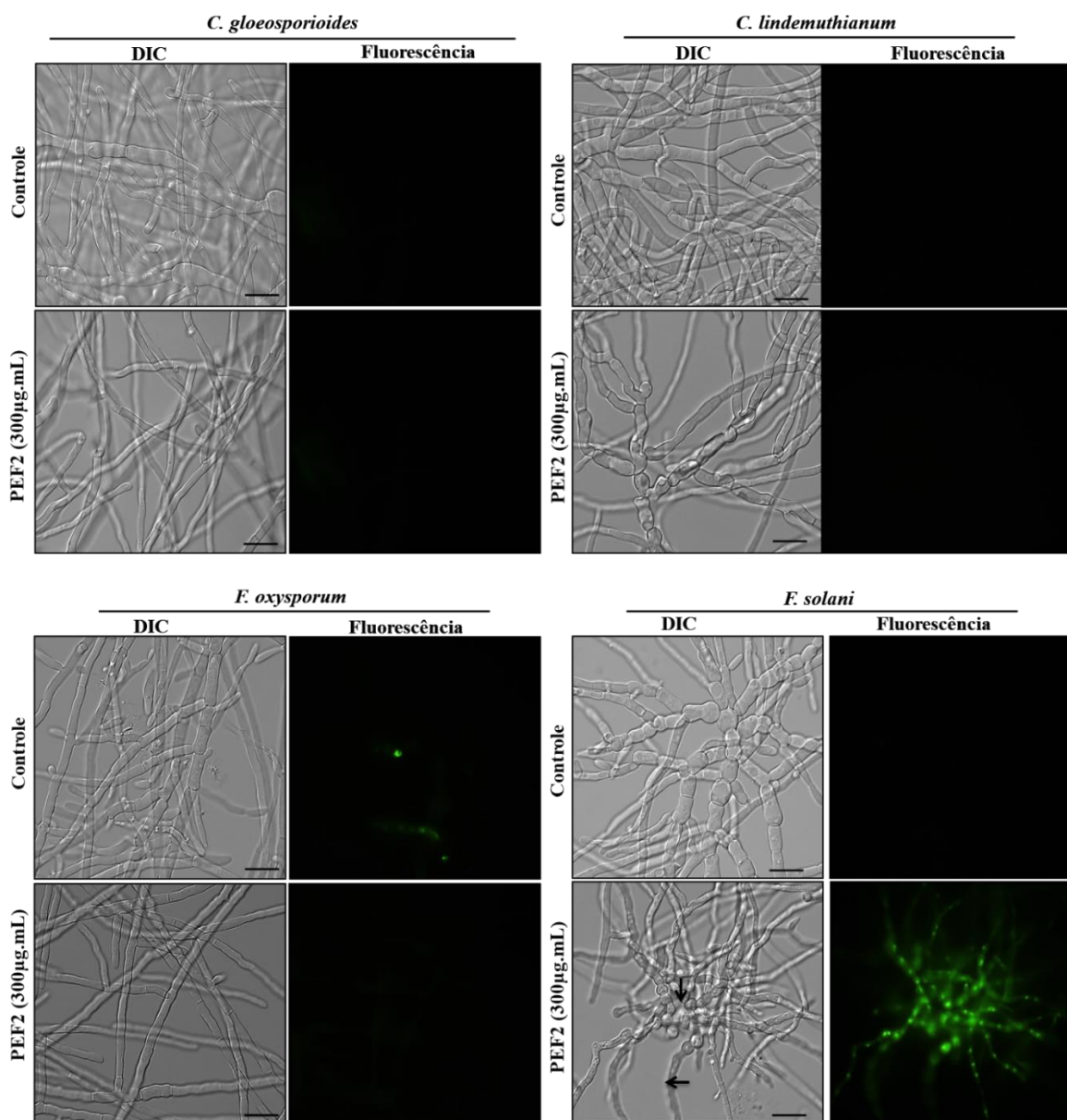
Na Figura 10, observa-se também o efeito dos peptídeos isolados PEF2A e PEF2B sobre o crescimento fúngico. O PEF2A, na concentração de 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , inibiu o crescimento de *C. lindemuthianum* em 75% ( $p < 0,05$ ) e o de *F. solani* em 43% ( $< 0,05$ ). O PEF2B também foi capaz de inibir o crescimento de *C. lindemuthianum* em 66% ( $p < 0,05$ ) e o de *F. solani* em 26% ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10- Efeito do PEF2 sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos nas concentrações de 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e dos PEF2A e PEF2B na concentração de 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  por 24 h. Os valores são médias ( $\pm$  DP) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamento e controle. (ns= não significativo).**

## 5.6- Efeito da fração PEF2 sobre a permeabilização de membranas de fungos filamentosos

Todos os fungos testados no ensaio de inibição do crescimento foram usados para análise da permeabilidade da membrana através da utilização de corante SYTOX Green após 24 h de incubação com  $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de PEF2 (Figura 11). Não foi observado efeito na permeabilização de membranas nos fungos *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum*. No entanto, por microscopia de campo claro, uma redução no número de hifas foi observada quando comparada ao controle. No entanto, o PEF2 foi capaz de permeabilizar as membranas das células de *F. solani*, indicando que essa fração comprometeu sua estrutura, permitindo a entrada do corante. Por microscopia de campo claro, observou-se que as hifas e os esporos apresentaram alterações estruturais (setas) diferentes das observadas no controle.



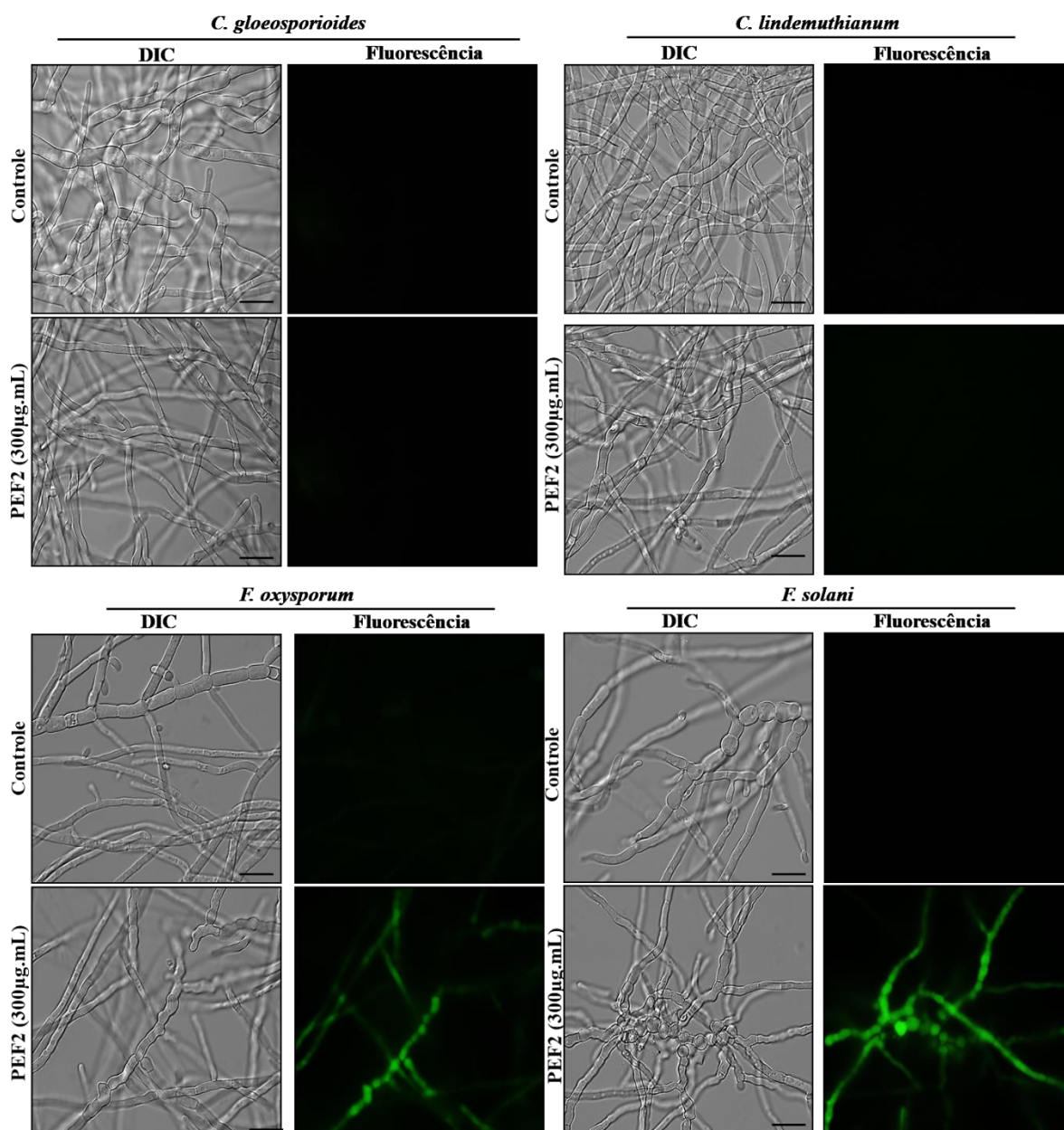
**Figura 11- Ensaio de permeabilização de membranas.** Imagens dos diferentes fungos filamentosos tratados com PEF2 e marcados com a sonda fluorescente SYTOX Green. Células controle (cultivadas na ausência do PEF2) e células testes (cultivadas na presença de  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF2) por 24 h. As setas apontam alterações estruturais diferentes das observadas no controle. Barras =  $50 \mu\text{m}$ .

### 5.7- Detecção da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A produção endógena de ROS nas diferentes espécies de fungos filamentosos foi analisada incubando  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF2 por 24 h e, em seguida, utilizando a sonda  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (Figura 12). Para *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum*, não houve aumento de ROS. No entanto, para os fungos *F.*



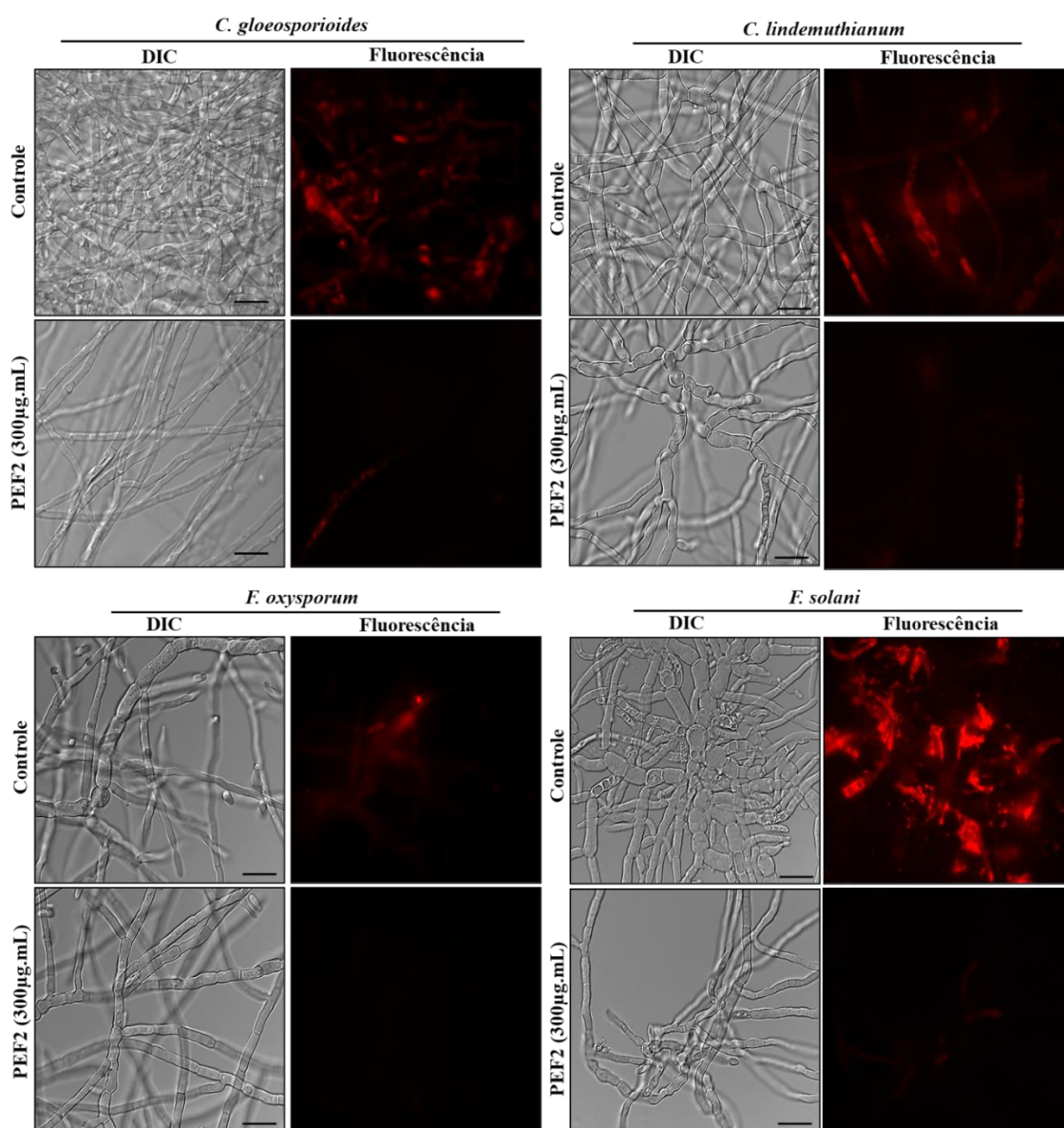
*oxysporum* e *F. solani*, houve uma intensa marcação do corante nas células cultivadas na presença de PEF2, o que indicou um aumento na produção endógena de ROS.



**Figura 12- Ensaio de estresse oxidativo para detecção de ROS.** Imagens dos fungos filamentosos tratados com o PEF2 e marcados com a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA). Células controle (cultivadas na ausência do PEF2) e células testes (cultivadas na presença de 300 µg.mL<sup>-1</sup> do PEF2) por 24 h. Barras = 50 µm.

