

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE FOLHAS E RAÍZES DE
Capsicum annuum L.: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE INIBITÓRIA
SOBRE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS

LÍDIA DA SILVA PEREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO - 2015

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE FOLHAS E RAÍZES DE
Capsicum annuum L.: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE INIBITÓRIA
SOBRE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS

LÍDIA DA SILVA PEREIRA

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

Orientador: Prof^a. Valdirene Moreira Gomes

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO - 2015

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE FOLHAS E RAÍZES DE
Capsicum annuum L.: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE INIBITÓRIA
SOBRE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS

LÍDIA DA SILVA PEREIRA

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

Aprovada em 31 de março de 2015.

Comissão Examinadora:

Prof. Marco Antônio Lopes Cruz (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UFRJ

Prof^a. Antonia Elenir Amâncio de Oliveira (D.Sc., Biociências e Biotecnologia)
UENF

Prof^a. Rosana Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

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

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente ao meu Deus, meu amigo, conselheiro, sem Ele nada seria possível... Digo de coração, sou eterna devedora a esse Deus maravilhoso que me cobre com suas bênçãos sem que eu tenha merecimento algum, Senhor, em todos os meus desejos e aspirações, eu sou muito mais a sua vontade, obrigada por fazer parte dos meus projetos! Obrigada por mais esta vitória!

À prof^a Valdirene Moreira Gomes, pela orientação e dedicação ao ensino, pelos elogios e críticas que me estimularam na busca de mais conhecimentos, por esta porta aberta, obrigada por confiar no meu potencial de trabalho.

À Dr^a Viviane Veiga do Nascimento, pela coorientação e paciência nos ensinamentos teóricos e de bancada, obrigada porque você me ensinou se não tudo, quase tudo que sei, nesses quatro anos de LFBM. Sua amizade é um presente para mim.

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

Ao Dr. André de Oliveira Carvalho, pela prontidão em responder minhas dúvidas.

À Dra. Suzanna de Fátima Ferreira Ribeiro, pela paciência e colaboração nos ensaios com os fungos e os ensaios com tripsina. Obrigada por me aturar, eu sei que não foi fácil.

Às Técnicas, Cíntia e Cláudia Pombo do LMGV, pela disponibilidade de ensinar as técnicas de plantio das sementes das pimentas e pela colaboração nos ensaios de antibiograma.

À Dr^a Ilka Maria dos Vasconcelos, pela colaboração no sequenciamento das proteínas.

Ao grupo LFBM, pelo companheirismo, ajuda e amizade. Obrigada por saber que sempre posso contar com todos vocês.

Aos técnicos, Luiz Carlos de Souza e Valéria, pela ajuda na preparação dos materiais de trabalho e pela amizade.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e à FAPERJ, pelo custeio e financiamento deste trabalho.

Aos meus irmãos da MIBE, às minhas amigas de república Larissa, Carina e Dani, que viraram minha família e que me deram força nos momentos bons e ruins.

À melhor mãe do mundo, Luciana da SilvaPereira, pela dedicação e pela força nos momentos difíceis, sem você não conseguiria... Obrigada por acreditar no meu sonho mesmo quando financeiramente isso não era possível.

Ao meu pai, meus irmãos e familiares, pela torcida, foi muito gratificante saber que eu incentivei vocês a voltarem a estudar. Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este sonho fosse possível.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	II
LISTA DE FIGURAS/TABELA	VII
ABREVIATURAS	VII
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 - O SISTEMA DE DEFESA DAS PLANTAS	4
3.2 - PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS	5
3.3 - O GÊNERO <i>CAPSICUM</i>	9
3.3 - Fungos do gênero <i>Colletotricum</i>	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 - MATERIAIS BIOLÓGICOS.....	14
4.1.1 - Sementes.....	14
4.1.2 - Microrganismos.....	14
4.2 - Extração e purificação parcial de proteínas de folhas e raízes de <i>C. annuum</i> L.....	15
4.2.1 - Cultivo das plantas.....	15

4.2.2 - Extração proteica das folhas e raízes de <i>C. annuum</i> L.....	15
4.2.3 - Purificação parcial por cromatografia de fase reversa em sistema HLC.....	18
4.3 - ELETROFORESE	19
4.3.1 - Eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE.....	19
4.3.2 - Preparo das amostras e condições de corrida.....	19
4.3.3 - Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)	20
4.3.4 - Visualização das proteínas	21
4.4 - DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS	21
4.5 - ENSAIO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	22
4.5.1 - Ensaio de inibição da germinação de esporos fúngicos em meio líquido ..	22
4.5.2 - Efeito dos peptídeos sobre a permeabilização das membranas fúngicas..	23
4.6 - ANTIBIOGRAMA	23
4.7 - DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA TRIPSINA	24
4.8 - DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA α -AMILASE SALIVAR HUMANA.....	24
5. RESULTADOS.....	26
5.1 - ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL SDS-TRICINA-PAGE DOS EXTRATOS ALCOÓLICOS E ÁCIDOS DE FOLHAS E RAÍZES DE <i>C. ANNUUM</i> L.	26
5.2 - ELETROFORESE BI-DIMENSIONAL SDS-TRICINA-PAGE DOS EXTRATOS ALCOÓLICO E ÁCIDOS DE FOLHAS E RAÍZES DE <i>C. ANNUUM</i> L.....	27
5.3 - ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS DE FOLHAS <i>C. ANNUUM</i> L.....	31
5.4 - ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL SDS-TRICINA-PAGE DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DO EXTRATO ALCOÓLICO E ÁCIDO DE FOLHAS	32
5.5 - ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS DE RAÍZES DE <i>C. ANNUUM</i> L.	34
5.6 - ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL SDS-TRICINA-PAGE DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DO EXTRATO ALCOÓLICO E ÁCIDO DE RAÍZES	35
5.7 - SEQUENCIAMENTO DE AMINOÁCIDOS	37
5.8 - EFEITO DOS EXTRATOS DE FOLHAS E RAÍZES DE <i>C. ANNUUM</i> L. SOBRE A INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM MEIO LÍQUIDO	38
5.9 - EFEITO DAS FRAÇÕES DE FOLHAS E RAÍZES DE <i>C. ANNUUM</i> L. SOBRE A INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM MEIO LÍQUIDO	42
5.10 - EFEITO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DE FOLHAS E RAÍZES DE <i>C. ANNUUM</i> L., SOBRE A PERMEABILIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	43
5. 11- ANTIBIOGRAMA	49

