

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE PEPTÍDEOS DE FRUTOS DE *Capsicum chinense* JACQ SOBRE
FUNGOS DOS GÊNEROS *Colletotrichum* E *Fusarium*

LARISSA MAXIMIANO RESENDE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2020

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE PEPTÍDEOS DE FRUTOS DE *Capsicum chinense* JACQ SOBRE
FUNGOS DOS GÊNEROS *Colletotrichum* E *Fusarium*

LARISSA MAXIMIANO RESENDE

Dissertação 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 Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientadora: Prof.^a Valdirene Moreira Gomes

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

R433 Resende, Larissa Maximiano.

Caracterização bioquímica e atividade antimicrobiana de peptídeos de frutos de *Capsicum chinense* Jacq sobre fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium* / Larissa Maximiano Resende. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

62 f. : il.

Bibliografia: 41 - 47.

Dissertação (Mestrado 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. AMPs. 2. Fungos. 3. Inibição de crescimento. 4. Pimenta. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE PEPTÍDEOS DE FRUTOS DE *Capsicum chinense* JACQ SOBRE
FUNGOS DOS GÊNEROS *Colletotrichum* E *Fusarium*

LARISSA MAXIMIANO RESENDE

“Dissertação 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 Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:



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



Prof.^a Maura da Cunha (D.Sc em Ciências) - UENF



Dr.^a Érica de Oliveira Mello (D.Sc em Biociências e Biotecnologia) - UENF



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

DEDICATÓRIA

Dedico esta e todas as minhas demais conquistas aos meus amados pais
Marta e Paulo

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de capacitação acadêmica competente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa. E aos demais órgãos de fomento Faperj e CNPq, pelo financiamento de projetos de pesquisa. Sem esses proventos não seria possível o desenvolvimento, nem a dedicação a esta pesquisa.

À professora Valdirene Moreira Gomes, pela orientação paciente e firme, dedicada nessa jornada.

Às professoras Adriana Uchoa, Maura da Cunha e Érica Mello, por aceitarem participar da banca avaliadora deste trabalho. Em especial, agradeço à Érica, não apenas por esse ato, mas por participar ativamente de todas as etapas deste trabalho.

Ao professor André de Oliveira Carvalho, por todas as contribuições e dúvidas esclarecidas durante o processo de pesquisa.

Aos amigos de laboratório e grupo de pesquisa, agradeço a convivência agradável, pelas conversas e risadas descontraídas, que fizeram, muitas vezes, a rotina ser mais leve. Em especial às alunas Mariana, Layrana, Lídia, Marciele e ao Drº Gabriel Taveira, que contribuíram em alguns experimentos.

Às minhas amigas de república, Fernanda e Cida. Às amigas de hospedagem solidária, Danielle, Bárbara, Kevelin e Ariele. E aos amigos Roberta,

Ney, Kaliane e Cléo, que fiz através do programa de pós-graduação. Vocês fizeram essa jornada ser muito mais divertida! .

Às amigas de sangue e alma Jaqueline e Kátia Gomes, que sabem dar conselhos e puxões de orelha, que vibram a cada conquista.

À minha família, pelo incentivo, compreensão e amor que dispõem a todo momento, fazendo deste apoio a força que me sustentou em muitos momentos.

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 Deus por me abençoar e cuidar de cada detalhe da minha vida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características que influenciam no potencial e atividade antimicrobiana dos peptídeos (Corrêa et al., 2019).....	06
Figura 2: Exemplos de peptídeos de plantas ricos em cisteína. [família, nome, e (PDB ID)]. (A) Heveina-like, pB1 (5XBD), (B) α -Hairpinin, Tk-hefu (5LM0), (C) α -Hairpinin, nigellin-1.1(2NB2), (D) LTP, Ag-LTP (2N2Z), (E) LTP, Ps-LTP1 (2N81), (F) Defensina, HsAFP1 (2N2Q), (G) Defensina, Lc-def (2LJ7) and (H) Snakina, snakin-1 (5E5Q). A estrutura secundária está representada por cores diferentes: em vermelho, folhas β ; em azul, α -hélice; e em rosa, regiões de loops e voltas. (Campos et al., 2018).....	07
Figura 3: Interações entre peptídeos antimicrobianos e membranas citoplasmáticas. (Wang et al., 2019).....	11
Figura 4: Etapas do processo de extração de peptídeos dos frutos de <i>C. chinense</i> acesso UENF 1751.....	14
Figura 5: Visualização eletroforética em SDS-Page tricina mostrando o padrão proteico de baixo peso molecular do Extrato Rico em Peptídeos (ERP), obtido dos frutos de <i>C. chinense</i> , acesso UENF 1751. M – Marcador de massa molecular em kDa.....	22
Figura 6: Perfil cromatográfico do ERP em cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose. A fração D1 (básica) foi eluída com tampão de equilíbrio da coluna e a fração D2 (ácida) foi eluída com tampão de equilíbrio contendo 1 M de NaCl. Visualização eletroforética do gel de tricina na presença de SDS das frações D1 e D2 M – marcador de massa molecular em kDa.....	23

Figura 7: Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular da fração D2 (obtida em cromatografia de troca aniônica). A coluna foi equilibrada com tampão TFA 0,1 % em um fluxo 30 mL.h⁻¹. G1, G2, G3 e G4- Frações separadas por tempo de retenção na coluna. M- Marcador de massa molecular (Sigma-Aldrich).....

24

Figura 8: Alinhamento de resíduos de aminoácidos de peptídeos de frutos de *C. chinense*, UENF 1751, provenientes de amostras de G2 e G4, respectivamente. As sequências foram obtidas no Blast e alinhadas pelo Clustal Omega. (A) O peptídeo G2 com, aproximadamente, 6,5 kDa mostrou similaridade com as seguintes sequências: Inibidor da proteinase PSI-1.1 de *C. annuum* (ID da sequência: P56615.1); Inibidor 38 de proteinase do tipo Pin-II da cadeia A de *C. annuum* (ID da sequência: 5ZFO_A); Cadeia A, inibidor de quimotripsina C1 de *Nicotiana alata* (ID da sequência: 2JZM_A); e Inibidor de Batata da Cadeia I Pci-1 de *Solanum tuberosum* (ID da sequência: 4SGB_I). (B) A Banda proteica de massa molecular acima de 6,5 kDa foi similar a Proteína de Transferência de Lipídios não específica (ns-LTP) 1 semelhante a *C. annuum* (Sequência ID: XP_016559796.1); ns-LTP 1 de *C. annuum* (ID da sequência: KAF3652405.1); ns-LTP 1 de *C. annuum* (ID da sequência: PHT78915.1); e ns-LTP 1 de *C. annuum* (ID da sequência: XP_009761744.1). (C) A banda proteica de massa molecular abaixo de 6,5 kDa de G4 apresentou similaridade com ns-LTP 2 de *C. chinense* (ID da sequência: PHU06864.1); como ns-LTP2 de *Coffea eugenoides* (ID da sequência: XP_027178858.1); como ns-LTP2 de *Coffea arabica* (ID da sequência: XP_027079037.1); e ns-LTP 2 de *C. baccatum* (ID da sequência: PHT49897.1); P% indica a porcentagem de resíduos positivos (que apresentam as mesmas características físico-bioquímicas) e estão escritos em cinza. I% indica a porcentagem de resíduos idênticos e está escrito em itálico. Lacunas (-) foram introduzidas para melhor alinhamento.....

27

Figura 9: Efeito inibitório das frações G2, G3 e G4 (50 µg.mL⁻¹) sobre atividades de serino proteases. (A) Efeito inibitório das frações sobre a atividade da enzima tripsina. Controle-Tripsina (Sigma-Aldrich). (B) Efeito inibitório das frações sobre a atividade da enzima quimitripsina. Controle-Quimiotripsina (Sigma-Aldrich). %- porcentagem de inibição das frações. Os asteriscos indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey.....

28

Figura 10: Zimografia reversa em SDS-Page copolimerizado com gelatina 1% para identificação da inibição da protease tripsina pelas frações G2 e G3 de frutos de *C. chinense*, acesso UENF 1751. (A) G2 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (B) G2 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (C) G3 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (D) G3 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. 29

Figura 11: Efeito inibitório das frações G2, G3 e G4 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre a atividade extratos enzimáticos de α -amilase. (A) Ensaio com α -amilase do intestino dos insetos *T. molitor*. (B) Ensaio com extrato contendo α -amilase salivar humana. No controle positivo da inibição de α -amilase, foi utilizado EDTA 5mM. Os asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. 30

Figura 12: Inibição do crescimento dos fungos filamentosos após 48 horas de incubação com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações G2, G3 e G4. (%) Porcentagem de inibição causada pelas frações. Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle pelo teste de Tukey. 31

Figura 13: Imagens de microscopia de fluorescência do ensaio de detecção de permeabilização de membrana do fungo *F. oxysporum* após tratamento com a fração G3 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 48 horas. As células controle foram tratadas apenas com o corante SYTOX® Green, e as células de controle positivo foram submetidas a aquecimento a 100 °C. A seta branca aponta para alterações nas células dilatadas e rompidas. Abreviação: DIC, contraste de interferência diferencial. Barras = 20 μm 33

Figura 14: Imagens de microscopia de fluorescência do ensaio de detecção do aumento endógeno de ROS no fungo *F. oxysporum* após tratamento com a fração G3 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 48 horas. As células controle foram tratadas apenas com o corante 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate e as células de controle positivo foram tratadas com peróxido de hidrogênio 300 mM. Abreviação: DIC, contraste de interferência diferencial. Barras = 20 μm 34

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Peptídeos antimicrobianos de plantas	5
3.2. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Cultivo das plantas.....	13
4.2. Extração de proteínas dos frutos	13
4.3. Cromatografia de troca aniônica em resina DEAE-Sepharose	15
4.4. Cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-50	15
4.5. Quantificação de proteínas	15
4.6. Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS	16
4.6.1. Preparo das amostras e condições da corrida	16
4.6.2. Coloração com Coomassie Blue e descoloração do gel.....	16
4.6.3. Precipitação de proteínas com nitrato de prata em gel de tricina	17
4.7. Sequenciamento de aminoácidos presentes das proteínas.....	17
4.8. Ensaio de inibição enzimática tripsina e quimiotripsina	18
4.9. Detecção da inibição de protease por zimográfica reversa.....	18

4.10.	O ensaio de inibição da atividade enzimática para α -amilases	18
4.11.	Ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido.....	20
4.12.	Ensaio de determinação de permeabilização de membranas fúngicas	20
4.13.	Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio intracelular	21
4.14.	Análise estatísticas	21
5.	RESULTADOS	22
5.1.	Perfil eletroforético do extrato proteico de <i>C. chinense</i>	22
5.2.	Fracionamento de peptídeos do extrato total de frutos	23
5.3.	Purificação de proteínas presentes na fração D2	23
5.4.	Sequenciamento das proteínas presentes nas frações G2 e G4 por espectrometria de massas	25
5.5.	Efeito das frações sobre a atividade das proteases tripsina e quimiotripsina.....	28
5.6.	Zimografia reversa	29
5.7.	Efeito das frações sobre a atividade extratos enzimáticos de α -amilase .	29
5.8.	Potencial de inibição de crescimento de fungos filamentosos	30
5.9.	Ensaio para verificação da permeabilização de membranas dos fungos filamentosos.....	32
5.10.	Ensaio para verificação da indução das espécies reativas de oxigênio (ROS) 34	
6.	DISCUSSÃO	35
7.	CONCLUSÕES	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

RESENDE, Larissa Maximiano; MS.c.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2020; Caracterização bioquímica e atividade antimicrobiana de peptídeos de frutos de *Capsicum chinense* Jacq sobre fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*; Orientadora: Valdirene Moreira Gomes; Conselheiros: Érica de Oliveira Mello e Clícia Grativol Gaspar de Matos.

Fungos fitopatogênicos causam grandes problemas para a agricultura e a economia global. Como uma propostas de controle de doenças fúngicas, os peptídeos antimicrobianos de plantas (AMPs) têm despertado grande interesse. por serem moléculas naturais com amplo espectro de atividade inibitória sobre microrganismos. Este trabalho objetivou identificar os peptídeos antimicrobianos presentes em frutos de *C. chinense* Jaq., acesso UENF 1751, caracterizar suas atividades biológicas e avaliar o potencial de inibição do crescimento e mecanismo de ação sobre fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*. O pericarpo dos frutos foi submetido a etapas de extração e purificação de peptídeos em cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular. A caracterização dos peptídeos foi feita por eletroforese em gel de acrilamida e espectrometria de massas. Para avaliação das atividades biológicas das frações, foram feitos ensaios de inibição de atividades enzimáticas e crescimento de esporos de fungos, com identificação de alterações morfológicas e possíveis mecanismos de ação dos peptídeos. O extrato rico em peptídeos, após ser submetido à cromatografia de troca aniônica, foi separado em duas frações: a

fração básica chamada de D1 e a fração ácida chamada de D2. A fração ácida apresentou maior potencial de inibir o crescimento de fungos e foi submetida à cromatografia de exclusão molecular. As frações obtidas foram denominadas G1, G2, G3 e G4. A banda majoritária de 6,0 kDa da fração G2 e as duas bandas proteicas (acima de 6,5 kDa e abaixo de 6,5 kDa) da fração G4 foram submetidas ao sequenciamento de aminoácidos por espectrometria de massas. Resíduos obtidos da banda da fração G2 foram semelhantes a inibidores de serino proteases da família II da batata. A banda proteica de massa molecular acima de 6,5 kDa da fração G4 apresentou similaridade com uma LTP do tipo I e a de massa molecular abaixo de 6,5 kDa da fração G4, com uma LTP do tipo II. Para caracterizar a atividade biológica das frações G2, G3 e G4, foram feitos ensaios de inibição de atividade tripsina, quimiotripsina e α -amilase. Apenas as frações G2 e G3 foram capazes de inibir a atividade da enzima tripsina em 100% e 54%, respectivamente. Nos ensaios de inibição de quimiotripsina, apenas a fração G2 apresentou inibição significativa de 85%. As frações G2 e G4 também foram capazes de inibir em 100% α -amilase salivar humana e α -amilase do intestino dos insetos *Tenebrio molitor*. As frações foram posteriormente submetidas a ensaios de inibição de crescimento com fungos filamentosos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*. A fração G2 não foi capaz de inibir o crescimento de nenhum dos fungos testados. A fração G3 apresentou inibição significativa para todos os fungos testados e foi capaz de causar permeabilização da membrana plasmática e indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *F. oxysporum*. A fração G4 apresentou inibição para os fungos *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum*. Sendo assim, a pimenta *Capsicum chinense* UENF1751 tem AMPs das famílias das LTPs, Inibidores de proteases, e também apresenta na fração G3 peptídeos com potencial de inibição de fungos filamentosos.