### 5.8- Análise da Funcionalidade Mitocondrial em células fúngicas tratadas com a fração PEF2

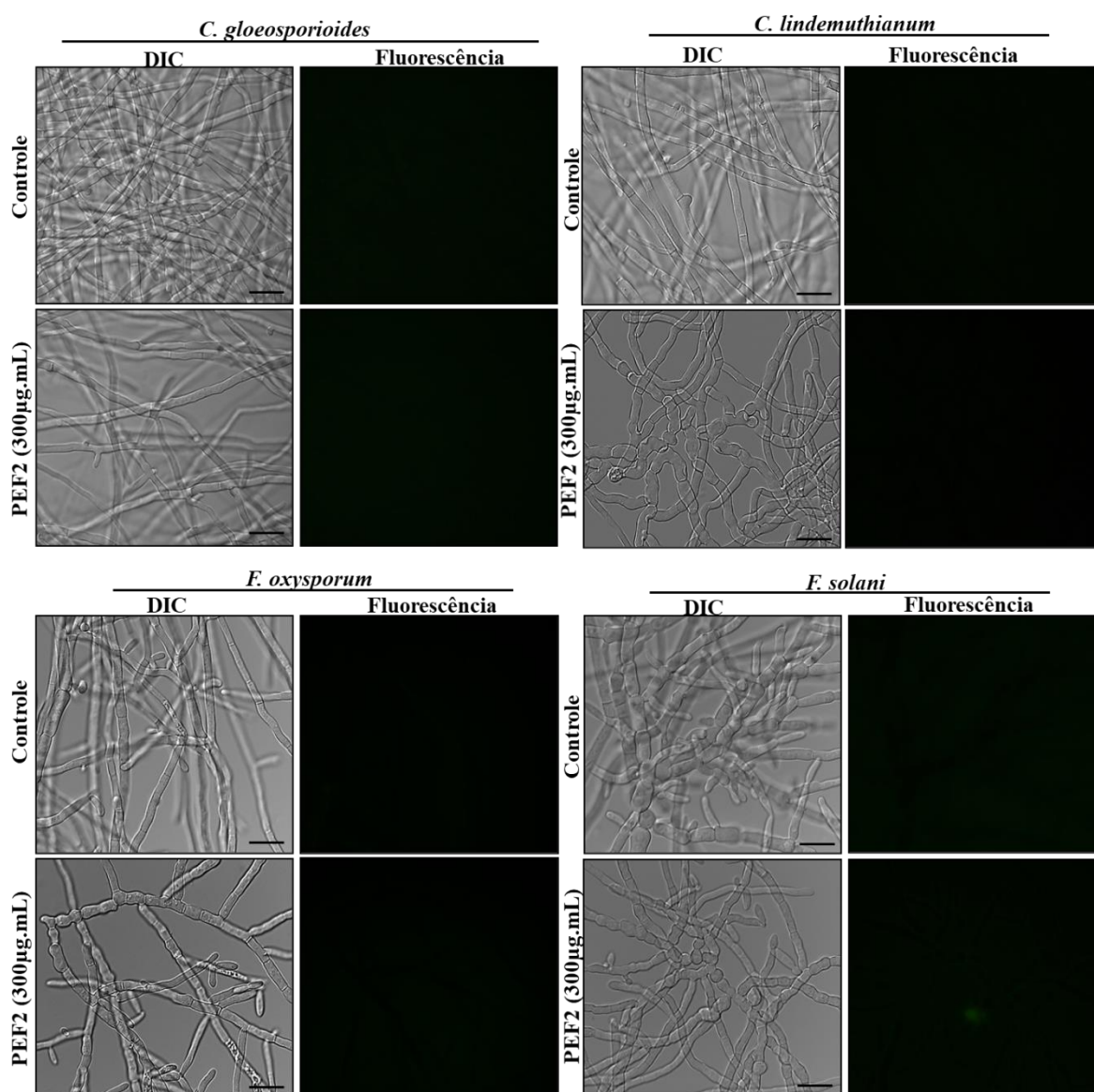
Todos os fungos filamentosos, após 24 h de tratamento com  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF2, apresentaram atividade mitocondrial reduzida, como observado pela baixa fluorescência do corante Rodamina 123. Para as células controle, com mitocôndrias funcionais, um forte sinal de fluorescência da Rodamina 123 foi detectado (Figura 13).



**Figura 13- Ensaio de funcionalidade mitocondrial.** Imagens dos fungos filamentosos tratados com o PEF2 e marcados com sonda de fluorescência Rodamina 123. As células foram tratadas com  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF2 por 24 h e analisadas quanto à funcionalidade mitocondrial. As células controle foram tratadas apenas com a sonda Rodamina 123. Barras =  $50 \mu\text{m}$ .

### 5.9- Detecção da atividade de caspases induzida em células fúngicas

A fim de verificar a ocorrência de eventos apoptóticos induzidos pela presença de PEF2 no meio de crescimento, a atividade de enzimas do tipo caspase foi investigada. Nossos resultados mostram que a exposição das células de todos os fungos filamentosos ao PEF2 não resultou na indução da atividade de caspases (Figura 14).

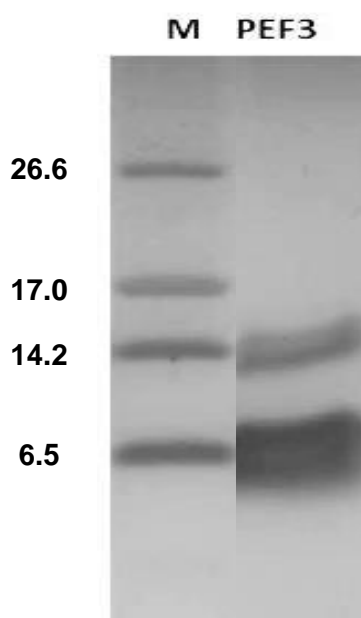


**Figura 14- Ensaio de atividade de caspases.** Imagens visualizadas após 24 h de incubação com  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF2. As células controle e as células tratadas com PEF2 foram incubadas com a sonda FITC-VAD-FMK e analisadas por microscopia de fluorescência. Barras =  $50 \mu\text{m}$ .

## PARTE II: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA FRAÇÃO PEF3 SOBRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

### 5.10- Perfil eletroforético da fração PEF3

A fração PEF3 obtida após cromatografia de fase reversa, como mostrado na seção 5.1, apresenta três bandas proteicas como já observado anteriormente. Uma abaixo de 6,5 kDa e outra acima de 6,5 kDa e uma terceira em torno de 14 kDa (Figura 15).



**Figura 15- Imagem do gel de tricina na presença de SDS da fração PEF3. (1) PEF3; M: marcadores de massa molecular (kDa).**

### 5.11- Análise da sequência de aminoácidos da fração PEF3

A análise da sequência parcial de aminoácidos da região N-terminal do peptídeo de ~6.0 kDa da fração PEF3 revelou 91%, 100%, 91% e 82% de identidade com peptídeos similares a inibidores de proteases, PEF3B de sementes de *C. chinense* (Dias *et al.*, 2013); Inibidor de Protease de *Capsicum annuum* (gi: 8948493); Inibidor de Protease de *Solanum melongena* (gi: 477995); Inibidor de Protease de *Solanum tuberosum* (gi: 15809084), respectivamente (Figura 16). Todos esses inibidores apresentam um tamanho compatível com o inibidor da

fração PEF3. Este alinhamento revelou todos os resíduos de cisteínas presentes no fragmento do peptídeo conservados, o que reforça a confiabilidade do alinhamento múltiplo realizado. Algumas dissimilaridades em relação ao peptídeo pertencente à família dos inibidores de protease foram a substituição do primeiro e penúltimo aminoácido em relação aos outros peptídeos. Para o peptídeo de massa molecular acima de 6,5 kDa da fração PEF3, não foi possível a determinação da sequência de aminoácidos.

Comparação da sequência de aminoácidos da região N-terminal do peptídeo de ~6.0 kDa de sementes de *C. chinense*

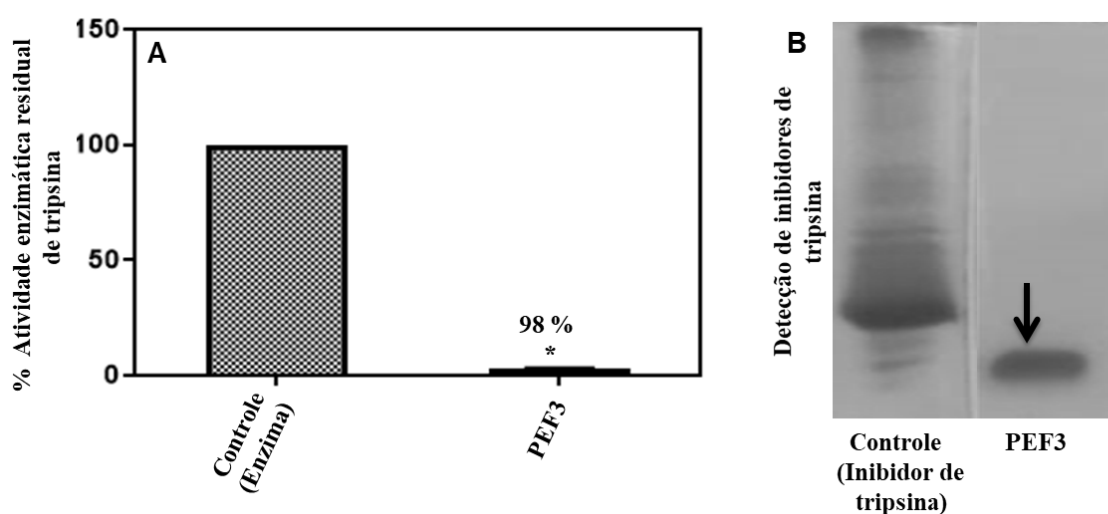
Identificação	Sequência N-terminal	P (%)	I (%)
PEF3 ~6.0 kDa	RICTN <b>CC</b> AGRK		
PEF3-B 5.0 kDa ( <i>C. chinense</i> )	GICTN <b>CC</b> AGRK	90	91
Protease inhibitor PSI-1.1 ( <i>C. annuum</i> )	RICTN <b>CC</b> AGRK	100	100
Protease inhibitor ( <i>S. melongena</i> )	QICTN <b>CC</b> AGRK	100	91
Potamin-1 ( <i>S. tuberosum</i> )	DICTN <b>CC</b> AGTK	81	82

**Figura 16- Alinhamento dos resíduos de aminoácidos do peptídeo de aproximadamente ~6.0 kDa da fração PEF3 de sementes de *C. chinense* com outros peptídeos semelhantes a inibidores de protease.** O peptídeo apresentou similaridade com as seguintes sequências: PEF3-B de sementes de *C. chinense*; Inibidor de Protease de *Capsicum annuum* (gi: 8948493); Inibidor de Protease de *Solanum melongena* (gi: 477995); Inibidor de Protease de *Solanum tuberosum* (gi: 15809084). Os resíduos de cisteínas conservadas estão destacados em vermelho. P% indica a porcentagem de resíduos positivos (que apresentam as mesmas características físico-bioquímicas) marcado em cinza. I% indica a porcentagem de resíduos idênticos marcado em negrito e itálico. A sequência foi obtida no SWISS-PROT e alinhada pelo Clustal Omega.



### 5.12- Efeito inibitório de PEF3 sobre a atividade da enzima tripsina

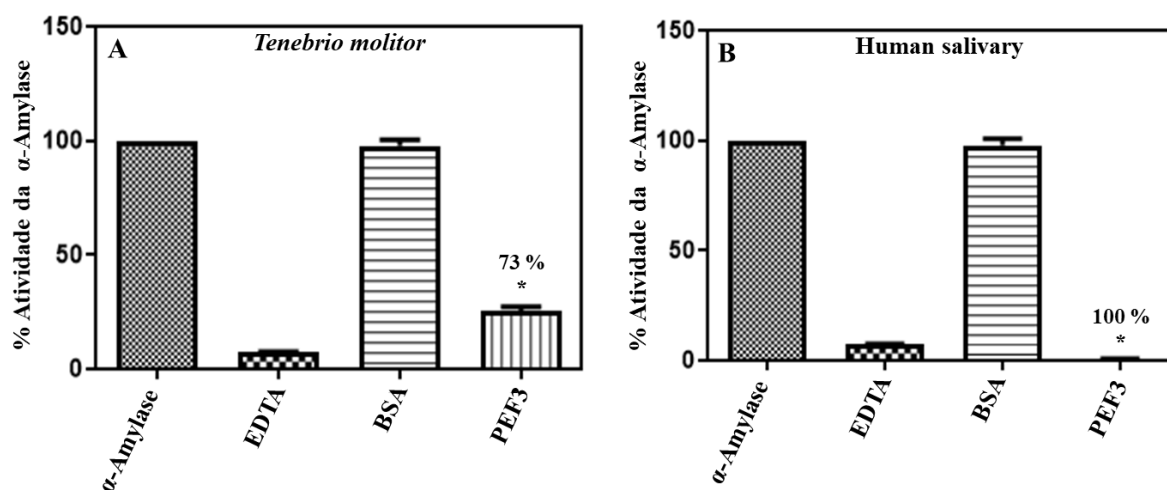
A atividade biológica da fração PEF3 foi testada através do ensaio de inibição da enzima tripsina (Figura 17A). A fração PEF3, na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , foi capaz de inibir significativamente a tripsina em 98% ( $p < 0,05$ ). A zimografia reversa foi realizada para confirmar a presença de inibidor de tripsina (Figura 17B). A presença de inibidor de protease é observada na raia PEF3 onde há uma região marcada indicando a incapacidade da tripsina digerir a gelatina nessa região.



**Figura 17- (A) Efeito do PEF3 ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sobre a atividade da enzima tripsina.** O controle corresponde à atividade enzimática sem inibidor. O asterisco indica significância pelo teste ANOVA, e a diferença no valor médio foi considerada significativa se  $P < 0,05$ . **(B) Zimograma reversa para identificação de inibidores de tripsina na fração PEF3.** Foram aplicados  $20 \mu\text{g}$  da fração. Controle (inibidor comercial da tripsina Soybean Kunitz – Merck). A seta indica inibidor de tripsina da fração PEF3.

### 5.13- Efeito da fração PEF3 sobre a inibição de $\alpha$ -amilases

A atividade inibitória enzimática foi realizada com  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  da fração PEF3 sobre a capacidade de inibir a atividade das  $\alpha$ -amilases larval do inseto *T. molitor* e  $\alpha$ -amilase salivar humana. A fração PEF3 inibiu significativamente 73% ( $p < 0,05$ ) da  $\alpha$ -amilase larval de *T. molitor* (Figura 18A). Para  $\alpha$ -amilase salivar humana, esta fração foi capaz de inibir significativamente ( $p < 0,05$ ) 100% da atividade desta enzima (Figura 18B).



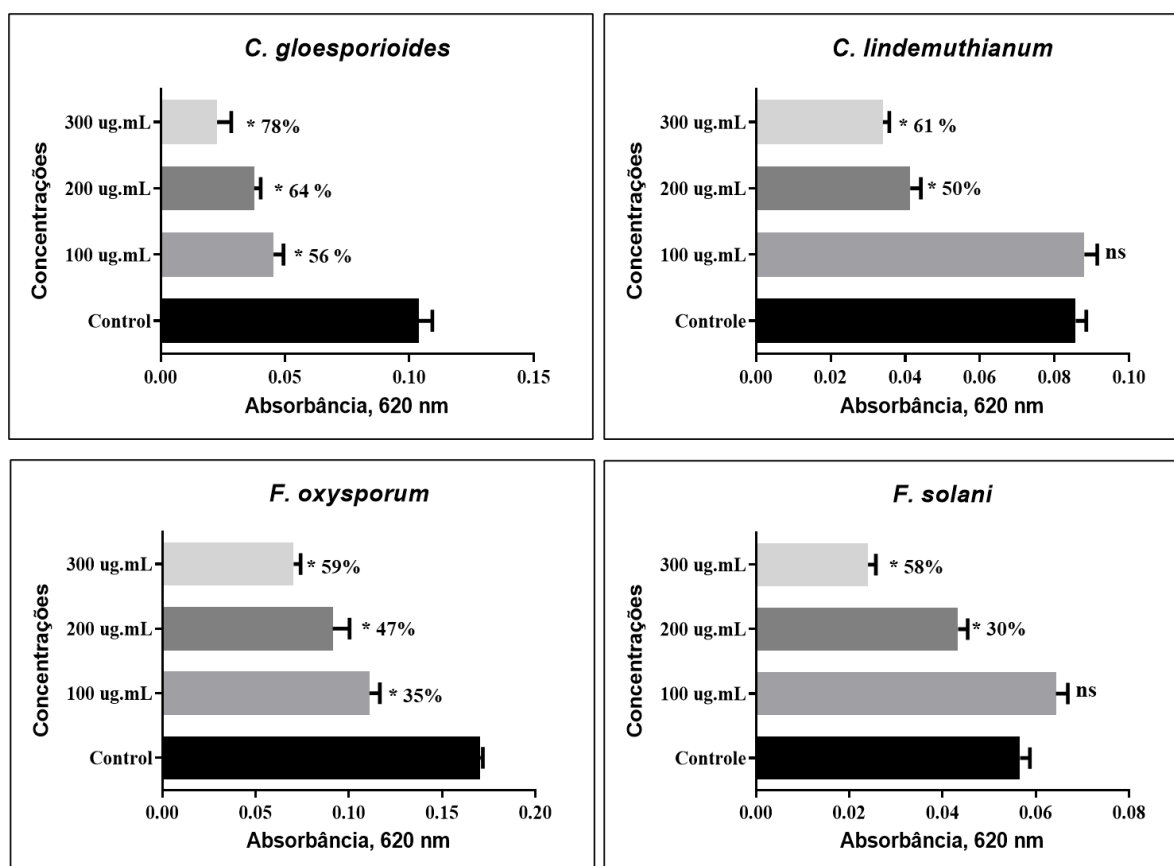
**Figura 18- (A) Efeito de ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) da fração PEF3 de sementes de *C. chinense* na atividade de  $\alpha$ -amilases. (A)  $\alpha$ -amilase larval do inseto *T. molitor*. (B)  $\alpha$ -amilase salivar humana. Os valores representam as médias ( $\pm$  DP) das triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento. EDTA (controle positivo); BSA (controle negativo).**

#### 5.14- Efeito da fração PEF3 sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos

Foi realizado um ensaio de inibição do crescimento contra diferentes fungos fitopatogênicos usando a fração PEF3 nas concentrações de 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  no tempo de 24 h (Figura 19). Estes ensaios apresentaram diferenças significativas em relação aos controles (na ausência da fração PEF3).