5.12 - ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TRIPSINA.....	51
5. 13 - ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ALFA- AMILASE SALIVAR HUMANA	52
6 – DISCUSSÃO.....	54
7- CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS/TABELA

Tabela 1 - Peptídeos antimicrobianos de plantas, adaptado de García-Olmedo et al., (2001).....	6
Esquema 1- Extração alcoólica de folhas e raízes de <i>C. annuum</i> L. a partir da extração descrita por Claeson et al., (1998).....	16
Esquema 2- Extração ácida de folhas e raízes de <i>C. annuum</i> L. a partir da extração descrita por Egorov et al., (2005).....	18
Figura 1 - Perfil eletroforético em gel de tricina dos extratos alcoólico e ácido de folhas e raízes de <i>C. annuum</i> L.....	27
Figura 2 - Perfil eletroforético em gel de tricina 2D PAGE do extrato alcoólico de folhas de <i>C. annuum</i> L.....	28
Figura 3 - Perfil eletroforético em gel de tricina 2D PAGE do extrato ácido de folhas de <i>C. annuum</i> L.....	29
Figura 4 - Perfil eletroforético em gel de tricina 2D PAGE do extrato alcoólica de raízes de <i>C. annuum</i> L.....	30
Figura 5 - Perfil eletroforético em gel de tricina 2D PAGE do extrato ácido de raízes de <i>C. annuum</i> L. após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna C2/C18 com coluna guarda C8	31
Figura 6 - Perfil cromatográfico dos extratos proteicos provenientes das extrações alcoólica e ácida de folhas de <i>C. annuum</i> L. após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna C2/C18 com coluna guarda C8.....	32

Figura 7 - Perfil eletroforético em gel de tricina das frações provenientes do extrato alcoólico de folha de <i>C. annuum</i> L., obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.....	34
Figura 8 - Perfil eletroforético em gel de tricina das frações proveniente do extrato ácido de folhas de <i>C. annuum</i> L., obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.....	35
Figura 9 - Perfil cromatográfico dos extratos proteicos provenientes das extrações alcoólica e ácida de raízes de <i>C. annuum</i> L. após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna C2/C18 com coluna guarda C8.....	39
Figura 10 - Perfil eletroforético em gel de tricina das frações provenientes do extrato alcoólico de raízes de <i>C. annuum</i> L., obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.....	37
Figura 11 - Perfil eletroforético em gel de tricina provenientes do extrato ácido de raízes de <i>C. annuum</i> L., obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.....	38
Figura 12 - Alinhamento de sequência da Fração A1 e da proteína U-Lim de <i>C. annuum</i> L.	39
Figura 13 - Efeito dos extratos proteico alcoólico e ácido de folhas e raízes de <i>C. annuum</i> L. (1000 µg/mL) sobre o crescimento dos fungos (A) <i>C. lindemuthianum</i> e (B) <i>C. gloeosporioides</i>	40
Figura 14 - Fotografias do ensaio dos extratos proteico de <i>C. annuum</i> L. (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo <i>C. lindemuthianum</i>	41
Figura 15 - Curva de crescimento do fungo <i>C. linthemutianum</i> A - Extrato alcoólico de folhas; B - Extrato ácido de folhas; C - Extrato alcoólico raízes e D - Extrato ácido raízes.....	42
Figura 16 - Curva de crescimento do fungo <i>C. gloeosporioides</i> . Extrato alcoólico de raízes.....	43
Figura 17 - Curva de crescimento do fungo <i>C. lindemuthianum</i> na presença de 250 µg/mL das frações A1, A2, A3 e A4 (Extrato ácido de folhas) (A), e as frações A5, A6 (Extrato alcoólico de folhas) A7 (Extrato ácido de raízes) e A8 (Extrato alcoólico de raízes) (B).....	44

Figura 18 - Microscopia de campo claro e fluorescência do fungo <i>C. lindemuthianum</i> na presença de 250 µg/mL das frações A1 e A2 e do corante Sytox Green green.....	46
Figura 19 - Microscopia de campo claro e fluorescência do fungo <i>C. lindemuthianum</i> na presença de 250 µg/mL das frações A3 e A4 e do corante Sytox green.....	47
Figura 20 - Microscopia de campo claro e fluorescência do fungo <i>C. lindemuthianum</i> na presença de na presença de 250 µg/mL das frações A5 e A6, e do corante Sytox green.....	48
Figura 21 - Microscopia de campo claro e fluorescência do fungo <i>C. lindemuthianum</i> na presença de na presença de 250 µg/mL das frações A7e A8 e do corante Sytox green.....	49
Figura 22 - Antibiograma da bactéria <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> , na presença dos extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de <i>C. annuum</i> L.....	51
Figura 23 - Antibiograma da bactéria <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> , na presença de 320 µg/mL do extrato ácido de raízes de <i>C. annuum</i> L.....	52
Figura 24 - Efeito dos extratos alcoólico de folhas (A) e ácido de folhas (B) de <i>C. annuum</i> L. sobre a atividade da tripsina.....	53
Figura 25 - Efeito dos extratos alcoólico de folhas (A) e ácido de folhas (B) de <i>C. annuum</i> L. sobre a atividade da α- amilase salivar humana.....	54