Palavras chaves: AMPs; Fungos; Inibição.

ABSTRACT

RESENDE, Larissa Maximiano; MS.c.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February de 2020; Biochemical characterization and antimicrobial activity of peptides fruits of *Capsicum chinense* Jacq fruits in fungi of the genus *Colletotrichum* and *Fusarium*; Advisor: Valdirene Moreira Gomes; Committee members: Érica de Oliveira Mello and Clícia Grativol Gaspar de Matos.

Phytopathogenic fungi cause major problems for agriculture and the global economy. As a proposal to control fungal diseases, plant antimicrobial peptides (AMPs) have been of great interest. for being natural molecules and with a broad spectrum of inhibitory activity on microorganisms. This work aimed to identify the antimicrobial peptides present in fruits of *C. chinense* Jaq. access UENF 1751, characterize its biological activities and evaluate the growth inhibition potential and mechanism of action on fungi of the genera *Colletotrichum* and *Fusarium*. The fruit pericarp was subjected to peptide extraction and purification steps in anion exchange and molecular exclusion chromatography. The peptides were characterized by acrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. In order to evaluate the biological activities of the fractions, tests were performed to inhibit enzymatic activities and the growth of fungal spores, with identification of morphological changes and possible mechanisms of action of the peptides. The extract rich in peptides after being subjected to anion exchange chromatography was separated into two fractions, the basic fraction called D1 and the acidic fraction called D2. The acidic fraction had the greatest potential to inhibit the growth of fungi and was subjected to molecular exclusion chromatography. The

fractions obtained were named G1, G2, G3 and G4. The major band of 6.0 kDa of the G2 fraction and the two protein bands (above 6.5 kDa and below 6.5 kDa) of the G4 fraction were subjected to amino acid sequencing by mass spectrometry. Residues obtained from the G2 fraction band were similar to inhibitors of potato II family serine proteases. The protein band with molecular mass above 6.5 kDa of the G4 fraction showed similarity to a type I LTP, and the molecular mass below 6.5 kDa of the G4 fraction with type II LTP. In order to characterize the biological activity of the G2, G3 and G4 fractions, tests for inhibition of trypsin, chymotrypsin and α -amylase activity were performed. Only fractions G2 and G3 were able to inhibit the activity of the enzyme trypsin by 100% and 54%, respectively. In chymotrypsin inhibition assays, only the G2 fraction showed a significant inhibition of 85%. Fractions G2 and G4 were also able to inhibit 100% human salivary α -amylase and α -amylase from the intestine of *Tenebrio molitor* insects. The fractions were subsequently subjected to growth inhibition tests with filamentous fungi of the genera *Colletotrichum* and *Fusarium*. The G2 fraction was not able to inhibit the growth of any of the tested fungi. The G3 fraction showed significant inhibition for all tested fungi and was able to cause plasma membrane permeabilization and the induction of reactive oxygen species (ROS) in *F. oxysporum*. The G4 fraction showed inhibition for the fungi *C. lindemuthianum* and *F. oxysporum*. Thus, the *Capsicum chinense* pepper UENF1751 has AMPs from the families of LTPs, protease inhibitors and also presents peptides with the potential to inhibit filamentous fungi in the G3 fraction.

Keywords: AMPs; Fungi; Inhibition.

1. INTRODUÇÃO

Doenças provocadas por fungos em plantas causam grandes problemas para a agricultura, afetando a economia de países que têm o agronegócio como parte importante de sua economia. Esses prejuízos podem acontecer desde as etapas de venda de sementes até etapas finais de consumo, visto que o patógeno poder ficar em forma de esporos até encontrar fatores físicos e químicos favoráveis para seu desenvolvimento e reprodução (Fones et al., 2017).

Algumas ações podem ser empreendidas para controlar o aparecimento e a epidemia de doenças fúngicas. Como medidas de controle, recomenda-se aplicar boas práticas agrícolas para o manejo integrado de doenças como: uso de sementes de qualidade e de procedência conhecida, como medida para controlar fungos que já estejam na semente e proteger a planta jovem de patógenos que estejam no solo; fazer rotação de culturas para eliminar restos de plantio e plantas daninhas no campo que possam ser hospedeiras de inóculos fúngicos; aplicar práticas de nutrição e balanceamento do solo, evitando um grande aporte de nitrogênio ou desbalanço de outros compostos importantes para defesa inata da planta; e utilizar agentes fungicidas. Este é o método de manejo químico de doenças de plantas mais utilizado e com maior eficiência em grandes extensões cultivadas. No entanto, o uso de fungicidas na agricultura e a liberação de seus rejeitos causam impactos ao ambiente e à saúde humana (Talamini e Nunes, 2018).

Os principais fungicidas químicos atualmente utilizados pertencem à classe dos azóis, que têm como alvo a biossíntese de ergosterol, as equinocandinas, que inibem a biossíntese da parede celular dos fungos agindo como inibidores não competitivos da (1,3) - β -D-glucana sintase, e os polienos, que formam um agregado extramembranoso que extrai ergosterol na membrana celular dos fungos, levando à lise celular (Revie et al., 2018).

Estes compostos podem ser aplicados individualmente ou de forma combinada com outros agentes químicos, com reaplicações periódicas para garantir maior sucesso no controle da doença (Spader et al., 2013; Camiletti et al., 2016; Ayoub et al., 2018). Contudo, devido à plasticidade genética dos fungos e à capacidade de adaptação fisiológica, estão surgindo cepas resistentes a altos níveis dos agroquímicos já utilizados (Sharma e Chowdhary, 2017).

Entre os mecanismos de resistência apresentados pelos patógenos, podemos incluir a formação de biofilmes, modificação de alvos da membrana, modificação de rotas metabólicas, eliminação dos componentes antifúngicos por bombas de efluxos, encapsulamento das moléculas quando em contato com o citoplasma e outros mecanismos ainda não completamente elucidados (Hokken et al., 2019).

Diante destes fatos, fica evidente a necessidade de busca por novas moléculas com potencial para serem utilizadas no controle de doenças fúngicas para garantir segurança na biodiversidade, na agricultura e na saúde.

Os peptídeos antimicrobianos - AMPs (do inglês *antimicrobial peptides*) de plantas são moléculas naturais, componentes do sistema de defesa das plantas, considerados potenciais agentes terapêuticos. Eles ganharam considerável atenção em pesquisas em razão de suas características específicas, como a baixa toxicidade às células de mamíferos, amplo espectro antimicrobiano, rápido modo de ação e, por serem de fonte biológica, podem ser causar menor contaminação no meio ambiente (Das et al., 2019).

Nos últimos anos, trabalhos referentes à caracterização de diferentes peptídeos envolvidos na defesa da planta têm sido desenvolvidos, especialmente em espécies do gênero *Capsicum*. Silva et al. (2014) mostraram que frutos maduros de *Capsicum chinense*, acesso 1751, não desenvolveram sintomas de infecção após a inoculação com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Buscando elucidar a presença de AMPs na pimenta de *C. chinense*, UENF 1751, Resende (2018) identificou uma fração com elevado potencial de inibição dos fungos *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum*. Contudo, tendo a identidade das proteínas presentes nessa fração permanece desconhecida, sendo um dos alvos principais deste trabalho.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar os peptídeos presentes na fração ácida do extrato rico em peptídeos de frutos de *C. chinense* Jaq., acesso UENF 1751, identificar suas atividades biológicas e avaliar o potencial de inibição do crescimento e mecanismo de ação sobre fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*.

2.2. Objetivos Específicos

- Purificar peptídeos presentes na fração ácida do extrato rico em peptídeos de frutos de *C. chinense* Jaq., acesso UENF 1751;
- Determinar bioquimicamente a massa molecular de peptídeos de frutos de *C. chinense*, acesso UENF1751;
- Analisar a atividade das frações obtidas sobre as atividades enzimáticas de serino proteases e α -amilases;
- Avaliar o potencial antifúngico das frações peptídicas sobre os fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*;
- Identificar a permeabilização de membranas citoplasmática em hifas do fungo *F. oxysporum* tratadas com a fração peptídica G3;
- Detectar o aumento endógeno de espécies reativas de oxigênio nas hifas do fungo *F. oxysporum* tratadas com a fração peptídica G3.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1. Peptídeos Antimicrobianos de Plantas

A busca por novas moléculas com potencial biotecnológico para utilização no controle de doenças fúngicas tem sido intensificada nos últimos anos, e os AMPs têm sido considerados moléculas promissoras no controle desses patógenos (Mahlapuu et al., 2016)

Os AMPs pertencem a um grupo diversificado de proteínas que foram conservadas evolutivamente, estando, portanto, presentes em organismos procariotos e eucariotos. São pequenas moléculas naturais ricas em resíduos de cisteínas que podem ser sintetizadas de forma constitutiva, ou induzidas a atuar como resposta defensiva ao ataque de patógenos (Campos et al., 2018).

Esses peptídeos apresentam amplo espectro de ação, podendo causar morte ou inibição da atividade de vírus, bactérias, fungos (filamentosos e unicelulares), protozoários e nematódeos. Podem atuar diretamente na morte do patógeno ou modular seu sistema de defesa, ativando outros componentes de defesas induzidas (Mahlapuu et al., 2016).

Os AMPs têm aproximadamente de 10 a 100 resíduos de aminoácidos, massa molecular inferior a 10 kDa, são anfipáticos, com carga global líquida positiva em pH fisiológico. Outra característica também importante dos AMPs é a presença de resíduos de cisteínas, em números pares (4, 6 ou 8), que se encontram interconectadas, formando pontes de dissulfeto, conferindo estabilidade a altas temperaturas e atividades enzimáticas (Zhu et al., 2017;

Campos et al., 2018). O conjunto desses fatores influenciam a interação eletroestática dos AMPs com a membrana citoplasmática dos patógenos, composta de fosfolipídios carregados negativamente, que é um de seus primeiros alvos de interação, e qualquer mudança nesses parâmetros pode afetar profundamente sua atividade (Campos et al., 2018).

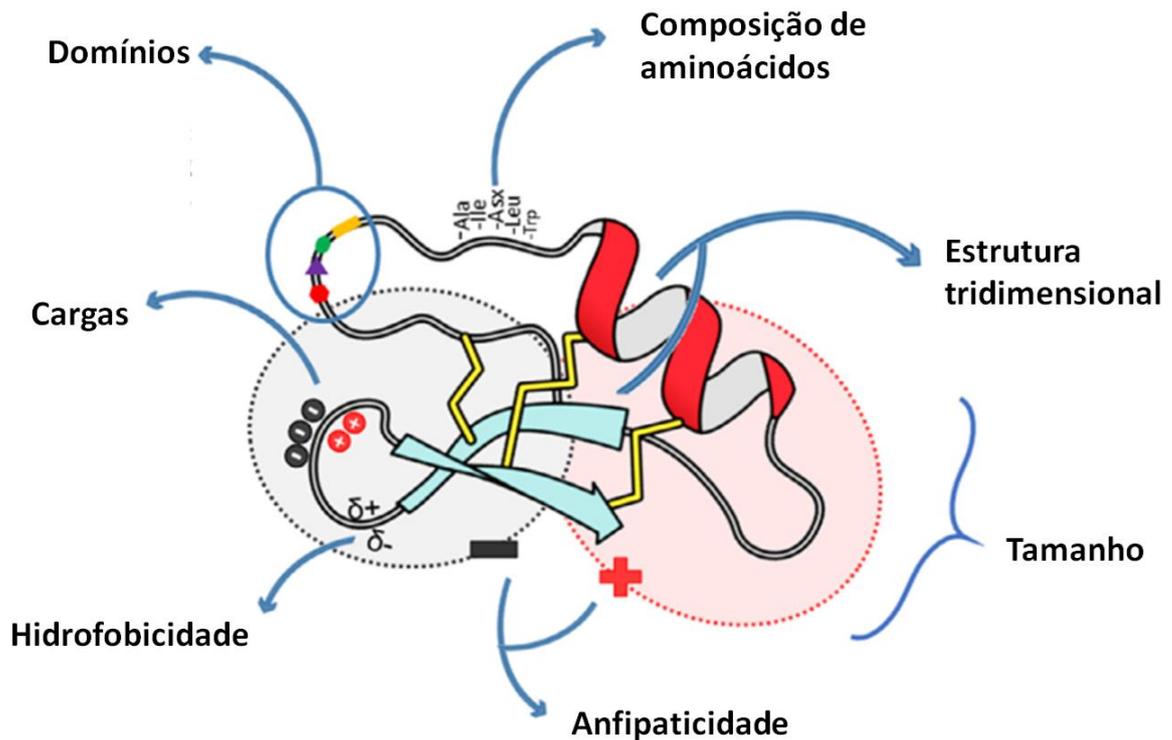


Figura 1: Características que influenciam no potencial e atividade antimicrobiana dos peptídeos (Corrêa et al., 2019).

Os AMPs podem apresentar estruturas tridimensionais diversificadas compostas por α -hélices, folhas β , podem ser cíclicos ou lineares, ou ainda formar uma estrutura composta ligada por loops, estabilizada por pontes de dissulfeto. São divididos em famílias considerando não exclusivamente a homologia de sequência de aminoácidos, mas, sim, a conservação de resíduos de cisteínas em posições específicas e seu arranjo estrutural (Koehebach e Craik, 2019).

As principais famílias de AMPs são as tioninas, as defensinas, os peptídeos tipo heveínas, as knotinas, as proteínas transportadoras de lipídeos

(LTPs), as snakinas, os inibidores de proteases e os ciclotídeos (Koehbach e Craik, 2019).

