

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
ANÁLISE PROTEÔMICA DE PEPTÍDEOS DE FRUTOS IMATUROS DE  
*Capsicum annuum***

**LORRAN YVES MACHADO DE SOUSA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE**

**DARCY RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ**

**DEZEMBRO – 2023**

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
ANÁLISE PROTEÔMICA DE PEPTÍDEOS DE FRUTOS IMATUROS DE  
*Capsicum annuum*

**LORRAN YVES MACHADO DE SOUSA**

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências parciais para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.”

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

Coorientador: Dr. Gabriel Bonan Taveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

DEZEMBRO – 2023

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.



ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
ANÁLISE PROTEÔMICA DE PEPTÍDEOS DE FRUTOS IMATUROS DE  
*Capsicum annuum*

**LORRAN YVES MACHADO DE SOUSA**

"Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências parciais para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia."

Aprovado em: 15/02/2024

Comissão Examinadora:

gov.br

Documento assinado digitalmente

EMÍLIO DE CASTRO MIGUEL

Data: 30/04/2024 13:31:22-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel

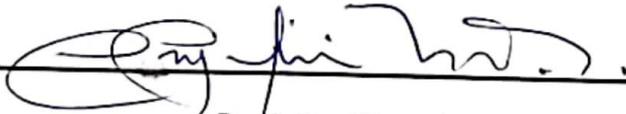
Doutor em Biociências e Biotecnologia – Lab. de Biomateriais - UFC



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maura da Cunha

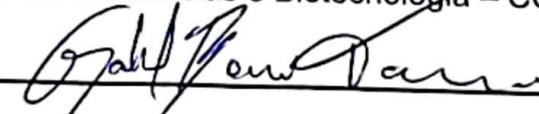
Doutora em Ciências – CBB – LBCT - UENF



---

Prof. Dr. Olney Vieira da Motta

Doutor em Biociências e Biotecnologia – CCTA – LSA – UENF



---

Dr. Gabriel Bonan Taveira

Doutor em Ciências – CBB – LFBM – UENF

Coorientador



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valdirene Moreira Gomes

Doutora em Ciências – CBB – LFBM – UENF

Orientadora

“Se estiver se sentindo desmotivado ou achando que não é bom o suficiente, reacenda o seu coração, enxugue as lágrimas e siga em frente. Quando se entristecer ou se acovardar, lembre-se de que o fluxo do tempo nunca para; ele não espera enquanto você se afoga em lágrimas”

Kyojuro Rengoku

Dedico essa conquista a toda minha família, por todas as oportunidades que puderam me dar, e por sempre acreditarem em mim.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a UENF- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e a coordenação do PGBB por tudo.

A minha orientadora, Professora Dra. Valdirene, por ter me aceitado no laboratório, me ensinado todo o caminho desde o início da graduação até o final do meu mestrado. Sendo paciente, preocupada, dedicada e sempre sendo a melhor orientadora que eu poderia pedir.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica. E aos demais órgãos de fomento do projeto (CAPES, Faperj)

À professora Rosana Rodrigues, pela colaboração nos cedendo às sementes e por ter disponibilizado casa de vegetação para o plantio das pimentas. E ao professor Vanildo Silveira e a doutora Kaliane Zaira pelos estudos ômnicos.

Agradeço aos professores Emílio de Castro Miguel, Olney Vieira da Mota e a professora Maura da Cunha por me agraciar com a sua presença nesse momento tão importante, compondo a banca.

Agradeço a todos do LFBM que além de me ajudarem com dicas e experimentos, tornaram a experiência laboratorial única, divertida e simplesmente boa, vocês são incríveis. Gabriel e Érica por sempre me auxiliarem nas minhas dúvidas científicas e pessoais, dando sempre dicas e conselhos de como continuar e dar o meu melhor. A Thaynã, Larissa, Marciele e Layrana por além de sempre estarem disponíveis para ajudar com os experimentos se tornaram grandes amigas por todo o tempo compartilhado. À Milena, Arielle, Gabriela, Thomas, Matheus e João compartilharam bancada, estresses, alegrias e nos tornamos um para os outros amigos, deixando um pouco mais fácil essa jornada diária que todos estávamos e estamos passando.

Aos meus pais Júlio e Ecleonir que sempre me motivaram, me dando todo o suporte que poderia pedir, me colocando para cima nos momentos que estava mais pra baixo e me levantando em cada queda do percurso, dando todo o amor e carinho possível e imaginável por tudo isso e muito mais obrigado por serem os melhores. A meus irmãos Gladson e Naraiane, obrigado por estarem sempre ao meu lado mesmo que fisicamente distantes. A minha vó Eclair que também me criou junto aos meus pais, sendo sempre a pessoa que estava lá dando o melhor de si para que eu aprendesse de forma mais fácil o mundo. A toda minha família e minha namorada Giulliana que sempre me acolheram nos momentos mais estressantes, acreditando em mim e dando forças para que eu não parasse de evoluir. A todos vocês eu agradeço com todo o meu coração.

E por último, mas não menos importante agradeço a Deus pelo dom da vida.

## RESUMO

As plantas, ao longo de sua evolução, desenvolveram diversas estratégias biofísicas e bioquímicas para lidar com fatores bióticos e abióticos. Entre essas estratégias, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) destacam-se como uma defesa, proporcionando resistência direta e duradoura contra uma ampla gama de pragas e patógenos. Os AMPs exibem uma diversidade estrutural em suas sequências, estrutura e conformação, geralmente consistindo de 10 a 100 resíduos de aminoácidos. Sua riqueza em resíduos de cisteína é uma característica distintiva que promove a formação de pontes dissulfeto. Conferindo assim estabilidade e resistência à degradação causada por altas temperaturas, variações de pH e atividades proteolíticas. Sendo considerado moléculas de alto interesse biotecnológico. O objetivo do presente trabalho foi de isolar, caracterizar e realizar uma análise proteômica de peptídeos de frutos de *Capsicum annuum* obtidos 30 dias após a antese e realizar testes de inibição contra leveduras do gênero *Candida*. Após o plantio e colheita das pimentas, os frutos imaturos passaram por um processo de extração proteica ácida. Que foi selecionada em consideração ao trabalho realizado na dissertação, onde observamos uma maior concentração de peptídeos bioativos neste extrato. O extrato total ácido foi então analisado por meio de géis de tricina na presença de SDS para avaliar seu perfil proteico. Além disso, foi realizado uma análise proteômica do extrato ácido para avaliar as proteínas de interesse biotecnológico expressas, e foi testada a inibição de crescimento em relação aos fungos *Fusarium solani*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, onde foram observadas inibições significativas nas concentrações testadas. Esse extrato foi posteriormente submetido a uma cromatografia líquida de alta eficiência com uma coluna de troca iônica (DEAE) em fase reversa, resultando em sete frações denominadas de F1 até F7. Essas frações foram novamente analisadas por géis de tricina na presença de SDS para avaliação do perfil proteico, além de ensaios de inibição de crescimento e viabilidade contra *C. albicans*. As frações F1, F4 e F7 demonstraram inibições significativas. Dentre essas frações, a F1 foi selecionada para uma investigação mais aprofundada de seus possíveis mecanismos de ação, sendo submetida a ensaios adicionais contra *C. albicans* na presença de sondas de permeabilização de membranas e de espécies reativas de oxigênio (ROS), mas não foi observada fluorescência significativa. Apresentando assim diversas moléculas de interesse para estudos futuros com potencial antimicrobiano.

**Palavras chave:** AMP; *Capsicum annuum*; *Candida*; *Fusarium*; Proteômica;

## ABSTRACT

Plants, throughout their evolution, have developed various biophysical and biochemical strategies to deal with biotic and abiotic factors. Among these strategies, antimicrobial peptides (AMPs) stand out as a defense, providing direct and long-lasting resistance against a wide range of pests and pathogens. AMPs exhibit structural diversity in their sequences, structure, and conformation, typically consisting of 10 to 100 amino acid residues. Their richness in cysteine residues is a distinctive feature that promotes the formation of disulfide bridges, thus providing stability and resistance to degradation caused by high temperatures, pH variations, and proteolytic activities. They are considered molecules of high biotechnological interest. The objective of the present study was to isolate, characterize, and perform a proteomic analysis of peptides from *Capsicum annuum* fruits obtained 30 days after anthesis and to perform inhibition tests against yeasts of the *Candida* genus. After planting and harvesting the peppers, immature fruits underwent a process of acidic protein extraction, selected considering the work done in the dissertation, where a higher concentration of bioactive peptides was observed in this extract. The total acidic extract was then analyzed using tricine-SDS gels to assess its protein profile. Additionally, a proteomic analysis of the acidic extract was performed to evaluate the expressed proteins of biotechnological interest, and inhibition of growth was tested against the fungi *Fusarium solani*, *Candida albicans*, and *Candida tropicalis*, where significant inhibitions were observed at the tested concentrations. This extract was subsequently subjected to high-performance liquid chromatography with anion-exchange (DEAE) reverse-phase column, resulting in seven fractions named F1 to F7. These fractions were again analyzed by tricine-SDS gels for protein profile evaluation, as well as growth and viability inhibition assays against *C. albicans*. Fractions F1, F4, and F7 demonstrated significant inhibitions. Among these fractions, F1 was selected for further investigation of its potential mechanisms of action, being subjected to additional assays against *C. albicans* in the presence of membrane permeabilization probes and reactive oxygen species (ROS), but no significant fluorescence was observed. Thus, presenting several molecules of interest for future studies with antimicrobial potential.

**Keywords:** AMP; *Capsicum annuum*; *Candida*; *Fusarium*; Proteomics;

## LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

- FIGURA 1. Representação esquemática das principais classes estruturais encontradas nos peptídeos incluindo:  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -folhas, mistura de  $\alpha$ -hélice/  $\beta$ -folhas, cíclicos e lineares.** As pontes de dissulfeto, nos AMPs que as possuem, são representadas pelas esferas. Abaixo das imagens entre parênteses é apresentado o nome do AMP representado (KANG et al., 2014).....13
- FIGURA 2. Modelo ilustrativo dos diferentes tipos de mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos.** Fonte: Adaptado de (NGUYEN; HANEY; VOGEL,2011).....16
- FIGURA 3. Mecanismos de controle que atuam na síntese proteica onde um único gene dá origem a múltiplas conformações proteicas e diferentes funções.** (BALBUENA et al., 2011).....26
- FIGURA 4. Semente, planta e fruto (30 dias após antese) de *Capsicum annuum* (acesso UENF 1381).**.....29
- FIGURA 5. Eletroforese do extrato total ácido.** Imagem de gel de poliacrilamida na presença de tricina e SDS obtido com extrato total ácido de frutos imaturos de *C. annuum* tratadas com  $\beta$ -mercaptoetanol. (M) marcador de massa molecular (kDa). Extrato Total Ácido (ET).....40
- FIGURA 6. Ensaio de inibição do crescimento dos fungos filamentosos e leveduras pela fração proteica ET.** Gráficos de inibição de crescimento do fungo filamentoso *Fusarium solani* (A) das leveduras *Candida tropicalis* (B) e *Candida albicans* (C) respectivamente, na presença da extração ácida em um gradiente de concentração de 200 a 1,56  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e na ausência (controle) durante 24h.....41
- FIGURA 7. Ensaio de inibição da atividade de tripsina e quimiotripsina.** (A) A inibição de tripsina (A) e quimitripsina (B) foi feita na presença (50, 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e ausência (controle) do Extrato Total Ácido. ....42
- FIGURA 8. Perfil proteômico dos frutos imaturos de *Capsicum annuum* 30 dias após antese.** Grupos funcionais de proteínas de frutos agrupadas de acordo com o processo biológico (A) e função molecular (B).....43
- Figura 9. Perfil cromatográfico de ET em sistema de HPLC e perfil eletroforético das frações.** (A) Cromatografia de fase reversa em coluna C18

em HPLC do Extrato Total Ácido (ET) de frutos imaturos de *C. annuum*. (B) Visualização eletroforética das frações F1 a F7 por gel de poliacrilamida na presença de tricina e SDS. As frações foram obtidas por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC do ET. Foram utilizados 20 µg.mL<sup>-1</sup> de proteína em cada poço. A amostra foi tratada com β-mercaptoetanol. (M) marcador de massa molecular (kDa).....44

**Figura 10. Gráficos de inibição de crescimento das frações F1 a F7, contra a levedura *Candida albicans*.** Os gráficos estão em ordem de F1 a F7, em um gradiente de concentração variando de 200 a 0 µg.mL<sup>-1</sup> de cada fração durante 24h.....46

**Figura 11. Figura do teste de viabilidade da levedura contra a *Candida albicans* tratadas com as frações e suas porcentagens de inibição.** (A) Imagens das placas de Petri evidenciando o desenvolvimento de colônias na condição de controle e após 36 horas de tratamento com 200 µg.mL<sup>-1</sup> das frações F1 a F7, respectivamente, obtidas por meio de cromatografia de fase reversa em HPLC. (B) Tabela que ilustra a porcentagem de perda de viabilidade em *C. albicans* após 36 horas de tratamento com as frações F1 a F7.....48

**Figura 12. Figura do teste de viabilidade da fração F1 sem diluição.** Imagens das placas de Petri evidenciando o desenvolvimento de colônias, sem diluição, na condição de controle e após 36 horas de tratamento com 100 e 50 µg.mL<sup>-1</sup> da fração F1, obtida por meio de cromatografia de fase reversa em HPLC.....49

**Figura 13. Figura do teste da permeabilização da membrana com a sonda SYTOX Green.** Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda SYTOX Green, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 50 µg.mL<sup>-1</sup> da fração F1, obtida após cromatografia de fase reversa em HPLC. O ensaio foi lido no tempo de 24 h e as células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm.....50

**Figura 14. Figura do teste de aumento na produção de ROS com a sonda SYTOX Green.** Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda 2',7' – diclorofluoresceína diacetato, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 50 µg.mL<sup>-1</sup> da fração F1, obtida após cromatografia de fase reversa em HPLC.

O ensaio foi lido no tempo de 24 h e as células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm. ....51

**TABELA 1.** Peptídeos antimicrobianos e genes de peptídeos antimicrobianos identificados no gênero *Capsicum*.....23

## ABREVIATURAS

**AMPs** - Peptídeos antimicrobianos

**DEAE** – Dietilaminoetil

**DIC** - Contraste diferencial interferencial

**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético

**kDa** - Quilodaltons

**LTP** - Proteína transportadora de lipídeos

**EA** - Extrato total ácido

**F1 a F7** – Frações obtidas do HPLC

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio

**SDS** - Dodecil sulfato de sódio

**TFA** - Ácido trifluoroacético

**Tris** - Tris (hidroximetil) aminometano

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1. Peptídeos Antimicrobianos</b> .....	12
<b>1.2- Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos (AMPs)</b> .....	14
<b>1.3- Peptídeos antimicrobianos de plantas</b> .....	17
<b>1.4- Pimentas do gênero <i>Capsicum</i></b> .....	20
<b>1.5- Proteômica como ferramenta de estudo</b> .....	24
<b>1.6- Gênero <i>Candida spp.</i></b> .....	25
<b>1.7- Gênero <i>Fusarium spp.</i></b> .....	27
<b>2. OBJETIVO</b> .....	28
<b>2.1- Objetivo Geral</b> .....	28
<b>2.2- Objetivos Específicos</b> .....	28
<b>3. MATERIAIS</b> .....	28
<b>3.1- Materiais Biológicos</b> .....	28
<b>3.1-1. Frutos de pimenta</b> .....	29
<b>3.1-2. Microrganismos</b> .....	29
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	30
<b>4.1- Obtenção de mudas e cultivos de plantas</b> .....	30
<b>4.2- Extração ácida para obtenção de peptídeos e proteínas de frutos de <i>Capsicum annuum</i></b> .....	30
<b>4.3- Quantificação de proteínas</b> .....	31
<b>4.4- Eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina</b> .....	31
<b>4.5- Análise proteômica</b> .....	32
<b>4.5-1. Extração e quantificação de proteínas totais</b> .....	32

4.5-2. Digestão de proteínas.....	32
4.5-3. Análise dos fragmentos trípticos por espectrometria de massas .....	34
4.5-4. Análise dos dados.....	35
4.6- Ensaio de inibição do crescimento das células do fungo <i>Fusarium solani</i> .....	35
4.7- Ensaio de inibição do crescimento das leveduras	36
4.8- Cromatografia de fase reversa em HPLC .....	37
4.9- Análise da viabilidade celular fúngica .....	37
4.10- ..... Ensaio da inibição da atividade de tripsina e quimiotripsina .....	38
4.11- ... Ensaio de determinação de permeabilização de membranas fúngicas.....	38
4.12- . Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) .....	39
4.13- ..... Análise estatística	39
5. RESULTADOS .....	39
5.1- Perfil eletroforético do Extrato Total Ácido em gel unidimensional de poliacrilamida .....	40
5.2- Ensaio de inibição crescimento de fungos filamentosos e leveduras pelo Extrato Total Ácido de <i>C. annuum</i> .....	40
5.3- Ensaio da inibição da atividade enzimática de tripsina e quimiotripsina pelo extrato total de <i>C. annuum</i> .....	42

<b>5.4- Perfil proteômico de frutos imaturos de <i>C. annuum</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>5.6- Ensaio da atividade antimicrobiana das frações F1 a F7 sobre células de <i>C. albicans</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>5.7- Viabilidade celular de células de <i>C. albicans</i> tratadas com as frações obtidas do HPLC .....</b>	<b>47</b>
<b>5.8- Teste de viabilidade de células de <i>C. albicans</i> tratadas com a fração F1 em diferentes concentrações .....</b>	<b>48</b>
<b>5.9- Efeito da fração F1 sobre a permeabilização de membranas da levedura <i>C. albicans</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>5.10- Efeito da fração F1 sobre a indução da produção endógena de ROS em células de leveduras de <i>C. albicans</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Peptídeos Antimicrobianos

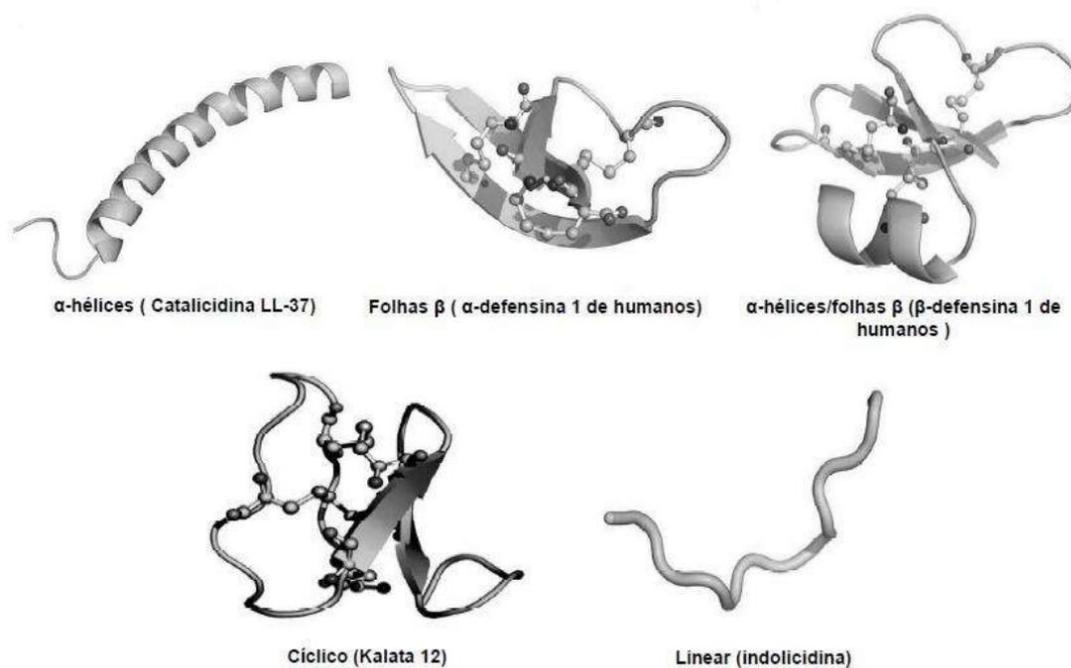
Os Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) são moléculas fundamentais no sistema de defesa em todos os reinos biológicos, desempenhando um papel crucial na resposta primária contra potenciais invasores. Sua expressão pode ocorrer constitutivamente, integrando o programa de desenvolvimento normal do organismo, ou ser induzida em resposta a fatores de estresse ambiental (PATEL; AKHTAR, 2017; ZHANG; GALLO, 2016).