Inicialmente, é possível observar que 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3 inibiu significativamente o crescimento de *C. gloeosporioides* em 56%, 64% e 78% ( $p < 0,05$ ) respectivamente. Para *C. lindemuthianum* 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3 não foi suficiente para causar uma inibição do crescimento significativa ( $p < 0,05$ ); na presença de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a inibição do crescimento foi 50% ( $p < 0,05$ ); e para 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a inibição foi de 61% ( $p < 0,05$ ). Já, para o fungo *F. oxysporum*, quando crescido em meio contendo 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3, as taxas de inibição foram de cerca de 35%, 47% e 59% ( $p < 0,05$ ), respectivamente. E, para o fungo *F. solani*, o PEF3, na concentração de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , não foi capaz de inibir significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento deste fungo; 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  inibiu cerca de 30%; e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  inibiu significativamente 58% do crescimento deste fungo.

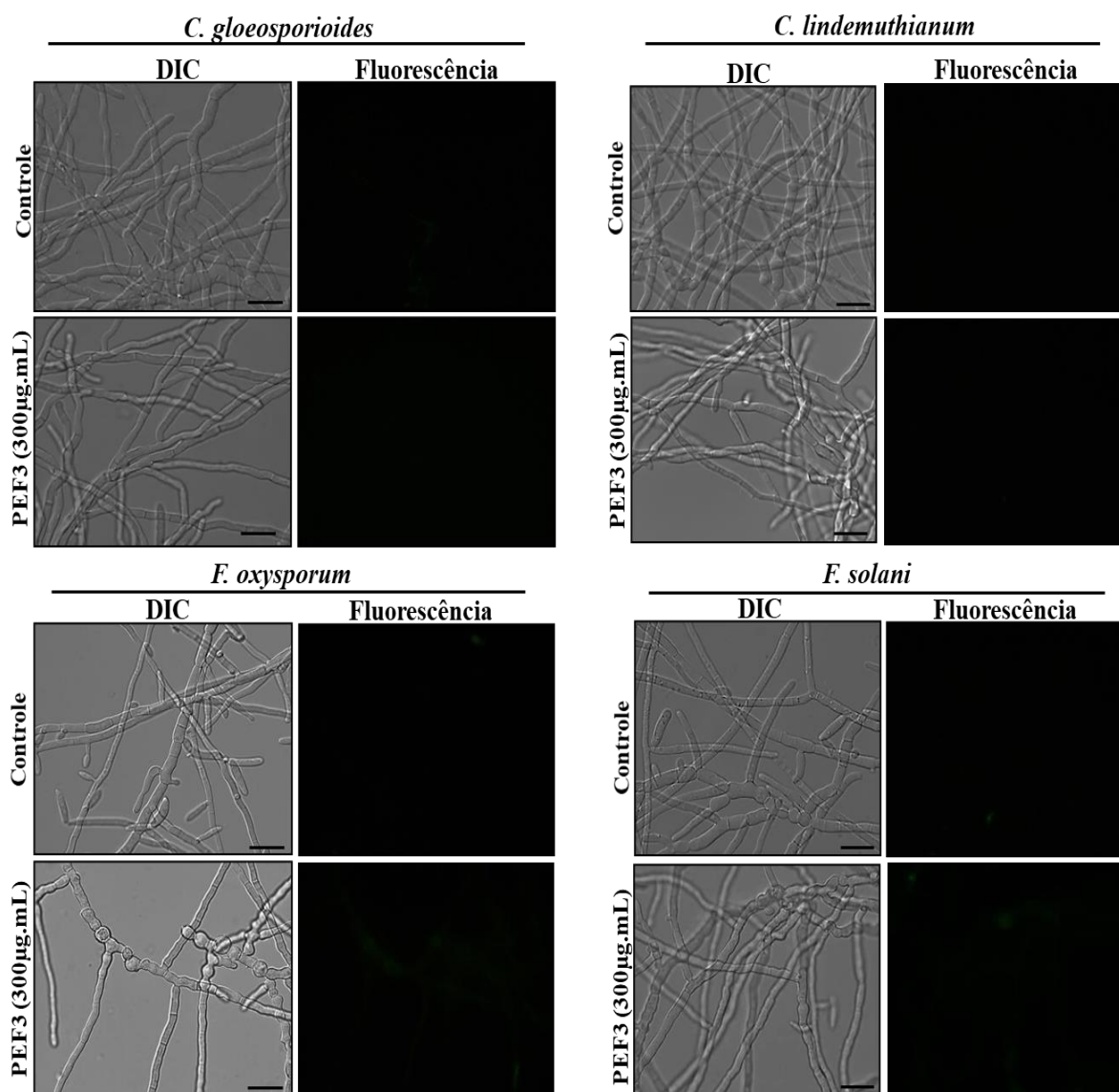




**Figura 19- Efeito do PEF3 nas concentrações de 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sobre o crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos.** Os valores são médias ( $\pm$  DP) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamentos e controles. (ns= não significativo).

### 5.15- Efeito da fração PEF3 sobre a permeabilização de membranas de fungos filamentosos

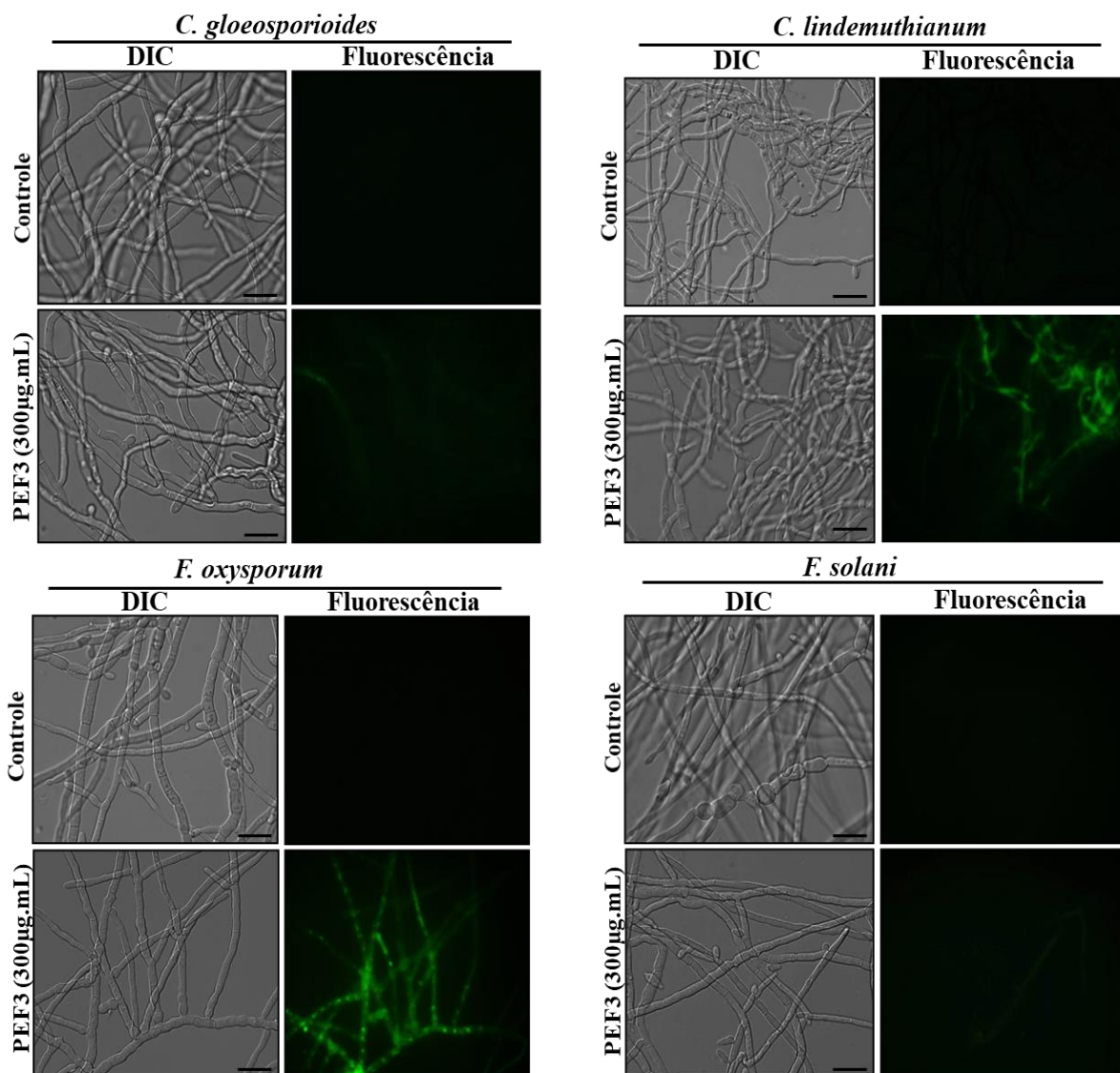
Diante dos resultados obtidos no ensaio de inibição do crescimento com a fração PEF3 na concentração de 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , alíquotas de células fúngicas foram incubadas com o corante SYTOX Green para análise da permeabilidade de membrana e investigação do possível mecanismo de ação (Figura 20). Não foi observado nenhuma marcação fluorescente para os fungos *C. gloesporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. solani* e *F. oxysporum* indicando que não houve permeabilização de membranas para estes fungos. Por microscopia de campo claro, notou-se que as hifas do fungo *F. oxysporum* apresentaram alterações estruturais diferentes das observadas no controle.



**Figura 20- Ensaio de permeabilização de membrana.** Imagens dos diferentes fungos filamentosos tratados com PEF3 e marcados com a sonda fluorescente SYTOX Green. Células controle (crescidas na ausência do PEF3) e células testes (crescidas na presença de  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3) por 24 h. Barras =  $50 \mu\text{m}$ .

#### 5.16- Detecção da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Foi realizado um ensaio para verificar se  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  da fração PEF3 causou um aumento na produção endógena de ROS utilizando a sonda  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  nas diferentes espécies de fungos filamentosos (Figura 21). Para *C. gloeosporioides* e *F. solani*, houve uma leve marcação com o corante. No entanto, para os fungos *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum*, houve uma intensa marcação do corante, o que indicou um aumento na produção endógena de ROS.

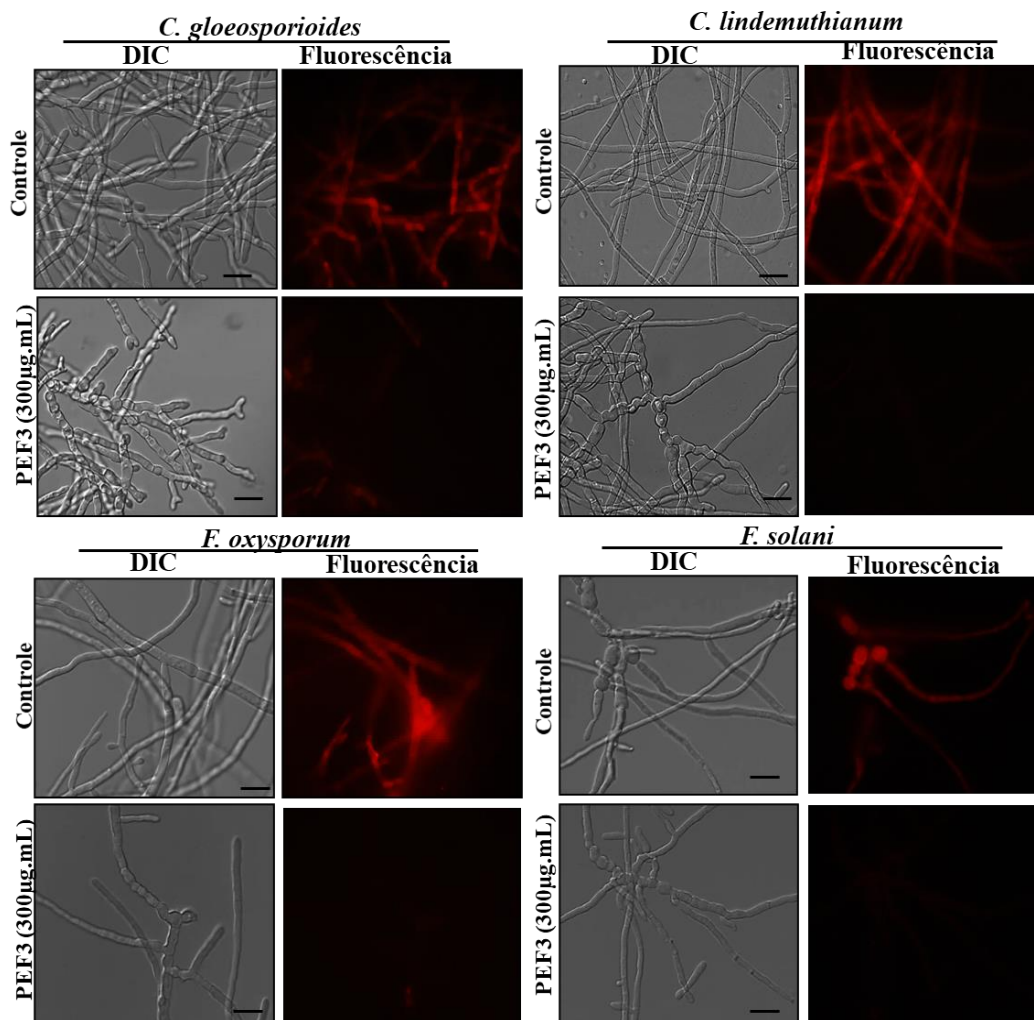


**Figura 21- Ensaio de estresse oxidativo por detecção de ROS.** Imagens dos fungos filamentosos tratados com PEF3 e marcados com a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA). Células controle (cultivadas na ausência do PEF3) e células testes (cultivadas na presença de 300 µg.mL<sup>-1</sup> do PEF3) por 24 h. Barras = 50 µm.

### 5.17- Análise da funcionalidade mitocondrial em células fúngicas tratadas com a fração PEF3

A Figura 22 mostra o ensaio para verificar a funcionalidade mitocondrial dos diferentes fungos testados. Após 24 h de incubação das diferentes células fúngicas com 300 µg.mL<sup>-1</sup> de PEF3, os testes apresentaram atividade mitocondrial reduzida em comparação com as células controle (sem adição da fração), o que pode ser observado pela baixa fluorescência do corante Rodamina 123. Para as células

controle que possuem mitocôndrias funcionais, nota-se um forte sinal de fluorescência da Rodamina 123.