ABREVIATURAS

- **ABS** - Absorbância
- **AMPs** - Peptídeos antimicrobianos
- **AZT** - Tiazolinona
- **BAPNA**- N- Benzoil- DL-arginil- *p*- nitriánilida
- **BCA** - Ácido bicinconínico
- **DTT** - Ditiotreitól
- **HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência
- **K** - Potássio
- **kDa** - kilodalton
- **LTPs** - Proteínas transportadoras de lipídeos
- **MBP-1** - *Maize Basic Peptide*
- **N** - Nitrogênio
- **NaOH** - Hidróxido de sódio
- **P** - Fósforo
- **PITC** - Fenil-isotiocianato
- **PMSF** - Fluoreto de fenilmetilasulfonila
- **PRs** - Proteínas relacionadas à patogênese
- **PTH-AA** - Feniltioidantoínas
- **PVPP** - Polivinilpolipirrolidona
- **ROS** - Espécies reativas de oxigênio
- **rpm** - Rotações por minuto

- **SAR** - Resposta sistêmica adquirida
- **SDS** - Dodecil sulfato de sódio
- **TEMED** - N',N'',N''',N'''' - tetrametiletilenodiamino
- **TFA** - Ácido trifluoracético
- **Tris** - Hidroximetil amino etano
- **UR** - Umidade relativa do ar
- **UV** - Ultravioleta

RESUMO

PEREIRA, Lídia da Silva; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março de 2015; "PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE FOLHAS E RAÍZES DE *Capsicum annuum* L.: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS"; Orientadora: Dr^a Valdirene Moreira Gomes; Conselheiros: Dr^a Rosana Rodrigues e Dr. André de Oliveira Carvalho.

As plantas produzem uma gama de peptídeos antimicrobianos (AMPs) contra seus patógenos, podendo ser expressos de forma constitutiva ou induzidos após o ataque do patógeno ou frente a um estresse abiótico. Resultados demonstram que peptídeos isolados de plantas, tais como defensinas e LTPs, inibem o crescimento de diferentes espécies de fungos patogênicos. Este trabalho teve como principal objetivo detectar e caracterizar AMPs de folhas e raízes de *Capsicum annuum* e avaliar suas atividades inibitórias, sobre os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum gloeosporioides* causadores da antracnose e sobre a bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* causadora da mancha bacteriana. Além disso, atividade inibitória sobre enzimas serino protease e α -amilase salivar humana foi avaliada. Foram utilizadas duas metodologias para a extração de peptídeos das folhas e raízes de *C. annuum*: extração ácida e extração em etanol 50%. Os extratos provenientes de ambas as extrações foram submetidos à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, utilizando coluna C2/C18 com coluna guarda C8. Todo o processo de extração e

purificação foi acompanhado por eletroforese uni e bi-dimensional em gel de tricina. Os extratos brutos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes foram capazes de inibir o crescimento do fungo *C. lindemuthianum* nas concentrações testadas e apenas o extrato alcoólico de raízes foi capaz de inibir o fungo *C. gloeosporioides*. Os peptídeos purificados por cromatografia foram também avaliados quanto a sua capacidade em inibir o crescimento desses fungos. Observou-se que peptídeos são potentes inibidores do crescimento de fungos fitopatogênicos. No antibiograma com a bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* utilizando os extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* em diferentes concentrações, verificou-se que esses extratos são capazes de inibir o crescimento desta bactéria. Observou-se nos ensaios enzimáticos que os extratos alcoólicos e ácidos de folhas são capazes de inibir a tripsina, mas só o extrato ácido inibiu a α -amilase salivar humana. Com esses resultados esperamos contribuir com o uso de AMPs de plantas como ferramentas no controle de doenças causadas por pragas e microrganismos fitopatogênicos.

ABSTRACT

PEREIRA, Lídia da Silva; March, 2015; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro “ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF LEAVES AND ROOTS *Capsicum annuum* L.: CHARACTERIZATION AND INHIBITORY ACTIVITY ON PATHOGENIC MICROORGANISMS”; Advisor: Dr^a Valdirene Moreira Gomes; Consultants: Dr^a Rosana Rodrigues e André de Oliveira Carvalho”.

The plants produce a range of antimicrobial peptides (AMPs) against their pathogens and they can be expressed constitutively or be induced after pathogen attack or against abiotic stresses. Results demonstrated that AMPs isolated from plants, such as defensins and LTPs, inhibits the growth of different species of pathogenic fungi. This study aimed to detect and characterize AMPs from leaves and roots of *Capsicum annuum* L. and evaluate their inhibitory activities on the phytopathogenic fungi such as *Colletotrichum lindemuthianum* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing the anthracnose and the bacteria *Xanthomonas euvesicatoria* cause of bacterial spot. In addition, their inhibitory activity against serine protease and human salivary α -amylase enzymes were evaluated. Two methodologies were used for the extraction of peptides from leaves and roots of *C. annuum*: acid extraction and extraction in 50% ethanol. The two extracts were subjected to reverse phase chromatography on HPLC system using C2/C18 column with C8 guard column. The entire process of extraction and purification was followed by uni- and bi-dimensional electrophoresis in tricine gel. Alcoholic and acids extracts from leaves and roots were able to inhibit the growth of *C.*