Dentro desse contexto, os AMPs têm uma presença marcante tanto no sistema imunológico inato de vertebrados quanto no sistema de defesa inespecífica de fungos, invertebrados e de plantas, com uma história evolutiva que remonta a mais de 2,6 bilhões de anos. Ao longo desse extenso período, essas moléculas evoluíram para se tornarem agentes anti-infecciosos cruciais, demonstrando eficácia contra uma diversidade de vírus, bactérias, fungos e parasitas (GORDON; ROMANOWSKI; MCDERMOTT, 2005; LACERDA et al., 2014; MORAVEJ et al., 2018).

Os AMPs são categorizados em dois grupos distintos, conforme o método de síntese adotado. O primeiro grupo abrange aqueles que são produzidos por meio de extensos complexos enzimáticos, apresentando aminoácidos não ribossomais, exemplificados por gramidicinas, polimixinas, estreptograminas e vancomicina (AMPs provenientes de bactérias). O segundo grupo de AMPs é codificado por genes e sintetizado nos ribossomos. Esse último conjunto possui subclasses, diferenciadas com base em características como sequência primária, estruturas secundárias, tridimensionais e pontes dissulfeto (Figura 1) (KANG et al., 2014; TAM et al., 2015).

A primeira subclassificação engloba peptídeos que adotam uma conformação em  $\alpha$ -hélice em ambientes hidrofóbicos, como a cecropina, AMP proveniente da hemolinfa do inseto *Hyalophora cecropia*, e a magainina, AMP originário da pele do anfíbio *Xenopus leavis*. O segundo subgrupo compreende peptídeos com estruturas secundárias em folha- $\beta$ , exemplificados pela

taquiplesina ,AMP do caranguejo ferradura *Limulus polyphemus*, e a tanatina ,AMP do inseto *Podisus maculiventris* (TAM et al., 2015). A terceira subclassificação refere-se aos AMPs ricos em cisteínas, formando pontes dissulfeto e conferindo maior estabilidade à molécula, a exemplo de *PvD1*, AMP presente em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. O quarto subgrupo inclui peptídeos cíclicos devido à formação de uma ligação peptídica entre o N e o C-terminal como a Kalata B1, AMP da planta *Oldenlandia affinis* (JENNINGS et al., 2001). O último subgrupo engloba os AMPs estendidos, predominantemente ricos em aminoácidos específicos como prolina, triptofano, arginina e histidina, caracterizados pela ausência de elementos de estrutura secundária regulares. A indolicidina, AMP proveniente de neutrófilos de bovinos, é um representante desse grupo (BROEKAERT et al., 1997; ERDEM BÜYÜKKIRAZ; KESMEN, 2022).



**Figura 1.** Representação esquemática das principais classes estruturais encontradas nos peptídeos incluindo:  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -folhas, mistura de  $\alpha$ -hélice/  $\beta$ -folhas, cíclicos e lineares. As pontes de dissulfeto, nos AMPs que as possuem, são representadas pelas esferas. Abaixo das imagens entre parênteses é apresentado o nome do AMP representado (KANG et al., 2014).

Os AMPs apresentam uma diversidade estrutural significativa em suas sequências, estrutura e conformação, geralmente com 10 a 100 resíduos de aminoácidos e são ricos em resíduos de cisteína. Essa característica promove a formação de pontes dissulfeto, conferindo estabilidade e resistência a

degradações decorrentes de altas temperaturas, alteração de pH e ações proteolíticas (ANNUNZIATO; COSTANTINO, 2020). Os AMPs direcionam-se a uma ampla gama de microrganismos por meio de interações tanto inespecíficas de membrana, quanto de alvos específicos (KOEHBACH; CRAIK, 2019). Além de sua ação antimicrobiana, os peptídeos antimicrobianos reduzem a suscetibilidade à resistência microbiana, apresentando baixa toxicidade para células de mamíferos, efeitos sinérgicos com antibióticos convencionais, capacidade de modular o sistema imunológico e de neutralizar endotoxinas assim, ressaltando seu potencial relevância em diversas aplicações terapêuticas e biomédicas por sua versatilidade. (KOEHBACH; CRAIK, 2019; MELLO et al., 2019; PATEL; AKHTAR, 2017).

Diante da atual problemática da resistência adquirida pelos microrganismos, resultante do uso indiscriminado de fármacos convencionais, a busca por moléculas com potencial terapêutico tem se intensificado. Entre essas moléculas, os AMPs destacam-se como promissores para o desenvolvimento de novos fármacos, evidenciados por suas características distintivas no mecanismo de ação, atividade efetiva em baixas concentrações e potencial de aplicação em diversas áreas, incluindo agricultura, veterinária, alimentação e medicina. Além disso, esses peptídeos apresentam diversas propriedades biológicas, anteriormente postuladas em estudos, abrangendo atividades antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antitumorais. Sua vantagem adicional reside na menor propensão à adaptação e resistência microbiana, uma característica intrínseca que não exige receptores específicos (OGUIS et al., 2019).

## **1.2- Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos (AMPs)**

Diversos estudos têm explorado a relação entre a estrutura e a função dos AMPs, focalizando na modulação de parâmetros estruturais, como carga, conformação, hidrofobicidade, momento hidrofóbico, anfipaticidade e ângulo polar (BREEN et al., 2015). Essas investigações revelaram que tais propriedades desempenham um papel de importância na determinação da potência e do espectro de atividade antimicrobiana, operando de maneira

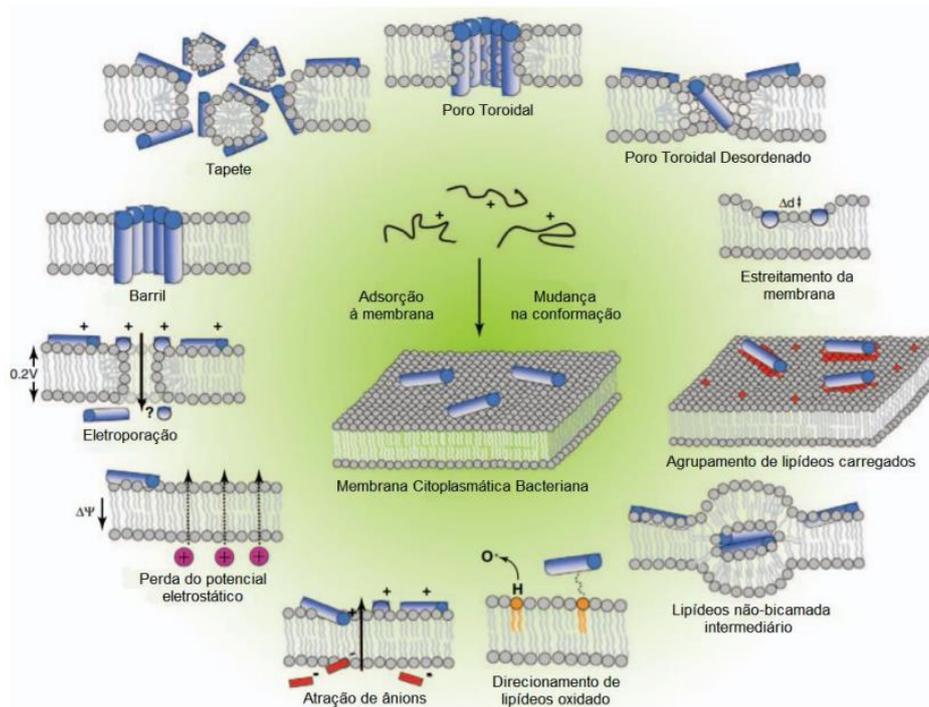
interdependente (TAM et al., 2015). Alterações em um parâmetro induzem mudanças simultâneas em outros, dificultando a avaliação da influência específica de uma única variável (YANG et al., 2018).

Os AMPs podem ser caracterizados pela presença de carga líquida positiva, variando de +2 a +9. Essa cationicidade resulta da ausência de resíduos ácidos, como ácido glutâmico e aspártico, e do excesso de resíduos de aminoácidos básicos, como arginina, lisina e histidina. O caráter catiônico desempenha um papel crucial na interação eletrostática dos AMPs com as membranas biológicas, que possuem carga elétrica negativa. Esta interação se destaca quando os AMPs demonstram uma baixa afinidade por membranas citoplasmáticas eletricamente neutras, proporcionando seletividade para a atividade antimicrobiana. Estudos diversos indicaram que a efetividade antimicrobiana dos AMPs pode estar relacionada ao seu caráter catiônico, associando alterações na carga líquida a variações na atividade antimicrobiana (ESPECHE et al., 2020).

Os AMPs manifestam diversos mecanismos de ação que se fundamentam na possível interação dessas moléculas com as membranas, resultando na formação de poros ao atingirem uma concentração limiar. No modelo de barril, os AMPs inserem-se paralelamente na membrana, formando um poro. Por outro lado, o modelo de tapete envolve a inserção desses peptídeos em porções da membrana, induzindo a formação de poros. No modelo de poro toroidal, também ocorre a formação de poros com os peptídeos inseridos paralelamente na membrana, porém entremeados com lipídeos (NAYAB et al., 2022).

Recentes investigações sobre o mecanismo de ação dos AMPs sugerem novos modelos para esclarecer como esses peptídeos rompem a membrana plasmática dos microrganismos (MELNIKOVA et al., 2023; NAYAB et al., 2022; SEYFI et al., 2020). O modelo de poro toroidal desordenado, ocorrendo com menor concentração de peptídeos em comparação ao modelo de poro toroidal, sugere uma disposição desordenada dos peptídeos, resultando na formação de um poro na membrana celular. O modelo de afinamento da membrana, por sua vez, aponta que a atração entre fosfolipídios carregados gera regiões mais

finas e frágeis nas membranas. Outra abordagem, conhecida como modelo de atração de ânions, sugere que os AMPs atraem pequenos ânions, induzindo sua passagem pela membrana e causando a perda do potencial eletrostático celular. Em um cenário alternativo, a perda do potencial eletrostático pode ocorrer sem a atração de íons. No modelo de eletroporação, os peptídeos afetam o potencial de membrana, reduzindo sua permeabilidade a diversas moléculas (Figura 2) (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018; NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).



**Figura 2.** Modelo ilustrativo dos diferentes tipos de mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos. Processos desencadeados na membrana citoplasmática bacteriana após a adsorção inicial do Peptídeo Antimicrobiano (AMP). Vale ressaltar que esses eventos não são necessariamente distintos entre si. Adaptado de Nguyen (2011).

Após rupturas ou permeabilização da membrana alvo, os AMPs ganham acesso ao meio citoplasmático, onde podem interagir com os elementos intracelulares, inibindo a atividade do DNA/RNA, proteínas e outros metabólitos essenciais. Esse processo controla ou interrompe o crescimento dos microrganismos. Além disso, foi observada a atividade dos AMPs na indução de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultante do excesso de ânions superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxil ( $OH$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) dentro

da célula do patógeno, causando danos e, em alguns casos, apoptose celular. Entretanto, alguns autores sugerem que o dano à membrana é apenas a primeira ação desses peptídeos (DESRIAC et al., 2020; SAVINI et al., 2020).

É fundamental compreender as relações entre as características estruturais dos AMPs e seus efeitos na atividade antimicrobiana para desenvolver análogos aprimorados com aplicação biotecnológica. Isso significa que entender como a estrutura molecular dos AMPs afeta sua capacidade de combater micro-organismos é essencial para criar versões melhoradas desses peptídeos que possam ser utilizadas em diversas áreas da biotecnologia. Ao estudar como diferentes aspectos da estrutura dos AMPs influenciam sua eficácia antimicrobiana, os cientistas podem projetar peptídeos com propriedades antimicrobianas mais potentes, seletivas e estáveis, visando aplicações que vão desde medicamentos até materiais biomédicos e alimentos. (SEYFI et al., 2020).

### **1.3- Peptídeos antimicrobianos de plantas**

As plantas, sendo organismos sésseis, permanecem fixas a um substrato, tornando-as suscetíveis a uma variedade de fatores que podem afetar negativamente seu desenvolvimento. Esses fatores podem ser categorizados como bióticos, representando os efeitos causados por organismos vivos, incluindo o estresse provocado por agentes fitopatogênicos. Além disso, existem os fatores abióticos, resultantes de influências do ecossistema, como variações abruptas de temperatura, elevados níveis de salinidade em determinados solos, flutuações de pH e escassez de nutrientes (LI et al., 2021; MITHÖFER; BOLAND, 2012; TAM et al., 2015).

Campos et al. (2018) propõem que, dentre as diversas estratégias desenvolvidas pelas plantas para enfrentar fatores bióticos e abióticos, os AMPs se destacam como sistema de defesa, conferindo resistência direta e duradoura contra uma ampla variedade de pragas e patógenos. Propriedades estruturais específicas, como comprimento, carga, hidrofobicidade, ângulo polar e conformação, desempenham um papel crucial para que os AMPs

vegetais atuem como um escudo químico, dificultando os ataques dos adversários (BENKO-ISEPPON et al., 2010).

Dentre as diversas classes estruturais de AMPs que contribuem para a defesa das plantas, as defensinas vegetais, proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs), tioninas e os ciclotídeos são as mais estudadas e caracterizadas. Esses peptídeos, em geral, exibem uma ampla atividade inibitória contra diversos organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, insetos, entre outros (BERROCAL-LOBO et al., 2002; LI et al., 2021).

Nas plantas, as defensinas foram inicialmente identificadas em sementes de trigo (*Triticum aestivum*) e cevada (*Hordeum vulgare*), sendo a primeira proteína cuja atividade contra patógenos foi detectada *in vitro*, inicialmente categorizada de forma errônea como um subgrupo de tioninas ( $\gamma$ -tioninas), uma família anteriormente conhecida como toxinas vegetais devido à sua toxicidade contra bactérias, fungos, células de mamíferos e larvas de insetos. Essas duas classes de peptídeos compartilham características como massa molecular (5 kDa), sequência de aminoácidos e oito cisteínas estabilizadas por quatro pontes dissulfeto, além de apresentarem atividades antifúngicas e antibacterianas. No entanto, estudos subsequentes reclassificaram as defensinas como um grupo distinto, com base em sua conformação estrutural, semelhante às defensinas identificadas em mamíferos e insetos (CARVALHO; GOMES, 2009; ODINTSOVA et al., 2008; WHITE; CRAIK, 2016).

A primeira observação de atividade dos ciclotídeos foi associada a efeitos uterotônicos na planta *Oldenlandia affinis* (Roem. & Schult.) DC. Essa classe protéica é cíclica devido à presença de uma ligação peptídica formada entre o grupo N e o grupo C-terminal. Os ciclotídeos consistem em cerca de 30 resíduos de aminoácidos, sendo seis cisteínas conservadas conectadas por três pontes dissulfeto. Sua expressão é constitutiva, desempenhando papel fundamental na defesa vegetal contra patógenos. Com base na estrutura primária da cadeia polipeptídica, os ciclotídeos são divididos em três subfamílias: Möbius, Bracelete e a subfamília dos inibidores de tripsina, e

apresentam atividades inseticida, moluscida, anti-helmíntica e antimicrobiana (CHERENE; TESE, 2023; CRAIK et al., 1999; HALLOCK et al., 2000; JENNINGS et al., 2001; LI et al., 2021)

As proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) constituem uma classe de peptídeos catiônicos estruturalmente compactos, amplamente distribuídos e solúveis, inicialmente identificados em tubérculos de batata (SALMINEN; BLOMQUIST; EDQVIST, 2016). Essa categoria de AMPs é exclusiva de vegetais, embora não seja encontrada na maioria das algas e fungos. A principal função das LTPs é facilitar a transferência de lipídeos (FINKINA et al., 2016). Devido à sua baixa especificidade para substratos lipídicos, as LTPs de plantas também são conhecidas como Proteínas Transportadoras de Lipídios Não-Específicas (nsLTP). A estrutura dessas proteínas é caracterizada por quatro pontes dissulfeto conservadas, formando quatro a cinco hélices alfa dobradas para criar uma estrutura compacta e resistente à desnaturação. Um padrão de oito cisteínas (C-X<sub>n</sub>-C-X<sub>n</sub>-CC-X<sub>n</sub>-CXC-X<sub>n</sub>-CX<sub>n</sub>-C) está presente em todas as LTPs. Com base nesse padrão de cisteínas e na sequência de aminoácidos, as LTPs são classificadas em duas principais categorias, sendo as LTPs tipo 1 e as LTPs tipo 2 as mais estudadas. Os peptídeos pertencentes ao grupo LTP1 possuem uma massa molecular de aproximadamente 10 kDa, enquanto os do grupo LTP2 apresentam uma massa em torno de 7 kDa (EDQVIST et al., 2018). Cavidades hidrofóbicas são criadas para facilitar a união e o transporte de lipídios (BERECZ et al., 2010). Essas cavidades são altamente flexíveis, capazes de acomodar uma variedade de lipídios, e assumem a forma de um túnel nas LTP1s e uma forma cônica nas LTP2s (MELNIKOVA et al., 2023). Sugere-se que as LTPs interajam com os lipídios da membrana, translocando-os para o meio extracelular, resultando na permeabilização das membranas e na indução de apoptose (FINKINA et al., 2016). As LTPs exibem uma gama variada de atividades biológicas, desempenhando um papel fisiológico crucial na defesa das plantas. Além disso, apresentam aplicações terapêuticas devido às suas atividades antitumorais e antimicrobianas, com baixa toxicidade para as células de mamíferos (FINKINA et al., 2016; REGENTE et al., 2005). Esses peptídeos também encontram aplicação em biotecnologia, contribuindo para o

desenvolvimento de sistemas de liberação de medicamentos, na indústria de alimentos, na criação de cultivares resistentes a estresses bióticos e abióticos, bem como no diagnóstico e tratamento de doenças alérgicas (MELNIKOVA et al., 2023).