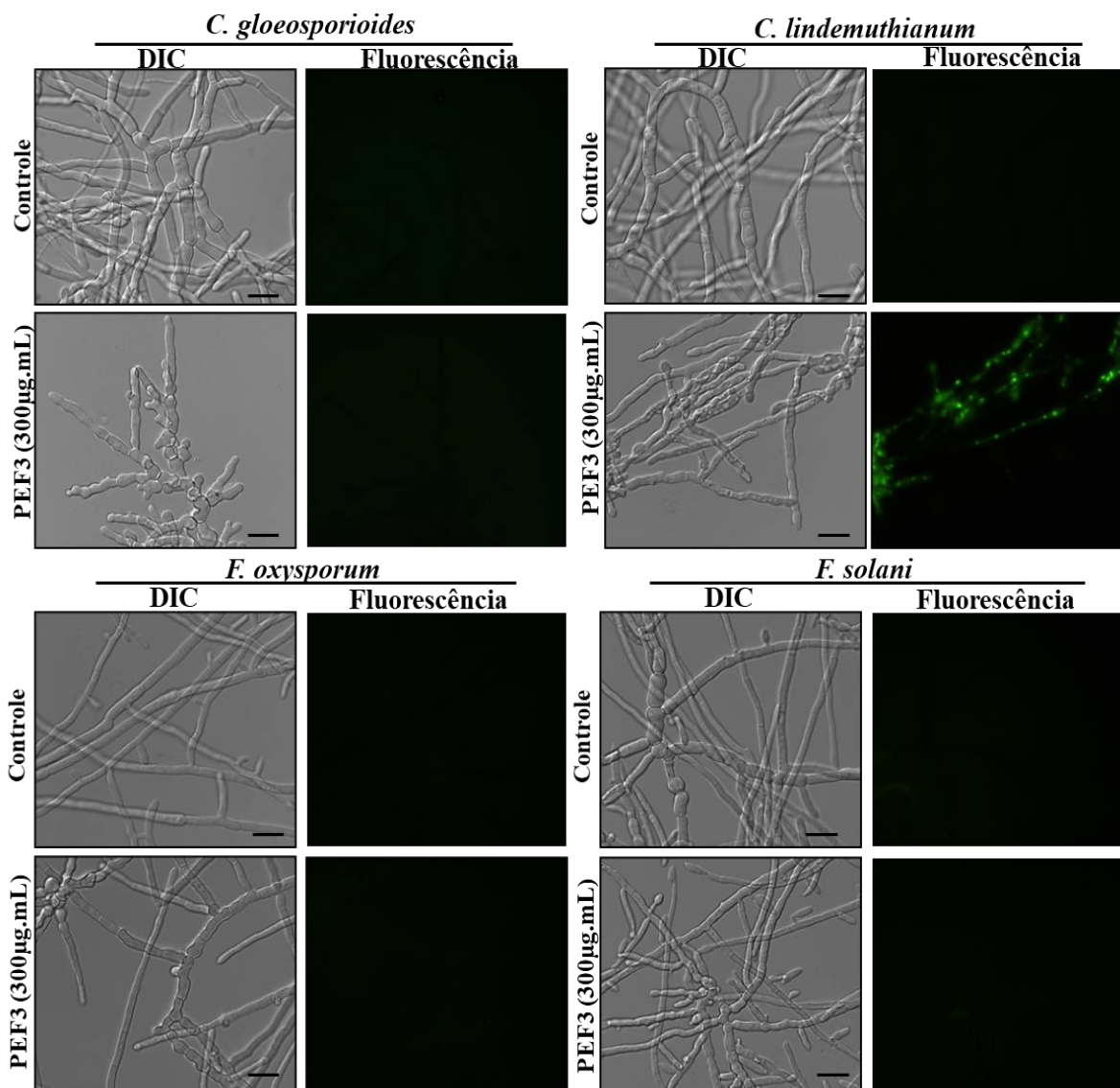


**Figura 22- Ensaio de funcionalidade mitocondrial.** Imagens dos fungos filamentosos tratados com PEF3 e marcados com sonda de fluorescência Rodamina 123. As células foram tratadas com  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3 por 24 h e analisadas quanto à funcionalidade mitocondrial. As células controle foram tratadas apenas com a sonda Rodamina 123. Barras =  $50 \mu\text{m}$ .

### 5.18- Detecção da atividade de caspases induzida em células fúngicas

Com o objetivo de verificar a ocorrência de eventos apoptóticos induzidos pela presença de  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3 no crescimento de fungos fitopatogênicos, a atividade de enzimas do tipo caspases foi investigada (Figura 23). Nossos resultados mostram que as células dos fungos *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* e

*F. solani*, quando expostas ao PEF3, não resultaram na indução da atividade de caspases. Apenas as células do fungo *C. lindemuthianum* resultaram na indução dessas enzimas.



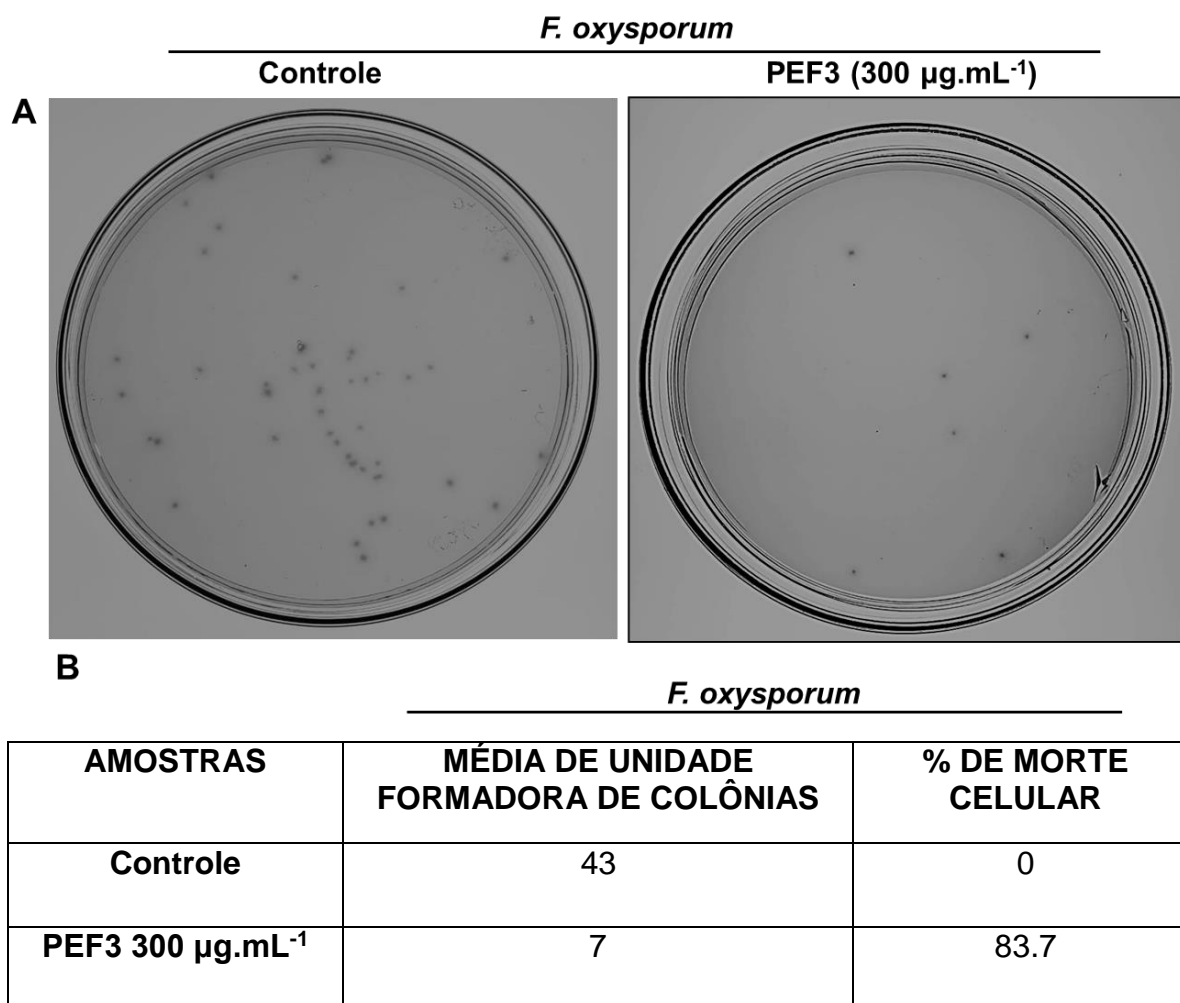
**Figura 23- Ensaio de atividade de caspases.** Imagens visualizadas após 24 h de incubação com  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3. As células controle e as células tratadas com PEF3 foram incubadas com a sonda FITC-VAD-FMK e analisadas por microscopia de fluorescência. Barras =  $50 \mu\text{m}$ .

### 5.19- Análise de viabilidade celular

Baseada na atividade antimicrobiana do PEF3, a viabilidade dos esporos do fungo *F. oxysporum* foi analisada. Foi observado que  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3 foi



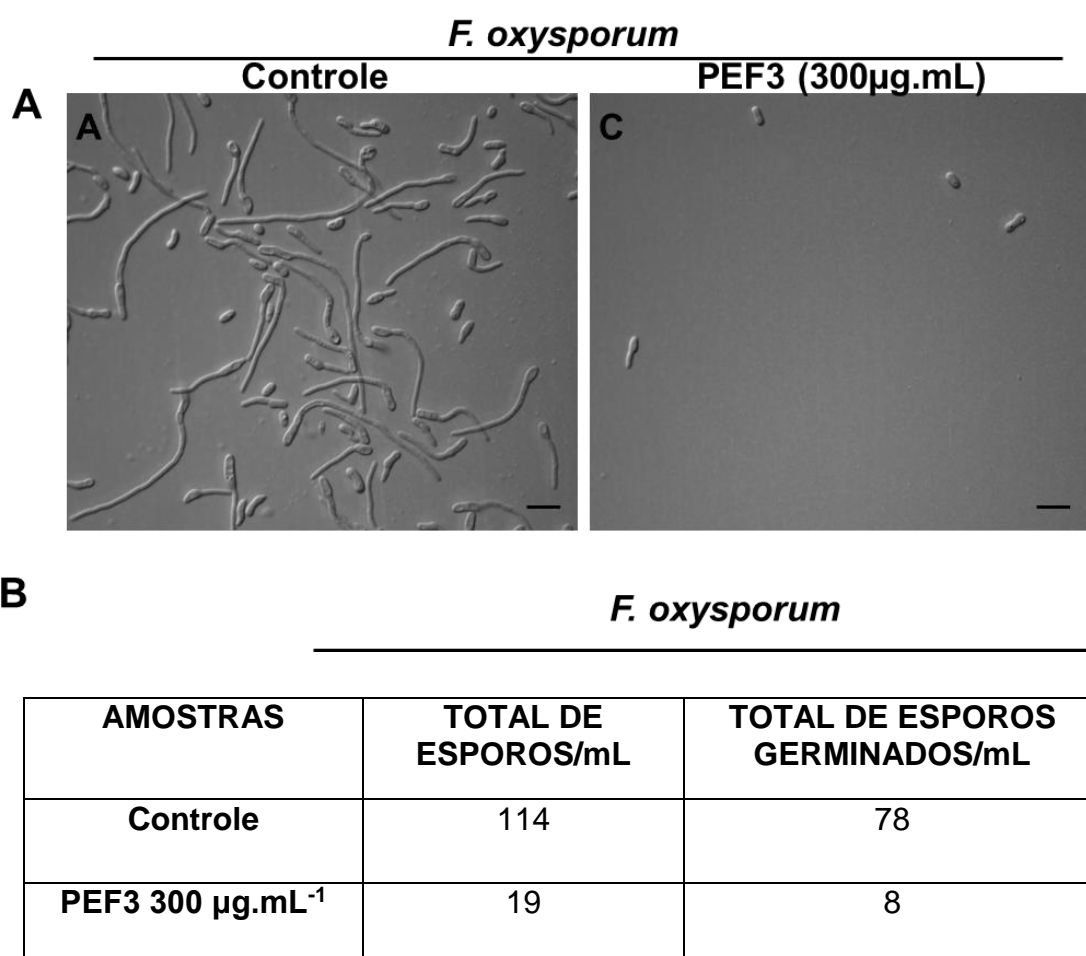
capaz de causar a morte celular no fungo testado (Figura 24). O PEF3 produziu uma redução severa do número de unidades formadoras de colônias (UFC) após 36 h de incubação, apresentando 83,7% de perda de viabilidade. Este resultado indica que o efeito inibitório do PEF3 foi fungicida contra esta espécie de fungo e que  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3 é a dose letal para causar a morte de 83,7%.



**Figura 24- Viabilidade celular do fungo *F. oxysporum*.** (A) Imagens de placa de Petri mostrando o crescimento de colônias no controle (sem adição da fração) e após o tratamento com  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3 durante 36 h. (B) Quantificação de células e de porcentagem de morte celular no controle e após o tratamento com o PEF3 durante 36h. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 5.20- Análise da inibição da germinação dos esporos fúngicos na presença da fração PEF3

Neste ensaio, observamos que o PEF3, na concentração de  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , foi capaz de inibir 90% da germinação do fungo *F. oxysporum* (Figura 25). Na imagem do controle, observamos a germinação dos esporos a partir do tubo germinativo. Por outro lado, nos esporos tratados, não constatamos essa germinação, o que indica que esta fração é capaz de inibir a germinação dos esporos. Também podemos notar que alguns esporos do teste começam a germinar, mas essa germinação é menor em relação ao seu controle.



**Figura 25- Análise da inibição da germinação do *F. oxysporum*.** (A) Imagens visualizadas após 8 h de incubação com  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3. Células controle e teste após o tratamento com  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PEF3. (B) Determinação do número total de esporos e esporos germinados (no controle e teste) visualizados em 25 campos da câmera de Neubauer.

## 6. DISCUSSÃO

As doenças e pragas que atacam as culturas de plantas desde o estágio de plantio até o armazenamento são responsáveis por uma grande queda na produção global de alimentos, o que indica uma grande ameaça à segurança alimentar global (Fones *et al.*, 2017). Para se defender de pragas e patógenos, como os vírus, os fungos e as bactérias, as plantas desenvolveram vários mecanismos de defesa, incluindo a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Meneguetti *et al.*, 2017). Entre as famílias de peptídeos antimicrobianos descritas na literatura, destacam-se os inibidores de protease. Inibidores de protease de plantas pertencem a uma família diversificada de importantes peptídeos responsáveis por manter a homeostase fisiológica e servir como mecanismo de defesa inato das plantas (Hellinger e Gruber, 2019).

Diferentes AMPs vêm sendo extraídos e purificados a partir de sementes de pimenta (Diz *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2017). Inicialmente, foi realizado a extração e a purificação das frações enriquecidas em peptídeos (PEFs) de sementes de *C. chinense* de acordo com a extração e métodos cromatográficos utilizados por Dias *et al.*, 2013. Primeiramente, o extrato foi submetido à cromatografia de fase reversa, revelando um perfil cromatográfico e eletroforético, mostrado nas Figuras (5A e 5B). De acordo com o padrão de eluição cromatográfico e com os tempos de retenção muito próximos, os peptídeos encontrados nas frações PEF1, PEF2 e PEF3 sugerimos que, provavelmente, são isoformas de uma



mesma proteína com pequena diferença de hidrofobicidade, que foram fracionadas pela coluna de fase reversa C18.

As frações obtidas neste trabalho foram testadas quanto à propriedade de inibir a atividade da enzima tripsina, em que diferentes taxas de inibição foram observadas (Figuras 7A e 17A). Foi possível observar a presença de atividade inibitória para tripsina no PEF2, PEF2B e PEF3 através também do ensaio de zimografia reversa (Figuras 7B e 17B), reforçando os achados de inibidores proteases serínicas descrito por Dias *et al.* (2013) em frações de sementes de *C. chinense*. Os inibidores de protease (PIs) são amplamente distribuídos no reino vegetal e são geralmente definidos como proteínas restritas não apenas aos tecidos de armazenamento, mas também expressas nas partes aéreas das plantas. Sua expressão também é induzida em resposta a lesões ou ataques de insetos ou patógenos. Os PIs são uma das estratégias de defesa importantes nas plantas para combater predadores, como proteínas anti-metabólicas, que interferem no processo digestivo dos insetos. E são particularmente eficazes contra microrganismos fitófagos (Jamal *et al.*, 2013; Bártová *et al.*, 2019; Clemente *et al.*, 2019).