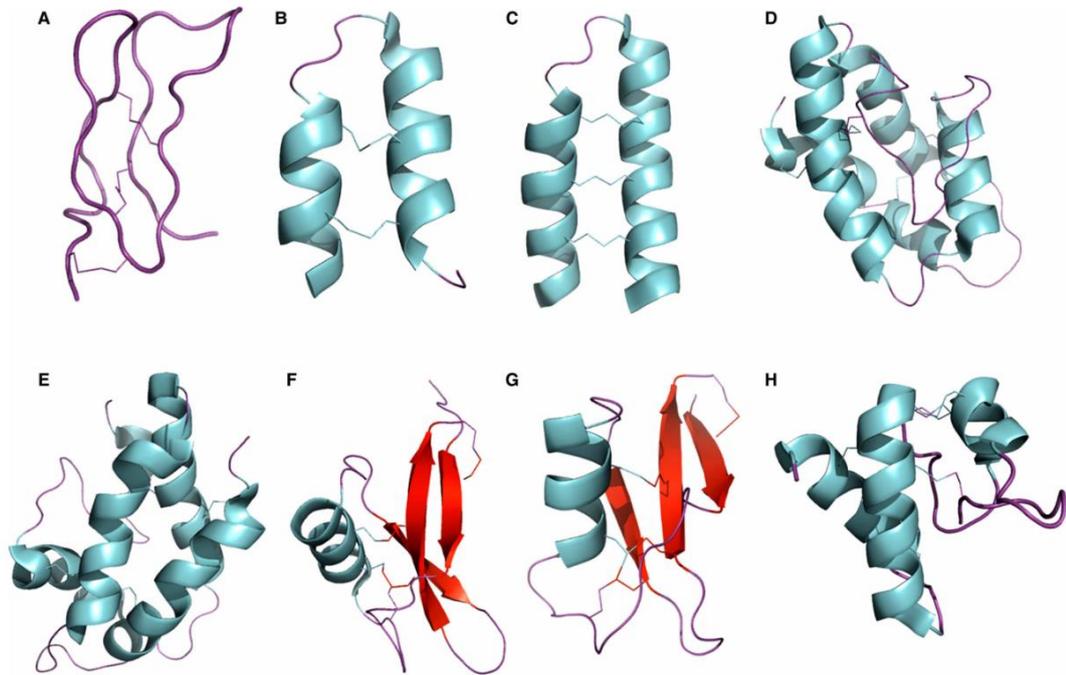


Figura 2: Exemplos de peptídeos de plantas ricos em cisteína. [família, nome, e (PDB ID)]. (A) Heveina-like, pB1 (5XBD), (B) α -Hairpinin, Tk-hefu (5LM0), (C) α -Hairpinin, nigellin-1.1(2NB2), (D) LTP, Ag-LTP (2N2Z), (E) LTP, Ps-LTP1 (2N81), (F) Defensina, HsAFP1 (2N2Q), (G) Defensina, Lc-def (2LJ7) and (H) Snakina, snakin-1 (5E5Q). A estrutura secundária está representada por cores diferentes: em vermelho, folhas β ; em azul, α -hélice; e em rosa, regiões de loops e voltas. (Campos et al., 2018).

Algumas famílias de peptídeos já foram extensivamente estudadas, como as defensinas, que são peptídeos de carga positiva (catiônicas) com 45-54 resíduos de aminoácidos e massa molecular entre 5 e 8 kDa. A estrutura terciária apresenta em sua maioria uma α -hélice e três folhas β - antiparalelas, estabilizadas por pontes de dissulfeto entre cisteínas. As regiões CS α / β (motif de folha β de hélice α), α -core (conexão entre a primeira cadeia β à hélice α) e γ -core (loop que liga as cadeias 2 e 3 -L β 2 β 3) são altamente conservadas e apresentam importância na atividade biológica dessas proteínas. Elas têm potente atividade

contra uma ampla gama de patógenos e baixa toxicidade para células de mamíferos (Cools et al., 2017).

Recentemente, alguns trabalhos apontaram a capacidade antitumoral para defensinas. Figueira et al. (2017) identificaram que a defensina PvD1 (*Phaseolus vulgaris*) tem atividade contra células tumorais, induzindo nestas células eventos apoptóticos, interferindo também no processo de metástase, impedindo a adesão das células tumorais a células cerebrais endoteliais.

As LTPs são peptídeos catiônicos com estrutura terciária formada por α -hélices e uma cavidade hidrofóbica, sustentada por pontes de dissulfeto. Desempenham funções fisiológicas como auxílio no transporte de lipídeos intracelular, na deposição de cera ou cutina nas paredes celulares, resposta ao estresse abiótico, atividade antimicrobiana, entre outras (Yeats e Rose, 2008; Odintsova et al., 2019).

Elas podem ser subdivididas em dois grupos de acordo com a massa molecular que a proteína madura apresenta. As LTPs do tipo 1 (LTPs1), que apresentam massa molecular próxima a 9 kDa, quatro α -hélices conectadas por voltas e um braço flexível da porção C-terminal, que finaliza a cavidade hidrofóbica. As LTPs do tipo 2 (LTPs2) apresentam massa molecular em torno de 7 kDa, alto ponto isoelétrico, três α -hélices e duas voltas simples na região C-terminal, a cavidade hidrofóbica formada na estrutura terciária é mais compacta quando comparada com a mesma região na LTPs1 (Edstam et al., 2011).

As LTPs apresentam também um amplo espectro antimicrobiano, mas o mecanismo de ação ainda não está completamente descrito. Sugere-se que elas interajam com os fosfolipídios da membrana citoplasmática, causando sua permeabilização (Carvalho e Gomes, 2007; Bard et al., 2016). Regente et al. (2005) mostraram pela primeira vez que uma LTP isolada de girassol, HaAP10, foi capaz de permeabilizar a membrana plasmática do fungo *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, isolado 3122. E desde então outros trabalhos mostraram a atividade antifúngica das LTPs (Regente e de la Canal, 2000; Nishimura et al., 2008; Zottich et al., 2011; Diz et al., 2011; Bogdanov et al., 2016).

As tioninas são peptídeos básicos de massa molecular de, aproximadamente, 5 kDa, com ponto isoelétrico maior ou igual a 8. Sua estrutura primária é rica em resíduos de arginina, cisteínas e lisinas. A estrutura terciária das tioninas é bem conservada, apresenta duas folhas- β e duas α -hélices

antiparalelas. Inicialmente, essa família era dividida em α -/ β -tioninas e γ -tioninas, no entanto, pela sua alta similaridade estrutural com as defensinas e diferenciação estrutural das α -/ β -tioninas, o segundo grupo foi renomeado com defensinas de plantas (Stec, 2006).

As tioninas podem desempenhar um papel importante no mecanismo de defesa da plantas contra patógenos. Já foi relatada atividade tóxica para bactérias, fungos, larvas de inseto e células de mamíferos (Kramer et al., 1979; Taveira et al., 2014a). Em razão da característica anfipática dessas moléculas, ocorre uma forte interação com as membranas citoplasmáticas, o que sugere ser um dos seus mecanismos de ação a formação de poros na membrana (Florack e Stiekema, 1994; Stec, 2006).

Os inibidores de protease produzidos pelas plantas, além de suas funções fisiológicas regulatórias, também desempenham papel importante na defesa contra herbívoros e microrganismos patogênicos (Clemente et al., 2019).

Eles podem ser agrupados quanto à sua origem biológica e à enzima que inibem, considerando o tipo de sítio reativo específico presente. As quatro principais famílias são os inibidores de protease cisteínicas, os inibidores de metaloproteases, os inibidores de protease aspártica e os inibidores de proteases serínicas, sendo esse último grupo um dos mais estudados (Laskowski e Kato, 1980).

Os inibidores de proteases serínicas podem ainda ser subdivididos em grupos de acordo com a homologia na sequência de resíduos de aminoácidos, localização de resíduos de cisteínas, que formam pontes de dissulfeto, localização de sítio reativo e massa molecular. Os principais inibidores de proteases serínicas conhecidos são inibidores do tipo Kunitz, inibidores Bowman-Birk, inibidores do tipo I e II de batata, inibidores tripsina/ α -amilase de cereais, de abóbora, de mostarda, entre outros (Christeller e Laing, 2005).

Atividades antifúngicas de inibidores já foram relatadas em diversos trabalhos (Araújo et al., 2019; Bleackley et al., 2017; Ribeiro et al., 2013; Giudici et al., 2000; Silva et al., 2017; Zhang et al., 2020). O mecanismo de ação é dependente de características da molécula inibidora. Sugere-se que os inibidores podem exercer sua atividade pela inibição de proteases produzidas por microrganismos, causando redução na disponibilidade de nutrientes para seu desenvolvimento. Por outro lado, alguns trabalhos sugerem que características de

carga líquida positiva que essas proteínas têm possam atuar sobre a membrana fúngica, afetando sua permeabilidade, como já foi descrito para outros peptídeos como as tioninas (Giudici et al., 2000).

Nos últimos anos, diferentes AMPs foram identificados em pimentas do gênero *Capsicum*. Diz et al. (2006) isolaram um peptídeo com alta homologia à LTP em sementes de *Capsicum annuum*; Ribeiro et al. (2007) isolaram e caracterizaram bioquimicamente um inibidor de proteinase presente em sementes de pimenta; Taveira et al. (2014) isolaram um peptídeo de frutos de *Capsicum annuum*, denominado CaThi, que mostrou alta similaridade com tioninas de plantas. Em estudos que buscaram elucidar o mecanismo de ação do peptídeo, CaThi, Taveira et al. (2017) relataram que o peptídeo causa a morte do fungo *F. solani*, via apoptose e sugerem que um alvo intracelular pode estar envolvido. Silva et al. (2017) identificaram um inibidor de tripsina (CaTI) em sementes de pimenta *C. annuum*, que foi capaz de inibir o crescimento e causar permeabilização de membrana citoplasmática nos fungos *C. lindemuthianum* e *C. gloeosporioides*. Em fungos do gênero *Fusarium*, causou aumento de espécies reativas de oxigênio e alterações morfológicas nas hifas. Maracahipes et al. (2019a) identificaram um peptídeo induzido em frutos de *C. annuum*, denominado CaDef1, que apresentou alta similaridade com outras defensinas de plantas com capacidade de inibição do fungo *C. gloeosporioides*.

3.2. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos

O mecanismo de ação que os AMPs apresentam para inibir ou causar a morte do patógeno ainda não está completamente elucidado para todos os microrganismos e peptídeos. Alguns modelos com base em estudos com defensinas já foram propostos para bactérias e, às vezes, podem ser extrapolados para fungos. Alguns trabalhos apontam que o primeiro alvo de interação do peptídeo ocorre com a membrana citoplasmática (Corrêa et al., 2019).

Os peptídeos que se encontram no meio extracelular se acumulam na superfície da membrana pela interação de cargas entre os peptídeos (catiônicos e anfipáticos) e os fosfolipídios (Figura 3). Na sequência, interagem com a membrana, causando distúrbios na organização dos fosfolipídios. Alguns modelos baseados em estudos com células bacterianas foram propostos para explicar o

mecanismo de interação dos peptídeos com a membrana plasmática (Wang et al., 2019).

No modelo barril revestido, o poro é formado pela inserção de peptídeos na membrana citoplasmática de forma que as regiões hidrofóbicas dos AMPs interajam com as caudas apolares dos fosfolipídios, sendo assim, no interior do poro ficam apenas as regiões polares dos AMPs, formando um poro transmembranar revestido de peptídeos. Outro modelo em que há formação de poros na membrana é conhecido como poro Toroidal, onde as ligações de regiões polares entre peptídeos de forma perpendicular com os fosfolipídios provocam modificações na estrutura da membrana citoplasmática, causando-lhe uma curvatura. Em outros casos, o peptídeo pode atuar também como um detergente, acumulando-se paralelamente à membrana, e sua interação com os fosfolipídios causa desnaturação da membrana em micelas, sendo este modelo conhecido como modelo “tapete” (Wang et al., 2019; Corrêa et al., 2019).

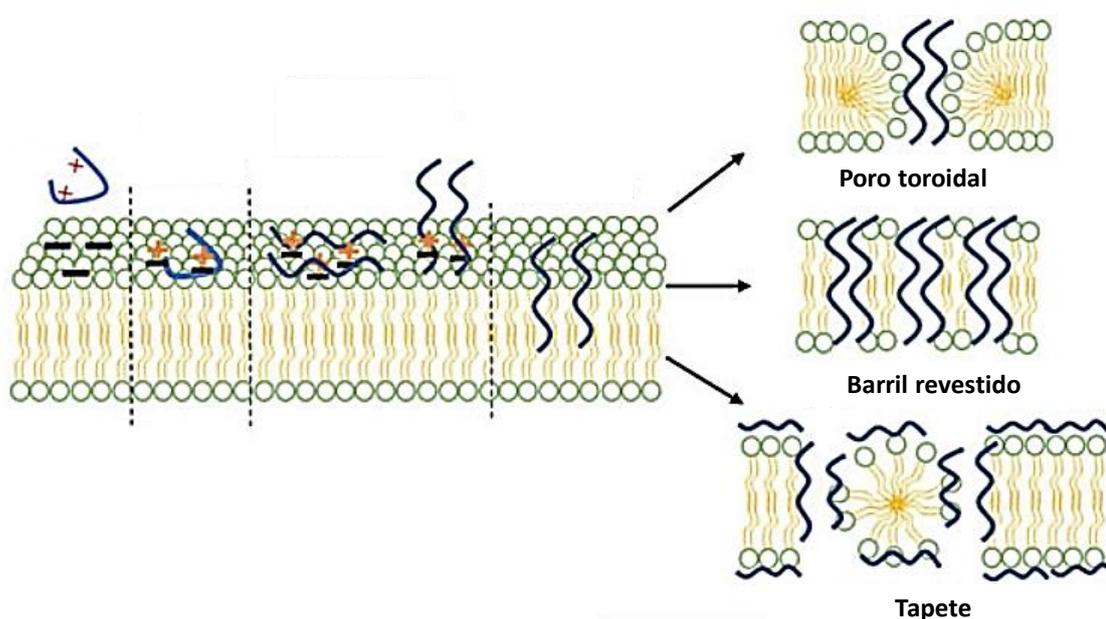


Figura 3: Interações entre peptídeos antimicrobianos e membranas citoplasmáticas. (Wang et al., 2019)

Em alguns casos, o peptídeo não promove formação de um poro fixo. A translocação do AMP pela membrana ocorre transiente. Com sua internalização

no citoplasma da célula, interage com alvos intracelulares, interferindo em processos celulares como inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas, atua como inibidor de proteases, na síntese da parede celular ou ainda causando danos à membrana mitocondrial e aumento da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS), agindo em alvo específico ou desencadeando uma cascata de eventos que podem levar à morte celular e a perturbações na membrana citoplasmática (Corrêa et al., 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultivo das plantas

Sementes de *C. chinense*, acesso UENF 1751, foram semeadas em copos de 250 mL, contendo substrato comercial organovegetal Vivatto®, mantidas em câmara de crescimento a 28 °C para sua germinação. Foram semeadas duas sementes por copo e, após a germinação, que ocorreu em torno de 15 dias, foi feita a separação das plântulas, deixando apenas uma plântula por copo. O transplântio para vasos em casa de vegetação foi feito quando as mudas apresentavam dois pares de folhas definitivas. O aparecimento de frutos ocorreu em torno de 120 dias após o transplântio. A colheita foi feita nos frutos maduros, com, aproximadamente, 50 dias após a antese. As plantas foram irrigadas uma vez ao dia.