#### **1.4- Pimentas do gênero *Capsicum***

O gênero *Capsicum*, pertencente à família Solanaceae, compreende uma variedade de espécies de pimentas e pimentões originárias dos trópicos do continente americano, sendo de grande importância agrônômica, social e econômica (DIAS et al., 2013a; LANNES et al., 2007). Atualmente, o gênero *Capsicum* abriga 38 espécies, das quais cinco são domesticadas, incluindo *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. e *Capsicum chinense* Jacq., sendo o Brasil o detentor da maior concentração de diversidade, com 16 espécies (MOSCONI et al., 2007; SILVAR; GARCÍA-GONZÁLEZ, 2017). *C. annuum*, uma das culturas domésticas mais antigas nas Américas, destaca-se como a espécie deste gênero mais diversificada e amplamente cultivada no globo, incluindo variedades de pimentas e pimentões, como pimentão doce, páprica e variedades de pimentas mexicanas (KIM et al., 2014).

O reconhecimento desse gênero pela sua importância farmacológica, nutritiva e econômica é contraposto pela suscetibilidade de seu cultivo à degradação por agentes patogênicos, como fungos, bactérias e vírus (DIAS et al., 2013a). Além de sua procura global como condimento devido à pungência e sabor, as pimentas ganham valorização por suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas, assumindo relevância tanto cultural quanto econômica (SILVAR; ROCHA; BARATA, 2022; TRIPODI et al., 2021).

Ao longo da história, as propriedades da pimenta foram empregadas para prevenir intoxicações alimentares causadas por microrganismos patogênicos (TEWKSBURY et al., 2008). Atualmente, evidências indicam que as plantas do gênero *Capsicum* contêm agentes antimicrobianos não relacionados aos capsaicinóides, apresentando compostos inéditos codificados em seu genoma, os quais demonstram ampla atividade antimicrobiana *in vivo* e *in vitro* (FERNANDO et al., 2011).

Nas últimas duas décadas, diversos AMPs de *Capsicum sp.* foram isolados e caracterizados, englobando defensinas (ANAYA-LÓPEZ et al., 2006; DA SILVA GEBARA et al., 2020; MARACAHIPES et al., 2019a), proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) (DIZ et al., 2011), inibidores de proteases (DA SILVA PEREIRA et al., 2018a; DIZ et al., 2011; RIBEIRO et al., 2007a), AMPs similares à tionina (TAVEIRA et al., 2014),  $\gamma$ -tionina (DÍAZ-MURILLO et al., 2016), e heveína-símile (GOMES et al., 2016). Os mecanismos de ação e as atividades biológicas desses peptídeos de *Capsicum* foram elucidados, apresentando efeitos semelhantes à apoptose em fungos (RIBEIRO et al., 2007b), incluindo a indução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como a permeabilização de membranas de microrganismos (SILVA et al., 2017; TAVEIRA et al., 2014, 2018). A tabela 1 apresenta uma síntese dos diversos peptídeos antimicrobianos e seus respectivos genes identificados em plantas do gênero *Capsicum* até o ano de 2022, conforme documentado por Oliveira *et al.* (2022).

**Tabela 1-** Peptídeos antimicrobianos e genes de peptídeos antimicrobianos identificados no gênero *Capsicum*.

Gene name	Peptide name	Number of amino acid residues	Molecular mass	Family	Plant organ	Species	Antimicrobial activity in vitro	Reference
<i>PepThi</i>	-	-	-	Thionin-like	Fruits, Leaves, Stems, and Roots	<i>C. annuum</i>	not determined	Oh et al. (1999)
<i>CATHION1</i>	-	-	-	Thionin	Leave	<i>C. annuum</i>	not determined	Lee et al. (2000a)
-	CaThi	-	-6 kDa	Thionin	Fruit	<i>C. annuum</i>	<i>F. solani</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. pelliculosa</i> <i>C. butnensis</i> <i>C. mogii</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	Taveira et al. (2014; 2016; 2017)
<i>J1</i>	J1	48	-5 kDa	Defensin	Fruit	<i>C. annuum</i>	<i>F. oxysporum</i> <i>B. cinerea</i>	Meyer et al. (1996)
<i>j1-1 and j1-2</i>	-	-	-	Defensin	-	<i>C. annuum</i>	not determined	Meyer et al. (1996); Houlné et al. (1998); Oh et al. (1999)
<i>CADEF1</i>	-	-	-	Defensin	Stem, Root, and Fruit of unripe peppers	<i>C. annuum</i>	not determined	Do et al. (2004)
<i>CDef1</i>	CDef1	47	5,2 kDa	Defensin	Fruit	<i>C. annuum</i>	not determined	Maarof et al. (2011)
-	IIF7Ca	-	-5 kDa	Defensin	Fruit	<i>C. annuum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Maracahipes et al. (2019a)
-	Cadef1	-40	5 kDa	Defensin	Fruit	<i>C. annuum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Maracahipes et al. (2019b)
<i>CanThio1</i>	CanThio1	64	7,22 kDa	Defensin	Flowers	<i>C. annuum</i>	not determined	Nikte et al. (2019)
<i>CanThio2</i>	CanThio2	72	8,36 kDa					
<i>CanThio3</i>	CanThio3	63	7,13 kDa					
<i>CanThio4</i>	CanThio4	81	9,32 kDa					
<i>CanThio5</i>	CanThio5	59	6,73 kDa					
<i>CanThio6</i>	CanThio6	59	6,70 kDa					
<i>CanThio7</i>	CanThio7	59	6,73 kDa					
<i>CanThio8</i>	CanThio8	59	6,81 kDa					
-	CaDeF2.1	40	5 kDa	Defensin	Fruit	<i>C. annuum</i>	<i>C. butnensis</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>M. tuberculosis</i>	Gebara et al. (2020)
-	CaDeF2.2	40	-6 kDa					
-	CeDef3	-	-6,5 kDa	Defensin	Fruit	<i>C. chinense</i>	<i>C. albicans</i> <i>C. butnensis</i> <i>C. tropicalis</i>	Aguiciras et al. (2021)
<i>CALTP1</i>	-	-	-	LTP	Leaves, Stalks, Fruit	<i>C. annuum</i>	not determined	Jung et al. (2003)
<i>CALTP2</i>	-	-	-					
<i>CALTP3</i>	-	-	-					

Gene name	Peptide name	Number of amino acid residues	Molecular mass	Family	Plant organ	Species	Antimicrobial activity in vitro	Reference
<i>CcLTP</i>	CcLTP-27	136	13.5 kDa	LTP	Fruit	<i>C. chinense</i>	not determined	Liu et al. (2006)
-	CcLTP+27	145	14.3 kDa	LTP	Seed	<i>C. annuum</i>	<i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. pombe</i>	Diz et al. (2006)
-	F1	-	~ 10 kDa	LTP	Seed	<i>C. annuum</i>	<i>F. oxysporum</i> <i>C. lindemuthianum</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. albicans</i>	Cruz et al. (2010)
-	CM1	-	9 kDa	LTP	Seed	<i>C. annuum</i>	<i>C. lindemuthianum</i> <i>C. tropicalis</i>	Diz et al. (2011)
-	Ca-LTP <sub>1</sub>	-	9 kDa	LTP	Seed	<i>C. annuum</i>	<i>C. lindemuthianum</i> <i>C. tropicalis</i>	Chen et al. (2011)
<i>CaMF2</i>	CaMF2	94	9,65 kDa	LTP	Anther	<i>C. annuum</i>	not determined	Antcheva et al. (1996)
-	PSI-1.1	55	6,05 kDa	PI	Seed	<i>C. annuum</i>	not determined	Moura and Ryan (2001)
-	PLPIs	-	6 kDa	PI	Leaves	<i>C. annuum</i>	not determined	Antcheva et al. (2001)
-	PSI-1.2	52	-	PI	Seed	<i>C. annuum</i>	not determined	Tamhane et al. (2005)
-	CapA1	-	~ 12 kDa	PI	Leaves	<i>C. annuum</i>	not determined	Mishra et al. (2013)
-	CapA2	-	~ 12 kDa	PI	Leaves	<i>C. annuum</i>	not determined	Dias et al. (2013)
<i>CanPI-7</i>	CanPI-7	-	25 kDa	PI	-	<i>C. annuum</i>	not determined	Dias et al. (2013)
<i>CanPI-15</i>	CanPI-15	-	6 kDa	PI	Seed	<i>C. chinense</i>	<i>C. albicans</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>C. tropicalis</i> <i>K. marxianus</i>	Dias et al. (2013)
-	PEF2 -B	-	8,5 kDa	PI	Seed	<i>C. chinense</i>	not determined	Bard et al. (2015)
-	PEF3	-	5 kDa	PI	Seed	<i>C. chinense</i>	not determined	Bard et al. (2015)
-	HyPep	-	6 kDa	PI	Seed	<i>C. annuum</i> Hybrid (Ikeda X UENF 1381)	<i>S. cerevisiae</i> <i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>K. marxianus</i>	Bard et al. (2015)
-	CaTI	-	6 kDa	PI	Seed	<i>C. annuum</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. albicans</i> <i>K. marxianus</i> <i>C. gloeosporioides</i> <i>C. lindemuthianum</i> <i>F. oxysporum</i>	Ribeiro et al. (2012); Silva et al. (2017a, b)
-	H4	-	9 kDa	Vicilin-like	-	<i>C. baccatum</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>K. marxianus</i>	Bard et al. (2014)
-	Ca-Alb	-	-	2 S albumin	Seed	<i>C. annuum</i>	<i>K. marxianus</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i>	Ribeiro et al. (2012)
-	HEV-CAN	40	4,258 kDa	Hevein-like	Leaves	<i>C. annuum</i>	<i>Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis</i> <i>Ralstonia solanacearum</i>	Games et al. (2016)

(OLIVEIRA et al., 2022).

### **1.5- Proteômica como ferramenta de estudo**

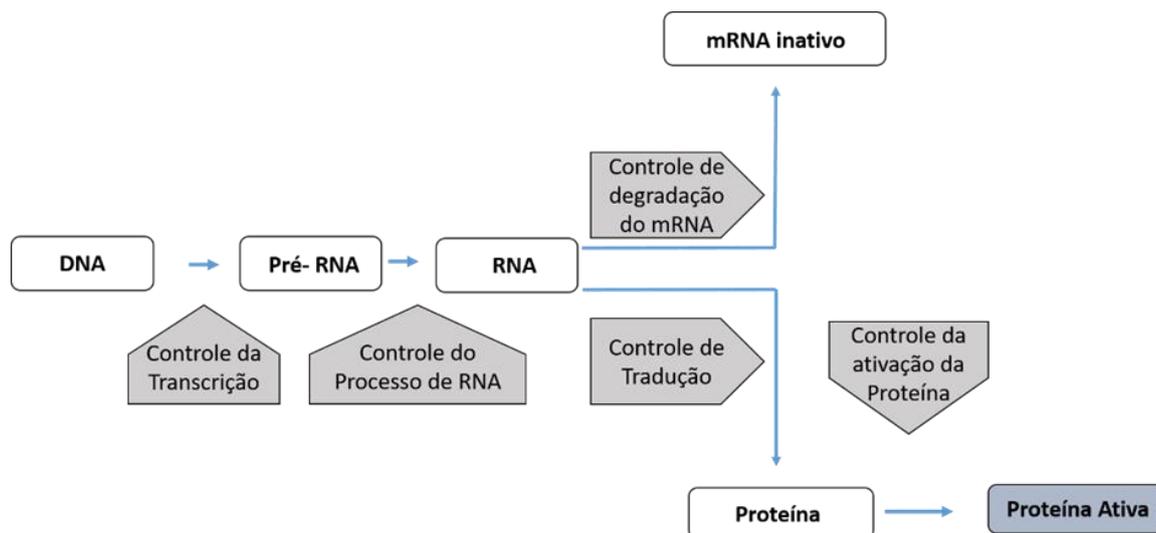
A origem do termo "proteômica" remonta à primeira reunião sobre Eletroforese 2-DE em Siena, Itália, em 1994, quando Mark Wilkins introduziu essa designação (WASINGER et al., 1995). A proteômica, como campo de estudo, concentra-se nos proteomas, ou seja, no conjunto de proteínas expressas em um organismo, célula ou tecido específico em um momento e condição determinados (WASINGER et al., 1995; WILKINS et al., 1996).

Ao proporcionar informações cruciais sobre propriedades proteicas, incluindo expressão, modificações pós-traducionais e interações, a análise proteômica possibilita uma avaliação abrangente da expressão proteica em tecidos sob diversas condições fisiológicas (patológicas e saudáveis), tratadas ou não, resistentes ou não a condições adversas (WASINGER et al., 1995). O cerne da proteômica reside na investigação qualitativa e quantitativa dos proteomas, compreendendo modificações diversas, interações e funções de proteínas específicas ou conjuntos delas (DI PALMA et al., 2012). Graças às tecnologias avançadas, a análise proteômica contribuiu para uma compreensão precisa dos perfis proteicos em organismos específicos, permitindo uma análise abrangente das mudanças bioquímicas em células ao longo do desenvolvimento (CHEN; HARMON, 2006).

A regulação da síntese proteica envolve diversos mecanismos (Figura 3), sendo que modificações pós-transcricionais e pós-traducionais desempenham papéis fundamentais na regulação espacial e temporal da expressão e na conformação de proteínas. Essas modificações influenciam várias classes de proteínas, exercendo papéis diversos nas vias metabólicas e na composição proteômica de um organismo (BALBUENA et al., 2011). Devido à disponibilidade de extensa informação sobre sequências nucleotídicas e aos avanços alcançados na identificação sensível e rápida de proteínas por meio da espectrometria de massa, as abordagens proteômicas oferecem novas perspectivas para analisar os peptídeos antimicrobianos em plantas (CÁNOVAS et al., 2004).

Estudos recentes enfatizam a importância do perfil de AMPs expressos ou identificados em uma espécie de planta sujeita a estresse específico ou

condição fisiológica. Esses perfis têm o potencial de revelar a presença de novos alérgenos e moléculas antimicrobianas em baixa abundância, contribuindo para a segurança e rastreabilidade de ingredientes alimentícios. Além disso, essas pesquisas ajudam a compreender as variações peptídicas dentro da mesma espécie em diferentes fases de crescimento e órgãos da planta (FARROKHI; WHITELEGGE; BRUSSLAN, 2008; NEWTON et al., 2004; RIGHETTI; BOSCHETTI, 2016; UMADEVI et al., 2018).



**Figura 3.** Mecanismos de controle que atuam na síntese proteica onde um único gene dá origem a múltiplas conformações proteicas e diferentes funções. Adaptado de (BALBUENA et al., 2011).

### 1.6- Gênero *Candida* spp.

O gênero *Candida*, pertencente à família Saccharomycetaceae, compreende aproximadamente 200 espécies de leveduras que colonizam habitualmente diversos nichos corporais, incluindo orofaringe, trato gastrointestinal, cavidade bucal, dobras da pele, mucosa do sistema respiratório, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes. Em contextos clínico e epidemiológico, é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas em ambientes hospitalares (ODDS et al., 1988; RICHARDSON, 2022; SHIN et al., 2002).

As espécies mais relevantes do gênero *Candida*, como *C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, afetam mais de

400.000 pessoas anualmente, com taxas de mortalidade variando de 10 a 25%, dependendo do estado imunológico do paciente. *C. albicans* destaca-se como a espécie mais prevalente em infecções humanas, devido à sua significativa incidência em condições normais e patológicas. Ao contrário de outras espécies do gênero, *C. albicans* está amplamente distribuída na natureza, ocupando diversos habitats (BARANTSEVICH; BARANTSEVICH, 2022; ODDS et al., 1988; SHIN et al., 2002).

O relatório global sobre vigilância da resistência antimicrobiana, publicado pela OMS, documenta que apenas três classes de medicamentos antifúngicos convencionais estão disponíveis para o tratamento da candidíase invasiva: os azóis (fluconazol), as equinocandinas (caspofungina) e os polienos (anfotericina B) (WHO, 2014). Nos últimos anos, observou-se uma elevada resistência antifúngica do gênero *Candida* contra todas as três classes de medicamentos utilizadas, tornando urgente a necessidade de novas moléculas antifúngicas para combater essas e outras infecções fúngicas hospitalares (NETO et al., 2022; PFALLER, 2012).

Os fungos pertencentes ao gênero *Candida* têm adquirido uma importância crescente no contexto da saúde pública. Em 2019, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) desenvolveu uma lista para enfrentar patógenos resistentes, classificando-os com base no grau de ameaça à saúde pública. Os fungos do gênero *Candida* foram incluídos nas categorias de "ameaças urgentes", referindo-se a patógenos que demandam ações imediatas e intensivas, e "ameaças sérias", relacionadas a patógenos que exigem intervenções rápidas e sustentáveis (CDC, 2019).

No ano de 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma lista de patógenos fúngicos prioritários, orientando pesquisas e intervenções em saúde pública. Essa diretriz tornou-se necessária devido ao aumento da população suscetível a infecções fúngicas, incluindo indivíduos imunocomprometidos e portadores de comorbidades. A lista da OMS abrange dezenove espécies que representam uma séria ameaça à saúde pública, sendo categorizadas como ameaça crítica, alta e média. As leveduras do gênero *Candida* destacam-se, com representantes em todas as três categorias:

*C. auris* e *C. albicans* (crítica); *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (alta); e *C. krusei* (média) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Dessa forma, torna-se urgente explorar alternativas medicamentosas para reverter essa situação e aumentar as chances de sobrevivência e recuperação do paciente (MELLO et al., 2019).

### **1.7- Gênero *Fusarium* spp.**

O gênero *Fusarium* constitui um amplo grupo monofilético de várias centenas de espécies que, com exceção de algumas, produzem macroconídios multisseptados característicos fusiformes. O gênero inclui diversos fitopatógenos vegetais causadores de várias doenças, como podridão da coroa, queima da cabeça e crostas de grãos de cereais. Sendo também cada vez mais associados a infecções oportunistas em humanos e outros animais (COLEMAN, 2016; MUHAMMED et al., 2011).

Nos seres humanos, as espécies de *Fusarium* causam uma ampla variedade de infecções, sendo o segundo fungo mais comum associado a infecções fúngicas. Isso resulta em infecções sistêmicas com uma alta taxa de mortalidade, além de infecções localizadas na pele e em outras partes do corpo. Em indivíduos imunocompetentes, os isolados do complexo de espécies *Fusarium solani* são principalmente reconhecidos por causarem ceratite micótica após a introdução traumática do inóculo. Por outro lado, pacientes neutropênicos, que são particularmente suscetíveis devido à forte imunocomprometimento, podem enfrentar a disseminação da infecção a partir de origens superficiais ou subcutâneas, o que frequentemente resulta em fatalidades (NUCCI; ANAISSIE, 2007; ZHANG et al., 2006).

Apresentando um desafio significativo para a condução de estudos clínicos, uma vez que os pacientes com fusariose sistêmica geralmente estão gravemente enfermos e têm uma alta taxa de mortalidade (MUHAMMED et al., 2011). Além disso, o *Fusarium* é listado como um patógeno fúngico prioritário, direcionando pesquisas e intervenções em saúde pública, de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Assim, há uma necessidade considerável de estudos relacionados a este patógeno.