Vários trabalhos têm mostrado a presença de inibidores de proteases com atividade direcionada a diferentes enzimas serínicas. Revina *et al.* (2008), por exemplo, relataram um inibidor de subtilisina do tipo Kunitz (PKSI) de tubérculos de batata. Dunce *et al.* (2010) encontraram um inibidor do tipo I de batata *Solanum tuberosum* (StPin1A), com atividade contra a enzima quimotripsina. Silva *et al.* (2017) relataram um inibidor de tripsina, denominado CaTI, de sementes de *C. annuum*. Outro peptídeo, denominado CaTI2, de frutos de IKEDA também apresentou atividade contra a enzima tripsina (Maracahipes *et al.*, 2019).

Por dedução, prevemos o tamanho dos peptídeos presentes no PEF2A e PEF2B (Figura 8). De acordo com a sequência do inibidor Pin II de *C. annuum* que apresenta dois sítios funcionais conservados (Mishra *et al.*, 2012), esta foi comparada às sequências de PEF2A e PEF2B. Nossos dados mostraram que estas sequências não apresentaram os dois sítios funcionais de maneira semelhante. A banda de aproximadamente 8,0 kDa (PEF2B) apresenta os dois sítios funcionais, porém a banda de aproximadamente 5,0 kDa (PEF2A) apresenta apenas uma parte do segundo sítio. O peptídeo que preservou os dois sítios exibiu uma maior atividade inibitória, enquanto, no outro peptídeo com apenas um sítio, observou-se

uma menor atividade. Com o objetivo de caracterizar os peptídeos presentes na fração PEF3, esta foi submetida ao sequenciamento por espectrometria de massas. A banda de aproximadamente 6,0 kDa mostrou alta similaridade com diferentes inibidores de proteases (Figura 16).

Além dos inibidores de proteases serínicas, estão entre os importantes inibidores enzimáticos a família dos inibidores de  $\alpha$ -amilase. A enzima  $\alpha$ -amilase é fundamental para o crescimento e desenvolvimento de organismos que dependem da  $\alpha$ -amilase para sobrevivência, como os insetos, por exemplo. Essa família de inibidores pode atuar como componente do sistema de defesa de plantas impedindo a invasão de pragas (Silva *et al.*, 2014). Para verificar se as frações PEF2 e PEF3 apresentavam inibidores bifuncionais, ou seja, mostravam também propriedades de inibir a enzima  $\alpha$ -amilase, foram realizados ensaios de inibição da atividade enzimática para a  $\alpha$ -amilase de *T. molitor* e  $\alpha$ -amilase salivar humana. Observou-se que a fração PEF2 e PEF3 foram capazes de inibir as enzimas testadas (Figuras 9 e 18). Inibidores bifuncionais apresentam a propriedade de inibir diferentes enzimas, como proteases e carboidrases (Pereira *et al.*, 2018). Uma consequência da inibição dessas enzimas pode ser dada na redução da viabilidade dos fungos. Alguns trabalhos descrevem inibidores bifuncionais com atividade contra tripsina e  $\alpha$ -amilase, como o inibidor bifuncional da  $\alpha$ -amilase/tripsina de *Triticum aestivum* L. (Islamov e Fursov, 2007) e o inibidor bifuncional de  $\alpha$ -amilase/tripsina de sementes de Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.), que afetam negativamente o desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* (Gadge *et al.*, 2015).

Após o processo de purificação das frações peptídicas, foram realizados testes antifúngicos para avaliar a atividade antimicrobiana sobre fungos fitopatogênicos. A fração PEF1 não foi utilizada, devido à sua baixa atividade em ensaios preliminares. A fração PEF2 inibiu significativamente o crescimento dos fungos filamentosos *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum*. O *F. solani* não apresentou uma inibição significativa, porém, ao observar a microscopia, visualizamos uma intensa aglomeração das hifas, o que pode resultar em um aumento da densidade ótica interferindo na absorbância do ensaio. O PEF2A e o PEF2B inibiram os fungos *C. lindemuthianum* e *F. solani* (Figura 10). Verificou-se que o fungo *F. solani*, quando crescido na presença da fração PEF2, não apresentou inibição no seu crescimento, porém, quando crescido na presença dos peptídeos isolados, PEF2A e PEF2B, este fungo apresentou uma inibição

significativa. Essa diferença na porcentagem de inibição também pode estar relacionada ao fato de que o PEF2A e o PEF2B apresentam uma maior concentração do peptídeo purificado. A fração PEF3 inibiu significativamente todos os fungos testados (Figura 19). O efeito inibitório da fração PEF3 sobre o fungo *F. oxysporum* foi fungicida (Figura 24). Também verificamos que esta fração atua inibindo a germinação dos esporos do *F. oxysporum* (Figura 25). O fato de PEF3 exercer um efeito fungicida sobre o fungo testado é uma característica importante quando se pensa no desenvolvimento de novas medidas de controle de patógenos, visto que compostos fungistáticos podem contribuir para o desenvolvimento de microrganismos resistentes (Kotaczowska e Kotaczowski, 2016). Vários estudos demonstraram os efeitos antimicrobianos de inibidores de tripsina de baixa massa molecular. Dokka e Davuluri (2014) identificaram um inibidor de tripsina em semente de *Abelmoschus moschatus*, com atividade inibitória contra os fungos *Aspergillus flavus* e *A. niger*. Silva *et al.* (2015) testaram um inibidor de tripsina denominado RcTI, que inibe a germinação de esporos do fungo *C. gloeosporioides*, mas não a germinação de *F. oxysporum* e *Rhizoctonia solani*. Pariani *et al.* (2016) caracterizaram dois inibidores de *Arabidopsis thaliana* que exibem atividade antifúngica na taxa de germinação dos esporos do fungo *Botrytis cinerea*. Silva *et al.* (2017) isolaram um inibidor de tripsina, chamado CaTI, capaz de inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum*; no entanto, o CaTI não foi capaz de inibir o crescimento de fungos do gênero *Fusarium*. Em geral, os efeitos dos inibidores de protease contra fungos fitopatogênicos estão associados à inibição de proteases fúngicas necessárias ao crescimento e à diferenciação (Silva *et al.*, 2015), o que pode ser observado nos resultados da fração PEF3 sobre a viabilidade celular (Figura 24) e a inibição da germinação dos esporos do *F. oxysporum* (Figura 25). Nossos dados mostram que esses inibidores provavelmente inibiram o crescimento de células da divisão celular e a diferenciação na formação das hifas.

Após os testes de inibição, começamos a investigar o mecanismo de ação responsável pela inibição dos fungos fitopatogênicos. Os AMPs possuem características anfipáticas, que conferem a capacidade de interagir com membranas biológicas. É amplamente aceito que o principal mecanismo de ação pelos quais os AMPs exercem sua ação contra os patógenos é na formação de poros transmembranares, causando vazamentos de íons e metabólitos,

despolarização do potencial da membrana e comprometimento das células, levando à morte celular (Corrêa *et al.*, 2019). Utilizando a sonda fluorescente SYTOX Green, buscamos verificar se as frações PEF2 e PEF3 causa permeabilidade na membrana plasmática dos fungos testados. Esta sonda possui afinidade por ácidos nucleicos, e penetra em células com membrana citoplasmática comprometida. Utilizando a fração PEF2, apenas o fungo *F. solani* sofreu permeabilização de membrana (Figura 11). A fração PEF3 permeabilizou a membrana plasmática do *F. oxysporum* (Figura 20). A permeabilização da membrana plasmática causa sérias consequências para a fisiologia celular, o que pode resultar em perda da viabilidade, como foi observado para o fungo *F. oxysporum* na presença da fração PEF3. A seletividade de inibição e permeabilização podem ser explicadas pela diferença intraespecífica dos patógenos. O mecanismo de ação de um AMP depende de fatores como: alvos no hospedeiro, concentração aplicada, composição lipídica da membrana, níveis de saturação de ácidos graxos e capacidade desses fungos em responder aos efeitos do peptídeo com o fortalecimento de suas paredes celulares por meio do aumento de síntese de quitina e  $\beta$ -(1,3)-glucano (Paege *et al.*, 2019). Alguns microrganismos, por exemplo, as bactérias, desenvolveram mecanismos de defesa que alteram a carga negativa de moléculas de superfície, como ácido teicóico ou lipopolissacarídeos e modificam também a fluidez da membrana para evitar a interação do AMP (Peschel, 2002).

Outros inibidores de protease também foram capazes de permeabilizar as membranas de diferentes patógenos. Após 24 horas de incubação com o inibidor de tripsina CaTI, as células de *S. cerevisiae* e *C. albicans* mostraram marcação do corante SYTOX Green, indicando a permeabilização dessas membranas (Ribeiro *et al.*, 2012). Outro exemplo é o inibidor de protease IETI, isolado de sementes de *Inga edulis*, que apresentou atividade contra as leveduras *C. buinensis* e *C. tropicalis*, alterando a permeabilidade da membrana e afetando a viabilidade celular (Dib *et al.*, 2019). Diferentes peptídeos de plantas permeabilizam membranas e modulam o fluxo de íons através das membranas (Ribeiro *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015; Dib *et al.*, 2019). É importante notar que a permeabilização da membrana e a inibição do crescimento de microrganismos não são necessariamente fenômenos relacionados. É possível encontrar peptídeos capazes de induzir a permeabilização

da membrana, mas que não são capazes de inibir o crescimento de patógenos e vice-versa (Teixeira *et al.*, 2012).

Atualmente, existem evidências consistentes que mecanismos adicionais causam a morte celular e que apenas a permeabilidade da membrana pode não ser suficiente para causar a morte do patógeno. Para os peptídeos obterem acesso a alvos intracelulares, é essencial atravessar a membrana e se translocar para o citoplasma. Uma vez no citoplasma, os peptídeos geralmente se concentram e liberam muitos processos diferentes, como alteração de vias metabólicas, inibição da síntese de proteínas, inibição de DNA e RNA, levando à inibição dos processos que envolvem esses ácidos nucleicos, especialmente replicação, transcrição e tradução, processos essenciais para o crescimento e a multiplicação celular, inibição da atividade enzimática interferindo, principalmente, na síntese da parede celular. Outra característica importante é a ação dos AMPs em organelas, por exemplo, as mitocôndrias (Scocchi *et al.*, 2016; Bechinger e Gorr, 2017; Castillo *et al.*, 2018). O peptídeo CF-14 apresenta atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que parecem ter alvos intracelulares, geralmente, o DNA ou enzimas. No caso do CF-14, ele penetra na célula após a interação com a membrana, um passo obrigatório para a ação do peptídeo, apesar de nenhuma lise da membrana ser verificada (Li *et al.*, 2019). No caso de AMPs que não promovem uma aparente permeabilização celular, como a CF-14, a formação de poros ocorreria de maneira discreta e, com a internalização, os peptídeos atuariam mais ativamente em seus alvos intracelulares, justificando a atividade antimicrobiana observada (Moniruzzaman *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

Os AMPs causam perda de potencial de membrana e, como as células dependem desse potencial para desempenhar suas funções fisiológicas vitais, a restauração é obrigatória e requer gasto de energia celular. Uma possível consequência desse processo é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela ativação de mitocôndrias durante a produção de ATP na cadeia transportadora de elétrons (Wang *et al.*, 2015). No interior das células, as moléculas de ROS estão normalmente em equilíbrio com antioxidantes e, quando esse equilíbrio é interrompido, há produção excessiva de ROS, resultando em danos celulares significativos, devido ao estresse oxidativo (Moore *et al.*, 2019). Os AMPs podem exercer sua ação antimicrobiana induzindo o acúmulo intracelular de ROS, o que pode causar danos ao DNA, oxidação de proteínas, carboidratos e lipídios,

incluindo ativação de vias apoptóticas (Soares *et al.*, 2017). Portanto, neste trabalho, verificou-se se as frações PEF2 e PEF3 poderiam induzir aumento da produção endógena de ROS, o que, de fato, foi observado para *F. oxysporum* e *F. solani* quando tratados com a fração PEF2 (Figura 12) e para *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum* quando tratados com a fração PEF3 (Figura 21). A indução de ROS pode ser uma consequência do efeito primário da permeabilização da membrana e, juntos, esses danos celulares podem ser responsáveis pela inibição do crescimento. Outros peptídeos também podem aumentar os níveis de ROS nas células fúngicas. A tionina CaThi, isolada de frutos de *C. annuum*, induziu aumento de ROS nos esporos de *F. solani* (Taveira *et al.*, 2016). Santos *et al.* (2017) mostraram a capacidade da fração Fa5, de frutos de *C. annuum*, induzir aumento da produção endógena de ROS nos fungos fitopatogênicos *F. lateritium*, *F. solani* e *F. oxysporum*, mas não em *C. gloeosporioides*. Moore *et al.* (2019) identificaram que o tratamento com o peptídeo sintético D4E1, na concentração de 1  $\mu$ M, induziu o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) em esporos do fungo *Aspergillus flavus*. Esses resultados sugerem que o PEF2 possui um mecanismo de ação no fungo *F. solani* e o PEF3, no fungo *F. oxysporum* que envolve não só a permeabilização de membranas, mas também a indução de estresse oxidativo.

Sabe-se que ações antifúngicas estão frequentemente associadas a alterações na permeabilização da membrana, como nas bombas de ATP, que levam ao comprometimento funcional das mitocôndrias e geração de ROS. Diante dessas informações, avaliamos a dissipação do potencial da membrana mitocondrial pelo corante Rodamina 123. Como as espécies reativas de oxigênio (ROS) são os principais indutores de apoptose em fungos, também foi verificada a presença de caspases ativas. Caspases são proteases aspartato específicas contendo resíduos de cisteínas em seu sítio ativo e fazem parte da rede de sinalização apoptótica (Rocha *et al.*, 2017). Nesses testes, verificamos que as frações PEF2 e PEF3 foram capazes de causar o colapso do potencial da membrana mitocondrial em todos os fungos testados (Figuras 13 e 22). Esses resultados indicam que as mitocôndrias dos fungos fitopatogênicos podem ser um alvo direto ou indireto dos AMPs aqui estudados. A fração PEF2 não aumentou o nível de atividade de caspases nos fungos testados (Figura 14), e a fração PEF3 aumentou o nível de atividade da caspase no fungo *C. lindemuthianum* (Figura 23). Nossos dados sugerem que o PEF2 não exerce suas propriedades antifúngicas por