lindemuthianum at the all concentrations tested, but only the alcoholic extract of roots was able to inhibit the fungus *C. gloeosporioides*. The peptides purified by chromatography were also evaluated for their ability to inhibit the growth of these fungi. It was observed that peptides are potent inhibitors of the growth of pathogenic fungi. The Antibioqram performed with the bacterium *Xanthomonas vesicatoria* and using alcoholic and acid extracts of leaves and roots from *C. annuum* at different concentrations showed that the both extracts are able to inhibit the growth of this bacterium. In this work we evaluated the ability of these extracts in inhibiting the activity of the human salivary α -amylase and trypsin. Observed that the alcoholic and acid extracts from leaf can inhibit trypsin activity, but only the acid extract inhibited the human salivary α -amylase. With these results we expect to contribute using AMPs as tools in plant disease control tails pests and phytopathogenic microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são pequenas proteínas, menos de 100 resíduos de aminoácidos, com carga líquida positiva em pH fisiológico, são anfipáticos e possuem um amplo espectro de atividade contra microrganismos, sendo conservados durante a evolução (Gennaro e Zanetti, 2000; Hancock e Scott, 2000; Mitta et al., 2000; Boman, 2003; Marshall e Arenas, 2003; Peschel et al., 2006).

Nas plantas, os AMPs desempenham o papel de defesa frente à invasão de um microrganismo, ou ataque de um inseto, ou até mesmo um estresse ambiental. Estes peptídeos foram denominados antimicrobianos, devido ao seu amplo espectro microbicida, especialmente sobre fungos, leveduras, vírus envelopados, bactérias e parasitas (Thevissen et al., 2004; Leonard et al., 2011).

O mecanismo de ação dos AMPs ainda não é bem compreendido para todas as famílias conhecidas, mas muitos estudos indicam que na maioria das vezes ocorre a permeabilização da membrana do microrganismo, devido às características estruturais e químicas destas moléculas.

AMPs possuem várias características químicas e biológicas que os classificam como agentes potenciais na produção de fármacos. Uma destas características é sua baixa toxicidade a células de mamífero *in vitro*. Dessa forma, estudos recentes baseiam-se no desenvolvimento de novos peptídeos antibióticos ou a conjugação de AMPs com medicamentos já utilizados convencionalmente. Outra vertente é o desenvolvimento de AMPs inseticidas, bem como plantas

transgênicas, que expresam genes que codificam AMPs, tornando essas plantas mais resistentes ao ataque de microrganismos invasores e pragas (Peters et al., 2010; Teixeira et al., 2012).

Um papel claro dos AMPs na proteção das plantas é relatado por Gao et al. (2000), em que as plantas transgênicas que expressam o gene para uma defensina de alfafa se tornam mais resistentes ao fungo *Verticillium dahliae*. Outro exemplo do papel dos AMPs é visto por Molina e García-Olmedo (1997), em que as plantas transgênicas de Tabaco e *Arabidopsis* que expressavam o gene para LTP de cevada se tornavam mais resistentes à bactéria *Pseudomonas syringae*.

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado diferentes espécies de pimentas e pimentões com atividade antimicrobiana (Dias et al., 2013). Egorov e colaboradores (2005) demonstraram pela primeira vez a presença e a diversidade, simultaneamente, de diferentes classes de AMPs em sementes de trigo. No total foram isolados 49 AMPs, dos quais 30 foram identificados e agrupados em sete classes as quais incluem: defensinas, peptídeos ricos em glicina, tioninas, LTPs, knotinas símile, heveína símile e peptídeos com quatro cisteínas (MBP-1) entre outros que ainda são desconhecidos.

Assim, durante os últimos anos nosso grupo vem isolando e caracterizando diferentes peptídeos e proteínas antimicrobianas pertencentes a diversas espécies de plantas como *Vigna unguiculata*, *Passiflora flavicarpa*, *Cucumis melo*, *Adenantha pavonina*, *Phaseolus vulgaris* e plantas do gênero *Capsicum*. Desta forma, a presente pesquisa investigou a interação entre fungos patogênicos e bactérias com moléculas peptídicas de plantas, antagonísticas ao seu desenvolvimento, importante não só por aspectos básicos, mas também aplicados, especialmente através da identificação de candidatos moleculares com alta capacidade de controle desses agentes fitopatogênicos.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Identificar e caracterizar peptídeos antimicrobianos de folhas e raízes de *Capsicum annuum* L., analisando seu efeito inibitório sobre microrganismos de interesse agrônômico e sobre enzimas da família serino protease e α -amilase.

2.2- Objetivos específicos

Identificar peptídeos antimicrobianos a partir de diferentes extrações de folhas e raízes de *C. annuum* L. e comparar a efetividade quanto à obtenção dos peptídeos; Purificar e caracterizar os peptídeos antimicrobianos de folhas e raízes de *C. annuum* L.; Analisar o efeito inibitório dos extratos e dos peptídeos isolados de folhas e raízes de *C. annuum* L. sobre o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum gloeosporioides*; Analisar o efeito inibitório dos extratos de folhas e raízes de *C. annuum* L. sobre o crescimento da bactéria *Xanthomonas euvesicatoria*; Analisar o efeito inibitório dos extratos brutos de folhas e raízes de *C. annuum* L. sobre as enzimas tripsina e α -amilase salivar humana.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - O sistema de defesa das plantas

As plantas sofrem constantemente com injúrias causadas por pragas e doenças causadas por microrganismos patogênicos, sendo estes responsáveis por grandes perdas na agricultura. As plantas, entretanto, apresentam certo grau de resistência ao ataque desses agressores, tendo para isso desenvolvido durante a evolução, mecanismos bioquímicos e morfológicos para a sua defesa. A resistência de plantas ao ataque de patógenos pode ser compreendida como a capacidade que elas desenvolveram de impedir ou retardar a penetração dos microrganismos em seus tecidos (Wit, 2007).