## 2. OBJETIVO

### 2.1- Objetivo Geral

Isolar, caracterizar e análise proteômica de peptídeos de frutos de *Capsicum annuum* obtidos 30 dias após a antese e testes contra leveduras do gênero *Candida* e fungo filamentoso *Fusarium*.

### 2.2- Objetivos Específicos

- A. Obter e analisar o perfil proteico do extrato ácido obtido de frutos imaturos de *Capsicum annuum*;
- B. Determinar o perfil proteômico do Extrato Total Ácido e dos processos biológicos e função molecular das proteínas coletadas;
- C. Avaliar a eficácia inibitória do Extrato Total Ácido em ensaios antifúngicos contra leveduras do gênero *Cândida* e fungos filamentosos do gênero *Fusarium*, bem como em ensaios da inibição da atividade enzimática de tripsina e quimiotripsina.
- D. Isolar os peptídeos presentes no Extrato Total Ácido e avaliar o potencial antifúngico das frações obtidas sobre leveduras do gênero *Candida*, comparando suas concentrações inibitórias mínimas, dose letal e tempo de morte;
- E. Identificar os mecanismos de ação dos peptídeos purificados com maior porcentagem inibitória, para a permeabilização de membrana e detecção de ROS;

## 3. MATERIAIS

### 3.1- Materiais Biológicos

### 3.1-1. Frutos de pimenta

A pimenta utilizada neste estudo foi a *C. annuum* (acesso UENF 1381), armazenada no banco ativo de germoplasma do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Nossos esforços de pesquisa têm sido direcionados ao estudo dessa pimenta, resultando na identificação de peptídeos antimicrobianos de interesse biotecnológico e agrônômico (TAVEIRA et al., 2014; LÓPEZ et al., 2006; DA SILVA GEBARA et al., 2020; MARACAHIPES et al., 2019a; DA SILVA PEREIRA et al., 2018a; DIZ et al., 2011; RIBEIRO et al., 2007a; OLIVEIRA et al. 2022).

Para a condução deste estudo, foi selecionado o fruto verde 30 dias após a antese, considerando a expressão genética mais acentuada nesse estágio com base nos dados obtidos de minha monografia. Onde apresentaram uma capacidade inibitória superior em comparação com estágios diferentes de maturação.



**Figura 4.** Semente, planta e fruto (30 dias após antese) de *Capsicum annuum* (acesso UENF 1381). Foto de acervo pessoal.

### 3.1-2. Microrganismos

O fungo filamentosso *Fusarium solani* foi cultivado em meio de cultura BDA (Agar batata e dextrose), e as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram cultivadas em meio de cultura Ágar Sabouraud. Ambos foram mantidos na refrigeração na temperatura de 4 °C, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1- Obtenção de mudas e cultivos de plantas**

Para obtenção de mudas, as sementes de *Capsicum annuum* (acesso UENF 1381) foram semeadas em bandejas de material isotérmico de 72 células em substrato comercial organovegetal Vivatto® e estas foram mantidas em câmara de crescimento a 28 °C para germinação das sementes. Foram semeadas duas sementes por célula e após a germinação, que ocorreu em torno de 15 dias, foi realizada a separação das plântulas deixando apenas uma plântula por célula. O transplântio para vasos em casa de vegetação foi realizado quando as mudas apresentavam dois pares de folhas definitivas. O aparecimento de frutos foi em torno de 120 dias após o transplântio e a colheita dos mesmos foi realizada aproximadamente 30 dias após a antese. As plantas foram irrigadas uma vez ao dia.

### **4.2- Extração ácida para obtenção de peptídeos e proteínas de frutos de *Capsicum annuum***

Os frutos imaturos sem sementes foram liofilizados por duas semanas e macerados a homogeneizado sólido com a utilização de nitrogênio líquido. O homogeneizado foi desengordurado com éter de petróleo (1:10) a temperatura de 37 °C durante uma hora, com trocas de éter de 20 em 20 minutos. Os peptídeos e as proteínas foram extraídos com uma mistura de 1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), HCl 1 M, 5% (v/v) de ácido fórmico e 1% (p/v) de NaCl na presença de pepstatina A (1 g.mL<sup>-1</sup>) com uma relação frutos / solvente de 1:10 (EGOROV et al., 2005). Após centrifugação (14000 RPM x 15 minutos)

o sobrenadante foi dialisado por 2 dias em água destilada e liofilizado, obtendo-se assim o extrato proteico final que foi nomeado como Extrato Total Ácido (ET).

#### **4.3- Quantificação de proteínas**

As determinações quantitativas das proteínas foram realizadas como descrito por Smith et al. (1985) utilizando o método do ácido bicinconínico conjuntamente com o sulfato de cobre para obtenção da absorbância das proteínas contidas nos extratos, e a albumina sérica bovina (Sigma) foi utilizada como proteína padrão. As absorbâncias foram lidas no leitor de placas a 544 nm.

#### **4.4- Eletrofose em gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina**

Para determinar a massa molecular dos peptídeos presentes no Extrato Total Ácido (ET) e nas frações obtidas, foi realizado um gel de poliacrilamida de acordo com Schägger Von Jagow (1987). Nessa metodologia, foram usadas placas de vidro de 7 x 10 cm e 8 x 10 cm e espaçadores de 0,5 mm. Para preparação do gel de separação foi utilizada a concentração de 16,4% de acrilamida/bisacrilamida e o gel de concentração com 3,9% de acrilamida/bisacrilamida. Para o preparo da amostra, as frações foram liofilizadas e a estas foram adicionados 5 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 2,5%; sacarose 15%; azul de bromofenol 0,25%), 1 µL de β-mercaptoetanol 5% e o volume foi elevado até o final de 20 µL com água ultrapura. Em seguida, as amostras foram aquecidas por 5 min a 100 °C e centrifugadas a 16.000 x g por 5min, à temperatura ambiente. Em seguida, foram aplicados 20 µL de cada amostra no gel e 10 µL do marcador da Sigma®(MW-SDS-17S) com as seguintes massas de proteínas em kDa: 26,6; 17,0; 14,2; 6,5; 3,2 e 1,06, que foi utilizado para estimar a massa molecular dos peptídeos das frações analisadas. O sistema de corrida do gel foi montado e foram adicionados o tampão anodo (Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9; SDS 0,2%) na parte externa e o tampão catodo (Tricina 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M, pH 8,3; SDS 0,1%) na parte interna do

sistema. A eletroforese foi realizada na voltagem de 20 V por aproximadamente 16h. Ao final da corrida, o gel foi desmontado e colocado em solução de fixação (metanol 40% e ácido acético 10%) por 30min e foi, posteriormente, imerso em uma solução de coloração (Coomassie Blue G 0,025% e ácido acético 10% em água destilada) em agitação constante por aproximadamente 1h. Em seguida, o gel foi imerso em uma solução de descoloração de ácido acético 10% em água destilada, até que fosse possível visualizar as bandas proteicas presentes no gel sendo posteriormente mantido em água destilada.

#### **4.5- Análise proteômica**

##### **4.5-1. Extração e quantificação de proteínas totais**

Os frutos imaturos de 30 dias após a antese foram coletados para a análise proteômica. O tampão de extração de proteínas foi composto por 7 M de ureia, 2 M de tiourea, 2% de triton X-100, 1% de ditioneína (DTT), 1 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF) e o coquetel completo de inibidores de protease. Três amostras biológicas (300 mg cada amostra) foram pulverizadas utilizando um almofariz e pilão em nitrogênio líquido, em microtubos. Em seguida, 1 mL de tampão de extração foi adicionado ao pó da amostra. As amostras foram agitadas por 30 minutos a 4 °C e centrifugadas a 16.000 x g por 20 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados, e a concentração de proteínas foi determinada utilizando o kit 2-D Quant kit.

##### **4.5-2. Digestão de proteínas**

Antes da etapa de digestão com tripsina, as amostras de proteínas passaram por precipitação utilizando a metodologia de metanol/clorofórmio, conforme descrito por Nanjo et al. (2012), visando eliminar interferências nas amostras. Após a precipitação, as proteínas foram ressuspensas em uma solução de ureia/tiourea (7 M/2 M). A digestão das proteínas foi conduzida por meio da metodologia de preparação de amostras auxiliada por filtro (FASP), seguindo o protocolo proposto por Wisniewski et al. (2009), com adaptações

realizadas de acordo com Reis et al. (2021). Antes de iniciar o procedimento de digestão, realizou-se um teste de integridade para garantir que as unidades de filtro não estivessem danificadas, conforme orientações de Hernandez-Valladares et al. (2016). Somente as unidades em condições e de integridade adequadas foram empregadas. Em seguida, alíquotas de proteína foram adicionadas às unidades de filtro Microcon-30 kDa, seguido por lavagem com 200  $\mu$ L de bicarbonato de amônio 50 mM (solução A) e centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos a 25 °C (todos os passos subsequentes de centrifugação foram realizados nessas condições, conforme protocolo de Lipecka e Cols 2016).

Essa etapa foi realizada novamente para assegurar a remoção completa da ureia antes da redução das proteínas. Para isso, foram adicionados às amostras 100  $\mu$ L de DTT 50 mM, previamente refrigerado e preparado em solução A. Essas foram suavemente agitadas em vórtex e incubadas por 20min a 60 °C (com agitação a 650 RPM por 1 minuto, seguido por 4 minutos de repouso). Posteriormente, adicionou-se 200  $\mu$ L de ureia 8 M e bicarbonato de amônio 50 mM (solução B), seguido de centrifugação por 15 minutos.

Para a alquilação das proteínas, acrescentou-se 100  $\mu$ L de iodoacetamida 50 mM, previamente refrigerada e preparada em solução B. As amostras foram suavemente agitadas em vórtex e incubadas por 20min a 25 °C, ao abrigo da luz (com agitação a 650 RPM por 1 minuto e repouso de 19 minutos). Em seguida, adicionaram-se 200  $\mu$ L de solução B e realizou-se a centrifugação por 15min. Este passo foi repetido mais uma vez. Prosseguindo, foram adicionados 200  $\mu$ L de solução A e realizada centrifugação por 15 minutos. Esse passo foi repetido duas vezes. Na última lavagem, aproximadamente 50  $\mu$ L de amostra foram retidos. Para a digestão das proteínas, adicionou-se 25  $\mu$ L de RapiGest a 0,2% (v/v) e 25  $\mu$ L de solução de tripsina (na proporção 1:100 enzima:proteína). As amostras foram suavemente agitadas em vórtex e incubadas por 16 horas a 37 °C (com agitação a 650 RPM por 1 minuto e repouso de 4 minutos). Para eluir os peptídeos, as unidades de filtragem foram transferidas para novos microtubos e centrifugadas por 10 minutos. Adicionou-se então 50  $\mu$ L de solução A e realizou-se a centrifugação por 15min. Este passo foi repetido mais uma vez. Para precipitar

o RapiGest e inibir a tripsina, foram acrescentados 5  $\mu\text{L}$  de solução de TFA 15% (TFA). As amostras foram suavemente agitadas em vórtex e incubadas por 30min a 37 °C. Após centrifugação por 15min, os sobrenadantes foram recolhidos, secos sob vácuo e os peptídeos resultantes foram ressuspensos em 100  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 50 mM de bicarbonato de amônio a 95%, acetonitrila a 5% e ácido fórmico a 0,1%. A quantificação dos peptídeos foi realizada utilizando um NanoDrop 2000c com leitura de absorbância a 205 nm.

#### **4.5-3. Análise dos fragmentos tripticos por espectrometria de massas**

A análise por espectrometria de massas foi conduzida por meio de um cromatógrafo líquido de ultraeficiência (UPLC) nanoAcquity, acoplado a um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) SYNAPT G2 Si. Cada corrida envolveu três repetições biológicas de 1  $\mu\text{g}$  de proteínas digeridas. Durante o processo de separação, as amostras foram inicialmente carregadas no nanoAcquity por meio de uma coluna de limpeza M-Class Symmetry C18 5  $\mu\text{m}$  (180  $\mu\text{m}$   $\times$  20 mm) a uma taxa de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  por 3 minutos. Posteriormente, foram transferidas para a coluna analítica de fase reversa nanoAcquity M-Class HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$  (75  $\mu\text{m}$   $\times$  150 mm) a uma taxa de 400  $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ , com a temperatura da coluna no forno mantida a 45 °C. A eluição dos peptídeos foi conduzida por um gradiente binário, onde a fase móvel A consistia em água e 0,1% de ácido fórmico, enquanto a fase móvel B era composta de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico. O gradiente começou com 5% de B, aumentou para 40% de B até 91,12 minutos e, em seguida, para 99% de B até 95,12 minutos, mantendo-se nessa concentração até 99,12 minutos. Posteriormente, retornou para 5% de B até 101,12 minutos, mantendo essa proporção até o final da corrida, aos 117,00 minutos.

A espectrometria de massa foi conduzida no modo positivo e de resolução (modo V), com uma resolução de 35.000 FWHM e mobilidade iônica (HDMSE), empregando o modo de aquisição de dados independente (DIA). A separação da mobilidade iônica utilizou uma rampa de velocidade da onda IMS, variando de 800  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  para 500  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . A energia de colisão de

transferência aumentou de 25 V para 55 V no modo de alta energia, com tensões cone e capilares de 30 V e 3000 V, respectivamente. O nano fluxo de gás foi mantido em 0,5 bar, o gás de purga a 150 L.h<sup>-1</sup> e a temperatura da fonte a 100 °C. Nos parâmetros TOF, o tempo de varredura foi fixado em 0,6s no modo contínuo, com um intervalo de massa de 50 a 2000 Da. Para calibração externa, utilizou-se o [Glu1]-fibrinopeptídeo B humano a 100 fmol.µL<sup>-1</sup>, e a aquisição de massa padrão foi realizada a cada 30 segundos. O software MassLynx v4.0 foi empregado para a aquisição do espectro de massa.

#### **4.5-4. Análise dos dados**

Os dados proteômicos foram processados utilizando o banco de dados de *Capsicum annuum* ID: UP000222542) disponível no UniProt (<https://www.uniprot.org>) no software PLGS. A quantificação foi realizada por meio do software ISOQuant v.1.7, seguindo configurações e algoritmos previamente descritos (DISTLER et al., 2014, 2016). A abordagem TOP3 (Silva et al., 2006) foi empregada para estimar a quantificação, seguida pelo processo de normalização multidimensional implementado no ISOQuant (Distler et al., 2014). Após a análise dos dados no ISOQuant, foram estabelecidos parâmetros de refinamento para garantir a qualidade dos resultados. Por fim, as proteínas foram submetidas à caracterização funcional utilizando o software OmicsBox (<https://www.biobam.com>). Sequências com processos biológicos não identificados pelo OmicsBox foram complementadas manualmente por meio das ferramentas de BLAST do UniProt e NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### **4.6- Ensaio de inibição do crescimento das células do fungo *Fusarium solani***

O fungo *Fusarium solani* foi transferido do estoque e colocado numa placa de Petri contendo meio ágar Sabouraud e crescido durante aproximadamente sete dias a 25 °C. Após este período foram espalhados 10 mL de caldo Sabouraud sobre a placa contendo o fungo, e os conídios foram

liberados com a ajuda de uma alça de Drigalski. Esta suspensão foi filtrada em gaze para evitar a passagem de detritos miceliais que poderiam estar em solução com os conídios. Esses conídios foram quantificados em uma câmara de Neubauer (Laboroptik) sob um microscópio óptico. O teste quantitativo para inibição do crescimento fúngico foi realizado seguindo o protocolo desenvolvido por Broekaert et al. (1995) com modificações. Para verificar o efeito das extrações de proteínas no crescimento do fungo filamentoso foram incubados  $1 \times 10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup> em 200 µL de meio Sabouraud a 25 °C em microplacas de 96 poços (Nunc) na presença do Extrato Total Ácido (ET) na concentração de 200 µg.mL<sup>-1</sup>. As leituras de densidade ópticas a 620 nm foram realizadas após 48h de incubação. O crescimento de fungos sem a adição de proteínas também foi determinado. Os experimentos foram feitos em triplicata e a percentagem de inibição foi calculada pela fórmula de acordo com Bard et al. (2015), com as seguintes modificações: as percentagens de inibição foram avaliadas contra um controle que representa 100% de crescimento com base na fórmula  $[100 - (ABS_{620} \times 100 / cABS_{620})]$ , onde  $ABS_{620}$  foi a leitura média de absorbância a 620 nm de células tratadas com extração de proteína a 48h e  $cABS_{620}$  foi a leitura média de absorbância a 620 nm das células de controle às 48h.

#### **4.7- Ensaio de inibição do crescimento das leveduras**

Para realizar o ensaio de inibição de crescimento, as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram colocadas para crescer em placas de Petri contendo agar Sabouraud. Inóculos dessas leveduras foram transferidos para uma nova placa onde foram realizadas estrias com o intuito de obter um crescimento homogêneo, as placas estriadas foram mantidas em estufa com temperatura de 30 °C por 24h. Das leveduras cultivadas nessas condições foram transferidos inóculos com o auxílio da alça de semeadura para meio líquido (caldo Sabouraud), onde foram devidamente homogeneizados. Em seguida, foi retirada uma alíquota para visualização e quantificação na câmara de Neubauer no microscópio óptico (Axioplan, Zeiss). Após a quantificação, o ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços estéril onde as células das

leveduras ( $1 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup>) foram incubadas em 100 µL de caldo Sabouraud contendo ET (200 µg.mL<sup>-1</sup>). Em seguida a placa foi mantida por 24h na estufa de 30 °C. Para determinação da inibição do crescimento fúngico, a placa foi observada após 24h de incubação, no leitor de microplacas, a 620 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert et al. (1990).

#### **4.8- Cromatografia de fase reversa em HPLC**

O Extrato Total Ácido (ET) foi submetido a cromatografia de fase reversa em HPLC, utilizando uma coluna C18 (µRPC C18, GE-Healthcare). A coluna de fase reversa foi equilibrada com TFA 0,1% (solução A), conforme descrito por Taveira et al. (2014). Inicialmente 200 µg do ET foi solubilizado em 200 µL de solução A, e essa mistura foi filtrada em filtro de 0,2 µm (Millex- GV, Millipore) e injetada na coluna. A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, numa temperatura de 40 °C, na qual a eluição das amostras foi efetuada em gradiente linear de propanol 100% em 0,1% de TFA (solução B). A coluna foi lavada com TFA 0,1% e água ultrapura (solução A) e em seguida um gradiente linear foi formado pela adição da solução B. A eluição das proteínas na coluna foi acompanhada por absorvância lida a  $220 \pm 4$  nm em um detector de arranjo de diodo (SPD-M20A, Shimadzu).