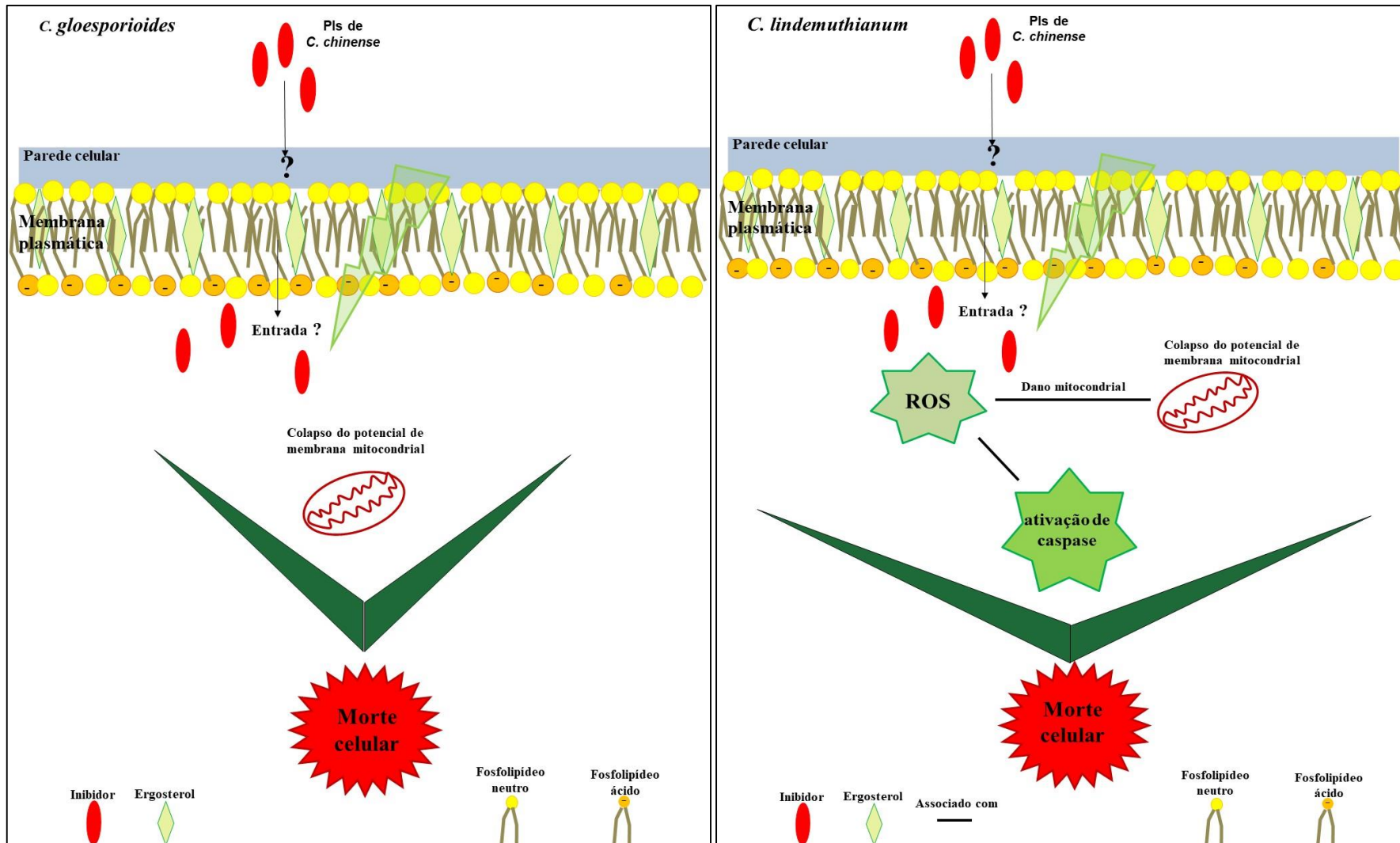
indução de apoptose, e o resultado da fração PEF3 indica que uma via de morte celular programada pode ter sido ativada, dentro do tempo avaliado, apenas para o fungo *C. lindemuthianum*. No caso da tionina CaThi, foi demonstrado que este AMP causa o colapso do potencial da membrana mitocondrial e eleva também o nível de atividade de caspase no fungo unicelular *C. tropicalis* (Taveira *et al.*, 2018). Um AMP Psacothiasin mostrou esse mesmo padrão de ação, causando dissipação do potencial da membrana mitocondrial e ativação de caspases (Hwang *et al.*, 2011). Alguns estudos associaram o acúmulo de ROS à indução de apoptose. Madeo *et al.* (1999) provaram que a indução da morte apoptótica por vários estímulos gera acúmulo de ROS nas células de levedura e mostraram que são necessárias e suficientes para induzir um fenótipo apoptótico. Em conjunto com os resultados já demonstrados para outros AMPs, nossos dados sugerem que a fração PEF3 pode exercer sua ação antimicrobiana para o fungo *C. lindemuthianum* ao induzir o acúmulo intracelular de ROS seguido pela indução de apoptose como mecanismo de ação.

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. Evidências – como a ausência de permeabilização da membrana, porém com atividade antimicrobiana confirmada em ensaios com bactérias patogênicas – apoiam a teoria de que existem outros alvos intracelulares para ação peptídica (Klimpel *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018). Após a interação com a membrana, os AMPs podem desencadear a indução de ROS (Moore *et al.*, 2019); a inibição da síntese de proteínas (Zahn *et al.*, 2013; Mardirossian *et al.*, 2018); a inibição da atividade mitocondrial (Vieira *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2018) e também podem disparar cascatas de sinalização que conduzem à apoptose (Higuchi *et al.*, 2016). Esses eventos podem levar à morte celular de forma independente, que ocorrem individualmente ou complementares. De acordo com o que já foi visto na literatura e com os resultados obtidos neste trabalho, os mecanismos de ação que podem estar associados a esses inibidores de proteases de *C. Chinense* estão ilustrados na (Figura 26). Diante das informações, observamos que os inibidores presentes nas frações PEF2 e PEF3 podem apresentar alvos intracelulares, já que não foram observada permeabilização da membrana de alguns fungos, como o *C. gloesporiondes*. Torna-se tecnicamente desafiador identificar o fator mais

importante para o efeito das frações PEF2 e PEF3 e caracterizar as etapas que conduzem à morte celular dos microrganismos alvo.

Conforme descrito, por Moguel-Salazar *et al.* (2011), as pimentas são fonte importante de AMPs e têm várias aplicações nas áreas farmacêutica e agrícola. Esses AMPs podem ser usados como uma alternativa para o controle de patógenos no futuro considerando a atual questão da resistência às substâncias tradicionais. Este é o primeiro relato de peptídeos isolados de *C. chinense* com atividade inibitória contra proteases e possivelmente envolvido na defesa contra fungos fitopatogênicos. Os peptídeos encontrados nas frações PEF2 e PEF3 apresentam potencial biotecnológico, especialmente para o controle de doenças de plantas causadas por fungos fitopatogênicos.





**Figura 26-** Sumário esquemático dos possíveis mecanismos de ação dos inibidores de protease presentes nas frações PEF2 e PEF3 em células fúngicas levando o microrganismo à morte.

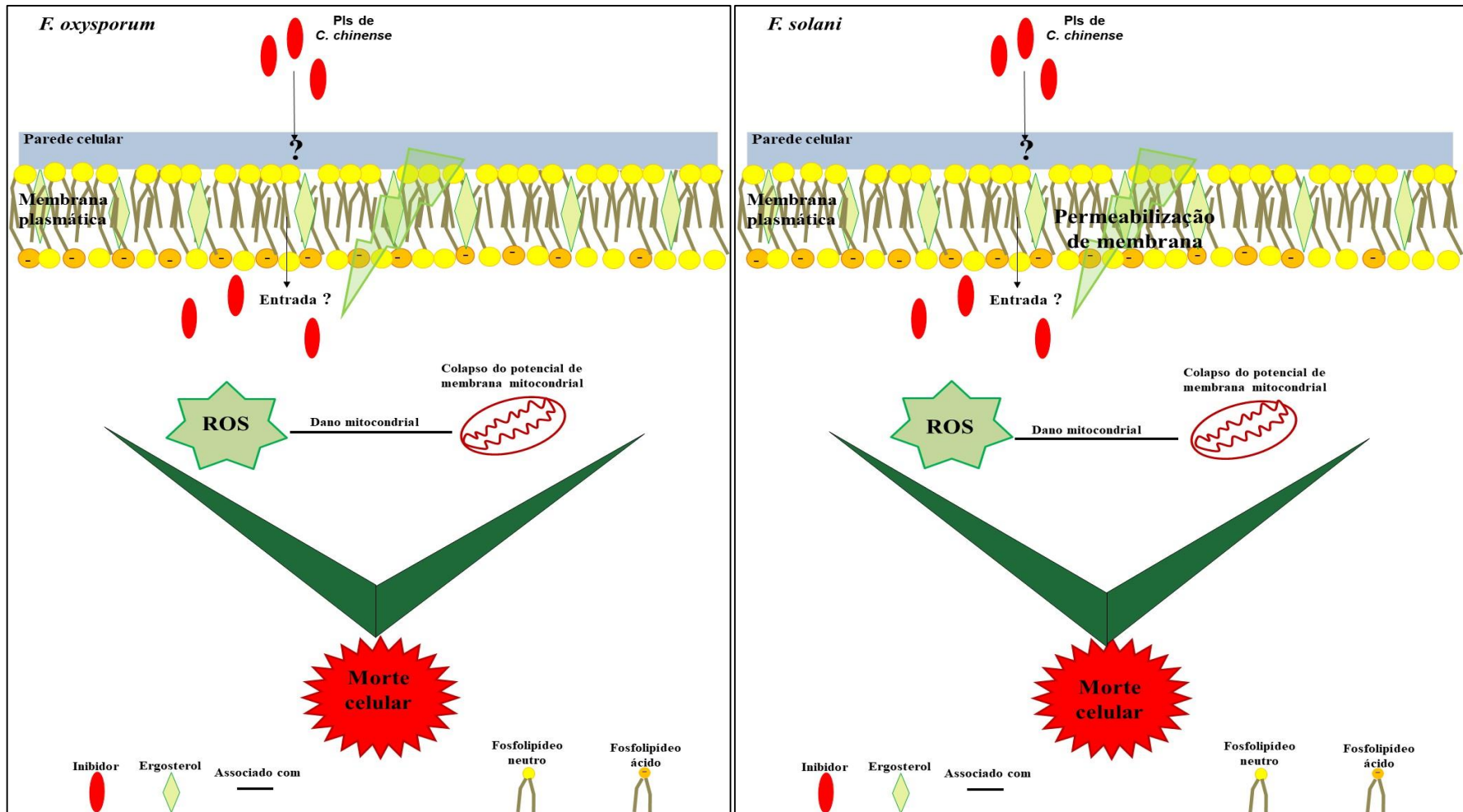


Figura 26 - Cont

## 7.CONCLUSÕES

- As frações PEF2, PEF2A, PEF2B e PEF3 inibiram significativamente a atividade da enzima tripsina *in vitro*;
- A banda de aproximadamente 6,0 kDa da fração PEF3 mostrou similaridade de sequência primária com a família dos inibidores de protease de planta;
- As frações PEF2 e PEF3 foram capazes de inibir a atividade de  $\alpha$ -amilases do intestino das larvas do inseto *T. molitor* e salivar humana;
- A fração PEF2 apresentou atividade antifúngica sobre os fungos *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum*. O PEF2A e o PEF2B inibiram os fungos *C. lindemuthianum* e *F.solani*, e a fração PEF3 inibiu todos os fungos testados de forma dose-dependente;
- A fração PEF2 foi capaz de permeabilizar as membranas das células de *F. solani* e a fração PEF3 do fungo *F. oxysporum*;
- A fração PEF2 induziu o aumento endógeno da produção de ROS em células de *F. oxysporum* e *F. solani* e a fração PEF3, nos fungos *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum*;
- O PEF2 e o PEF3 causaram um colapso no potencial de membrana mitocondrial em todos os fungos testados;

- O PEF3 induziu aumento na atividade de caspases, proteínas reguladoras do processo de apoptose em *C. lindemuthianum*;
- O efeito de PEF3 sobre o fungo *F. oxysporum* foi fungicida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anandakumar, P., Kamaraj, S., Jagan, S., Ramakrishnan, G., Devaki, T. (2013) Capsaicin provokes apoptosis and restricts benzo(a) pyrene induced lung tumorigenesis in swiss albino mice. *Int Immunopharmacol.* 17:254-259.
- Andreev, K., Martynowycz, M.W., Huang, M.L., Kuzmenko, I., Bu, W.K., Kirshenbaum, D. (2018) Gidalevitz, hydrophobic interactions modulate antimicrobial peptoid selectivity towards anionic lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1860:1414-1423.
- Andrés, M.T., Acosta-Zaldívar, M., Fierro, J.F. (2016) Antifungal mechanism of action of lactoferrin: identification of H<sup>+</sup>-ATPase (P3A-Type) as a new apoptotic-cell membrane receptor. *Antimicrob Agents Chemother.* 60:4206-4216.
- Barboza, G.E., Carrizo, G.C., Leiva, G.S., Scaldaferro, M., Reyes, X. (2019) Four new species of *Capsicum* (Solanaceae) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus. *PLoS One*, 14.
- Bard, G.C.V., Nascimento, V.V., Ribeiro, S.F.F., Rodrigues, R., Perales, J., Teixeira-Ferreira, A., Carvalho, A.O., Fernandes, K.V.S., Gomes, V.M. (2015) Characterization of peptides from *Capsicum annuum* hybrid seeds with inhibitory activity against  $\alpha$ -amylase, serine proteinases and fungi. *Protein J.* 34:222-9.

- Bártová, V., Bárta, J., Jarošová, M. (2019) Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 103:5533-5547.
- Baumann, C., Kampfer, U., Schurch, S., Schaller, J., Largiader, C., Nentwig, W., Kuhn-Nentwig, L. (2010) Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. *Cell Mol Life Sci.* 66:2787-2798.
- Bechinger, B., Gor, S.U. (2017) Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. *J Dent Res.* 96:254-260.
- Bendre, A.D., Ramasamy, S., Suresh, C.G. (2018) Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. *Int J Biol Macromol.* 113:933-943.
- Benko-Iseppon, A.M., Galdino, S.L., Calsa, T.J., Kido, E.A., Tossi, A., Belarmino, L.C., Crovella, S. (2010) Overview on plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci.* 11:181-188.
- Bosland, P.W., Votava, E.J. (2012) Peppers: vegetable and spice *Capsicum*, 2nd ed. CABI Publishing: Wallingford, UK, 248p.
- Brodgen, K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 3:238-250.
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Sambland, G.W., Osborn, R.W. (1997) Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J Biol Chem.* 267: 2228-2233.
- Campos, M.L., Lião, L.M., Alves, E.S.F., Migliolo, L., Dias, S.C., Franco, O.L. (2018) A structural perspective of plant antimicrobial peptides. *Biochem J.* 9:3359-3375.
- Carrizo, G.C., Sterpetti, M., Volpi, P., Ummarino, M., Saccardo, F. (2013) Wild *Capsicums*: identification and *in situ* analysis of Brazilian species. XVth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and Eggplant. Torino, Italy, p. 205-213.

- 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, S.I.C., Bianchetti, L.B. (2007) Sistema de produção de pimentas (*Capsicum* spp.). *Embrapa Hortaliças*, 18.
- Castillo, J.I., Równicki, M., Wojciechowska, M., Trylska, J. (2018) Antimicrobial synergy between mRNA targeted peptide nucleic acid and antibiotics in *E. coli*. *Bioorg Med Chem Lett*. 28:3094-3098.
- Ceciliani, F., Bortolotti, F., Menengatti, E., Ronchi, S., Ascenzi, P., Pakmieri, S.A. (1994) Purification, inhibitory properties, amino acid sequence and identification of the reactive site of a new serine proteinase inhibitor from oil-rape (*Brassica napus*) seed. *FEBS Lett*. 342:221-224.
- 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*. 20:1345.
- Corrêa, J.A.F., Evangelista, A.G., Nazareth, T.M., Luciano, F.B. (2019) Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. *Materialia*, 8:100494.
- Cotabarren, J., Lufrano, D., Parisi, M.G., Obregón, W.D. (2020) Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *Plant Sci*. 292:110398.
- Craik, D.J. (2001) Plant cyclotides: circular, knotted peptide toxins. *Toxicon*, 39:1809-1813.
- Cushnie, T.T., Cushnie, B., Lamb, A.J. (2014) Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J Antimicrob Agents*, 44:377-386.
- Da Silva, F.C.V., Do Nascimento, V.V., Fernandes, K.V., Machado, O.L.T., Da Pereira, L.S., Gomes, V.M., Carvalho, A.O. (2018) Recombinant production and

- $\alpha$ -amylase inhibitory activity of the lipid transfer protein from *Vigna unguiculata* (L. Walp.) seeds. *Process Biochem.* 65:205-212.
- Dabhade, A.R., Mokashe, N.U., Patil, U.K. (2016) Purification, characterization, and antimicrobial activity of nontoxic trypsin inhibitor from *Albizia amara* Boiv. *Process Biochem.* 51:659-674.
- Dang, L., Els, J.M., Damme, V. (2015) Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, 117:51-64.
- Dayler, C.S.A., Mendes, P.A.M., Prates, M.V. Bloch Jr, C., Franco, O.L., Grossi-de-Sá, M.F. (2005) Identification of a novel bean  $\alpha$ -amylase inhibitor with chitinolytic activity. *FEBS Lett.* 579:5616-5620.
- De Caleyra, R.F., Gonzalez-Pascual, B., Garcia-Olmedo, F., Carbonero, P. (1972) Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*. *Appl Microbiol.* 23:998-1000.
- Dias, G.B., Gomes, V.M., Zottich, U., Ribeiro, S.F., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Fernandes, K., Valevski, S., Machado, O.L.T., Ferreira, A.T., Perales, J., Cunha, M.D. (2013) Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. seeds. *Protein J.* 32:15-26.
- Dib, H.X., De Oliveira, D.G.L., De Oliveira, C.F.R., Taveira, G.B., De Oliveira, E., Verbisk, M.N.V., Chang, M.R., Junior, D.C., Gomes, V.M., Macedo, M.L.R. (2019) Biochemical characterization of a Kunitz inhibitor from *Inga edulis* seeds with antifungal activity against *Candida* spp. *Arch Microbiol.* 201:223-233.
- Diz, M.S., Carvalho, A.O., Ribeiro, S.F.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 chilli pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel  $\alpha$ -amylase inhibitory properties. *Physiol Plant.* 142:233-246.
- Diz, M.S.S., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A.G., Da Cunha, M., Alves, E.W., Okorova-Façanha, A.L., Oliveira, M.A., Perales, J., Machado, O.L., Gomes, V.M. (2006) Antimicrobial peptides from chill pepper seeds cause yeast



plasma membrane permeabilization and inhibit the acidification of the medium by yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, 1760:1323-1332.