O sistema de defesa das plantas está dividido em dois grandes grupos: defesas constitutivas ou pré-formadas e defesas induzidas. As defesas constitutivas são aquelas naturalmente presentes nas plantas, funcionando como barreiras químicas e físicas. Essas defesas pré-formadas protegem as plantas, em um primeiro momento, sem a obrigatoriedade de um ataque ou agressão (Heath, 1997; Heath, 2000; Van Loo et al., 2006)

As defesas induzidas são aquelas evidentes somente após a percepção da invasão do patógeno ou quando a planta sofre injúria. As respostas da defesa induzida incluem: resposta de hipersensibilidade, lignificação do tecido e ativação das barreiras químicas em que ocorre aumento na concentração ou síntese de

vários AMPs e proteínas relacionadas à patogênese, também conhecidas como proteínas PR (Heil, 2010).

É importante ressaltar que as repostas produzidas pelas barreiras físicas e químicas fazem parte tanto da defesa constitutiva quanto da defesa induzida. As repostas das barreiras químicas constitutivas caracterizam-se pela produção de alcaloides, aminoácidos não proteicos, flavonoides, entre outros compostos de baixo peso molecular, podendo também ser principalmente decorrentes da presença de proteínas, tóxicas e peptídeos antimicrobianos, os quais são componentes fundamentais na defesa das plantas (Garcia-Olmedo et al., 2001; Nishimura e Dangl, 2010).

3.2 - Peptídeos antimicrobianos de plantas (AMPs)

As plantas produzem uma ampla gama de proteínas antimicrobianas para defenderem-se de fitopatógenos. Os AMPs podem ser encontrados na maioria ou em todas as espécies de plantas, e são encontrados constitutivamente em órgãos de armazenamento como sementes, tubérculos, órgãos reprodutivos, frutos e flores (Thevissen et al., 2004; Peters et al., 2010). Os AMPs possuem uma ampla atividade contra bactérias patogênicas, fungos, vírus envelopados e parasitas, sendo, dessa forma, uma estratégia comum aplicada pelas plantas como resposta de defesa (Leonard et al., 2011).

Os AMPs são moléculas que apresentam um baixo peso molecular podendo variar de 3 a 10 kDa. Possuem carga líquida positiva em pH fisiológico, dobram-se em moléculas anfipáticas, apresentando uma face hidrofóbica e outra face carregada, facilitando a interação com a membrana da célula alvo (Lay e Gallo, 2009; Baumann et al., 2010). AMPs são ricos em cisteína, podendo variar entre 4, 6 ou 8 de acordo com a família, sendo as cisteínas pareadas formando pontes dissulfeto (2, 3 ou 4), conferindo à molécula uma alta estabilidade. Os AMPs apresentam, ainda, uma estrutura tridimensional globular comum, de acordo com a família em que se encontram (Broekaert et al., 1997).

Baseando-se na homologia das estruturas primárias, os peptídeos podem ser classificados em diferentes famílias, entre elas estão: as snakinas, peptídeos do tipo heveína, peptídeos do tipo knotinas, peptídeos MBP-1, peptídeos macrocíclicos, proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs), defensinas, e

tioninas (Benko-Isepon et al., 2010). Os AMPs podem ser classificados também quanto à massa molecular, carga, estrutura tridimensional e atividade inibitória (Tabela 1).

Tabela 1 - Peptídeos antimicrobianos de plantas, adaptado de García-Olmedo et al. (2001).

Família	Número de resíduos	Ligações dissulfeto	Tipos de subfamílias	Atividade inibitória
LTPs	90-95 (I) ou 70-75 (II)	3-4	I-II	Bactérias Gram-positivas e fungos
Snakinas	61-70	6	I-III	Bactérias e fungos
Defensinas	45-54	4	I-IV	Bactérias Gram-positivas e fungos
Tioninas	45-47	3-4	I-IV	Bactérias e fungos
Heveínas-like	43	4	I	Bactérias Gram-positivas e fungos
Knotinas-like	36-37	3	I	Bactérias Gram-positivas e fungos
Seferdinas	28-38	0	I-II	Bactérias e fungos
MBP-1	33	2	I	Bactérias e fungos
Peptídeos macrocíclicos	29-31	3	I-III	Bactérias Gram-positivas
IB- AMPs	20	2	I	Bactérias Gram-positivas e fungos

As snakinas são AMPs encontrados em várias espécies de plantas, foram inicialmente isoladas de batata (*Solanum tuberosum*). São peptídeos ricos em cisteína (12 resíduos) e possuem uma ampla atividade contra bactérias e fungos (Berrocal-Lobo et al., 2002).

Os AMPs da família MBP-1 possuem um enovelamento característico, onde duas α -hélices estão unidas por duas pontes de dissulfeto, sua estrutura

contém 33 resíduos de aminoácidos. Estes AMPs foram isolados de sementes de milho da espécie *Zea mays* por Duvick et al. (1992). A atividade deste peptídeo foi observada em concentrações muito baixas em torno de 7,6 e 14,52 μM , contra bactérias Gram-negativas e fungos (Duvick et al., 1992).