4.2. Extração de proteínas dos frutos

Os frutos maduros de *C. chinense* foram colhidos no período de aproximadamente 50 dias após a antese. Com auxílio de um bisturi, foram retiradas as sementes, e o pericarpo, submetido à extração de proteínas, segundo metodologia descrita por Taveira et al. (2014).

Primeiro, o pericarpo foi triturado em tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,01 M, NaH_2PO_4 0,015 M, KCl 0,1 M e EDTA 1,5 %) pH 5,4 na proporção de 1:4 (m/v). Em seguida, foi acondicionado sob agitação por 2 horas a 4 °C. O homogeneizado foi centrifugado a 7197 x g por 45 minutos a 4 °C. O sedimentado

foi descartado e o sobrenadante, submetido à precipitação de proteínas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 70 % de saturação por 16 horas, a 4 °C. Após esse período, o material foi novamente submetido à centrifugação a 7197 x g por 45 minutos a 4 °C, e o precipitado resultante foi suspenso em 15 mL de água destilada e aquecido a 80 °C por 15 minutos. Após a etapa de desnaturação de proteínas de alto massa molecular, a amostra foi submetida a mais uma etapa de centrifugação de 7197 x g por 30 minutos a 4 °C, e o sobrenadante obtido foi dialisado em água destilada por 72 horas, com trocas periódicas. Ao final, o extrato rico em peptídeos (ERP) foi concentrado por liofilização (Figura 3).

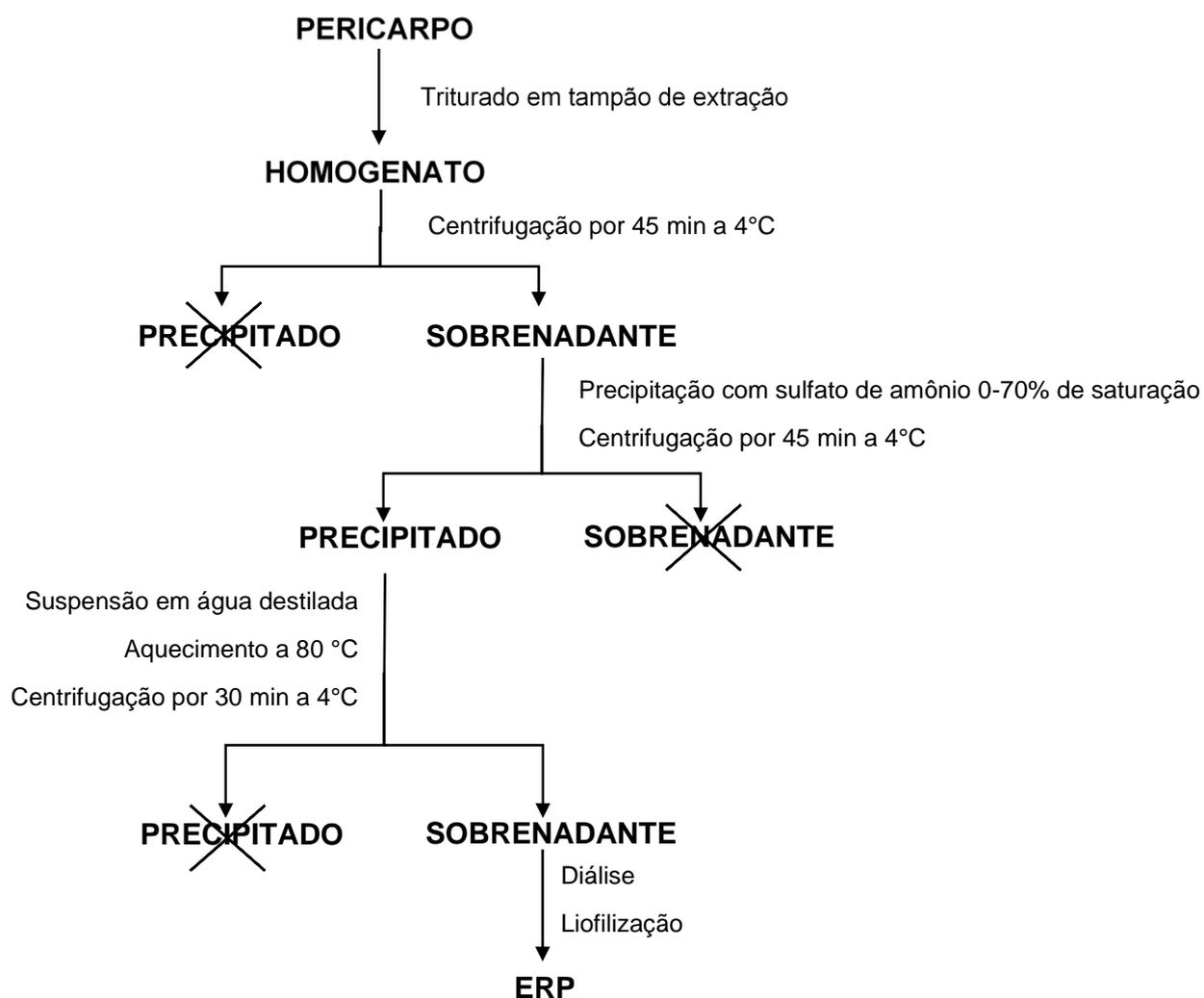


Figura 4: Etapas do processo de extração de peptídeos dos frutos de *C. chinense* acesso UENF 1751.

4.3. Cromatografia de troca aniônica em resina DEAE-Sepharose

Uma coluna de vidro (2,3 x 20 cm) foi preparada com 50 mL de resina de troca aniônica DEAE-Sepharose Fast Flow (GE). A coluna foi montada sob a ação da gravidade. A resina empacotada foi lavada com 200 mL de água destilada, em seguida, com 150 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, novamente 200 mL de água destilada, 150 mL de ácido clorídrico 0,1 M e novamente 200 mL de água destilada. Assim, com a resina ativada, foi, em seguida, equilibrada com o tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0. Com a coluna preparada, 30 mg do ERP foram diluídos em 10 mL do tampão Tris-HCl, centrifugado a 14 000 x *g* por 3 minutos em temperatura ambiente, tendo o sobrenadante sido aplicado sobre a resina. Foram coletadas frações de 3 mL em fluxo de 60 mL.h⁻¹. As primeiras 25 frações foram eluídas com tampão Tris-HCl e, em seguida, feita a eluição das proteínas retidas com tampão Tris-HCl, acrescido de 1 M de NaCl. As absorvâncias das frações foram lidas em um espectrofotômetro a 280 nm e os picos proteicos, separados de acordo com o tempo de eluição (Resende, 2018).

4.4. Cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-50

Uma coluna de vidro (1,5 x 100 cm) foi preparada com 70 mL de resina Sephadex G-50 fine (Sigma-Aldrich) hidratada com água ultrapura. A coluna foi montada e equilibrada com tampão TFA 0,1 % a um fluxo constante de 30 mL.h⁻¹. A fração ácida (D2) oriunda da cromatografia de troca aniônica foi solubilizada 10 mg em 1mL de tampão de equilíbrio da coluna, centrifugada a 14 000 x *g* por 2 minutos. O sobrenadante foi aplicado na coluna. Foram coletadas frações de 1 mL, a um fluxo constante de 30 mL.h⁻¹. As absorvâncias das frações foram lidas em um espectrofotômetro a 280 nm. As frações foram separadas e liofilizadas (Resende, 2018)

4.5. Quantificação de proteínas

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

4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina foi feita segundo metodologia descrita por Schägger e Von Jagow (1987). Foram utilizadas placas de vidro 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,7 mm. O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4 % de acrilamida/bis-acrilamida e o gel, na concentração de 3,9 %.

4.6.1. Preparo das amostras e condições da corrida

As amostras concentradas por liofilização contendo os peptídeos foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 2,5 %; sacarose 15 %; azul de bromofenol 0,25 %; β -mercaptoetanol 5 %), aquecidas por 5 minutos a 100 °C e, posteriormente, centrifugadas a 14 000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este procedimento, 20 μ g de cada amostra foram aplicados no gel de poliacrilamida. Para a corrida, foram utilizados tampão catodo (Tricina 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M pH 8,3; SDS 0,1 %) e tampão anodo (Tris-HCl 0,2 M pH 8,9; SDS 0,2 %). A eletroforese transcorreu por 16 h, aproximadamente, em uma corrente de 20 V. Para estimar a massa molecular dos peptídeos, foi usado o marcador de baixa massa molecular composto das seguintes massas moleculares de proteínas em Da 26,600, 17,000, 14,200, 6,500, 3,200 e 1,060 (Ultra low range molecular weight marker, MW 1,060-26,600, Sigma-Aldrich).

4.6.2. Revelação das bandas proteicas com Azul de Coomassie

Ao término da corrida, o sistema de gel foi cuidadosamente desmontado e o gel colocado em uma solução de fixação (metanol 40 % e ácido acético 10 %) por 30 minutos, em seguida, colocado em uma solução de coloração (Azul de Coomassie G 0,025 % e ácido acético 10 % em água destilada), segundo orientações do fabricante, em agitação por 1 hora. Após a coloração do gel por Coomassie, ele foi transferido para uma solução descorante (ácido acético 10 % em água destilada) e mantido nesta solução até a visualização das bandas proteicas e, em seguida, armazenado em água destilada.

4.6.3. Revelação das proteínas por precipitação de proteínas com nitrato de prata

Em alguns casos, para a visualização de peptídeos, foi utilizado o método de precipitação com nitrato de prata (Morrissey, 1981). Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas com o auxílio de luvas e incubado por 40 minutos na solução 1 (10 % de ácido acético, 4 % de etanol). Após este período, o gel foi lavado por 5 minutos em água ultrapura e, em seguida, incubado por 20 minutos na solução 2 (25 % de glutaraldeído). O gel foi lavado duas vezes por 10 minutos em água ultrapura e incubado na solução 3 (60 % de etanol) por 20 minutos. O gel foi incubado por 20 minutos na solução 4 (20 % de etanol, 1 % de nitrato de prata, 30 % de hidróxido de amônio e 40 % de NaOH), que foi preparada na hora do uso, sob agitação, e mantido ao abrigo da luz. Em seguida, o gel foi lavado duas vezes por 10 minutos na solução 3 e incubado na solução 5 (20 % de etanol, 37 % de formaldeído, 5,75 mM de ácido cítrico) até obter a visualização das bandas proteicas. A coloração foi interrompida com uma solução de fixação (10 % de ácido acético, 0,5 mL de glicerol, por 10 minutos. Em seguida, o gel foi fotodocumentado.

4.7. Sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massas

O sequenciamento dos peptídeos presentes nas frações foi feito em colaboração com o Laboratório de Bioquímica Marinha (BioMar-Lab), Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil. Após separação por eletroforese em gel de tricina - SDS, as bandas de proteínas de interesse foram extraídas e digeridas com tripsina. Os peptídeos digeridos por tripsina foram analisados por espectrometria de massa por desorção a laser assistida por matriz (ESI-Quad-ToF). Os espectros foram interpretados utilizando o programa Mascot, e os peptídeos sequenciados, submetidos a alinhamento local, utilizando a ferramenta BLASTp. As sequências com alto valor de *e-value* e percentual de identidade foram escolhidas e submetidas a alinhamento múltiplo, utilizando o programa CLUSTAL *Multiple Sequence Alignment by MUSCLE* (3.8).

4.8. Ensaio de inibição de enzimas serínicas

A propriedade de inibição da atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina foi determinada pela medição da atividade hidrolítica residual da tripsina (Sigma-Aldrich) e quimiotripsina (Sigma-Aldrich) sob os substratos BApNA (N-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida) (Sigma-Aldrich) e BTpNA (N-benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida) (Sigma-Aldrich), respectivamente, em pH 8,0, após pré-incubação com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações obtidas em cromatografia de exclusão molecular. A atividade proteolítica foi medida usando derivados de peptídeos sintéticos de *p*-nitroanilida (400 mM) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, 37 °C, em um volume final de 200 μL . A reação foi interrompida por adição de 100 μL de ácido acético a 30 %. A hidrólise do substrato foi seguida pela medição da absorvância da *p*-nitroanilina liberada em 405 nm (Ribeiro et al., 2013).

4.9. Detecção da inibição de protease por zimografia reversa

O teste de inibição de tripsina em gel foi feito utilizando a metodologia de Felicioli et al. (1997), tendo as amostras sido corridas em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE a 12 %) copolimerizado com gelatina a 0,1 %, em condição de semi-desnaturante, em que o tampão da amostra não continha SDS, ureia ou β -mercaptoetanol. Após a corrida eletroforética por aproximadamente 16 horas a 22 V, o gel foi colocado em tampão de lavagem (Tris / HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo Triton X-100 a 2,5 %) duas vezes durante 60 minutos para remover o SDS. Em seguida, foi imerso em tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo CaCl_2 20 mM e tripsina a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a 37 °C por 1 h. O gel foi então lavado com água destilada para remoção do excesso de tripsina. As regiões em que estavam os inibidores e a gelatina não foram digeridas, mas coradas por uma solução de 0,2 % de Coomassie Brilliant Blue G 250, 45 % de metanol e 10 % de ácido acético por 30 minutos e posteriormente descoradas.

4.10. Ensaio de inibição da atividade enzimática para α -amilases

A atividade enzimática para α -amilases intestinais de *Tenebrio molitor* e α -amilases salivar humana foi determinada como descrito por da Silva et al. (2018), com algumas adaptações.

4.10.1. Obtenção dos extratos contendo α -amilase

Larvas de *T. molitor* com aproximadamente 16 dias de idade foram dissecadas, tiveram seu intestino removido e seu conteúdo luminal coletado. Os intestinos larvais foram macerados a 4 °C em soro fisiológico estéril e submetidos a centrifugação por 10 minutos a 12.000 x g. O conteúdo proteico do sobrenadante foi quantificado usando o método do ácido bicinconínico, descrito por Smith et al. (1985).

A enzima α -amilase salivar humana foi coletada em microtubos e centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante também foi submetido à quantificação de proteínas.