Dokka, M.K., Davuluri, S.P. (2014) Antimicrobial activity of a trypsin inhibitor from the seeds of *Abelmoschus moschatus*. L. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 3:184-199.

Dunce, K.M., Stevens, J.A., Lay, F.T., Gaspar, Y.M., Heath, R.L., Anderson, M.A. (2010) Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:15011-15015.

Duvick, J.P., Rood, T., Rao, A.G., Marshak, D.R. (1992) Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J Biol Chem*. 267:18814-18820.

Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Pukhalsky, V.A., Grishin, E.V. (2005). Diversity of wheat antimicrobial peptides. *Peptides*, 26:2064-2073.

Fan, S.G., Wu, G.J. (2005) Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Bot Bull Acad Sin*. 46:273-292.

Felicioli, R., Garzelli, B., Vaccari, L., Melfi, D., Balestreri, E. (1997) Activity staining of protein inhibitors of proteases on gelatin containing polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 244:176-178.

Fones, H.N., Fisher, M.C., Gurr, S.J. (2017) Emerging fungal threats to plants and animals challenge agriculture and ecosystem resilience. *Microbiol Spectr*. 5.

Franco, J.J.G., Gamboa, D.N.D., Perea, N.T. (2019) Bacterial communities of *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) from pepper crops (*Capsicum* sp.). *Sci Rep*. 9:5766.

Fujimura, M., Minami, Y., Watanabe, K., Tadera, K. (2003) Purification, characterization and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, Fa-AMP1 and Fa-AMP2, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Biosci Biotechnol Biochem*. 67:1636-1642.

- Furstenberg-Hagg, J., Zagrobelny, M., Bak, S. (2013) Plant defense against insect herbivores. *Int J Mol Sci.* 14:10242-10297.
- Gadge, P.P., Wagh, S.K., Shaikh, F.K., Tak, R.D., Padul, M. V., Kachole, M.S. (2015) A bifunctional  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor from *Pigeonpea* seeds: Purification, biochemical characterization and its bio-efficacy against *Helicoverpa armigera*. *Pestic Biochem Physiol.* 125:17-25.
- 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., Ferreira, B.S., Gomes, V.M. (2008). Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides*, 29:2090-2100.
- García, C.A., Barfuss, M.H.J., Sehr, E.M., Barbosa, 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.
- García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., Rodríguez-Palenzuela, P. (1998) Plant defense peptides. *Pept Sci.* 47:479-91.
- Gebara, R.S., Taveira, G.B., Dos Santos, L.A., Calixto, S.D., Simão, T.L.B.V., Lassounskaia, E., Muzitano, M.F., Teixeira-Ferreira, A., Perales, J., Rodrigues, R., Carvalho, A.C., Gomes, V.M. (2020) Identification and characterization of two defensins from *Capsicum annum* fruits that exhibit antimicrobial activity. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 27.
- Giuliani, A., Pirri, G., Nicoletto, S.F. (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Electron J Biotechn.* 2:1-33.
- Greenblatt, H.M., Ryan, C.A., James, M.N.G. (1989) Structure of the complex of *Streptomyces griseus* proteinase B and polypeptide chymotrypsin inhibitor-1 from Russet Burbank potato tubers at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol.* 205:201-228.
- Habib, H., Fazili, K.M. (2007) Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnol Mol Biol Rev.* 2:68-85.

- Habu, Y., Peyachoknagul, S., Umemoto, K., Sakata, Y., Ohno, T. (1992) Structure and regulated expression of Kunitz chymotrypsin inhibitor genes in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.). *J Biochem.* 111:249-258.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (2000) Responses to plant Pathogens In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. BB Buchanan, W., Gruissem e R. L., Jones (eds.) American Society of Plant Physiology, p. 1102-1156.
- Haney, E.F., Straus, S.K., Hancock, R.E.W. (2019) Reassessing the host defense peptide landscape. *Front Chem.* 7:43.
- Harp, T.L., Pernezny, K., Lewis Ivey, M.L., Miller, S.A., Kuhn, P.J., Datnoff, L. (2008) The etiology of recent pepper anthracnose outbreaks in Florida. *Crop Prot.* 27:1380-1384.
- Hellinger, R., Gruber, C.W. (2019) Peptide-based protease inhibitors from plants. *Drug Discov Today*, 24:1877-1889.
- Hernandez, J.F., Gagnon, J., Chiche, L., Nguyen, T.M. (2000) Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. *Biochemistry*, 39:5722-5730.
- Hernández-Ortega, M., Ortiz-Moreno, A., Hernández-Navarro, M.D., Chamorro-Cevallos, G., Dorantes-Alvarez, L., Necoechea-Mondragón, H. (2012) Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory effects of carotenoids extracted from dried pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Biomed Biotechnol.* 2012:524019.
- Higuchi, N., Ito, Y., Kato, J., Ogihara, J., Kasumi, T. (2016) NP24 induces apoptosis dependent on caspase-like activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* 121:619-624.
- Hill, T.A., Ashrafi, H., Wo, R.C.S., Yao, J., Stoffel, K., Truco, J.M., Kozik, A., Micheltore, R.W., Deynze, A.V. (2013) Characterization of *Capsicum annuum* genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with a 30K unigene pepper gene chip. *PLoS One*, 8:1-16.

- Holásková, E., Galuszka, P., Frebort, I., Oz, M.T. (2015) Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnol Adv.* 33:1005-1023.
- 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.
- Hyde, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z., Prihastuti, H. (2009) *Colletotrichum*: A catalogue of confusion. *Fungal Divers.* 39:1-17.
- Islamov, R.A., Fursov, O.V. (2007) Bifunctional inhibitor of  $\alpha$ -amylase/trypsin from wheat grain. *Appl Biochem Microbiol.* 43:379-382.
- Jamal, F., Pandey, P.K., Singh, D., Khan, M.Y. (2013) Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem Rev.* 12:1-34.
- Karlova, R., Chapman, N., David, K., Angenent, G.C., Seymour, G.B., de Maagd, R.A. (2014) Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *J Exp Bot.* 65:4527-4541.
- Kim, S.Y., Ahn, H.G., Ha, P.J., Lim, U.T., Lee, J.H. (2018) Toxicities of 26 pesticides against 10 biological control species. *J Asia Pac Entomol.* 21:1-8.
- Klimpel, A., Neundorff, I. (2018) Bifunctional peptide hybrids targeting the matrix of mitochondria. *J Control Release*, 291:147-156.
- Koehbach, J., Craik, D.J. (2019) The vast structural diversity of antimicrobial peptides. *Trends Pharmacol Sci.* 40:517-528.
- Kotaczkowska, A., Kotaczkowski, M. (2016) Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. *J Antimicrob Chemother.* 71:1438-50.

- Kraft, K.H., Brown, C.H., Nabhan, G.P., Luedeling, E., Ruiz, J.J.L., d'Eeckenbrugge, G.C., Hijmans, R.J., Gepts, P. (2014) Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proc Natl Acad Sci.* 111:6165-6170.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Laskowski, M., Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem.* 49:593-626.
- Lazaro, A., Rodriguez-Palenzuela, P., Marana, C., Carbonero, P., Garcia-Olmedo, F. (1988) Signal peptide homology between the sweet protein thaumatin II and unrelated cereal  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitors. *FEBS Lett.* 239:147-150.
- Ledoigt, G., Griffaut, B., Debiton, E., Vian, C., Mustel, A., Evray, G., Maurizis, J.C., Madelmont, J.C. (2006) Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers. *Int J Biol Macromol.* 38:268-271.
- 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, Z., Wang, X., Teng, D., Mao, R., Hao, Y., Yang, N., Chen, H., Wang, X., Wang, J. (2018) Improved antibacterial activity of a marine peptide-N2 against intracellular *Salmonella Typhimurium* by conjugating with cell-penetrating peptides-bl.Fcin 6/Tat 11. *Eur J Med Chem.* 145:263-272.
- Lin, J.Y., Chu, S.C., Wu, H.C., Hsieh, Y.S. (1991) Trypsin inhibitor from the seeds of *Acacia confusa*. *J Biochem.* 110:879-883.
- Liu, Y., Luo, J., Xu, C., Ren, F., Peng, C., Wu, G., Zhao, J. (2000) Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from Pokeweed. *Plant Physiol.* 122:1015-1024.
- Ma, W., Zhang, D., Li, G., Liu, J., He, G., Zhang, P., Yang, L., Zhu, H., Xu, N., Liang, S. (2017) Antibacterial mechanism of daptomycin antibiotic against

- Staphylococcus aureus* based on a quantitative bacterial proteome analysis. *J Proteomics*, 150:242-251.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Franco, O.L., Migliolo, L., Oliveira, C.F.R. (2011) Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 158:164-172.
- Madeo, F. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol*. 145:757-767.
- Mahlapuu, M., Hakansson, J., Ringstad, L., Bjorn, C. (2016) Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 6:1-12.
- Malekhaat, S., Haffner, M. (2018) Malmsten, Influence of self-assembly on the performance of antimicrobial peptides. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 38:56-79.
- Maracahipes, Á.C., Taveira, G.B., Mello, E.O., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Perales, J., Teixeira-Ferreira, A., Silva, M.S., Rocha, G.L., 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*. 23:39.
- Maracahipes, A.C., Viscovini, K.K.C.G., Annunziatto, E.S., Neves, L.G., da Luz, P.B., Araujo, K.L. (2016) Genetic diversity of the germplasm active bank of *Capsicum* of UNEMAT based on components resistant to the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Aust J Crop Sci*. 10:940-948.
- Marcus, J.P., Green, J.L., Goulter, K.C., Manners, J.M. (1999) A family of antimicrobial peptides is produced by processing of 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. *Plant J*. 19:699-710.
- Mardirossian, M., Pérébasquine, N., Benincasa, M., Gambato, S., Hofmann, S., Huter, P., Muller, C., Hilpert, K., Innis, C.A., Tossi, A., Wilson, D.N. (2018) The dolphin proline-rich antimicrobial peptide tur1a inhibits protein synthesis by targeting the bacterial ribosome. *Cell Chem Biol*. 25:530-539.

- 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* (online), 40:1746-1751.
- Martins, T.F., Vasconcelos, I.M., Silva, R.G.G., Silva, F.D.A., Souza, P.F.N., Varela, A.L.N., Albuquerque, L.M., Oliveira, J.T.A. (2018) A Bowman-Birk inhibitor from the seeds of *Luetzelburgia auriculata* inhibits *Staphylococcus aureus* growth by promoting severe cell membrane damage. *J Nat Prod.* 81: 1497-1507.
- 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.
- Mendez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G.G., Mendez, R., Soriano, F., Salinas, M., De Haro, C. (1990) Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin,  $\gamma$ -hordothionin, from barley endosperm. *Eur J Biochem.* 194:533-539.
- Meneguetti, B.T., Machado, L.S., Oshiro, K.G.N., Nogueira, M.L., Carvalho, C.M.E., Franco, O.L. (2017) Antimicrobial peptides from fruits and their potential use as biotechnological tools - A review and outlook. *Front Microbiol.* 10:2136.
- Menegatti, E., Tedeschi, G., Ronchi, S., Bortolotti, F., Ascenzi, P., Thomas, R.M., Bolognesi, M., Pakmieri, S.A. (1992) Purification, inhibitory properties and amino acid sequence of a new serine proteinase inhibitor from white mustard (*Sinapis alba* L.) seed. *FEBS Lett.* 301:10-14.
- Mishra, M., Mahajan, N., Tamhane, V.A., Kulkarni, M.J., Baldwin, I.T., Gupta, V.S., Giri, A.P. (2012) Stress inducible proteinase inhibitor diversity in *Capsicum annuum*. *BMC Plant Biol.* 16:217.
- 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. *African J Biotech.* 10:19918-19928.
- Mojsoska, B., Jenssen, H. (2015) Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design. *Pharmaceuticals* (Basel), 13:366-415.

- Moniruzzaman, M., Islam, M.Z., Sharmin, S., Dohra, H., Yamazaki, M. (2017) Entry of a six residue antimicrobial peptide derived from lactoferricin B into single vesicles and *Escherichia coli* cells without damaging their membranes. *Biochemistry*, 56:4419-4431.
- Moore, J., Rajasekaran, K., Cary, J.W., Chlan, C. (2019) Mode of action of the antimicrobial peptide D4E1 on *Aspergillus flavus*. *Int J Pept Res Ther*. 25:1135-1145.
- Moreira, A.F.P., Ruas, P.M., Ruas, C.F., Baba, V.Y., Giordania, 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.
- Moscone, E.A., Scaldaferrro, M.A., Grabiele, M., Cecchini, N.M., Sanchez, G.Y., Jarret, R., Davina, J.R., Ducasse, D.A., Barboza, G.E., Ehrendorfer, F. (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum*-Solanaceae): A cytogenetic perspective. *Acta Hortic*. 745:137-170.
- Moses, M., Umaharan, P. (2012) Genetic structure and phylogenetic relationships of *Capsicum chinense*. *J Amer Soc Hort Sci*. 137:250-262.
- Moses, M., Umaharan, P., Dayanandan, S. (2014) Microsatellite based analysis of the genetic structure and diversity of *Capsicum chinense* in the Neotropics. *Genet Resour Crop Evol*. 61:741-755.
- Mulvenna, J.P., Foley, F.M., Craik, D.J. (2005) Discovery, structural determination, and putative processing of the precursor protein that produces the cyclic trypsin inhibitor sunflower trypsin inhibitor 1. *J Biol Chem*. 280:32245-32253.
- Nan, Y.H., Park, K.H., Park, Y., Jeon, Y.J., Kim, Y., Park, I.S., Hahm, K.S., Shin, S.Y. (2009) Investigating the effects of positive charge and hydrophobicity on the cell selectivity, mechanism of action and anti-inflammatory activity of a Trp-rich antimicrobial peptide indolicidin. *FEMS Microbiol Lett*. 292:134-140.
- 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*, 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.
- Nguyen, L.T. Haney, E.F., Vogel, H.J. (2011) The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 29:464-472.
- Nordstrom, R., Malmsten, M. (2017) Delivery systems for antimicrobial peptides. *Adv Colloid Interface Sci.* 242:17-34.
- Olatunji, T.L., Afolayan, A.J. (2019) Comparative quantitative study on phytochemical contents and antioxidant activities of *Capsicum annum* L. and *Capsicum frutescens* L. *Sci World J.* 26:190-207.
- Oliveira, C.F.R., Macedo, M.L.R. (2011) Emprego de inibidores de protease vegetais como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. *Ciências biológicas da saúde*, 1-1.
- Oliveira, J.T.A., Souza, P.F.N., Vasconcelos, I.M., Dias, L.P., Martins, T.F., Tilburg, M.F.V., Guedes, M.I.F., Sousa, D.O.B. (2019) Mo-CBP<sub>3</sub>-PepI, Mo-CBP<sub>3</sub>-PepII, and Mo-CBP<sub>3</sub>-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. *Biochimie*, 157:10-21.
- Omardien, S., Drijfhout, J.W., Vaz, F.M., Wenzel, M., Hamoen, L.W., Zaat, S.A.J., Brul, S. (2018) Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1860:2404-2415.
- Paege, N., Warnecke, D., Zauner, S., Hagen, S., Rodrigues, A., Baumann, B., Thiess, M., Jung, S., Meyera, V. (2019) Species-specific differences in the susceptibility of fungi to the antifungal protein AFP depend on C-3 saturation of glycosylceramides. *Ther Prev.* 11:4.
- Pandit, G., Ilyas, H., Ghosh, S., Bidkar, A.P., Mohid, S.A., Bhunia, A., Satpati, P., Chatterjee, S., Bhunia, A., Satpati, P., Chatterjee S. (2018) Insights into the mechanism of antimicrobial activity of seven-residue peptides. *J Med Chem.* 61:7614-7629.