Os AMPs similares a heveínas possuem 43 resíduos de aminoácidos, quatro ligações dissulfeto e são ricos em glicina. São relatados no látex das seringueiras, em sementes de amaranto, folhas de beterraba, flores da espécie *Pharbitis nil*, frutos de sabugueiro, nas flores do gênero *Arabidopsis*, na casca de plantas de *Eucommia ulmoides*, bem como, em várias outras espécies de plantas. Estes AMPs possuem atividade contra um amplo espectro de fungos e bactérias (Broekaert et al., 1990; Broekaert et al., 1992; Koo et al., 1992; Nielsen et al., 1997; Huang et al., 2002).

Os peptídeos da família knotina foram inicialmente isolados de sementes de *Mirabilis jalapa*, popularmente chamada de maravilha. Peptídeos desta família apresentam em torno de 36 - 37 resíduos de aminoácidos, três ligações dissulfeto e um enovelamento característico em forma de nó. Estes peptídeos inibem o crescimento de uma ampla gama de fungos e bactérias (Benko-Iseppon et al., 2010).

Os Ib-AMPs foram isolados inicialmente em sementes de *Impatiens balsamina*, popularmente chamada de bálsamo de jardim. São peptídeos com 20 resíduos de aminoácidos e possuem duas ligações dissulfeto. Sua atividade já foi identificada contra fungos e bactérias Gram-positivas (Tailor et al., 1997).

Os peptídeos pertencentes à família das Seferdinas são os únicos peptídeos descritos que não possuem pontes de dissulfeto. Suas estruturas são formadas por peptídeos lineares ricos em glicina e histidina e apresentam entre 28 - 38 resíduos de aminoácidos. Estes peptídeos foram inicialmente isolados de raiz de *Capsella bursapastoris*, conhecido popularmente como bolsa-de-pastoros, são ativas contra fungos e bactérias (Park et al., 2000).

Os peptídeos macrocíclicos foram inicialmente encontrados em plantas das famílias Rubiaceae e Violaceae, apresentando em sua estrutura 29 - 31 resíduos de aminoácidos e três ligações dissulfeto. São peptídeos ativos contra fungos e bactérias (Craik et al., 2006).

As tioninas foram os primeiros peptídeos de plantas caracterizados (García-Olmedo et al., 1998). São peptídeos básicos, com baixo peso molecular,

em torno de 5 kDa, ricos em arginina, lisina e cisteína. Localizam-se predominantemente no meio intracelular, mas também, são encontradas no espaço extracelular e em vários tecidos vegetais, como sementes, caules e raízes. A principal característica das tioninas é a sua ampla atividade antifúngica e antibacteriana, e os seus efeitos antimicrobianos conduzem à permeabilização das membranas celulares (Cammue et al., 1992; Bohlmann et al., 1998; Stec, 2006). Há também vários relatos que mostram plantas transgênicas expressando um gene para tionina e tornando-se mais resistentes ao ataque de fungos, bactérias e outros patógenos (Epple et al., 1997).

As LTPs são peptídeos catiônicos encontrados em muitas espécies de mono e dicotiledôneas. Estas proteínas foram nomeadas proteínas transportadoras de lipídeos, devido à sua capacidade de facilitar a transferência de fosfolipídios entre as membranas celulares. As LTPs são subdivididas em duas famílias, LTP1 e LTP2, que apresentam massa molecular de aproximadamente 7 e 9 kDa, respectivamente. As duas famílias apresentam, em comum, oito resíduos de cisteína, formando quatro pontes dissulfeto, elevado ponto isoelétrico e um peptídeo sinal, que varia de acordo com a família. O peptídeo sinal da família LTP1 apresenta em torno de 21 a 27 resíduos de aminoácidos e a família LTP2 de 27 a 35 resíduos de aminoácidos. Peptídeos de ambas as famílias, apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas, fungos e leveduras (Thevissen et al., 1996).

As defensinas representam uma família de peptídeos com 45 a 54 resíduos de aminoácidos, sendo, primeiramente, caracterizadas em plantas por Terras e colaboradores (1995). Estes peptídeos obtidos a partir de grãos de trigo e cevada foram, inicialmente, chamados de tioninas, por apresentarem tamanho de 5 kDa e quatro ligação dissulfeto (Broekaert et al., 1995). Apesar das semelhanças entre tioninas e defensinas, as mesmas não apresentavam o mesmo padrão de formação de pontes de dissulfeto. As defensinas apresentam oito cisteínas que formam uma estrutura estável, com quatro pontes dissulfeto, que são enoveladas em forma globular, contendo três folhas- β antiparalelas e uma α -hélice (Carvalho e Gomes, 2009).

No reino vegetal, as defensinas podem ser encontradas na maioria, se não em todas as plantas (Broekaert et al., 1995; Liu et al., 2006). Isoladas a partir de várias espécies, podem ser encontradas em diferentes partes da planta, por

exemplo, folhas de rabanete da espécie *Raphanus sativus* (Terras et al., 1992), frutos de pimenta da espécie *Capsicum annuum* L. (Meyer et al., 1996) e sementes de *Phaseolus vulgaris* (Games, et al., 2008).

Mello e colaboradores (2011) mostraram que a defensina *PvD1* de *Phaseolus vulgaris*, na concentração de 100 µg/mL, foi capaz de causar permeabilização na membrana celular de diferentes leveduras tais como: *Candida albicans*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Nas leveduras *Candida albicans* e *Candida guilliermondii*, a defensina foi capaz de causar ainda desorganização da membrana citoplasmática. Na levedura *Candida albicans* e no fungo *Fusarium oxysporum*, *PvD1* induziu a produção ROS, que são compostos que comprometem funções celulares. Assim as defensinas de plantas são dotadas de múltiplas atividades biológicas, entre elas, a inibição de fungos e bactérias Gram-positivas. O mecanismo de ação deste peptídeo baseia-se na interação com a célula alvo, permeabilização das membranas celulares e inibição do crescimento de diferentes espécies de fungos e leveduras patogênicas (Dubin et al., 2005; Carvalho e Gomes, 2011).