#### **4.9- Análise da viabilidade celular fúngica**

Após o ensaio antifúngico a viabilidade das células tratadas foi realizada, no intuito de analisar se a ação antifúngica das frações protéicas obtidas era fungicida ou fungistática. Segundo a metodologia descrita por Soares et al. (2017), as células tratadas (teste) e não tratadas (controle) com as frações obtidas da cromatografia de fase reversa em HPLC nas concentrações de 200, 100 e 50 µg.mL<sup>-1</sup>, foram retiradas do ensaio antifúngico e lavadas em PBS. Testes com diluição com a quantidade de 200 células e com o volume final do poço foram espalhados com uma alça de Drigalski sobre a superfície de placas

de Petri contendo ágar Sabouraud e cultivadas a 30 °C durante 36h. No final deste período as unidades formadoras de colônias (CFU) foram determinadas e as placas de Petri foram fotografadas. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram mostrados assumindo que o controle representa 100% de viabilidade celular.

#### **4.10- Ensaio da inibição da atividade de tripsina e quimiotripsina**

As atividades inibitórias da tripsina e da quimiotripsina do Extrato Total Ácido foram quantificadas medindo a atividade hidrolítica da tripsina suína e da quimiotripsina bovina em relação aos substratos BapNa (N-benzoil-DI-arginil-p-nitroanilida) e BatNa (N-benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida), respectivamente. A atividade inibitória foi determinada incubando peptídeos em concentrações crescentes de 25 a 300 µg mL<sup>-1</sup> com enzimas e seus respectivos substratos em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) a 37 °C em um volume final de 200 µL. Uma amostra controle sem peptídeos foi incluída em cada ensaio. A reação foi interrompida com 100 µL de ácido acético a 30% (v/v). A hidrólise do substrato foi quantificada medindo a absorbância do p-nitroanilina a 405 nm. Todos os ensaios de inibição foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados em atividade relativa ao controle positivo (100% de atividade).

#### **4.11- Ensaio de determinação de permeabilização de membranas fúngicas**

A permeabilização da membrana das células da levedura *C. albicans* tratadas com a fração F1 obtida da cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC foi avaliada através da utilização da sonda fluorescente SYTOX® Green, segundo metodologia descrita por Thevissen et al.(1999) com modificações. SYTOX Green é uma sonda que acessa o espaço intracelular quando a membrana plasmática está estruturalmente comprometida, e dentro do citoplasma fúngico, ela se liga aos ácidos nucleicos e a célula fica fluorescente. Desta forma, este corante pode ser usado para verificar a permeabilização da membrana plasmática de leveduras. Imediatamente após 24h de incubação das células fúngicas com a fração F1, alíquotas de 100µL de

células foram incubadas ao abrigo da luz e por 15min a 30 °C, 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 controle foram incubadas apenas com as sondas nas mesmas condições do tratamento. Em seguida, as células foram analisadas em microscópio óptico Axioplan, versão 4.0, acoplado a uma câmera e as imagens foram 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 – 490 nm e emissão a partir de 500 nm).

#### **4.12- Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Após ensaio de inibição de crescimento, para medir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, as células fúngicas de *C. albicans* tratadas e não tratadas com a fração F1 na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup> foram incubadas com a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA) na concentração de 20 µM. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 30min a 30 °C, sob agitação constante. As células fúngicas foram analisadas no microscópio óptico (Axioplan, Zeiss) equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção de fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 – 490 nm e emissão a partir de 500 nm) (MELLO et al., 2011).

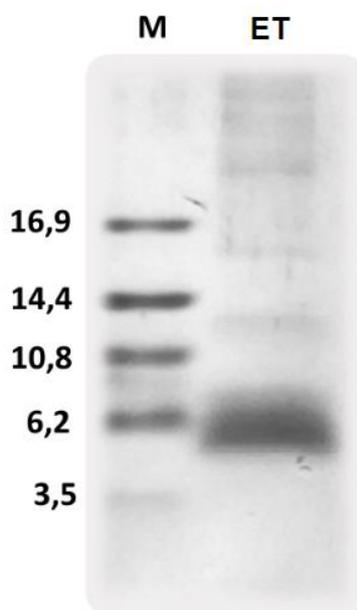
#### **4.13- Análise estatística**

Todos os dados analisados foram obtidos a partir de experimentos realizados em triplicata. Os dados do ensaio de inibição do crescimento fúngico e do ensaio de inibição da atividade de tripsina e quimiotripsina foram avaliados utilizando o teste ANOVA unidirecional. As diferenças médias foram consideradas significativas em  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows).

## **5. RESULTADOS**

### 5.1- Perfil eletroforético do Extrato Total Ácido em gel unidimensional de poliacrilamida

O extrato proveniente da extração ácida de frutos imaturos 30DAA de *C. annuum*, denominado ET, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina, para a obtenção e comparação do perfil proteico inicial. O extrato (ET) apresentou um perfil proteico com proteínas com massa variando de 3,5 a 16,9 kDa com bandas majoritárias com massa em torno de 6,2 kDa (Figura 5).

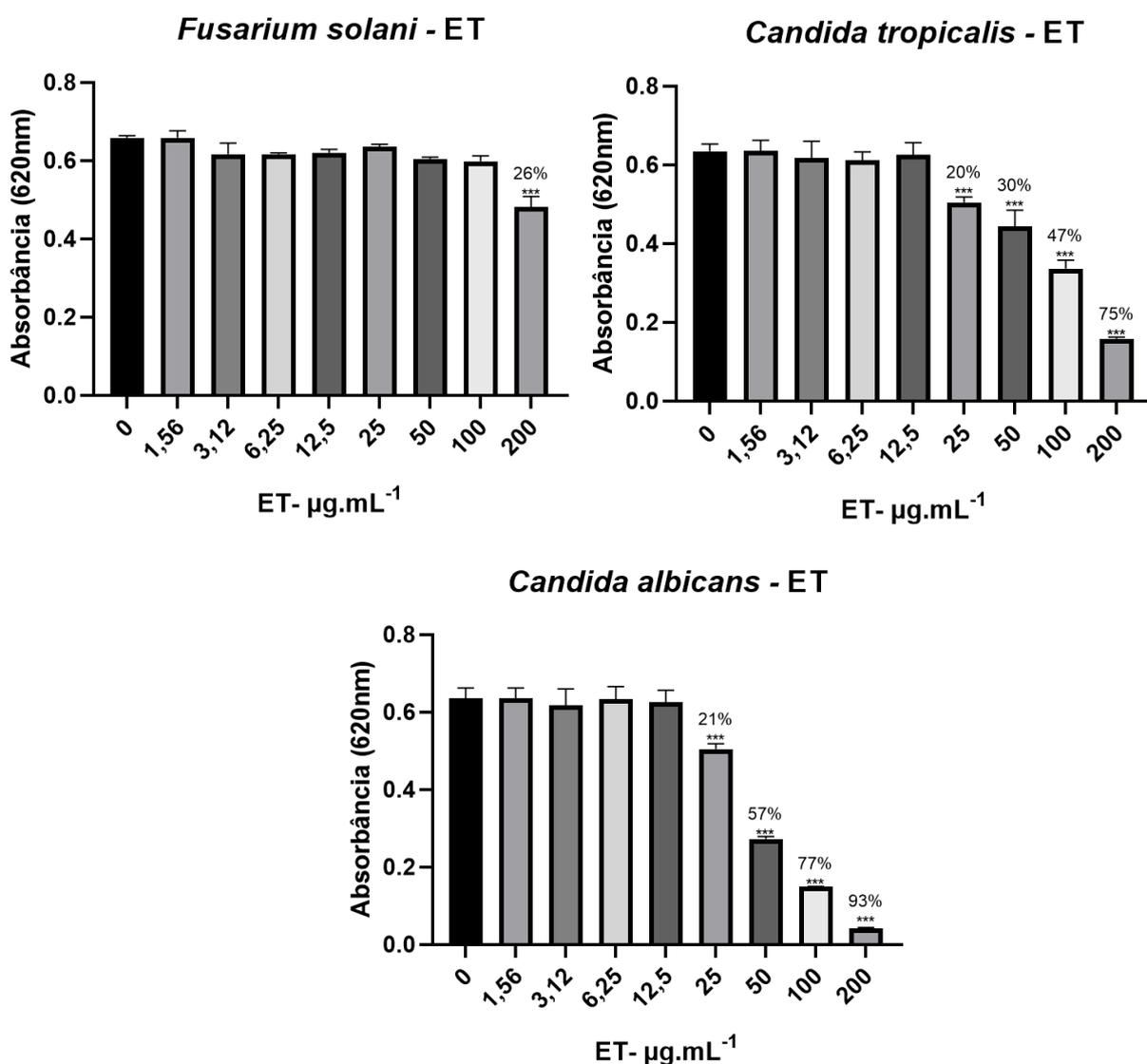


**Figura 5.** Perfil eletroforético do Extrato Total Ácido (ET). Foram utilizados 20 µg de proteína por poço. A amostra foi tratada com β-mercaptoetanol. (M) Marcador de massa molecular (kDa).

### 5.2- Ensaio de inibição crescimento de fungos filamentosos e leveduras pelo Extrato Total Ácido de *C. annuum*

Após obter o extrato dos frutos imaturos de *C. annuum* por meio da extração ácida, foi realizado um ensaio antifúngico. As células de *Fusarium solani*, *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, foram tratadas com ET em concentrações variando de 200 a 1,56 µg.mL<sup>-1</sup> por 24 horas. O extrato demonstrou capacidade inibitória contra todos os microrganismos testados, alcançando aproximadamente 93% de inibição do crescimento de *C. albicans*,

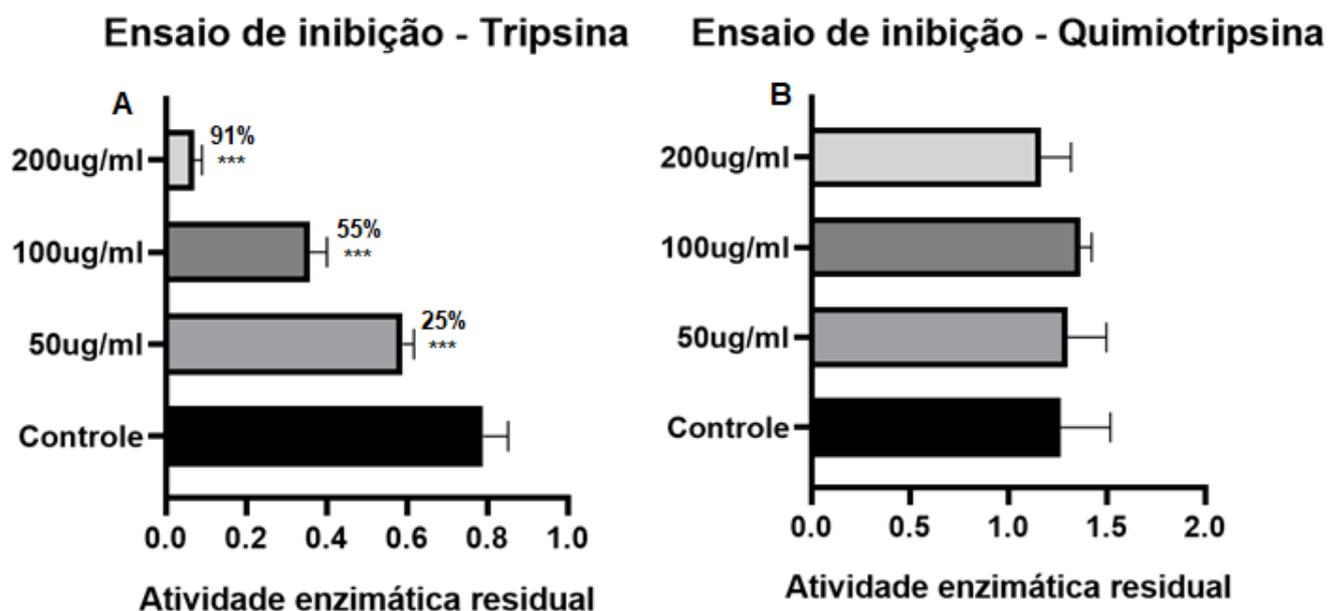
na maior concentração testada. Além disso, o extrato também apresentou uma inibição significativa de 26% contra o fungo filamentosso *F. solani* e de 75% contra a levedura *C. tropicalis*, ambos na concentração de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 6).



**Figura 6.** Gráficos de inibição de crescimento do fungo filamentosso *Fusarium solani* (A) da levedura *Candida tropicalis* (B) e *Candida albicans* (C) respectivamente, na presença do extrato total ácido em concentrações variando de 200 a 1,56  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e na ausência (controle) durante 24h. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores apresentados acima das colunas representam a porcentagem de inibição em relação ao controle e (\*\*\*) indica significância pelo teste ANOVA -  $p < 0.05$ .

### 5.3- Ensaio da inibição da atividade enzimática de tripsina e quimiotripsina pelo extrato total de *C. annuum*

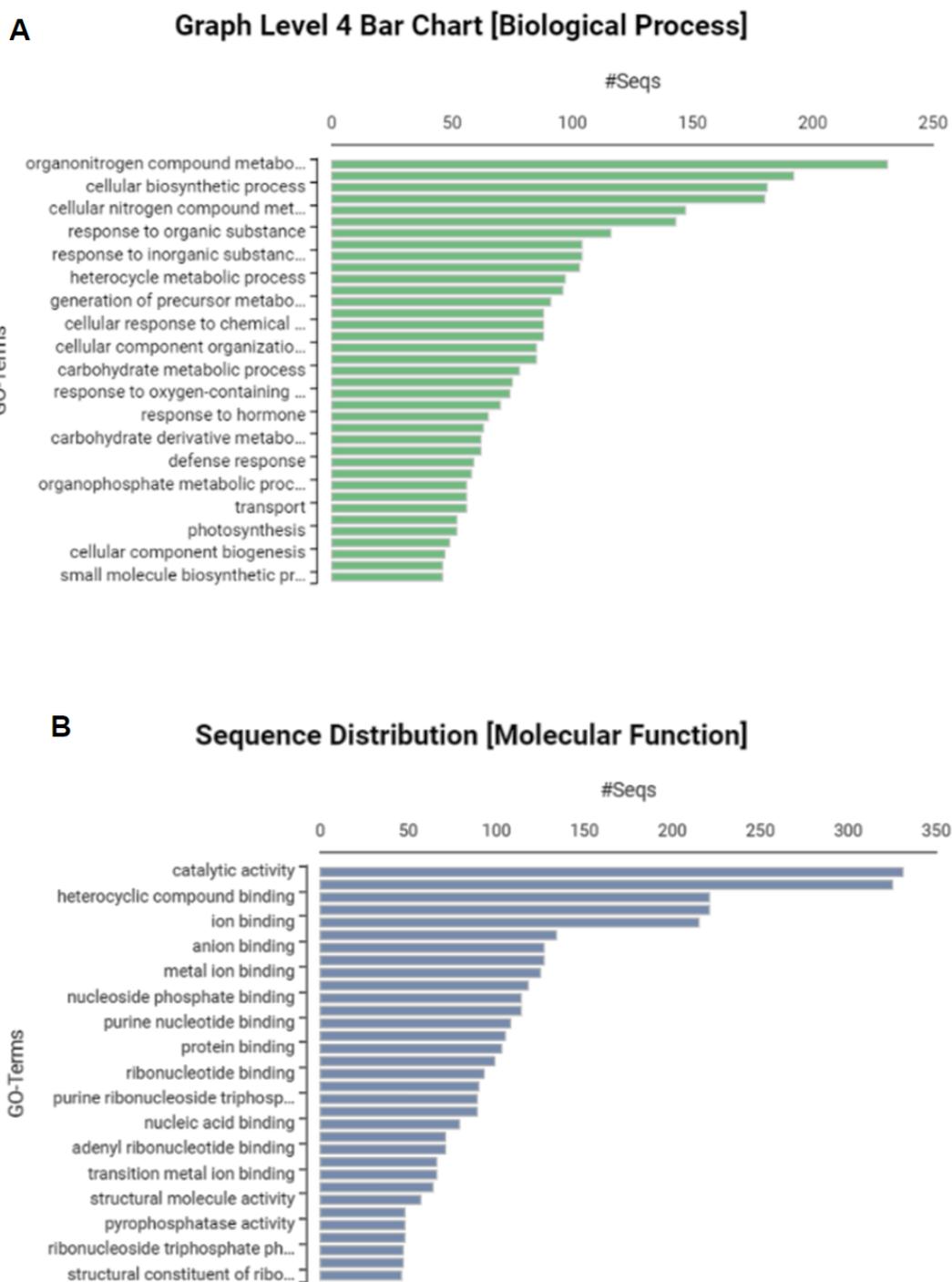
Em todas as concentrações avaliadas, o ET demonstrou impacto significativo apenas na inibição da atividade da tripsina. A capacidade inibitória foi observada de maneira dose dependente, chegando a 91% com 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ET (Figura 7A). No caso da quimiotripsina, nenhuma das concentrações testadas apresentou um nível significativo de inibição (Figura 7B).



**Figura 7.** Ensaio de inibição da atividade de tripsina e quimiotripsina. Na inibição de tripsina (A) e quimiotripsina (B) foram usados 50, 100 e 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do extrato ET. Controles foram feitos na ausência de ET. Os valores apresentados acima das colunas representam a porcentagem de inibição em relação ao controle e (\*\*\*) Indica significância pelo teste ANOVA -  $p < 0.05$ .

### 5.4- Perfil proteômico de frutos imaturos de *C. annuum*

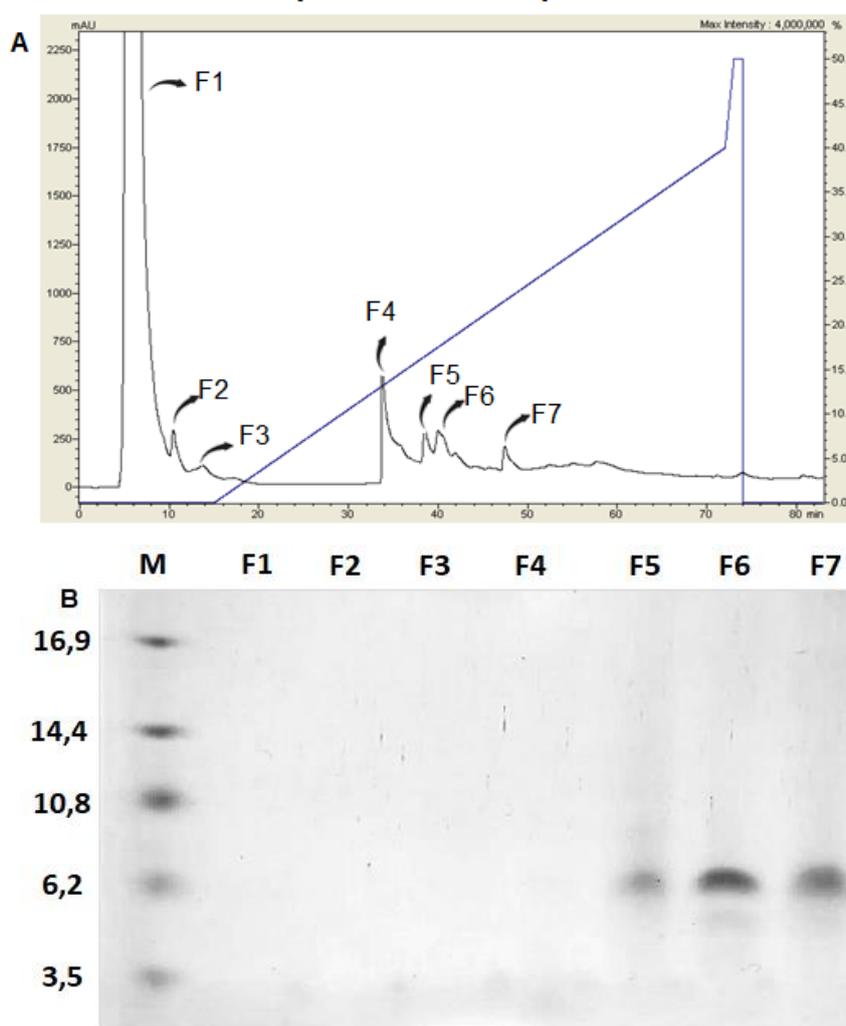
Após a colheita dos frutos de *C. annuum* 30 dias após a antese, foi realizado uma análise proteômica para investigar o perfil proteico dos frutos. Foi identificado 513 proteínas nesse perfil, principalmente associadas a processos catabólicos (Figuras 8A e 8B). Dentre essas proteínas, foi observada a presença de diversas moléculas que desempenham funções na defesa dos frutos, como defensinas, quitinases, peroxidases e proteínas transportadoras de lipídeos.