- Pariani, S., Contreras, M., Rossi, F.R., Sander, V., Corigliano, M.G., Simón, F., Busi, M.V., Gomez-Casati, D.F., Pieckenstain, F.L., Duschak, V.G., Clemente, M. (2016) Characterization of a novel Kazal-type serine proteinase inhibitor of *Arabidopsis thaliana*. *Biochimie*, 123:85-94.
- Pelegri, P.B., Murad, A.M., Silva, L.P., dos Santos, R.C., Costa, F.T., Tagliari, P.D., Bloch Jr, C., Noronha, E.F., Miller, R.N., Franco, O.L. (2008) Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. *Peptides*, 29:1271-1279.
- Pelegri, P.B., Quirino, B.F., Franco, O.L. (2007) Plant cyclotides: An unusual class of defense compounds. *Peptides*, 28:1475-1481.
- 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 annuum* L. leaf and root antimicrobial peptides: antimicrobial activity against phytopathogenic microorganisms. *Acta Physiol Plant*. 40:107.
- Perrin, B.S., Pastor, R.W. (2016) Simulations of membrane-disrupting peptides I: alamethicin pore stability and spontaneous insertion. *Biophys J*. 111:1248-1257.
- Peschel, A. (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol*. 10:179-186.
- Poerio, E., Di Gennaro, S., Di Maro, A., Farisei, F. (2003) Primary structure and reactive site of a novel wheat proteinase inhibitor of subtilisin and chymotrypsin. *Biol Chem*. 384:295-304.
- Qi, R.F., Song, Z.W., Chi, C.W. (2005) Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biochim Biophys Sin*. 37:283-292.
- Quilis, J., López-García, B., Meynard, D., Guiderdoni, E., San Segundo, B. (2014) Inducible expression of a fusion gene encoding two proteinase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnol J*. 12: 367-377.

- Quilis, J., Meynard, D., Vila, L., Avilés, F.X., Guiderdoni, E., San Segundo, B. (2007) A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnol J.* 5:537-553.
- Ramos, V.S., Silva, G.S., Freire, M.G.M., Machado, O.L.T., Parra, J.R.P., Macedo, M.L.R. (2008) Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Plathymentia foliolosa* seeds. *J Agric Food Chem.* 56:11348-11355.
- Ramos, V.S., Souza, D.P., Gomes, M.T.R., Freitas, C.D.T., Carvalho, C.P.S., Júnior, P.A.V.R., Salas, C.E. (2014) A phytopathogenic cysteine peptidase from latex of wild rubber vine *Cryptostegia grandiflora*. *Protein J.* 33:99-209.
- Reis, A., Duval, A.M.Q., Inoue-Nagata, A.K., Ávila, A.C., Lopes, C.A. (2011) Manejo de doenças em pimentas no Brasil. Embrapa Hortaliças. II Encontro acional do Agronegócio Pimentas (*Capsicum spp.*).
- Revina, T.A., Gerasimova, N.G., Kladnitskaya, G.V., Chalenko, G.I., Valueva, T.A. (2008) Effect of proteinaceous proteinase inhibitors from potato tubers on the growth and development of phytopathogenic microorganisms. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 44:101-105.
- Ribeiro, S.F., Da Cunha, A.O., Rodrigues, M., Melo, V.M., Vasconcelos, I.M., Melo, E.J.T., Cruz, L.P., Gomes, V.M. (2007) Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicom*, 50:600-611.
- Ribeiro, S.F.F., Fernandes, K.V.S., Santos, S.S., Taveira, G.B., Carvalho, A.O., Lopes, J.L.S., Beltramini, L.M., Rodrigues, R., Vasconcelos, I.M., Da 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. *Biopolymers*,100:132-40.
- Ribeiro, S.F.F., Silva, M.S., Da Cunha, M., Carvalho, A.O., Dias, G.B., Rabelo, G., Mello, É.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. *A Van Leeuw.* 3:657-670.

- Richardson, M. (1974). Chymotryptic inhibitor I from potatoes. The amino acid sequence of subunit A. *Biochem J.* 137:101-112.
- Ridzuan, R., Rafii, M.Y.R., Ismail, S.I., Yusoff, M.M., Miah, G., Usman, M. (2018) Breeding for anthracnose disease resistance in chili: progress and prospects. *Int J Mol Sci.* 19:3122.
- Rocha, G.L., Fernandez, J.H., Oliveira, A.E.A., Fernandes, K.V.S. (2017) Programmed cell death-related proteases in plants. In: enzyme inhibitors and activators. Ed. Rijeka. Intech.
- Salvaudon, L., Heraldet, V., Shykoff, J. A. (2005) Parasite-host fitness trade-offs change with parasite identity: genotype-specific interactions in a plant-pathogen system. *Evolution*, 59:2518-2524.
- Santos, L.A., Taveira, G.B., Ribeiro, S.F.F., Pereira, L.S., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Oliveira, A.E.A.O., 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  $\alpha$ -amylase inhibitors and exhibit high antimicrobial activity against fungi of agronomic importance. *Protein Expr Purif.* 132:97-107.
- Schagger, 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.
- Schneider, T., Kruse, T., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A.K., Mygind, P.H., Raventós, D.S., Neve, S., Ravn, B., Bonvin, A.M., De Maria, L., Andersen, A.S., Gammelgaard, L.K., Sahl, H.G., Kristensen, H.H. (2010) Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor lipid II. *Science*, 328:1168-1172.
- Schrader-Fischer, G., Apel, K. (1994) Organ-specific expression of highly divergent thionin variants that are distinct from the seed-specific crambin in the crucifer *Crambe abyssinica*. *Mol Gen Genet.* 245:380-390.

- Scocchi, M., Mardirossian, M., Runti, G., Benincasa, M. (2016). Non-membrane permeabilizing modes of action of antimicrobial peptides on bacteria. *Curr Top Med Chem.* 16:76-88.
- Selitrennikoff, C.P. (2001) Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol.* 67:2883-2894.
- Shamsi, T.N., Parveen, R., Fatima, S. (2016) Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *Int J Biol Macromol.* 91:1120-1133.
- Shao, C., Tian, H., Wang, T., Wang, Z., Chou, S., Shan, A., Cheng, B. (2018) Central  $\beta$ -turn increases the cell selectivity of imperfectly amphipathic  $\alpha$ -helical peptides. *Acta Biomater.* 69:243-255.
- Shewry, P.R., Lafiandra, D., Salcedo, G., Aragoncillo, C. (1984) N-terminal amino acid sequence of chloroform/methanol-soluble proteins and albumins from endosperm of wheat, barley and related species. *FEBS Lett.* 175:359-363.
- Silva, M.S., Ribeiro, S.F.F., Taveira, G.B., Rodrigues, R., Fernandes, K.V.S., Vasconcelos, I.M., Carvalho, A.O., 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.G., Vasconcelos, I.M., Filho, A.J.U.B., Carvalho, A.F.U., Souza, T.M., Gondima, D.M.F., 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 Crops Prod.* 70:48-55.
- Silva, S.M., Koehnlein, E.A., Bracht, A., Castoldi, R., Morais, R.G., Baesso, M.L., Peralta, R.A., Souza, C.G.M., Sá-Nakanishi, B.A., Sá-Nakanishi, A.B., Peralta, R.M. (2014) Inhibition of salivary and pancreatic  $\alpha$ -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Food Res Int.* 56:1-8.
- Silvar, C., García-González, C.A. (2017) Screening old peppers (*Capsicum* spp.) for disease resistance and pungency-related traits. *Sci Hortic.* 218:249-257.

- Smith, P.K., Hermanson, G.T., Maallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Goeke, N.M., Oslon, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150:76-85.
- Soares, J.R., José Tenório de Melo, E., da Cunha, M., Fernandes, K.V.S., Taveira, G.B., da Silva Pereira, L., Pimenta, S., Trindade, F.G., Regente, M., Pinedo, M., de la Canal, L., Gomes, V.M., de Oliveira Carvalho, A. (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. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 1861:3429-3443.
- Spiller, F., Alves, M.K., Vieira, S.M., Carvalho, T.A., Leite, C.E., Lunardelli, A., Poloni, J.A., Cunha, F.Q., Oliveira, J.R. (2008). Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan and antigen-induced inflammation. *J Pharm Pharmacol.* 60:473-478.
- Stec, B. (2006) Plant thionins – the structural perspective. *Cell Mol Life Sci.* 63:1370-85.
- Steppek, G., Buttle, D.J., Duce, I., Lowe, A., Behnke, J.M. (2005) Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, in vitro. *Parasitology*, 130:203-211.
- Strukelj, B., Pungercar, J., Mesko, P., Barlic-Maganja, D. (1992) Characterization of aspartic proteinase inhibitors from potato at the gene, cDNA and protein levels. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 373:477-482.
- Sudré, C.P., Gonçalves, L.S., Rodrigues, R., Do Amaral, T., 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.
- Suzuki, A., Tsunogae, Y., Tanaka, I., Yamane, T., Ashida, T. (1987) The structure of Bowman-Birk type protease inhibitor A-II from peanut (*Arachis hypogaea*) at 3.3 - Å resolution. *J Biochem.* 101:267-274.

- Svensson, B., Fukuda, K., Nielsen, P.K., Bonsager, B.C. (2004) Proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, 1696:145-156.
- Taylor, R.H., Acland, D.P., Attenborough, S., Cammue, B.P., Evans, I.J., Osborn, R.W., Ray, J.A., Rees, S.B., Broekaert, W.F. (1997) A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J Biol Chem*. 272:24480-87.
- Talamini, V., Nunes, M.U.C. (2018) Estratégias de controle das principais doenças do tomateiro orgânico na região central de Sergipe. Embrapa, Aracaju, SE.
- Tam, J.P., Wang, S., Wong, K.H., Tan, W.L. (2015) Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*, 8:711-757.
- Tamm, B., Thurig, A., Fliessbach, A.E., Goltlieb, S., Karavani, Y.C., Coehn, L. (2011) Elicitors and soil management to induce resistance against fungal plant diseases. *NJAS – Wagen J Life Sc*. 58:131-137.
- Tang, S.S., Proadhan, Z.H., Biswasa, S.K., Lec, C.F., Sekarand, S.D. (2018) Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. *Phytochemistry*, 154:94-105.
- Taveira, G.B., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Trindade, F.G., Da Cunha, M., Gomes, V.M. (2016) Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. *BMC Microbiol*. 16:12.
- Taveira, G.B., Mathias, L.S., Vieira-da-Motta, O., Machado, O.L.T., Rodrigues, R., Carvalho, A.O., Ferreira, A.T., Perales, J., Vasconcelos, I.M., Gomes, V.M. (2013) Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Biopolymers*, 102:30-39.
- 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*. 27:38.

- Teixeira, V., Feio, M.J., Bastos, M. (2012) Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog Lipid Res.* 51:149-77.
- Terras, F.R.G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F. (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 7:573-88.
- Thevissen, K., Terras, F.R.G., Broekaert, W.F. (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensin inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol.* 65:5451-5458.
- Vallee, F., Kadziola, A., Bourne, Y., Juy, M., Rodenburg, K.W. (1998) Barley alpha-amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. *Structure*, 6:649-659.
- Van Zonneveld, M., Ramirez, M., Williams, D.E., Petz, M., Meckelmann, S., Avila, T., Bejarano, C., Ríos, L., Peña, K., Jager, M., Libreros, D., Amaya, K., Scheldeman, X. (2015) Screening genetic resources of *Capsicum* peppers in their primary center of diversity in Bolivia and Peru. *PLoS ONE*, 10:1-23.
- Vermelho, A.B., Pereira, A.F., Coelho, R.R.R., Souto-Padrón, T. (2006) Práticas de microbiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 239p.
- 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.* 47:716-29.
- Wahyuni, Y., Ballester, A.R., Tikunov, Y., Vos, R.C.H., Pelgron, T.B.K., Maharijaya, A., Sudarmonowati, E., Bino, J.R., Bovy, A.G. (2013) Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. *Metabolomics*, 9:130-144.
- Wang, G. (2015) Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol.* 1268:43-66.



- Wieczorek, M., Otlewski, J., Cook, J., Parks, K., Leluk, J. (1985) The squash family of serine proteinase inhibitors. Amino acid sequences and association equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zucchini, and cucumber seeds. *Biochem Biophys Res Commun.* 126:646-652.
- Yang, S., Yang, T., Tang, Y., Aisimutuola, P., Zhang, G., Wang, B., Li, N., Wang, J., Yu, Q. (2020) Transcriptomic profile analysis of non-coding RNAs involved in *Capsicum chinense* Jacq. fruit ripening. *Sci Hort.* 264:109158.
- Zahn, M., Berthold, N., Kieslich, B., Knappe, D., Hoffmann, R., Strater, N. (2013) Structural studies on the forward and reverse binding modes of peptides to the chaperone DnaK. *J Mol Biol.* 24:2463-2479.
- Zeng, H., Li, T., Tian, J., Zhang, L. (2018) TUBP1 protein lead to mitochondria-mediated apoptotic cell death in *Verticillium dahliae*. *Int J Biochem Cell Biol.* 103:35-44.
- Zhang, D., He, Y., Ye, Y., Ma, Y., Zhang, P., Zhu, H., Xu, N., Liang, S. (2019) Little antimicrobial peptides with big therapeutic roles. *Protein Pept Lett.* 26:564-578.
- Zhang, Z., Kang, S.S., Liu, X., Ahn, E.H., Zhang, Z., He, L., Michael, M., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Benskey, M.J., Manfredsson, F.P., Jin, L., Sun, Y.E., Wang, J.Z., Ye, K. (2017) Asparagine endopeptidase cleaves  $\alpha$ -synuclein and mediates pathologic activities in parkinson's disease. *Nat Struct Mol Biol.* 24:632-642.
- Zhao, X., Wu, H., Lu, H., Li, G., Huang, Q. (2011) LAMP: A database linking antimicrobial peptides. *PLoS One*, 25:908-912.
- Zhou, Q.J., Wang, J., Mao, Y., Liu, M., Su, Y.Q., Ke, Q.Z., Chen, J., Zheng, W.Q. (2019) Molecular structure, expression and antibacterial characterization of a novel antimicrobial peptide NK-lysin from the large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*, 500:315-321.