3.3 - O Gênero *Capsicum*

O gênero *Capsicum* compreende pimentas e pimentões que apresentam uma grande variabilidade nos tipos de frutos, variando em tamanhos, cores e formas. Plantas do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae, que inclui pimentas de importante valor econômico (Luning, et al., 1995; Menichini et al., 2009).

As plantas do gênero *Capsicum* são, preferencialmente, autógamas com flores hermafroditas, com $2n = 2x = 24$ número de cromossomos, mas outras espécies, principalmente as selvagens, podem apresentar $2n = 2x = 26$ números de cromossomos (Pickersgill et al., 1997). Diferença no número de cromossomos de acordo com Pozzobon e colaboradores (2006) podem ocorrer em plantas da mesma espécie ou plantas de espécies diferentes.

O gênero *Capsicum* compreende plantas nativas das zonas tropicais e úmidas da América Central e do Sul. Segundo McLeod e colaboradores (1982), a hipótese mais aceita sugere que a maior parte das espécies do gênero *Capsicum*

originou-se na região Sul-Central boliviana, com migrações para os Andes e terras baixas da Amazônia.

A pimenta é uma cultura importante para a agricultura, não apenas pelo seu valor econômico, mas também, por ser uma especiaria da culinária popular, valorizada por seus atributos sensoriais de cor, sabor, pungência, aroma e valor nutricional do seu fruto. Seus frutos podem ser consumidos em diferentes estádios de maturação, desde verde até totalmente maduro (Kouassi et al., 2012).

Devido à sua versatilidade, as pimentas do gênero *Capsicum* também são utilizadas como especiarias, na ornamentação e em uma ampla variedade de aplicações terapêuticas, como antiinflamatório e diurético (Bosland, 1994; Topuz e Odzemir, 2007; Maria et al., 2010).

As pimentas e os pimentões do gênero *Capsicum* sempre foram utilizados pelos índios e civilizações antigas com a finalidade de tornar os alimentos mais agradáveis ao paladar, eram também utilizados pelos índios por serem fontes de conservantes naturais. Devido as suas propriedades antioxidantes, as pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* têm sido alvos de estudos na prevenção de alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e no processo de envelhecimento (Deepa et al., 2006; Arroyo e Iruela-Arispe, 2010; Guzman et al., 2010).

O cultivo de *Capsicum* se iniciou com a domesticação das espécies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens* e *C. chinenses* (Zimmer et al., 2012). O gênero *Capsicum* ainda pode ser dividido em três grandes complexos, de acordo com a facilidade de cruzamento: Complexo *baccatum*, Complexo *pubescens* e Complexo *annuum* (Pickersgill, 1991).

O Complexo *annuum* é representado pelas espécies: *C. annuum* (var. *annuum* e *glabriusculum*), *C. frutescens*, *C. chacoense*, *C. galapagoensei* e *C. chinense* (Pickersgill, 1991).

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), *Capsicum annuum* é a espécie de pimenta mais conhecida e difundida no mundo. Trata-se de uma planta herbácea, com flores brancas, que dão origem a frutos de diferentes tamanhos e cores. A espécie *Capsicum annuum* é largamente utilizada na indústria de alimentos, devido às suas propriedades corantes e aromatizantes (Romo-Hualde et al., 2012). Seus pimentões são considerados uma das

fruticulturas mais importantes das regiões subtropicais de todo o mundo (Marín et al., 2004).

Plantas do gênero *Capsicum* têm sido alvo de vários estudos, Jung e et al. (2003) estudaram três genes isolados de plantas do gênero *Capsicum*, nestes genes *CALTPI*, *CALTPII* e *CALTPIII*, observaram-se-se que estes genes codificavam para proteínas transportadoras de lipídeos (LTP) um AMP já descrito. Observou-se também que o gene *CALTPIII*, apenas era transcrito nas folhas, nas raízes, nas flores e nos tecidos do fruto quando estavam infectados por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Phytophthora capsici* e *Colletotrichum gloeosporioides*. O gene *CALTPIII* também foi expresso nas folhas superiores após as folhas mais baixas serem imunizadas por bactérias patogênicas ou por não patogênicas (Jung et al., 2006).

Ribeiro et al. (2007; 2012) apresentaram em seus estudos, que peptídeos isolados de sementes de pimenta da espécie *C. annuum* L. são eficazes contra o crescimento de leveduras de diferentes gêneros como *Candida*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces* e *Pichia*, e causam alterações nas estruturas celulares destas leveduras. Taveira et al. (2014) identificaram em frutos de *C. annuum* L. uma proteína similar a tioniina, com atividade antifúngica e antibacteriana. Esses resultados se devem a mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas durante o processo evolutivo.

3.4 - Fungos do gênero *Colletotrichum*

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são causadores da antracnose, uma das doenças de grande importância que atingem plantas de diversas culturas como: morango, manga, caju, banana, goiaba, maçã, tomate, jiló, berinjela, entre outras. Em pimentão e pimentas as espécies do gênero *Colletotrichum* que causam a antracnose estão subdivididas em várias espécies, tais como *C. gloeosporioides*, *C. capsici*, *C. acutatum*, *C. dematium* e *C. coccodes*. No Brasil, o principal agente causador da doença é o fungo *C. gloeosporioides*, sendo as infecções causadas pelos fungos de outras espécies raras (Mendes et. al., 1998; Azevedo et al., 2006).