**Figura 8.** Perfil proteômico dos frutos imaturos de *Capsicum annuum* 30 dias após antese. Grupos funcionais de proteínas de frutos agrupadas de acordo com o processo biológico (A) e função molecular (B).

### 5.5- Perfil cromatográfico de fase reversa em sistema em HPLC

Após constatar o efeito antimicrobiano do Extrato Total Ácido, este foi submetido à purificação por cromatografia em coluna de fase reversa, utilizando a coluna C18 em sistema HPLC. A Figura 9(A) ilustra a obtenção de sete frações distintas, denominadas F1 a F7. O perfil eletroforético das frações provenientes do ET de frutos imaturos após cromatografia de fase reversa em HPLC é apresentado na Figura 9(B). Notam-se bandas proteicas nas frações F5, F6 e F7, com massa molecular entre 6,2 e 10,8 kDa; entretanto, não foi possível visualizar bandas proteicas pelo método utilizado nas frações F1, F2, F3 e F4 sendo essas frações armazenadas para futuras pesquisas.

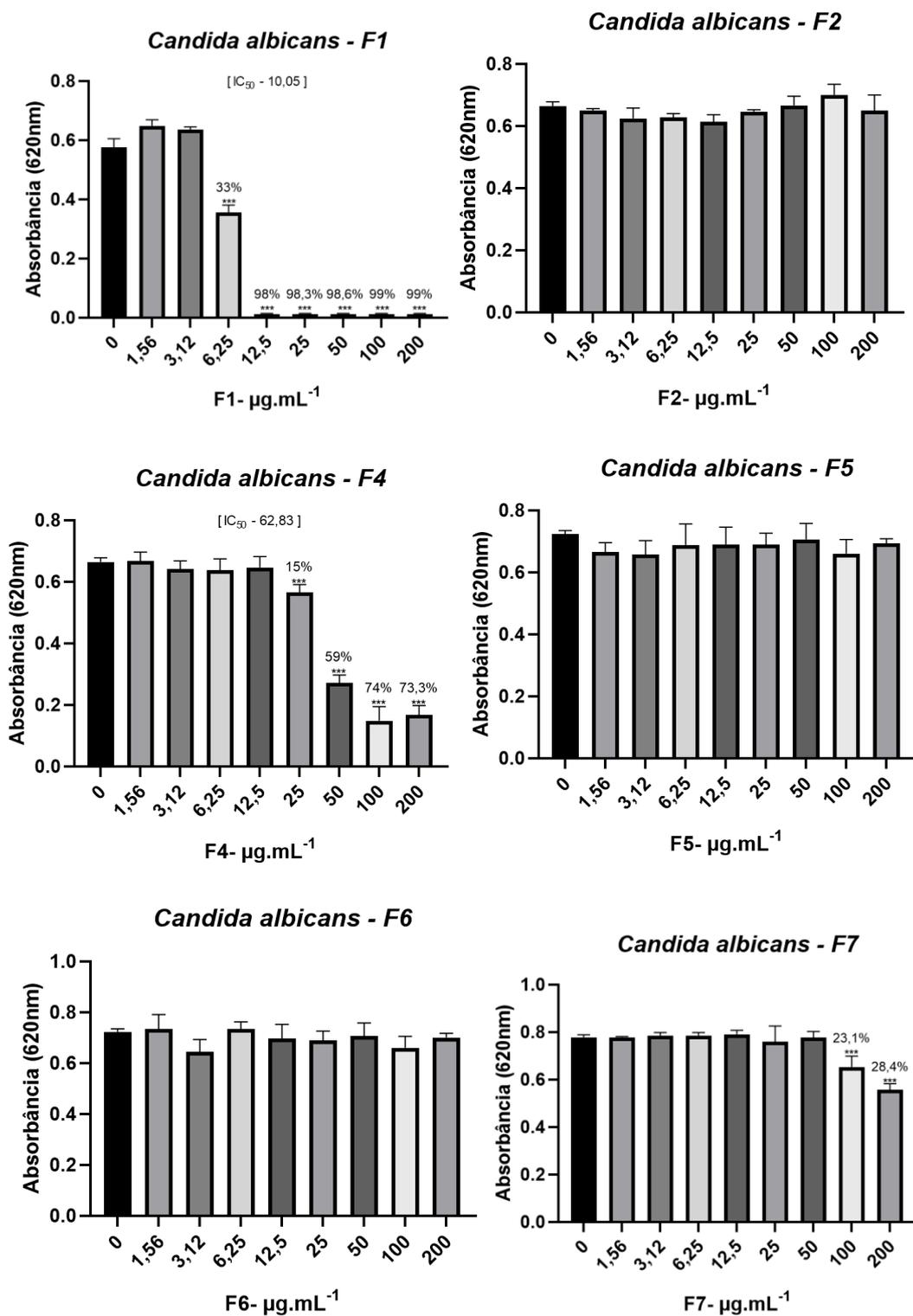


**Figura 9.** (A) Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC, do Extrato Total Ácido (ET) obtido de frutos imaturos de *C. annuum*. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida realizada com 0,1% de TFA (Solvente A) e a amostra eluída usando um gradiente linear de propanol (Solvente B). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> acompanhado de monitoramento por absorvâncias a 220nm. (B) Visualização eletroforética das frações F1 a F7 por gel de poliacrilamida na presença de SDS e tricina. Frações obtidas por cromatografia de fase reversa

em sistema HPLC do extrato ET. Foi utilizado 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteína por poço. As amostras foram tratadas com  $\beta$ -mercaptoetanol. (M) marcador de massa molecular (kDa).

### **5.6- Ensaios da atividade antimicrobiana das frações F1 a F7 sobre células de *C. albicans***

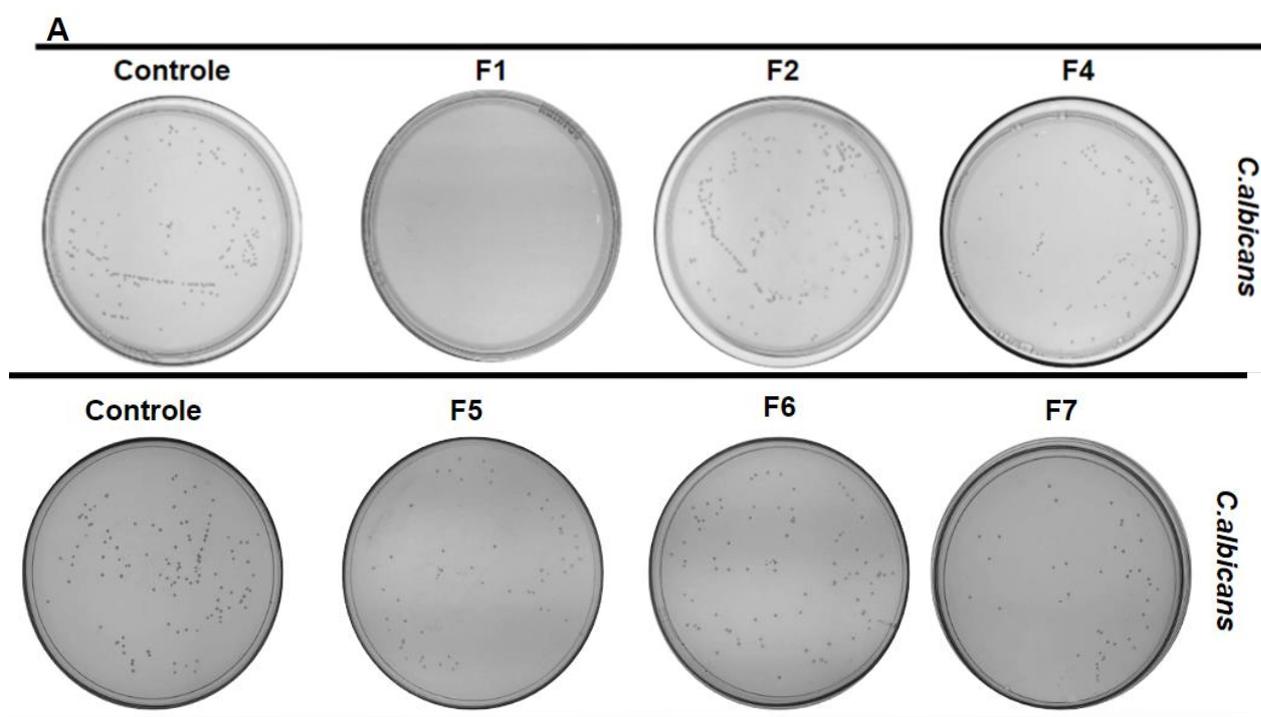
Após obter as frações dos frutos imaturos de *C. annuum* por meio da cromatografia de fase reversa em HPLC, foi conduzido um ensaio antifúngico (Figura 10). As células de *C. albicans* foram tratadas com as frações, empregando um gradiente de concentração de 200 a 1,56  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e o ensaio foi avaliado após um período de 24 horas. Entre todas as frações e concentrações testadas, apenas as frações F1, F4 e F7 apresentaram capacidades inibitórias contra a levedura *C. albicans*. A fração F1 apresentou a maior capacidade inibitória contra a levedura *C. albicans* dentre todas as frações testadas, com aproximadamente 33% de inibição na concentração de 6,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 98% de inibição com 12,5 até 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 99% de inibição com 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Já a fração F4 apresentou inibição contra a levedura *C. albicans* de 15% na concentração de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 59% na concentração de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 74% com 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A fração F7 apenas apresentou inibição contra a *C. albicans* nas concentrações de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (16%) e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (28%). As frações F2, F5 e F6 não apresentaram inibição significativa nas concentrações testadas.



**Figura 10.** - Gráficos de inibição de crescimento de *Candida albicans* tratadas com as frações por cromatografia de fase reversa do extrato ET. Os gráficos estão em ordem de F1 a F7 respectivamente, em um gradiente de concentração de 200 a 1,56 µg.mL<sup>-1</sup> de cada fração e na ausência (controle) durante 24h. Entre colchetes estão os IC<sub>50</sub> teórico obtidos do prisma. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores apresentados acima das colunas representam a porcentagem de inibição em relação ao controle e (\*\*\*) Indica significância pelo teste ANOVA -  $p < 0.05$ .

### 5.7- Viabilidade celular de células de *C. albicans* tratadas com as frações obtidas do HPLC

A Figura 11 (A), apresenta o resultado do ensaio de viabilidade celular de *C. albicans* após o teste antifúngico utilizando as frações F1 até F7, cada uma em uma concentração de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com uma diluição de 1.000 vezes para cada poço (equivalente a 200 células). Nesse ensaio, foi observada uma maior suscetibilidade da levedura *C. albicans* às frações F1, F5 e F7. Houve uma redução na viabilidade celular de 49%, 62% e 100% com os tratamentos com F5, F7 e F1 respectivamente. Esses resultados indicam que, na concentração testada, a fração F1 demonstra um perfil fungicida contra *C. albicans*, enquanto as frações F5 e F7 exibiram um perfil fungistático, inibindo a formação de colônias após a exposição das células a um meio rico em nutrientes. A partir daqui foi selecionado a fração F1 para continuidade dos experimentos, devido sua alta capacidade inibitória (Figura 11 B).



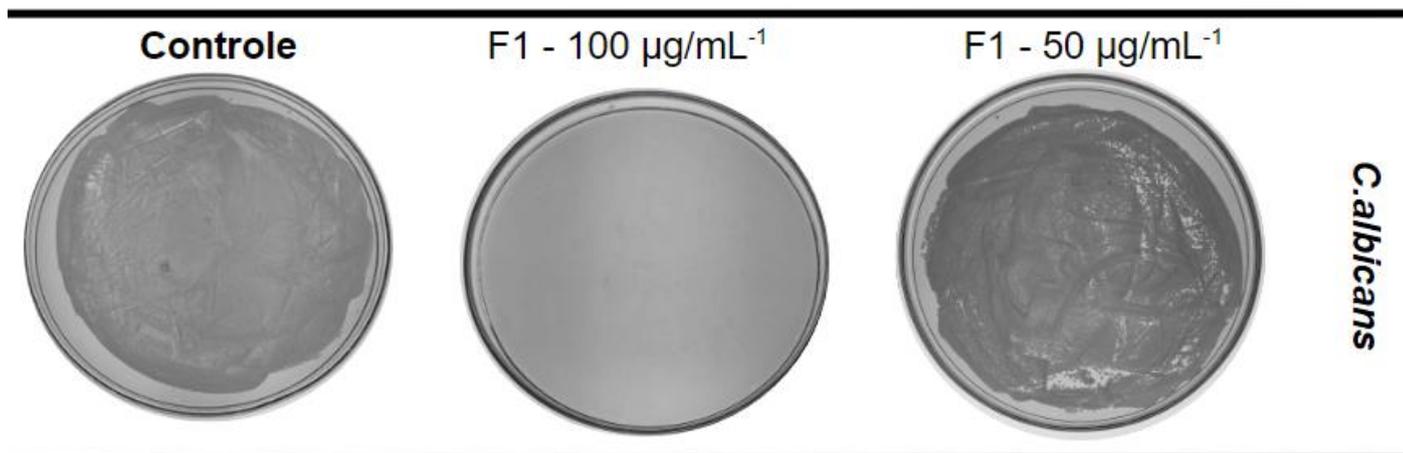
**B**

Amostra	UFC	Perda de viabilidade (%)
Controle	104 ± 35,1	0%
F1	0	100%
F2	215,3 ± 57,4	0%
F4	189,6 ± 39,8	0%
F5	77,3±14,18	49%
F6	126±34,17	0%
F7	58,66±15,69	62%

**Figura 11.** (A) Imagens das placas de Petri evidenciando o desenvolvimento de colônias na condição de controle e após 36 horas de tratamento com 200 µg.mL<sup>-1</sup> das frações F1 a F7, respectivamente, obtidas por meio de cromatografia de fase reversa em HPLC. (B) Tabela que ilustra a porcentagem de perda de viabilidade em *C. albicans* após 24 horas de tratamento com as frações F1 a F7. UFC = Unidade Formadora de Colônia. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

#### **5.8- Teste de viabilidade de células de *C. albicans* tratadas com a fração F1 em diferentes concentrações**

Na Figura 12, foi observado o resultado do ensaio de viabilidade celular de *C. albicans* conduzido após o tratamento com a fração F1 em duas concentrações: 100 e 50 µg.mL<sup>-1</sup>. Desta vez, o ensaio foi realizado sem diluições da quantidade de células, utilizando todo o volume do poço. Foi observado que, na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup>, a fração F1 foi capaz de inibir completamente (100%) as células de *C. albicans*, enquanto na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup> essa capacidade foi atenuada, indicando que nesta concentração o efeito de F1 é fungistático.

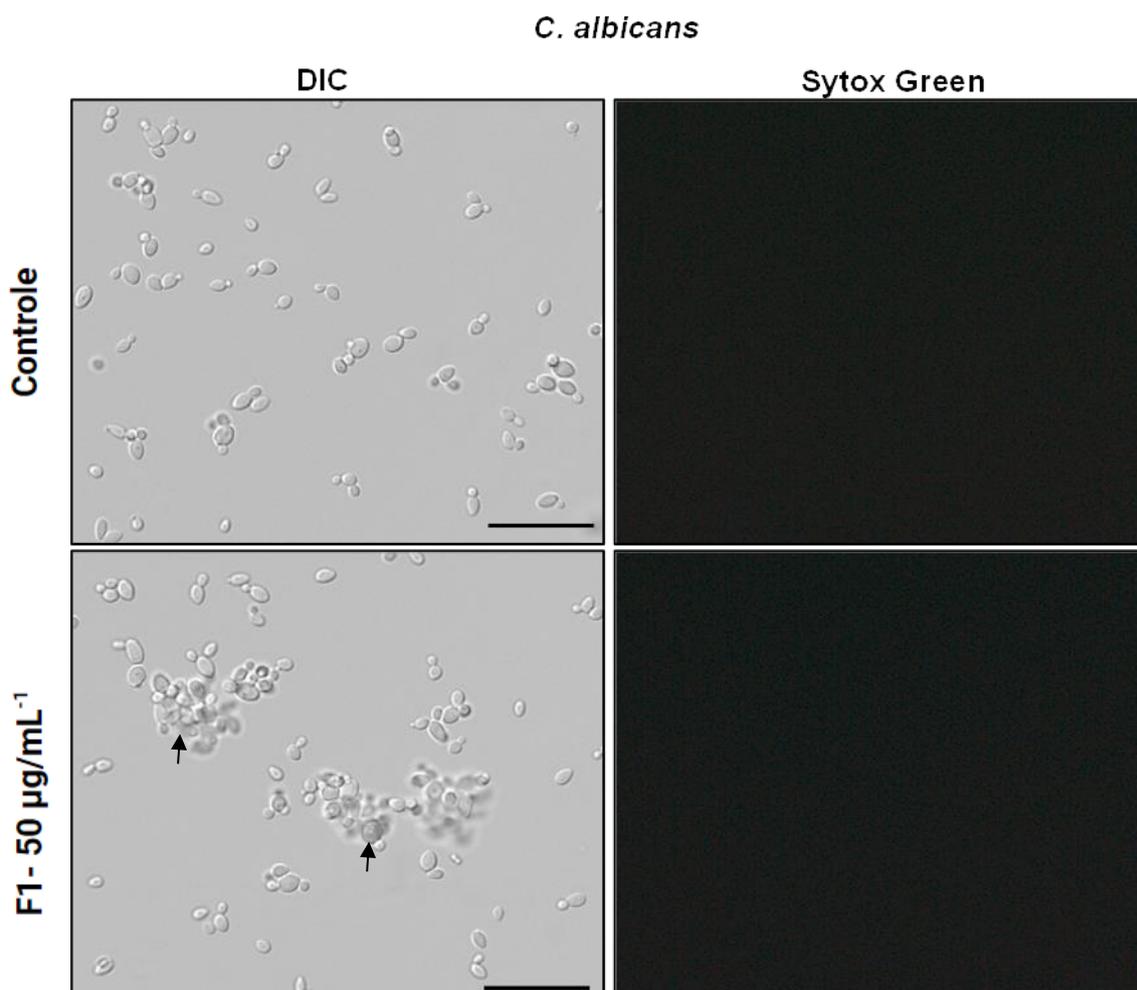


**Figura 12.** Imagens das placas de Petri evidenciando o desenvolvimento de colônias na condição de controle e após 24 horas de tratamento com 100 e 50 µg.mL<sup>-1</sup> da fração F1, obtida por meio de cromatografia de fase reversa em HPLC.