4.10.2. Curva para determinação de atividade das enzimas

Diferentes volumes em μ L de extrato de α -amilase intestinal (2,4,6,8 e 10) e 25 μ L de amido a 1 % (Sigma-Aldrich) em um volume final de 100 μ L a ser completado com água foram incubados a 37 ° C por 30 minutos. Após a incubação, 400 μ L de solução DNS foram adicionados à reação e aquecidos a 100 °C por 5 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, as amostras foram lidas a 540 nm (Spectroquant Pharo 100, Merck). A unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade do extrato de enzima intestinal (em μ g) que aumentou a absorvância a 540 nm em 0,1 unidade de absorvância durante 30 minutos. Inicialmente, a hidrólise do amido foi quantificada pela redução da liberação de açúcar com base no ensaio colorimétrico com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

4.10.3. Avaliação da atividade de inibição de α -amilase das frações

Para o ensaio de inibição, as frações da cromatografia de exclusão molecular (50 μ g.mL⁻¹) foram previamente incubadas com 2 μ L do extratos de α -amilase de *T. molitor* (5,8 mg.mL⁻¹) e 3 μ L do extrato de α -amilase salivar humana (0,5 mg.mL⁻¹), separadamente. Em seguida, foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. A atividade enzimática residual foi determinada como descrito acima. Como controle positivo, foi utilizado o ácido etilenodiamina tetraacético 5 mM (Sigma-Aldrich). A porcentagem de inibição foi calculada tomando o controle como 100 % da atividade. Todos os ensaios de inibição foram feitos em triplicata, sendo considerada a média dos valores com desvio padrão.

4.11. Ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido

Os fungos *Fusarium lateritium*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum* foram transferidos do estoque mantidos na geladeira e colocados para crescer em uma placa de *Petri* contendo ágar *Sabouraud* (Merck) por 15 dias a 30 °C. Após esse período, 10 mL de caldo *Sabouraud* foram vertidos sobre a placa contendo o inóculo e os esporos, liberados com o auxílio de uma alça de *Drigalski*. Essa suspensão foi devidamente filtrada em gaze para evitar restos miceliais que pudessem estar em solução juntamente com os esporos. Os esporos foram quantificados (1×10^4 células.mL⁻¹) em câmara de *Neubauer* com o uso de um microscópio óptico (Axioplan, Zeiss). Após quantificação, os esporos dos fungos filamentosos foram incubados em 200 µL de caldo *Sabouraud* contendo 200 µg.mL⁻¹ das amostras proteicas obtidas em etapas de purificação. O ensaio foi feito em placas de cultura de células 96 poços Nunc MicroWell™, incubado a 30 °C por um período de 48 h. O acompanhamento da inibição do crescimento dos fungos foi por determinação de curva de crescimento, através a densidade óptica calculada pelas leituras de absorvância em um leitor de microplacas a 620 nm, a cada 6 h. Todo o ensaio foi feito em triplicata e sob condições de assepsia em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert et al. (1990).

4.12. Ensaio de determinação de permeabilização de membranas fúngicas

A permeabilização da membrana das células dos fungos filamentosos tratadas com as frações obtidas em cromatografia de exclusão molecular foi avaliada pela utilização da sonda fluorescente SYTOX® Green, segundo metodologia descrita por Thevissen et al. (1999).

Imediatamente após 30 h de incubação das células fúngicas com as frações proteicas, alíquotas de 96 µL de células foram incubadas ao abrigo da luz por 15 min com o corante fluorescente SYTOX® Green (Thermo Fisher Scientific), a uma concentração final de 0,2 µM, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. As células do controle foram incubadas apenas com o corante SYTOX® Green nas mesmas condições. E para controle positivo, submetemos células controle incubadas com a sonda fluorescente ao aquecimento a 90 °C por 30 segundos, em banho seco. Em seguida, as células foram analisadas em microscópio óptico Axio Zeiss, Imager, A,2 e as imagens, analisadas pelo

software Axiovision, versão 4.0. O microscópio é equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 - 490nm e emissão de 500nm).

4.13. Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio intracelular

Após ensaio de inibição do crescimento, as células dos fungos filamentosos crescidas na presença e ausência das frações obtidas após cromatografia de exclusão molecular foram incubadas com 20 μ M da sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) (Sigma-Aldrich), para avaliar o aumento endógeno de espécies reativas de oxigênio (ROS), segundo metodologia descrita por Mello et al. (2011). O tratamento controle positivo foi feito com as células do fungo crescidas na ausência dos peptídeos e incubadas com 300 μ M de peróxido de hidrogênio por 15 minutos antes da adição da sonda H₂DCFDA. Todo o procedimento foi feito ao abrigo da luz, por 2 h em temperatura ambiente. As células foram analisadas no microscópio óptico Axio Zeiss, Imager, A,2, equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 – 490 nm e emissão de 500 nm).

4.14. Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados pela *One-way ANOVA test Tukey's*. Os testes levaram em consideração a comparação de médias entre controle e os tratamentos ao nível de rigor 5 % ($p < 0,05$) e apontaram as diferenças significativas. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software *GraphPad Prism* (versão 6.0 para Windows).

5. RESULTADOS

5.1. Perfil eletroforético do extrato proteico de *C. chinense*

O perfil eletroforético do extrato rico em peptídeos (ERP) obtido do pericarpo dos frutos foi correspondente ao perfil proteico encontrado por Resende (2018). Neste extrato, é possível observar presença de bandas proteicas majoritárias entre 6 e 26 kDa.

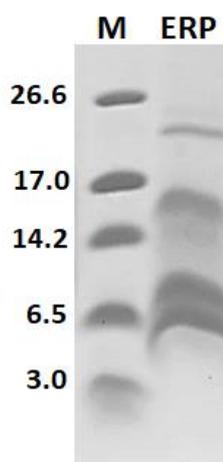


Figura 5: Visualização eletroforética em SDS-Page tricina mostrando o padrão proteico de baixo peso molecular do Extrato Rico em Peptídeos (ERP), obtido dos frutos de *C. chinense*, acesso UENF 1751. M – Marcador de massa molecular em kDa.

5.2. Fracionamento de peptídeos do extrato total de frutos

A cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose do ERP apresentou duas diferentes frações denominadas D1 (fração não retida) e D2 (fração retida). A Figura 6 mostra o perfil de eluição cromatográfico correspondente ao obtido por Resende (2018). As frações obtidas na cromatografia em DEAE-Sepharose foram reveladas por eletroforese em SDS-PAGE tricina por precipitação com nitrato de prata. Foi possível observar na fração D1 bandas proteicas com massa moleculares entre 6 e 20 kDa, e a fração D2 com bandas proteicas com massas moleculares entre 3 e 26,6.

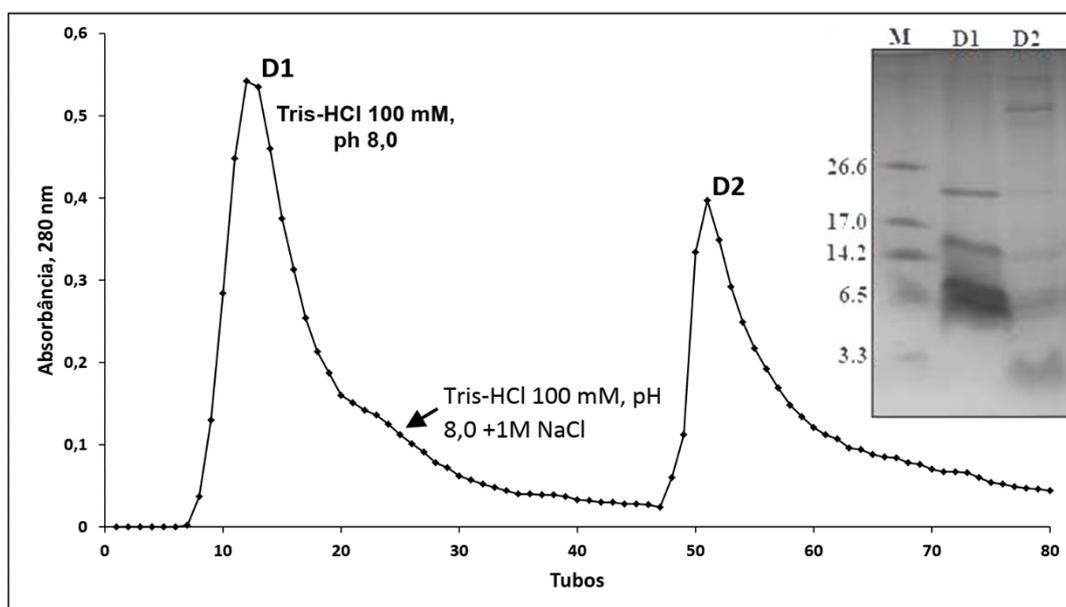


Figura 6: Perfil cromatográfico do ERP em cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose. A fração D1 (básica) foi eluída com tampão de equilíbrio da coluna e a fração D2 (ácida) foi eluída com tampão de equilíbrio contendo 1 M de NaCl. Visualização eletroforética do gel de tricina na presença de SDS das frações D1 e D2 M – marcador de massa molecular em kDa.

5.3. Purificação de proteínas presentes na fração D2

A fração D2 foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich). O perfil cromatográfico foi separado em quatro frações, denominadas G1, G2, G3 e G4, por ordem de eluição. Inicialmente, as frações foram submetidas a diálise e liofilização. No entanto, durante o processo

de padronização da metodologia decidimos, com base em outros trabalhos na literatura, não submeter as frações ao processo de diálise. Como resultado, houve diminuição do tempo de processamento e obtenção das amostras. Essas frações amostraram percentual mais significativo na inibição de crescimento dos fungos testados (dados não apresentados).

A fração G1, eluída aproximadamente aos 38'00" minutos, apresentou bandas proteicas com massa molecular entre 6,5-26 kDa. Essa fração apresentou baixo rendimento. A fração G2, eluída aos 68'00"- 81'00" minutos, apresentou bandas proteicas entre 6,5 e 17,0 kDa, sendo a banda majoritária próxima a 6,5 kDa. A fração G3 eluída aos 84'00" apresentou duas bandas proteicas com massas moleculares muito distintas, uma próxima a 6,5 kDa e outra entre 26,6 e 17,0 kDa. E, a fração G4 apresentou duas bandas proteicas próximas aos 6,5 kDa. Essas bandas só foram possíveis de serem visualizadas por precipitação com nitrato de prata (Figura 7).

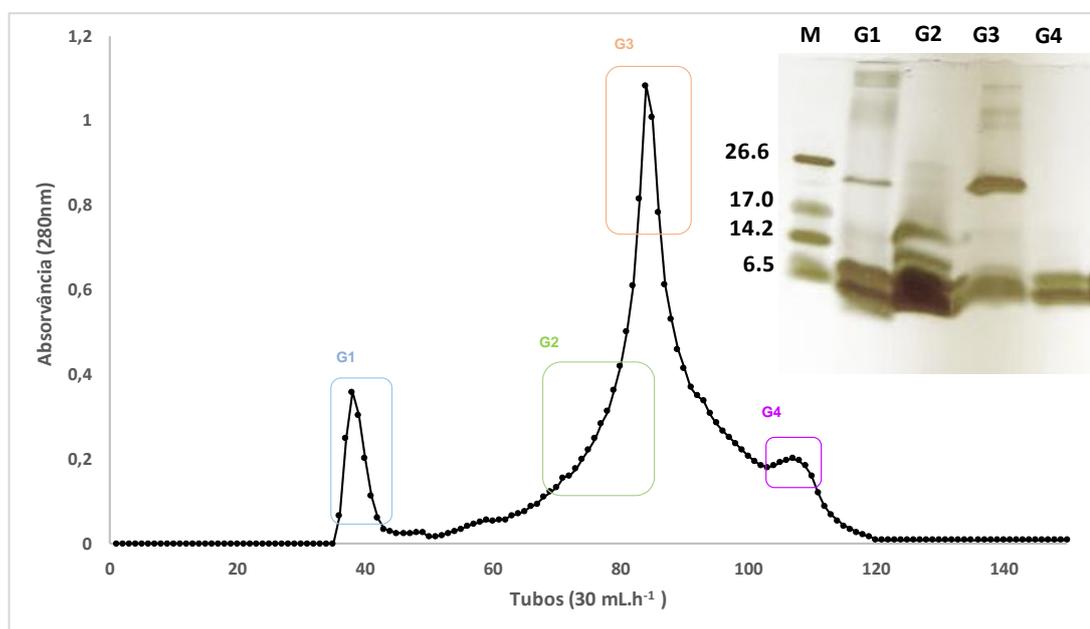


Figura 7: Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular da fração D2 (obtida em cromatografia de troca aniônica). A coluna foi equilibrada com tampão TFA 0,1 % em um fluxo 30 mL.h⁻¹. G1, G2, G3 e G4- Frações separadas por tempo de retenção na coluna. M- Marcador de massa molecular (Sigma-Aldrich).

5.4. Sequenciamento das proteínas presentes nas frações G2 e G4 por espectrometria de massas

A frações G2 e G4 (40 µg) foram submetidas a eletroforese em gel de tricina e, após a corrida, o gel foi corado com azul de *Comassee* G, as bandas proteicas de interesse foram excisados do gel e enviadas para a Universidade Federal do Ceará, onde foram submetidas ao sequenciamento por espectrometria de massas. Os espectros foram interpretados pelo software Mascot e fragmentos das sequências de resíduos de peptídeos obtidos. Todos os resíduos foram submetidos à identificação de proteínas semelhantes no banco de dados NCBI blastp.

Os peptídeos KGCNYYSADGTFICEGESDPNNPK e ACTLECDPR, obtidos da banda majoritária da fração G2, próximo a 6 kDa, foram semelhantes ao inibidores de serino proteases da família Potato II de *Capsicum*. Esses resíduos foram alinhados com o inibidor da proteinase PSI-1.1 de *Capsicum annuum* (ID da sequência: P56615.1); Cadeia A do inibidor de proteinase 38 do tipo Pin-II de *Capsicum annuum* (ID da sequência: 5ZFO_A); Cadeia A, inibidor de quimotripsina C1 de *Nicotiana alata* (ID da sequência: 2JZM_A); e Cadeia 1 do inibidor de Batata Pci-1 de *Solanum tuberosum* (ID da sequência: 4SGB_I) usando o programa CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8), como mostra a Figura 8A.

O alinhamento local das proteínas com o fragmento obtido na fração G2 teve percentual de identidade entre 88-94 %. Todos os resíduos de cisteínas presentes nos fragmentos de peptídeos obtidos foram alinhados sem a necessidade de adição de gap, o que reforça a confiabilidade do alinhamento múltiplo realizado. O maior número de substituições ocorre próximo ou dentro da região sítio inibidor destacada pelo quadro vermelho.