### **5.9- Efeito da fração F1 sobre a permeabilização de membranas da levedura *C. albicans***

O mecanismo de ação antifúngica da fração F1 sobre *C. albicans* foi avaliado após 24 horas de incubação das células com esta fração. A permeabilização da membrana por meio da sonda SYTOX Green foi avaliada em *C. albicans*, que se mostrou suscetível à ação de F1 na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup>.

Como mostrado na Figura 13, não se registrou emissão de sinal fluorescente nas células de *C. albicans*, confirmando a ausência de permeabilização da membrana. No entanto, houve uma diminuição na população celular, e foram observadas alterações morfológicas na levedura (setas).

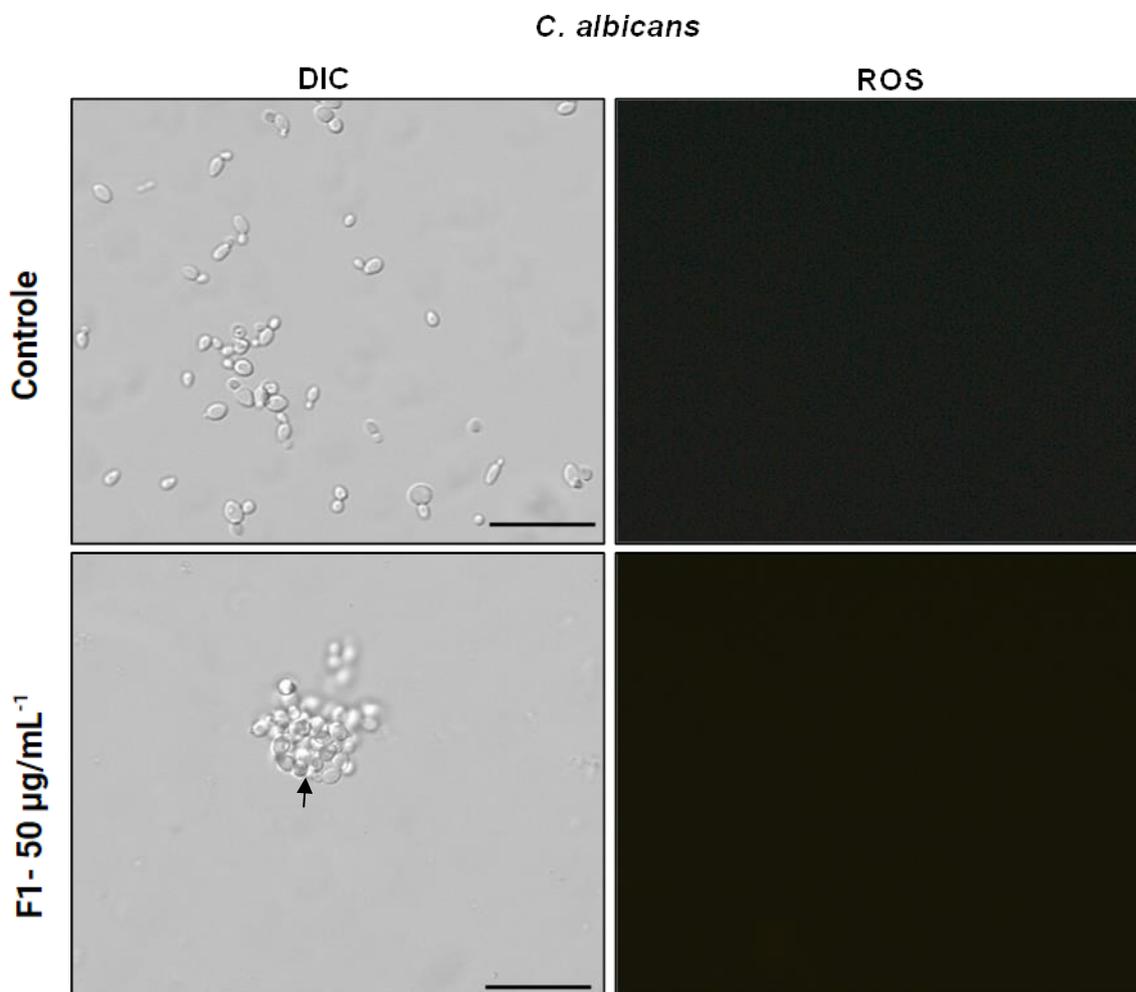


**Figura 13.** Imagens de microscopia óptica de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda SYTOX Green, após terem sido cultivadas por 24h na ausência (controle) e na presença de 50 µg.mL<sup>-1</sup> da fração F1, obtida por cromatografia em fase reversa em HPLC. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm.

#### **5.10- Efeito da fração F1 sobre a indução da produção endógena de ROS em células de leveduras de *C. albicans***

Foi analisado a capacidade da fração F1 (50 µg.mL<sup>-1</sup>) de aumentar a produção endógena de ROS em *C. albicans* utilizando a sonda 2',7' – diclorofluoresceína diacetato, que se mostrou suscetível à ação de F1. Os resultados obtidos revelaram a ausência de marcação do corante nas células tratadas na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup>. No entanto, foi observado que, nessas condições testadas, a fração foi capaz de reduzir o número de células e causar danos na morfologia celular das leveduras, indicando toxicidade sobre *C. albicans* (Figura 14). Isso sugere a existência de outro possível mecanismo de

ação para essa fração, que não envolva a indução de estresse oxidativo em *C. albicans*.



**Figura 14.** Imagens de microscopia óptica de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda 2',7' – diclorofluoresceína diacetato, após terem sido cultivadas por 24h na ausência (controle) e na presença de 50 µg.mL<sup>-1</sup> da fração F1 obtida após cromatografia de fase reversa em HPLC. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência, onde no tratamento apresentaram aglutinação em relação ao controle. Barras = 20 µm.

## 6. DISCUSSÃO

As espécies vegetais têm despertado crescente interesse na busca por novas proteínas e peptídeos com potencial antimicrobiano, desempenhando um papel crucial no controle de doenças causadas por bactérias e fungos (DEMAIN e SANCHEZ, 2009). No contexto das propriedades biológicas das plantas de *Capsicum*, há uma sugestão de que a interação entre o ambiente e a planta resulta na produção de moléculas, visando a defesa vegetal. Entre

essas moléculas, as proteínas envolvidas na imunidade inata destacam-se como promissoras para aplicações biotecnológicas, oferecendo uma proteção rápida ao hospedeiro com baixo consumo de energia e biomassa, apresentando propriedades antimicrobianas e amplo espectro de bioatividade (HANCOCK e LEHRER, 1998; ZASLOFF, 2002; LAY e ANDERSON, 2005).

O conhecimento das propriedades dos AMPs não apenas simplifica o processo de isolamento e classificação dessas moléculas, mas também abre portas para a manipulação e criação de novos AMPs. Essa capacidade de inovação permite aos pesquisadores desenvolver produtos com potencial agrônômico e farmacológico, buscando, ao mesmo tempo, minimizar o impacto no meio ambiente e na saúde dos usuários (CAMPOS et al., 2018; PORTO et al., 2018). Dessa forma, a compreensão das propriedades dos AMPs não se limita apenas a ampliar nosso entendimento sobre as interações planta-microrganismo; ela oferece oportunidades concretas para aplicações práticas em diversos setores, alinhadas com a busca por soluções sustentáveis e eficazes.

AMPs de origem vegetal demonstram um potencial na inibição do crescimento de leveduras do gênero *Candida* (AGUIEIRAS et al., 2021; RIBEIRO et al., 2022; TAVEIRA et al., 2018). Esse gênero compreende espécies reconhecidas por causar infecções fúngicas invasivas e sistêmicas, assumindo uma posição proeminente no cenário de doenças hospitalares ou infecções nosocomiais (LAMOTH et al., 2018; GARCIA-BUSTOS et al., 2021). Nas infecções sanguíneas, em particular, 34,3% são atribuídas às espécies *Candida albicans*, 24,1% a *C. parapsilosis*, 15,3% a *C. tropicalis* e 10,2% a *C. glabrata* (HUNG et al., 2012; ELHOUI et al., 2014).

É relevante destacar que, neste estudo, a seleção dos frutos e o método de extração foram determinados com base em pesquisas anteriores realizadas em minha dissertação. Nessa pesquisa, a extração ácida dos frutos de *Capsicum annuum*, colhidos 30 dias após a antese, revelou uma concentração elevada de compostos antimicrobianos. Esses compostos foram testados no trabalho atual e demonstraram taxas significativas de inibição contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Fusarium solani* (Figura 6).

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 (PELEGRINI et al., 2008).

O Extrato Total Ácido (ET) obtido neste trabalho também foi testado quanto à capacidade de inibir a atividade de enzimas proteolíticas (tripsina e quimiotripsina) (Figura 7). Foi verificado a presença de um inibidor da atividade de tripsina com uma potente atividade passível de ser explorada. A atividade de inibir enzimas proteolíticas como tripsina e quimiotripsina em plantas de pimenta também foram detectadas e caracterizadas por outros autores como Ribeiro et al. (2007b), Dias et al. (2013a) e Silva et al. (2023).

O perfil proteômico dos frutos imaturos foi analisado com o propósito de elucidar as proteínas presentes no ET, proporcionando compreensão sobre as potenciais moléculas antimicrobianas contidas no extrato (Figura 8). Neste proteoma, se destacaram quatro proteínas ainda não caracterizadas (A0A2G3ALX3, A0A2G2Z4Q2, A0A2G2YZZ1 e A0A2G2YBW1), três catalases (A0A2G2ZSU7, A0A2G2YAT8 e A0A2G2YAF1), uma quitinase (B9VRK7), quatro peroxidases (A0A2G3AC59, A0A2G2ZPZ9, A0A1U8HHN4, A0A1U8FQG1), uma ribonuclease (A0A2G2YJ24) e uma LTP não específica (A0A2G2ZAL7). Todos esses peptídeos apresentam amplo potencial para estudos antimicrobianos, estando sujeitos a investigações mais aprofundadas no futuro, sendo que alguns deles já foram identificados na literatura como moléculas de significativa importância na defesa de plantas. (XIAOKANG et al., 2023; JASWANTHI et al., 2019; WU et al., 2019). É importante ressaltar que a fração F1 também foi submetida a análise proteômica, porém os dados obtidos não foram conclusivos e novos experimentos serão realizados para caracterização da fração com maior atividade antifúngica detectada neste estudo.

Assim como Santos et al. (2017), que utilizaram cromatografia de fase reversa em HPLC para a purificação de proteínas, o Extrato Total Ácido obtido

neste estudo também foi submetido à cromatografia em coluna de fase reversa C18. Essa coluna possibilitou a separação por hidrofobicidade, resultando em sete frações distintas (Figura 9A). A fração F3 apresentou um baixo rendimento, impossibilitando a realização de análises subsequentes para a caracterização e identificação de suas atividades biológicas.

Quanto ao perfil eletroforético, as frações F5 a F7, revelaram perfis de proteínas com massas moleculares variando entre 6,2 e 16,9 kDa. Por outro lado, as frações F1 até F4 não exibiram perfil eletroforético, uma ocorrência não incomum (Figura 9B). Diversos trabalhos, como os de Pinheiro et al. (2023), Santos et al. (2006) e Maracahipes et al. (2019b) mostram frações resultantes do fracionamento do HPLC que não apresentam bandas visíveis no perfil eletroforético. Outras pesquisas também já evidenciaram a presença de diferentes peptídeos em frutos de *Capsicum*, com diversas massas moleculares e atividade antimicrobiana (LIU et al., 2006; TAVEIRA et al., 2014). Essa diversidade de peptídeos antimicrobianos também foi observada em diferentes órgãos da planta desse gênero, como sementes (DIAS et al., 2013b; RIBEIRO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2006; VIEIRA BARD et al., 2015) folhas (CHERENE et al., 2023; DA SILVA PEREIRA et al., 2018a) e raízes (DA SILVA PEREIRA et al., 2018a).

As frações resultantes foram, então, submetidas a testes preliminares, incluindo um ensaio antifúngico contra o crescimento de *C. albicans* (Figura 10) e um teste de viabilidade celular (Figura 11), ambos realizados na concentração final de 200 µg.mL<sup>-1</sup>. Foi observado que as frações F1, F4 e F7 apresentaram taxas de inibição significativas contra a levedura *C. albicans*. A fração F1 foi destacada como a mais eficaz, apresentando altos níveis de inibição nas concentrações testadas, enquanto as frações F4 e F7 também apresentaram inibições significativas, porém menores em comparação com a F1. As frações F2, F5 e F6 não revelaram inibição significativa.

Ao realizar uma comparação entre os resultados deste estudo e a pesquisa conduzida por Maracahipes et al. (2019a), percebemos algumas diferenças significativas. Ambos os estudos utilizaram frutos colhidos 30 dias após a antese, mas divergiram quanto à metodologia, no qual Maracahipes e colaboradores utilizaram frutos após a inoculação com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, o que pode induzir uma resposta imunológica nas pimentas e a

produção exacerbada de proteínas relacionadas à patogênese, alterando assim o perfil proteico do extrato. No estudo de Maracahipes e colaboradores a fração identificada como IIFF7Ca exibiu forte inibição contra fungos filamentosos, porém apresentou baixa atividade contra leveduras do gênero *Candida*, contrastando com nossos resultados.

É importante destacar que a ação de AMPs contra microrganismos é dependente de diversos fatores, como concentração, tipo de peptídeo e microrganismo testado. Diversos estudos, incluindo o de Brown e Hancock (2006), bem como outras pesquisas sobre AMPs, evidenciam que essas moléculas possuem atividade antimicrobiana variada. Além disso, a ação desses peptídeos pode induzir alterações morfológicas nos microrganismos, como as aglutinações observadas na fração F1.

Um exemplo é o estudo conduzido por Gebara et al. (2020), no qual foram purificadas três frações de frutos maduros de *C. annuum*. As frações F2 e F3 apresentaram inibição significativa no crescimento de *C. albicans*, enquanto a F4 não foi capaz de inibir significativamente o crescimento. Ainda no estudo de Gebara et al. (2020) foi feito um teste contra *C. tropicalis* onde todas as três frações testadas demonstraram uma inibição significativa, sendo as frações F2 e F3 mais tóxicas em comparação com a F4. Esses resultados destacam a complexidade da atividade antimicrobiana de AMPs, a qual varia conforme as condições experimentais e os microrganismos envolvidos.

Para melhor avaliar o papel inibitório das frações obtidas, células de *C. albicans* tratadas com as mesmas foram submetidas a ensaio de viabilidade celular (Figura 11) no intuito de caracterizar a atividade das frações como fungicida (morte, lise) ou fungistática (metabolismo interrompido, o que dificulta o desenvolvimento dos fungos). Apenas as frações F1, F5 e F7 causaram redução significativa da viabilidade celular das células de *C. albicans* na concentração de  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  após 24 horas de incubação. A fração F1 causou 100% de redução, sendo considerada assim fungicida, e as frações F5 e F7 causaram redução na viabilidade de 49% e 62%, respectivamente (fungistática). A fração F1 se destacou ao exibir a maior atividade tanto na inibição do crescimento quanto na redução da viabilidade das células de *C. albicans*, sendo, portanto, escolhida para a continuidade da pesquisa (Figura 12).

Moraes (2008) propõe que a avaliação estatística da viabilidade celular, quando realizada em células submetidas a ensaios antifúngicos com extratos de plantas, contribui para as observações morfológicas. A quantidade de colônias apresenta correlação com a concentração da amostra, refletindo nas observações microscópicas das células tratadas, evidenciando possíveis alterações na morfologia e/ou redução do número de células. Com isso a fração F1 foi submetida a estudos para avaliar seu mecanismo de ação sobre células fúngicas de *C. albicans* (Figura 13 e 14).

Com base nos resultados obtidos, a fração F1, que demonstrou um perfil fungicida, foi submetida à avaliação de sua capacidade de permeabilização de membranas fúngicas (Figura 13). A análise revelou que, na concentração de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a fração F1 não provocou a permeabilização das membranas das células de *C. albicans* tratadas por 24h. Conforme documentado na literatura, a falta de observação de permeabilização não é um fenômeno raro. Estudos, como o realizado por Soares (2017), que investigou cinco tempos distintos de exposição a um mesmo peptídeo, indicam que essa ausência pode ser atribuída às variações no tempo de contato e/ou na concentração utilizada, sendo ambos fatores que podem influenciar na detecção. Essas variações dependem da interação específica entre o microrganismo e o peptídeo antimicrobiano.

O estudo conduzido por Cherene et al. (2023) destaca outro exemplo de seletividade. Nele, os peptídeos CaCpin-II, CaCDef-like e CaCLTP2 foram testados contra as leveduras do gênero *Candida*. Observou-se que, na concentração testada, nenhum desses peptídeos foi capaz de permeabilizar a membrana das leveduras avaliadas. No entanto, ao analisar a produção exacerbada de ROS em *C. albicans*, apenas o CaCLTP2 apresentou atividade indutora de ROS. Em relação a *C. tropicalis*, somente os peptídeos CaCpin-II e CaCDef-like induziram aumento de ROS, enquanto contra *C. parapsilosis*, nenhum dos peptídeos induziu aumento de ROS.

No presente estudo, foi notado que a fração F1 não apenas inibiu o crescimento da levedura, mas também provocou alterações morfológicas em seus padrões de crescimento (aglutinação). É importante ressaltar que a permeabilização de membranas e a inibição do crescimento de microrganismos não são fenômenos necessariamente correlacionados. Existem peptídeos com

atividade antimicrobiana que são capazes de induzir a permeabilização de membranas, mas não apresentam um efeito fungicida, e vice-versa (KOSHLUKOVA et al., 1999; STEFFEN et al., 2006; VYLKOVA et al., 2007).

Estudos recentes têm revelado que a permeabilização de membranas não representa a única causa da morte de microrganismos, pois AMPs podem ter múltiplos alvos. Resultados obtidos por Klimpel et al. (2018) e Li et al. (2018) corroboraram essa perspectiva ao evidenciar a ação antimicrobiana efetiva em bactérias patogênicas, mesmo na ausência de permeabilização de membranas, sugerindo a existência de outros alvos intracelulares para a ação peptídica. Embora os mecanismos de ação dos AMPs não estejam completamente elucidados, há indícios de que, após a interação com a membrana, esses peptídeos possam desencadear a indução de ROS (MOORE et al., 2019), inibição da síntese de proteínas (MARDIROSSIAN et al., 2018; ZAHN et al., 2013), bloqueio da atividade mitocondrial (VIEIRA BARD et al., 2015; ZENG et al., 2018) e ativação de cascatas de sinalização levando à apoptose (HIGUCHI et al., 2016). Esses eventos podem contribuir de maneira independente ou complementar para a morte celular.

Addabbo et al. (2009) mostraram que a permeabilização de membranas pode resultar no colapso do potencial de membrana. No entanto, as células dependem desse potencial para suas funções fisiológicas vitais, e a restauração é essencial, demandando maior energia celular. De acordo com Silva (2018b), uma possível consequência desse processo é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por mitocôndrias ativadas. Diante disso, foi avaliado a capacidade da fração F1 em induzir o aumento na produção endógena de ROS nas células de *C. albicans* na presença de 50 µg.mL<sup>-1</sup> (Figura 14). Porém nas condições avaliadas, não foi possível observar o aumento de ROS nas células de *C. albicans*.

Com base no exposto, as frações contendo os AMP's obtidos nesse trabalho apresentam um amplo espectro de atividade contra diversos patógenos. Portanto, eles podem representar uma alternativa viável para o desenvolvimento de novos fármacos contra microrganismos resistentes. Embora o mecanismo de ação dos AMPs ainda não esteja totalmente esclarecido, os resultados obtidos são promissores e podem abrir novas perspectivas para o tratamento de diversas doenças.

## 7. CONCLUSÃO

- O Extrato Total Ácido dos frutos de *C. annuum* 30DAA (acesso UENF 1381) demonstrou atividade inibitória significativa contra as leveduras e o fungo filamentosos testados. Em particular, na concentração de 200 µg.mL<sup>-1</sup>, a atividade foi mais pronunciada contra *C. albicans*.
- As frações F1, F4, e F7, obtidas em cromatografia de fase reversa foram capazes de inibir o crescimento das leveduras *C. albicans*, enquanto as frações F2, F5 e F6 não apresentaram potencial inibitório significativo nas concentrações testadas;
- A fração F1 apresentou um perfil fungicida sobre as células de *C. albicans* enquanto que as frações F5 e F7 demonstraram caráter fungistático sobre a levedura;
- A fração F1 induziu alterações morfológicas, mas não causou permeabilização de membrana e aumento de ROS das células de *C. albicans*;
- Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que a fração F1 foi a mais promissora (*in vitro*) para estudos prospectivos que visam à geração de novos fármacos com potencial antimicrobiano.

## 8. REFERÊNCIAS

- ADDABBO, F.; MONTAGNANI, M.; GOLIGORSKY, M. S. Mitochondria and reactive oxygen species. **Hypertension**, v. 53, n. 6, p. 885–892, 2009.
- AGUIEIRAS, M. C. L. et al. Potent Anti-Candida Fraction Isolated from *Capsicum chinense* Fruits Contains an Antimicrobial Peptide That is Similar to

Plant Defensin and is Able to Inhibit the Activity of Different  $\alpha$ -Amylase Enzymes. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 3, p. 862–872, 2021.

ANAYA-LÓPEZ, J. L. et al. Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 14, p. 1101–1108, 2006.

ANNUNZIATO, G.; COSTANTINO, G. Antimicrobial peptides (AMPs): a patent review (2015–2020). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, n. 12, p. 931–947, 2020.

BALBUENA, T. S. et al. Challenges in proteome analyses of tropical plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 2, p. 91–104, 2011.

BARANTSEVICH, N.; BARANTSEVICH, E. Diagnosis and Treatment of Invasive *Candidiasis*. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, 2022.

BENKO-ISEPPON, A. M. et al. Overview on Plant Antimicrobial Peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 11, n. 3, p. 181–188, 2010.

BERECZ, B. et al. Structural stability and surface activity of sunflower 2S albumins and nonspecific lipid transfer protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6490–6497, 2010.

BERROCAL-LOBO, M. et al. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. **Plant Physiology**, v. 128, n. 3, p. 951–961, 2002.

BROEKAERT, W. F. et al. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, n. 1–2, p. 55–59, 1990.

BROEKAERT, W. F. et al. Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant Physiology**, v. 108, n. 4, p. 1353–1358, 1995.

BROEKAERT, W. F. et al. Antimicrobial Peptides from Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, n. 3, p. 297–323, 1997.

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 1, p. 24–30, 2006.

CAMPOS, M. L. et al. **The role of antimicrobial peptides in plant immunity** *Journal of Experimental Botany*, 12 out. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article/69/21/4997/5067520>>

CÁNOVAS, F. M. et al. Plant proteome analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 285–

298, 2004.

CARVALHO, A. DE O.; GOMES, V. M. Plant defensins-Prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides**, v. 30, n. 5, p. 1007–1020, 2009.

CDC. 2019 AR Threats Report. METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS. p. 1–2, 2019.

CHEN, S.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5504–5516, 2006.

CHERENE, M. B. et al. Structural and Biochemical Characterization of Three Antimicrobial Peptides from *Capsicum annuum* L. var. *annuum* Leaves for Anti-Candida Use. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, n. 0123456789, 2023.

CHERENE, M. B.; CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE FOLHAS DE *Capsicum annuum* cv. Carioquinha 2023. 120. (Ciências Biológicas) Campos dos goytacazes, rj julho - 2023.

CRAIK, D. J. et al. Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1327–1336, 1999.

DA COSTA, L. M. et al. Biochemical analysis of antimicrobial peptides in two different *Capsicum* genotypes after fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 1, p. 1–14, 1 jul. 2019.

DA SILVA GEBARA, R. et al. Identification and Characterization of Two Defensins from *Capsicum annuum* Fruits that Exhibit Antimicrobial Activity. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 3, p. 1253–1265, 2020.

DA SILVA PEREIRA, L. et al. Characterization of *Capsicum annuum* L. leaf and root antimicrobial peptides: antimicrobial activity against phytopathogenic microorganisms. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 6, p. 0, 2018a.

DESRIAC, F. et al. Alterins Produced by Oyster-Associated *Pseudoalteromonas* Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. **Marine Drugs**, v. 18, n. 12, 2020.

DI PALMA, S. et al. Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3791–3813, 2012.

DIAS, G. B. et al. Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase

inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. seeds. **Protein Journal**, v. 32, n. 1, p. 15–26, 2013a.

DIAS, G. B. et al. Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. seeds. **Protein Journal**, v. 32, n. 1, p. 15–26, 2013b.

DÍAZ-MURILLO, V. et al. Defensin  $\gamma$ -thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. **Peptides**, v. 78, p. 109–118, 2016.

DISTLER, U. et al. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. **Nature Methods**, v. 11, n. 2, p. 167–170, 2014.

DISTLER, U. et al. Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. **Nature Protocols**, v. 11, n. 4, p. 795–812, 2016.

DIZ, M. S. et al. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel  $\alpha$ -amylase inhibitory properties. **Physiologia Plantarum**, v. 142, n. 3, p. 233–246, 2011.

DOS SANTOS, L. DE A. et al. Purification and characterization of peptides from *Capsicum annuum* fruits which are  $\alpha$ -amylase inhibitors and exhibit high antimicrobial activity against fungi of agronomic importance. **Protein Expression and Purification**, v. 132, p. 97–107, 2017.

EDQVIST, J. et al. Plant lipid transfer proteins: Are we finally closing in on the roles of these enigmatic proteins? **Journal of Lipid Research**, v. 59, n. 8, p. 1374–1382, 2018.

EGOROV, T. A. et al. Diversity of wheat anti-microbial peptides. **Peptides**, v. 26, n. 11, p. 2064–2073, 2005.

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

ESPECHE, J. C. et al. Unravelling the mechanism of action of “de novo” designed peptide P1 with model membranes and gram-positive and gram-negative bacteria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 693, n. August, 2020.

FARROKHI, N.; WHITELEGGE, J. P.; BRUSSLAN, J. A. Plant peptides and peptidomics. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, n. 2, p. 105–134, 2008.

FERNANDO, M. S. et al. A review of a promising therapeutic and agronomical alternative: Antimicrobial peptides from *Capsicum sp.* **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 86, p. 19918–19928, 2011.

FINKINA, E. I. et al. Lipid transfer proteins as components of the plant innate immune system: Structure, functions, and applications. **Acta Naturae**, v. 8, n. 2, p. 47–61, 2016.

GAMES, P. D. et al. Computer aided identification of a Hevein-like antimicrobial peptide of bell pepper leaves for biotechnological use. **BMC Genomics**, v. 17, n. Suppl 12, p. 1–13, 2016.

GORDON, Y. J.; ROMANOWSKI, E. G.; MCDERMOTT, A. M. Mini review: A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. **Current Eye Research**, v. 30, n. 7, p. 505–515, 2005.

HALLOCK, Y. F. et al. Cycloviolins A-D, anti-HIV macrocyclic peptides from *Leonia cymosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 124–128, 2000.

HERNANDEZ-VALLADARES, M. et al. Reliable FASP-based procedures for optimal quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis on samples from acute myeloid leukemia patients. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2016.

HIGUCHI, N. et al. NP24 induces apoptosis dependent on caspase-like activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 6, p. 619–624, 2016.

JAMAL, F. et al. Serine protease inhibitors in plants: Nature's arsenal crafted for insect predators. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 1, p. 1–34, 2013.

JASWANTHI, N. et al. Apoplast proteomic analysis reveals drought stress-responsive protein datasets in chilli (*Capsicum annum* L.). **Data in Brief**, v. 25, p. 104041, 2019.

JENNINGS, C. et al. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: The cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10614–10619, 2001.

KANG, S. J. et al. Antimicrobial peptides: Therapeutic potentials. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 12, n. 12, p. 1477–1486, 2014.

KIM, S. et al. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. **Nature Genetics**, v. 46, n. 3, p. 270–278, 2014.

KLIMPEL, A.; NEUNDORF, I. Bifunctional peptide hybrids targeting the matrix of mitochondria. **Journal of Controlled Release**, v. 291, p. 147–156, 2018.

KOEHBACH, J.; CRAIK, D. J. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 40, n. 7, p. 517–528, jul. 2019.

KOSHLUKOVA, S. E. et al. Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 27, p. 18872–18879, 1999.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, 2018.

LACERDA, A. F. et al. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–10, 2014.

LANNES, S. D. et al. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 112, n. 3, p. 266–270, 2007.

LI, J. et al. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. **Botanical Studies**, v. 62, n. 1, 2021.

LI, X. H. et al. Microexon gene transcriptional profiles and evolution provide insights into blood processing by the *Schistosoma japonicum* esophagus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 1–22, 2018.

LIU, K. et al. Isolation and characterization of a lipid transfer protein expressed in ripening fruit of *Capsicum chinense*. **Planta**, v. 223, n. 4, p. 672–683, 2006.

MARACAHIPES, Á. C. et al. Biochemical analysis of antimicrobial peptides in two different *Capsicum* genotypes after fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 4, p. 1–14, 2019a.

MARACAHIPES, Á. C. Á. C. Á. C. et al. Characterization and antifungal activity of a plant peptide expressed in the interaction between *Capsicum annuum* fruits and the anthracnose fungus. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 12, 20 dez. 2019b.

MARDIROSSIAN, M. et al. The Dolphin Proline-Rich Antimicrobial Peptide Tur1A Inhibits Protein Synthesis by Targeting the Bacterial Ribosome. **Cell Chemical Biology**, v. 25, n. 5, p. 530- 539.e7, 2018.

MELLO, É. DE O. et al. Improved smallest peptides based on positive charge increase of the  $\gamma$ -core motif from PvD 1 and their mechanism of action against *Candida* species. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 407–420, 2019.

MELLO, E. O. et al. Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. **Current Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1209–1217, 2011.

MELNIKOVA, D. N. et al. Molecular Insight into Ligand Binding and Transport by the Lentil Lipid Transfer Protein Lc-LTP2: The Role of Basic Amino Acid Residues at Opposite Entrances to the Hydrophobic Cavity. **Biomolecules**, v. 13, n. 12, 2023.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: Chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 431–450, 2012.

MOORE, J. et al. Mode of Action of the Antimicrobial Peptide D4E1 on *Aspergillus flavus*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 25, n. 3, p. 1135–1145, 2019.

MORAVEJ, H. et al. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 747–767, 2018.

MOSCONE, E. A. et al. The Evolution of Chili Peppers (. p. 137–170, 2007.

NANJO, Y. et al. Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 1, p. 372–385, 2012.

NAYAB, S. et al. A Review of Antimicrobial Peptides: Its Function, Mode of Action and Therapeutic Potential. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 28, n. 1, p. 1–15, 2022.

NETO, N. A. S. et al. Synergistic Antibiofilm Activity between Synthetic Peptides and Ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, v. 11, n. 9, 2022.

NEWTON, R. P. et al. Plant proteome analysis by mass spectrometry: Principles, problems, pitfalls and recent developments. **Phytochemistry**, v. 65, n. 11, p. 1449–1485, 2004.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in**

**Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011.

ODDS, F. C. et al. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. **Medical Mycology**, v. 26, n. 5, p. 277–283, 1988.

ODINTSOVA, T. I. et al. Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. **Biochimie**, v. 90, n. 11–12, p. 1667–1673, 2008.

OGUIS, G. K. et al. Butterfly pea (*Clitoria ternatea*), a cyclotide-bearing plant with applications in agriculture and medicine. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. May, p. 1–23, 2019.

OLIVEIRA, A. P. B. F. et al. Antimicrobial peptides of the genus *Capsicum*: a mini review. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 63, n. 4, p. 453–466, 2022.

PATEL, S.; AKHTAR, N. Antimicrobial peptides (AMPs): The quintessential ‘offense and defense’ molecules are more than antimicrobials. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. July, p. 1276–1283, 2017.

**Peptide Science - 2013 - Taveira - Thionin-like peptides from *Capsicum annum* fruits with high activity against human.pdf.** , [s.d.].

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1 SUPPL., p. S3–S13, 2012.

PINHEIRO, A.; FAVA, B. Purificação , caracterização e atividade antifúngica de proteínas transferidoras de lipídeos ( LTPs ) de sementes de *Capsicum chinense* Jacq. p. 1–66, 2023.

REGENTE, M. C. et al. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 183–189, 2005.

REIS, R. S. et al. Pretreatment free of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid improves the differentiation of sugarcane somatic embryos by affecting the hormonal balance and the accumulation of reserves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 145, n. 1, p. 101–115, 2021.

RIBEIRO, S. F. F. et al. Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. **Toxicon**, v. 50, n. 5, p. 600–611, 2007a.

RIBEIRO, S. F. F. et al. A new peptide of melon seeds which shows sequence

homology with vicilin: Partial characterization and antifungal activity. **Scientia Horticulturae**, v. 111, n. 4, p. 399–405, 2007b.

RIBEIRO, S. F. F. et al. Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi. **Protein Journal**, v. 31, n. 1, p. 59–67, 2012.

RICHARDSON, J. P. *Candida albicans*: A Major Fungal Pathogen of Humans. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 10–12, 2022.

RIGHETTI, P. G.; BOSCHETTI, E. Global proteome analysis in plants by means of peptide libraries and applications. **Journal of Proteomics**, v. 143, p. 3–14, 2016.

SALMINEN, T. A.; BLOMQUIST, K.; EDQVIST, J. Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. **Planta**, v. 244, n. 5, p. 971–997, 2016.

SANTOS, L. DE A. DOS. Caracterização e atividade antimicrobiana de peptídeos de frutos de *Capsicum annuum* sobre fungos fitopatogênicos e detecção em frutos de outras espécies do gênero *Capsicum*. 2006.101. (Ciências Biológicas) - UENF, Rj, 2016

SAVINI, F. et al. Binding of an antimicrobial peptide to bacterial cells: Interaction with different species, strains and cellular components. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1862, n. 8, p. 183291, 2020.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987.

SEYFI, R. et al. Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 1451–1463, 2020.

SHIN, J. H. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: Comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1244–1248, 2002.

SILVA, M. S. et al. Application and bioactive properties of CaTI, a trypsin inhibitor from *Capsicum annuum* seeds: membrane permeabilization, oxidative stress and intracellular target in phytopathogenic fungi cells. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3790–3801, 2017.

SILVAR, C.; GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A. Screening old peppers (*Capsicum* spp.) for disease resistance and pungency-related traits. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 249–257, 2017.

SILVAR, C.; ROCHA, F.; BARATA, A. M. Tracing Back the History of Pepper (*Capsicum annuum*) in the Iberian Peninsula from a Phenomics Point of View. **Plants**, v. 11, n. 22, p. 1–18, 2022.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SOARES, J. R. et al. 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. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 1, p. 3429–3443, 2017.

STEFFEN, H. et al. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2608–2620, 2006.

TAM, J. P. et al. Antimicrobial peptides from plants. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 4, p. 711–757, 2015.

TAVEIRA, G. B. et al. Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 102, n. 1, p. 30–39, 2014.

TAVEIRA, G. B. et al. Programmed cell death in yeast by thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits involving activation of caspases and extracellular H<sup>+</sup> flux. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 2, p. 1–12, 2018.

TEIXEIRA, F. R. et al. Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 7–8, p. 418–421, 2006.

TEWKSBURY, J. J. et al. Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11808–11811, 2008.

THEVISSSEN, K.; TERRAS, F. R. G.; BROEKAERT, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and**

- Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5451–5458, 1999.
- TRIPODI, P. et al. Global range expansion history of pepper (*Capsicum* spp.) revealed by over 10,000 genebank accessions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 34, p. 1–9, 2021.
- UMADEVI, P. et al. Proteomics assisted profiling of antimicrobial peptide signatures from black pepper (*Piper nigrum* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 3, p. 379–387, 2018.
- VIEIRA BARD, G. C. et al. Characterization of Peptides from *Capsicum annuum* Hybrid Seeds with Inhibitory Activity Against  $\alpha$ -Amylase, Serine Proteinases and Fungi. **Protein Journal**, v. 34, n. 2, p. 122–129, 2015.
- VYLKOVA, S. et al. Human  $\beta$ -defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 154–161, 2007.
- WASINGER, V. C. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 1, p. 1090–1094, 1995.
- WHITE, A. M.; CRAIK, D. J. Discovery and optimization of peptide macrocycles. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, n. 12, p. 1151–1163, 2016.
- WHO. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. **World Health Organization**, v. 61, n. 3, p. 383–394, 2014.
- WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 19–50, 1996.
- WIŚNIEWSKI, J. R. et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 359–362, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO GUIDELINE on control and elimination of human schistosomiasis**. [s.l: s.n.].
- WU, X. et al. Proteomic analysis by iTRAQ-PRM provides integrated insight into mechanisms of resistance in pepper to *Bemisia tabaci* (Gennadius). **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–19, 2019.
- YANG, M. et al. Beta-defensin derived cationic antimicrobial peptides with potent killing activity against gram negative and gram positive bacteria. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2018.
- ZAHN, M. et al. Structural studies on the forward and reverse binding modes of

peptides to the chaperone DnaK. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 14, p. 2463–2479, 2013.

ZENG, H. et al. TUBP1 protein lead to mitochondria-mediated apoptotic cell death in *Verticillium dahliae*. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 103, p. 35–44, 2018.

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