Os peptídeos NNGPLGICCNGIR e ISPSTDCTK obtidos do sequenciamento da banda proteica de maior massa molecular (pouco acima de 6,5 kDa) da fração G4 foram semelhantes a uma LTP não específica (ns-LTP) do tipo I, os dois fragmentos de aminoácidos obtidos pelo sequenciamento foram alinhados com ns-LTP 1 de *Capsicum annuum* (Sequência ID: XP_016559796.1); ns-LTP 1 de *Capsicum annuum* (ID da sequência: KAF3652405.1); ns-LTP 1 de *Capsicum annuum* (ID da sequência: PHT78915.1); e ns-LTP 1 de *Capsicum annuum* (ID da sequência: XP_009761744.1) (Figura 8B). O alinhamento local

com cada uma das proteínas identificadas no banco de dados com os fragmentos obtidos mostrou-se superior a 70 % de identidade.

Os peptídeos QYVNSPNA e RVASTCGVPTPR obtidos do sequenciamento da banda proteica de menor massa molecular (abaixo de 6,5 kDa) da fração G4 apresentaram semelhança com ns-LTP 2 de *Capsicum chinense* (ID da sequência: PHU06864.1); como ns-LTP2 de *Coffea eugenioides* (ID da sequência: XP_027178858.1); como ns-LTP2 de *Coffea arabica* (ID da sequência: XP_027079037.1); e ns-LTP 2 de *Capsicum baccatum* (ID da sequência: PHT49897.1). O alinhamento local com cada uma das proteínas identificadas no banco de dados com os fragmentos obtidos mostrou-se superior a 85 % de identidade (Figura 8C).

5.5. Efeito inibitório das frações sobre a atividade das proteases tripsina e quimiotripsina

As frações G2 e G3 na concentração $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,05$) a atividade da enzima tripsina em 100 e 54 %, respectivamente, enquanto a fração G4 não apresentou potencial de inibição nas condições testadas (Figura 9A).

Nos ensaios de inibição da enzima quimiotripsina, Figura 9B, a fração G2 apresentou inibição significativa de 85 %, enquanto as frações G3 e G4 não apresentaram potencial de inibição para quimiotripsina.

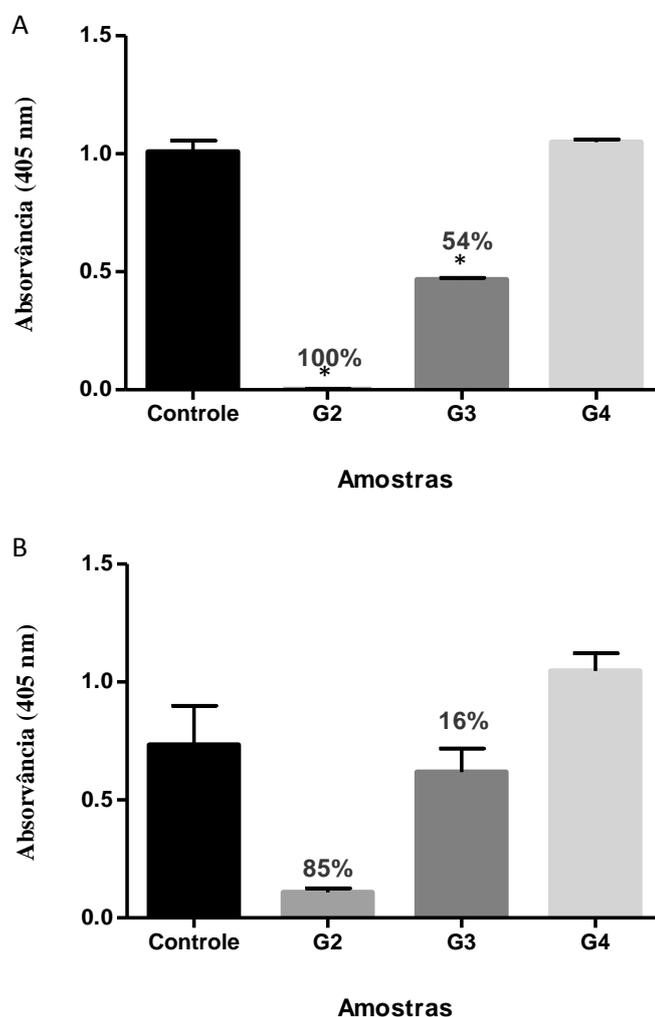


Figura 9: Efeito inibitório das frações G2, G3 e G4 ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre atividades de serino proteases. (A) Efeito inibitório das frações sobre a atividade da enzima tripsina. Controle-Tripsina (Sigma-Aldrich). (B) Efeito inibitório das frações sobre a atividade da enzima quimiotripsina. Controle- Quimiotripsina (Sigma-Aldrich). %-porcentagem de inibição das frações. Os asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

5.6. Zimografia reversa

O ensaio de inibição de atividade de tripsina em gel confirmou os resultados de inibição *in vitro* feitos com as frações G2 e G3. Foram usadas as concentrações 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as duas frações. Ambas apresentaram spots de inibição indicados pelas setas na Figura 10. Nesta região, a atividade de inibição de protease atuou impedindo que a tripsina fosse capaz de digerir a gelatina presente no gel.

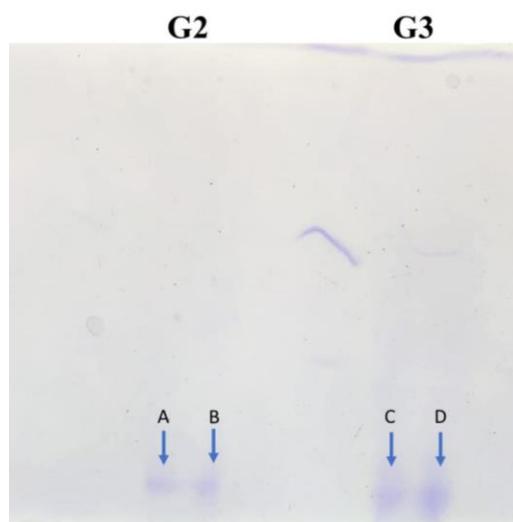


Figura 10: Zimografia reversa em SDS-Page copolimerizado com gelatina 1% para identificação da inibição da protease tripsina pelas frações G2 e G3 de frutos de *C. chinense*, acesso UENF 1751. (A) G2 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (B) G2 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (C) G3 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (D) G3 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.7. Efeito inibitório das frações sobre a atividade extratos enzimáticos de α -amilase

A atividade inibitória enzimática foi feita da com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das amostras G2, G3 e G4 sobre os extratos enzimáticos de α -amilase salivar humana (HSA) e α -amilase do intestino dos insetos *T. molitor*. Em ambos os ensaios, as frações G2 e G4 foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,05$) sob o teste estatístico de Tukey em 100 % da atividade das enzimas testadas, enquanto a fração G3 não foi capaz de inibir a ação das enzimas sob as condições testadas (Figura 11). Foram utilizados nestes ensaios EDTA 5 mM como inibidor no controle positivo.

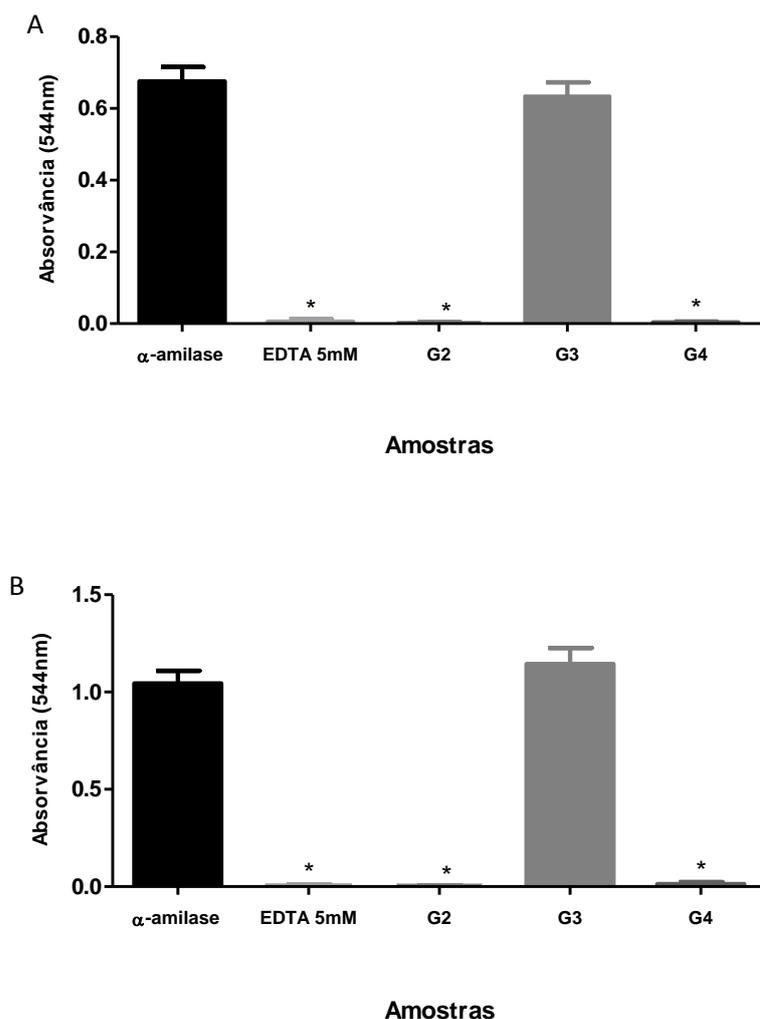


Figura 11: Efeito inibitório das frações G2, G3 e G4 ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre a atividade extratos enzimáticos de α -amilase. (A) Ensaio com α -amilase do intestino dos insetos *T. molitor*. (B) Ensaio com extrato contendo α -amilase salivar humana. No controle positivo da inibição de α -amilase, foi utilizado EDTA 5mM. Os asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

5.8. Potencial de inibição de crescimento de fungos filamentosos

As frações G2, G3 e G4 que apresentaram bom rendimento na etapa de cromatografia de exclusão molecular foram submetidas a ensaios para verificar o potencial de inibição sobre o crescimento de fungos filamentosos *in vitro*. As leituras de densidade ótica do crescimento foram feitas nos tempos de 24 e 48 horas após a incubação dos esporos fúngicos com as frações proteicas. Contudo, apenas os resultados para o tempo final de 48 serão apresentados, visto que no tempo de 24 horas não houve diferença entre o controle e os tratamentos.

A fração G2 na concentração $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não foi capaz de inibir o crescimento de nenhum dos fungos testados. A fração G3 apresentou inibição significativa de 48% para o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, 51 % para os fungos *F. oxysporum* e *F. solani* e 49 % para o fungo *F. lateritium*. A fração G4 apresentou inibição de 35 e 50 % para os fungos *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum*, respectivamente (Figura 11). Os valores de absorvância são médias ($\pm\text{SD}$) de triplicatas.

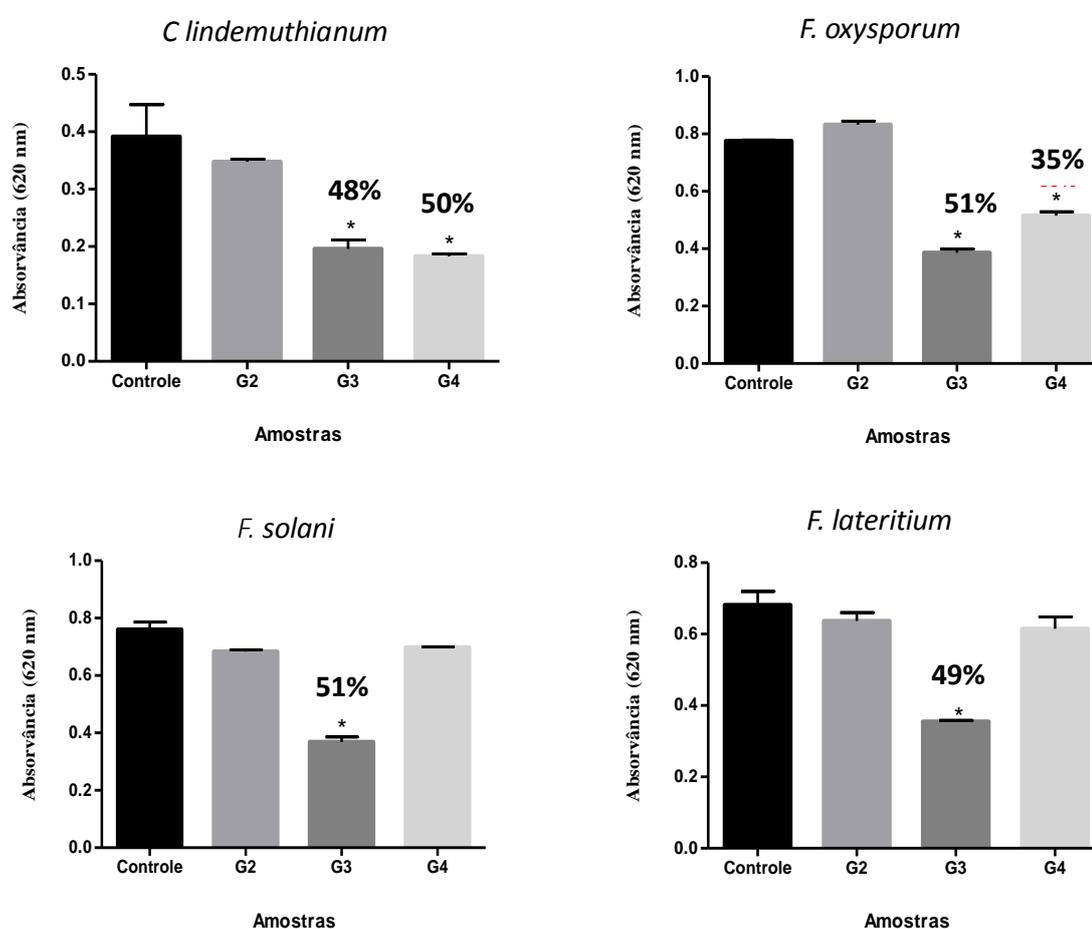


Figura 12: Inibição do crescimento dos fungos filamentosos após 48 horas de incubação com $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações G2, G3 e G4. (%) Porcentagem de inibição causada pelas frações. Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle pelo teste de Tukey.

5.9. Ensaio para verificação da permeabilização de membranas dos fungo *F. oxysporum*

Diante dos resultados do ensaio de inibição do crescimento, decidimos submeter as células fúngicas de *F. oxysporum* tratadas com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração G3 (nestas condições foi observado o melhor potencial de inibição) à investigação do possível mecanismo de ação. Alíquotas de células fúngicas foram incubadas com o corante SYTOX® Green e visualizadas em microscópio óptico.

Na Figura 12 é possível observar que as células tratadas com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração G3 apresentam marcação fluorescente, sugerindo que estavam com a membrana comprometida, permitindo a penetração do corante SYTOX® Green. As células do controle positivo, que foram submetidas ao aquecimento e sofreram alterações na membrana citoplasmática, também apresentaram marcação fluorescente pelo corante, condições que não foram observadas no controle negativo.

Destacamos também as alterações morfológicas observadas nas células tratadas com a fração G3, que apresentaram dilatações das hifas mal desenvolvidas e células rompidas, como apontado pela seta na Figura 13.

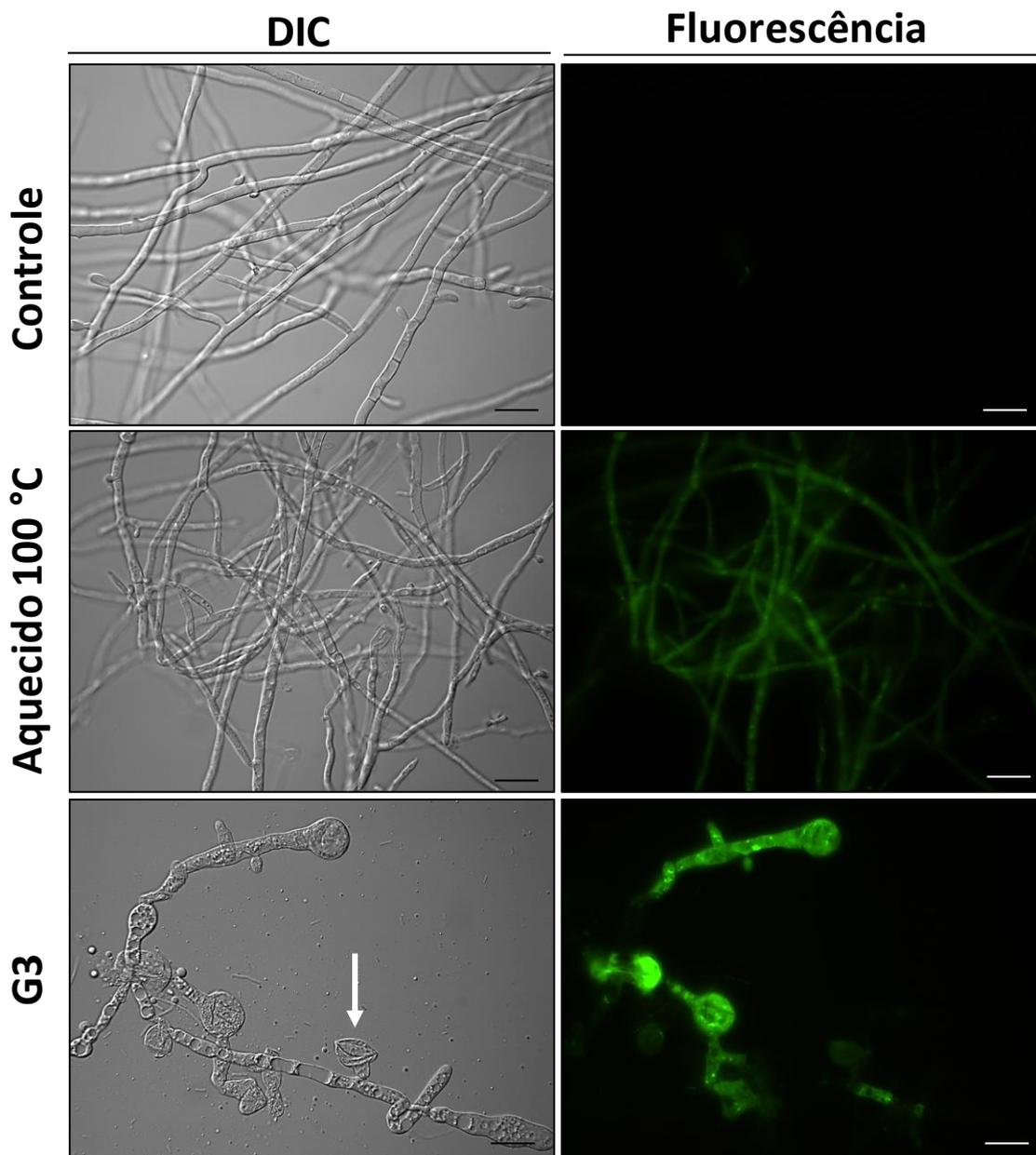


Figura 13: Imagens de microscopia de fluorescência do ensaio de detecção de permeabilização de membrana do fungo *F. oxysporum* após tratamento com a fração G3 ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por 48 horas. As células controle foram tratadas apenas com o corante SYTOX® Green, e as células de controle positivo foram submetidas a aquecimento a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. A seta branca aponta para alterações nas células dilatadas e rompidas. Abreviação: DIC, contraste de interferência diferencial. Barras = $20 \mu\text{m}$

5.10. Verificação do aumento endógeno de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para verificar se a fração G3 induz aumento endógeno de ROS, utilizamos a sonda H₂DCFDA. Na Figura 14, é possível verificar a marcação fluorescente nas hifas de *F. oxysporum* tratadas com a fração G3 e no controle positivo, onde as células foram incubadas com 300µM de peróxido de hidrogênio, indicando aumento da produção endógena de ROS nessas células.

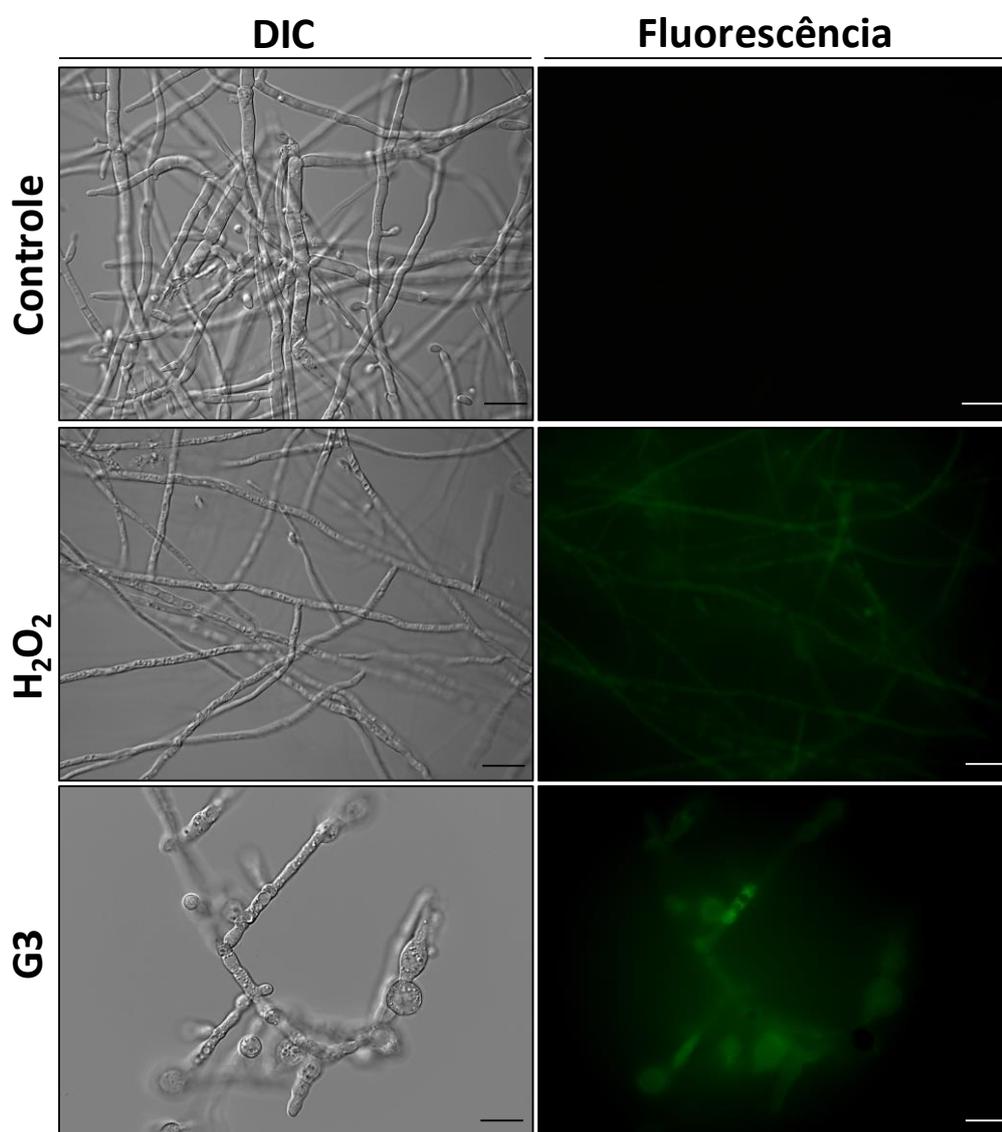


Figura 14: Imagens de microscopia de fluorescência do ensaio de detecção do aumento endógeno de ROS no fungo *F. oxysporum* após tratamento com a fração G3 (100 µg.mL⁻¹) por 48 horas. As células controle foram tratadas apenas com o corante 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate e as células de controle positivo foram tratadas com peróxido de hidrogênio 300 mM. Abreviação: DIC, contraste de interferência diferencial. Barras = 20 µm.

6. DISCUSSÃO

Fungos fitopatogênicos causam grandes perdas na agricultura e, conseqüentemente, na economia, familiar e global. Como uma proposta de controle desses patógenos, os peptídeos antimicrobianos de plantas (AMPs) têm despertado grande interesse (Meneguetti et al., 2017).

Resende (2018) mostrou que a fração ácida (D2) da cromatografia de troca aniônica do ERP de *Capsicum chinense*, acesso UENF 1751, apresentou, em baixas concentrações, atividade inibitória do crescimento dos fungos *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum*. Para separar os peptídeos presentes na fração D2, empregamos técnicas de separação de peptídeos de acordo com a baixa massa molecular que os AMPs apresentam e obtivemos quatro frações, denominadas G1, G2, G3 e G4, de acordo com tempo de retenção na coluna. Todas as frações apresentaram peptídeos de baixa massa molecular. A fração G1 apresentou baixo rendimento, por esse motivo não foi possível reproduzir análises subsequentes para caracterização e identificação de suas atividades biológicas.

Com o objetivo de caracterizar os peptídeos presentes nas frações G2 e G4, submetemos-as ao sequenciamento por espectrometria de massas. A banda majoritária (próxima a 6 kDa) da fração G2 apresentou alta similaridade com inibidores de proteases do tipo II. As duas bandas proteicas da fração G4 apresentaram similaridade a LTP tipo I e LTP tipo II. Peptídeos de famílias iguais a estas já foram identificados nos mais diversos tecidos de pimentas do gênero *Capsicum*, demonstrando que esse gênero é promissor em estudos de

identificação de AMPs (Bard et al., 2016; M. S. Diz et al., 2011; dos Santos et al., 2017; F. Ribeiro et al., 2013; Moguel-Salazar Fernando, 2011; Ribeiro et al., 2007; Taveira, Mathias, et al., 2014).

A propriedade de os AMPs inibirem o crescimento de fungos tem sido relatada em diversos trabalhos (Kirubakaran et al., 2008; Pizzo et al., 2015; dos Santos et al., 2017; Silva et al., 2017; Khani et al., 2019; Moore et al., 2019). Maracahipes et al. (2019b), em estudo com frutos imaturos de *C. annuum* inoculados com o fungo *C. gloeosporioides*, isolaram uma defensina chamada IIFF7Ca. Esta defensina, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi capaz de inibir em 73,94 % o crescimento do fungo *C. gloeosporioides*.

Neste trabalho testamos as frações contra outras espécies de fungos em uma concentração menor, neste caso, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e observamos que a fração G4 foi efetiva na concentração testada apenas para *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum*. Essa seletividade de inibição pode ser explicada pela diferença intraespecífica. A capacidade citotóxica 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 inibitórios com o fortalecimento de suas paredes celulares pelo aumento da síntese de quitina e β - (1,3) -glucana (Paege et al., 2019).

A fração G3, capaz de inibir todos fungos testados, foi submetida à investigação do mecanismo de ação que esta fração apresenta para inibir o crescimento do fungo *F. oxysporum*. Utilizando a sonda fluorescente SYTOX® Green, buscamos verificar se a fração G3 causa permeabilidade na membrana plasmática do *F. oxysporum*. Esta sonda tem afinidade por ácidos nucleicos e só penetra em células com membrana citoplasmática comprometida. Por este ensaio, observamos marcação fluorescente nas células testadas, indicando que a membrana estava comprometida. A capacidade de causar danos a membranas é apontada por alguns autores como um mecanismo rápido e eficiente, diminuindo as chances de o patógeno desenvolver resistência (Corrêa et al., 2019).

Moore et al. (2019) também identificaram permeabilização de membranas citoplasmática através da sonda SYTOX® Green no fungo *Aspergillus flavus* quando tratado com o peptídeo sintético D4E1. Além de causar lesões na membrana, o tratamento com D4E1, na concentração de 1 μM , induziu acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) em conídios germinativos de *A. flavus*.

Neste trabalho, também detectamos aumento de ROS nas hifas de *F. oxysporum* tratadas com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da fração G3. 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). Demais testes são necessários para elucidar o completo mecanismo de ação da fração G3 sobre *F. oxysporum*. Contudo, os resultados obtidos aqui sugerem que a permeabilização de membranas e o aumento de ROS estão envolvidos no processo de inibição do crescimento do fungo.

Observamos, pelas microscopias em contraste diferencial de interferência (DIC), alterações morfológicas nas hifas do fungo *F. oxysporum* tratadas com a fração G3. A literatura descreve que fungos crescidos na presença de AMPs podem ou não sofrer alterações morfológicas durante seu crescimento (Carvalho e Gomes, 2011). Alguns peptídeos podem ser classificados em morfogênicos e não morfogênicos quanto à sua propriedade inibir o crescimento, causando ou não alterações morfológicas, como as defensinas (Broekaert et al., 1995).

Osborn et al. (1995) mostraram que a defensina Rs-AFP2 (*Raphanus sativus* L.) causou inibição do crescimento de *F. culmorum*. Também foram observadas redução do alongamento e dilatações dos tubos germinativos e hifas. Boyce et al. (2005) identificaram que o tratamento com Rs-AFP2 em *F. culmorum*, resulta na localização incorreta de septina, proteína essencial para a orientação da divisão celular e crescimento polarizado das hifas de fungos filamentosos. Zottich et al. (2013) também observaram alterações morfológicas bem semelhantes em *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum* e relataram que os efeitos observados foram devidos à ação de uma outra família de peptídeos, denominada de GRPs (proteínas ricas em glicina).

Sendo assim, percebe-se que peptídeos de diferentes famílias têm capacidade de inibir o crescimento de fungos, causando alterações morfológicas como as dilatações nas hifas observadas neste trabalho. Contudo, mais estudos são necessários para que possamos caracterizar a fração G3 e desvendar os mecanismos, vias ou componentes induzidos por esta fração para causar inibição do crescimento dos fungos.

Além da atividade antimicrobiana, os AMPs podem apresentar outras atividades biológicas. A atividade de inibição de proteases entre os AMPs é

amplamente estudada (Zhang et al., 2020; Araújo et al., 2019; Bleackley et al., 2017; Silva et al., 2017; Ribeiro et al., 2013). O mecanismo antimicrobiano pelo qual esses inibidores atuam é atribuído à sua ação sobre a digestão proteica, que sofre redução da disponibilidade de aminoácidos, impedindo a síntese de novas proteínas necessárias para desenvolvimento normal do metabolismo do patógeno. Essa propriedade evidencia o potencial dessas proteínas como ferramentas biotecnológicas de aplicação na agricultura no controle de patógenos (Pelegri et al., 2008).

Inibidores que apresentam propriedade de inibição de proteases serínicas e α -amilases em conjunto são denominados inibidores bifuncionais α -amilase/tripsina (Islamov e Fursov, 2007; Gadge et al., 2015; Pereira et al., 2018). Tamhane et al. (2007) relataram que um inibidor de proteases serínicas do tipo II, CanPI-7 (*C. annuum*), foi capaz de inibir a atividade de tripsina, quimiotripsina e proteases intestinais da mariposa *Helicoverpa armigera*.

As frações obtidas neste trabalho também foram testadas quanto à capacidade de inibir a atividade de enzimas proteolíticas (tripsina e quimiotripsina) e glicosidases, como a α -amilase salivar humana e α -amilase intestinal de *T. molitor*. Verificamos que a fração G2, que apresentou uma proteína com similaridade a inibidores de serino proteases do tipo II, foi capaz de inibir em baixas concentrações a atividade das proteases e glicosidases testadas. Sendo assim, podemos sugerir que a fração G2 tem um inibidor bifuncional α -amilase/tripsina com uma potente atividade passível de ser explorada.

Verificamos também que a fração G4 apresentou a propriedade de inibir 100%, em baixa concentração, a atividade das α -amilases testadas. Outras LTPs também foram caracterizadas para essa a atividade de inibição (da Silva et al., 2018; Diz et al., 2011; Zottich et al., 2011). A capacidade de inibir diferentes α -amilases pode ser apontada como um promissor potencial biotecnológico para agricultura na proteção de plantas cultivadas contra o ataque de insetos (Tormo et al., 2004).

Os resultados descritos neste trabalho mostram, pela primeira vez, que a pimenta *C. chinense*, acesso UENF1751, apresenta frações ricas em AMPs com atividades biológicas contra fungos, passíveis de serem testadas também contra herbívoros. A investigação dessas moléculas torna-se relevante pois muitas culturas de plantas têm sua produtividade diminuída em decorrência de doenças

causadas por fungos. Atualmente, essas doenças são controladas por fungicidas, havendo algumas doenças resistentes a determinados fungicidas. Por óbvio, estudos como este são oportunos para a proposição de novas medidas de controle desses patógenos.

7. CONCLUSÕES

- A fração ácida de frutos de *C. chinense*, acesso UENF 1751, apresentou peptídeos de baixa massa molecular;
- A fração ácida submetida à cromatografia de exclusão molecular originou as frações G1, G2, G3 e G4, que apresentaram proteínas de baixa massa molecular;
- Na fração G2, foi identificado um inibidor de protease tipo II, de massa molecular de, aproximadamente, 6,5 kDa, com atividade de inibição de próteses serínicas;
- Na fração denominada G4, foram identificadas duas bandas proteicas com similaridade - LTP tipo I e LTP tipo 2;
- As frações G2 e G4 foram capazes de inibir significativamente a atividade de α -amilases;
- A fração G2 também apresentou capacidade de inibir a atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina. Com isso, sugere-se que na fração G2 haja o inibidor bifuncional α -amilase/tripsina;
- A fração G3 foi capaz de inibir o crescimento de todos os fungos do gênero *Fusarium* e *Colletotrichum* testados, tendo as demais frações se mostrado seletivas dependendo da espécie de fungo testado; e
- A fração G3 foi capaz de causar alterações morfológicas, permeabilidade de membrana e aumento de ROS das células do fungo *F. oxysporum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bard, G.C.V., Zottich, U., Souza, T.A.M., Ribeiro, S.F.F., Dias, G.B., Pireda, S., Da Cunha, M., Rodrigues, R., Pereira, L.S., Machado, O.L.T., Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2016) Purification, biochemical characterization, and antimicrobial activity of a new lipid transfer protein from *Coffea canephora* seeds. Genet Mol Res.
- Boyce, K.J., Chang, H., D'Souza, C.A., Kronstad, J.W. (2005) An *Ustilago maydis* septin is required for filamentous growth in culture and for full symptom development on maize. Eukaryot Cell.
- Boto, A., Pérez de la Lastra, J., González, C. (2018) The Road from Host-Defense Peptides to a New Generation of Antimicrobial Drugs. Molecules 23: 311.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P., & Osborn, R. W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant physiology, 108(4), 1353.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A., Vanderleyden, J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. FEMS Microbiol Lett.
- 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.

- Carvalho, A. de O., Gomes, V.M. (2007) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-A concise review. *Peptides* 28: 1144–1153.
- Carvalho, A., Moreira Gomes, V., (2011) Plant defensins and defensin-like peptides-biological activities and biotechnological applications. *Curr Pharm Des*, 17(38):4270-4293.
- Cools, T.L., Struyfs, C., Cammue, B.P., Thevissen, K. (2017) Antifungal plant defensins: increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiol* 12: 441–454.
- Corrêa, J.A.F., Evangelista, A.G., Nazareth, T. de M., Luciano, F.B. (2019) Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. *Materialia* 8: 100494.
- da Silva, F.C.V., do Nascimento, V.V., Fernandes, K.V., Machado, O.L.T., da Silva Pereira, L., Gomes, V.M., Carvalho, A. de O. (2018) Recombinant production and α -amylase inhibitory activity of the lipid transfer protein from *Vigna unguiculata* (L. Walp.) seeds. *Process Biochem*.
- da Silva Pereira, L., do Nascimento, V.V., de Fátima Ferreira Ribeiro, S., Rodrigues, R., Fernandes, K.V.S., de Oliveira Carvalho, A., Vasconcelos, I.M., dos Santos Bento, C., 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*.
- 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 chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. *Physiol Plant*.
- Diz, M.S.S., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A.G.C., Da Cunha, M., Alves, E.W., Okorokova-Façanha, A.L., Oliveira, M.A., Perales, J., Machado, O.L.T., Gomes, V.M. (2006) Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification

of the medium by yeast cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1760: 1323–1332.

dos Santos, L. de A., Taveira, G.B., Ribeiro, S. de F.F., Pereira, L. da S., Carvalho, A. de O., Rodrigues, R., Oliveira, A.E.A., Machado, O.L.T., Araújo, J. da S., Vasconcelos, I.M., Gomes, V.M. (2017) Purification and characterization of peptides from *Capsicum annuum* fruits which are α -amylase inhibitors and exhibit high antimicrobial activity against fungi of agronomic importance. *Protein Expr Purif* 132: 97–107.

Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Pukhalsky, V.A., Grishin, E. V. (2005) Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*.

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*.

Figueira, T.N., Oliveira, F.D., Almeida, I., Mello, É.O., Gomes, V.M., Castanho, M.A.R.B., Gaspar, D. (2017) Challenging metastatic breast cancer with the natural defensin PvD1. *Nanoscale* 9: 16887–16899.

Florack, D.E.A., Stiekema, W.J. (1994) Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action.

Fones, H.N., Fisher, M.C., Gurr, S.J. (2017) Emerging Fungal Threats to Plants and Animals Challenge Agriculture and Ecosystem Resilience. *Microbiol Spectr*.

Gadge, P.P., Wagh, S.K., Shaikh, F.K., Tak, R.D., Padul, M. V., Kachole, M.S. (2015) A bifunctional α -amylase/trypsin inhibitor from pigeonpea seeds: Purification, biochemical characterization and its bio-efficacy against *Helicoverpa armigera*. *Pestic Biochem Physiol* 125: 17–25.

Hokken, M.W.J., Zwaan, B.J., Melchers, W.J.G., Verweij, P.E. (2019) Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi.

Islamov, R.A., Fursov, O. V. (2007) Bifunctional inhibitor of α -amylase/trypsin from wheat grain. *Appl Biochem Microbiol* 43: 379–382.

- Kirubakaran, S.I., Begum, S.M., Ulaganathan, K., Sakthivel, N. (2008) Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. *Plant Physiol Biochem* 46: 918–927.
- Khani, S., Seyedjavadi, S.S., Zare-Zardini, H., Hosseini, H.M., Goudarzi, M., Khatami, S., Amani, J., Imani Fooladi, A.A., Razzaghi-Abyaneh, M. (2019) Isolation and functional characterization of an antifungal hydrophilic peptide, Skh-AMP1, derived from *Satureja khuzistanica* leaves. *Phytochemistry* 164: 136–143.
- Koehbach, J., Craik, D.J. (2019) The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. *Trends Pharmacol Sci* 40: 517–528.
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., Björn, C. (2016) Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol* 6: 1–12.
- 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*.
- Maracahipes, Á.C., Taveira, G.B., Sousa-Machado, L.Y., Machado, O.L.T., Rodrigues, R., Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2019b) Characterization and antifungal activity of a plant peptide expressed in the interaction between *Capsicum annuum* fruits and the anthracnose fungus. *Biosci Rep*.
- 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*.
- 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*.
- Morrissey, J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem*.

- Pelegriani, P.B., Lay, F.T., Murad, A.M., Anderson, M.A., Franco, O.L. (2008) Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family. *Proteins Struct Funct Genet*.
- Pizzo, E., Zanfardino, A., Di Giuseppe, A.M.A., Bosso, A., Landi, N., Ragucci, S., Varcamonti, M., Notomista, E., Di Maro, A. (2015) A new active antimicrobial peptide from PD-L4, a type 1 ribosome inactivating protein of *Phytolacca dioica* L.: A new function of RIPs for plant defence?. *FEBS Lett* 589: 2812–2818.
- Regente, M.C., Giudici, A.M., Villalaín, J., De La Canal, L. (2005) The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Lett Appl Microbiol* 40: 183–189.
- RESENDE, L. M. (2018) Purificação, caracterização parcial e atividade antifúngica de peptídeos antimicrobianos de *Capsicum chinense* Jacq. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 57p.
- Ribeiro, S.F., Fernandes, K. V., Santos, I.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 annum* seeds: Characterization, stability, spectroscopic analysis and a cDNA cloning. *Biopolymers* 100: 132–140.
- Ribeiro, S.F.F., Carvalho, A.O., Da Cunha, M., Rodrigues, R., Cruz, L.P., Melo, V.M.M., Vasconcelos, I.M., Melo, E.J.T., Gomes, V.M. (2007) Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon* 50: 600–611.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*.
- Schöning, J.C., Streitner, C., Meyer, I.M., Gao, Y., Staiger, D. (2008) Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback

- loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* 36: 6977–6987.
- Sharma, C., Chowdhary, A. (2017) Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi. Elsevier B.V., 607-616p.
- Silva, M.S., Ribeiro, S.F.F., Taveira, G.B., Rodrigues, R., Fernandes, K.V.S., Carvalho, A.O., Vasconcelos, I.M., Mello, E.O., Gomes, V.M. (2017) Application and bioactive properties of CaTI, a trypsin inhibitor from *Capsicum annuum* seeds: membrane permeabilization, oxidative stress and intracellular target in phytopathogenic fungi cells. *J Sci Food Agric* 97: 3790–3801.
- Silva, S.A.M., Rodrigues, R., Gonçalves, L.S.A., Sudré, C.P., Bento, C.S., Carmo, M.G.F., Medeiros, A.M. (2014) Resistance in *Capsicum* spp. to anthracnose affected by different stages of fruit development during pre- and post-harvest. *Trop Plant Pathol* 39: 335–341.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*.
- 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*.
- Stec, B. (2006) Plant thionins – the structural perspective. *Cell Mol Life Sci* 63: 1370–1385.
- Talamini, V., Nunes, M.U.C. (2018) Estratégias de controle das principais doenças do tomateiro orgânico na região central de Sergipe.
- Tamhane, V.A., Giri, A.P., Sainani, M.N., Gupta, V.S. (2007) Diverse forms of Pin-II family proteinase inhibitors from *Capsicum annuum* adversely affect the growth and development of *Helicoverpa armigera*. *Gene*.

- Taveira, G.B., Mello, É.O., Carvalho, A.O., Regente, M., Pinedo, M., de La Canal, L., Rodrigues, R., Gomes, V.M. (2017) Antimicrobial activity and mechanism of action of a thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits and combinatorial treatment with fluconazole against *Fusarium solani*. *Biopolymers* 108: e23008.
- Taveira, G.B., Mathias, L.S., da Motta, O. V., Machado, O.L.T., Rodrigues, R., Carvalho, A.O., Teixeira-Ferreira, A., Perales, J., Vasconcelos, I.M., Gomes, V.M. (2014) Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Biopolymers* 102: 30–39.
- Taveira, G.B., Mello, É.O., Carvalho, A.O., Regente, M., Pinedo, M., de La Canal, L., Rodrigues, R., Gomes, V.M. (2017) Antimicrobial activity and mechanism of action of a thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits and combinatorial treatment with fluconazole against *Fusarium solani*. *Biopolymers* 108: e23008.
- Thevissen, K., Terras, F.R.G., Broekaert, W.F. (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth.
- Wang, J., Dou, X., Song, J., Lyu, Y., Zhu, X., Xu, L., Li, W., Shan, A. (2019) Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Med Res Rev* 39: 831–859.
- Zhu, M., Liu, P., Niu, Z.W. (2017) A perspective on general direction and challenges facing antimicrobial peptides. *Chinese Chem Lett* 28: 703–708.
- Zottich, U., Da Cunha, M., Carvalho, A.O., Dias, G.B., Casarin, N., Vasconcelos, I.M., Gomes, V.M. (2013) An antifungal peptide from *Coffea canephora* seeds with sequence homology to glycine-rich proteins exerts membrane permeabilization and nuclear localization in fungi. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1830: 3509–3516.