A Antracnose é a principal doença em *C. annuum* L., caracterizada por lesões necróticas arredondadas de diferentes diâmetros, o centro desta lesão é constituído de uma massa de conídeos alaranjada sendo, esta doença com maior

incidência em períodos de chuva. As condições para a infecção do fungo são de 20°C á 24°C, e alta umidade relativa do ar, sendo a presença de água um fator essencial para a germinação e dispersão dos esporos fúngicos pela lavoura (Lopes et al., 2003; Serra & Silva, 2004; Azevedo et al., 2006).

Patógenos deste gênero são responsáveis por grandes perdas na agricultura por serem capazes de infectar as plantas em diferentes fases do seu desenvolvimento. As perdas se apresentam principalmente na pós-colheita em frutífera. No Brasil, estimam-se perdas de cerca de 30% em produtos comercializados (Serra & Silva, 2004; Tavares, 2004).

Segundo a EMBRAPA, a principal forma de controle desta doença é o uso de fungicidas, sementes sadias, rotação de bem como, a utilização de cultivares resistentes. Sendo a obtenção de cultivares dificultada pela grande variabilidade genética dos fungos. Outra forma de controle desta doença é o uso de agrotóxico, mas o uso de forma indiscriminada tem causado problemas como a contaminação do meio ambiente e a seleção de fungos resistentes aos agrotóxicos já utilizados convencionalmente. Nesse sentido, formas alternativas de controle da antrocnose que sejam menos danosos ao ambiente se tornam de grande importância para o controle desta doença (Rios & Recio, 2005).

Nos últimos anos, há relatos do uso de extratos e óleos essenciais de plantas no controle de microrganismo fitopatogênicos como, por exemplo, bactérias, vírus, nematoides e fungos (Fiori et al., 2000; Schwan-Estrada & Stangarlin, 2005). Os extratos e óleos essenciais de plantas podem agir diretamente sobre os microrganismos ou indiretamente, ativando o sistema de defesa das plantas (Franzener et al., 2000; Bonaldo et al., 2004).

3.5 - Bactérias do gênero *Xanthomonas*

As bactérias do gênero *Xanthomonas* são causadoras da mancha-bacteriana. Os patógenos causadores desta doença pertencem a quatro espécies *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans*. A mancha-bacteriana é uma doença de difícil controle que atinge plantas de diferentes culturas (berinjela, jiló, tomate, pimenta e pimentão e etc.) e em diferentes estágios de seu desenvolvimento (Jones et al., 2004; Obradovic et al., 2004).

Mancha-bacteriana é uma das doenças mais importantes em tomate e pimenta, caracterizada pela formação de manchas necróticas ou não, distribuídas

principalmente nas bordas das folhas Há ocorrência também de lesões de coloração marrom no caule. Nos frutos esta doença causa deformações e manchas de coloração esbranquiçadas a marrom. A disseminação da doença se dá a longas distâncias por meio de sementes contaminadas, plantas doentes dentro de uma mesma área de cultivo ou até mesmo através da água cotaminada da chuva ou da irrigação. Estima-se que esta doença pode levar a cerca de 30% de perdas na produção de frutos. (Ritchie, 2000).

As medidas de controle da mancha-bacteriana são baseadas primeiramente na seleção do local do plantio, sendo este bem ventilado, bem drenado e longe de áreas de cultivo de solanácias. Deve-se realizar análise no solo, utilizar mudas e sementes livres de contaminação, bem como a irrigação adequada que não favoreça o aparecimento da bactéria. Outra medida de grande importância é a utilização de cultivares com genótipos resistentes. Em áreas em que a contaminação já é latente, utiliza-se de agrotóxicos à base de hidróxido de cobre, oxicloreto de cobre, oxitetraciclina e estreptomicina (Viana et al., 2007).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Materiais biológicos

4.1.1 - Sementes

As sementes de *C. annuum* L. (acesso UENF1381) foram selecionadas no banco de germoplasma e fornecidas pela Prof^a Dr^a. Rosana Rodrigues do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Este acesso foi primeiramente identificado como sendo resistente á mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria*. A resistência genética é controlada por três genes resistente (Riva et al.,2004).

4.1.2 - Microrganismos

Os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum* (5771) e *Colletotrichum gloeosporioides* (5522) foram cultivados em meio de cultura Ágar Sabouraud e mantidos conservados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

A bactéria *Xantomonas euvesicatoria*, isolado T1P3 (ENA - 4135), foi cultivada em meio de cultura DYGS (1L do meio DYGS foi preparado adicionando

2 g de glicose, 1,5 de peptona bacteriológica, 1,5 g de extrato de levedura, 0,5 de K₂HPO₄, 1,5 g de ácido glutâmico, 0,5 de MgSO₄ e 18 g de Agar, o pH foi ajustado para 7, em seguida a solução foi autoclavada por 15 min) e mantida no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

4.2 - Extração e purificação parcial de proteínas de folhas e raízes de *C. annuum* L.

4.2.1 - Cultivo das plantas

As plantas de *C. annuum* L. foram cultivadas em câmara de crescimento a 28°C e 80 UR com fotoperíodo de 16h para o dia e 8h para a noite. O plantio das sementes foi realizado em bandejas de isopor de 72 células com substrato comercial Vivatto[®] adubado com formulação N-P-K (4-14-8), sendo irrigadas uma vez ao dia. Com 47 dias as primeiras folhas foram cortadas próximo ao pecíolo e as folhas cotiledonares foram excluídas. As raízes coletadas foram lavadas até a retirada total do substrato e depois lavadas por mais uma vez em água destilada. Após a coleta, as folhas e raízes foram armazenadas separadamente em saquinhos de papel alumínio e imerso em nitrogênio líquido. Após este período, o material foi armazenado em ultrafreezer -70°C, para posterior extração proteica.

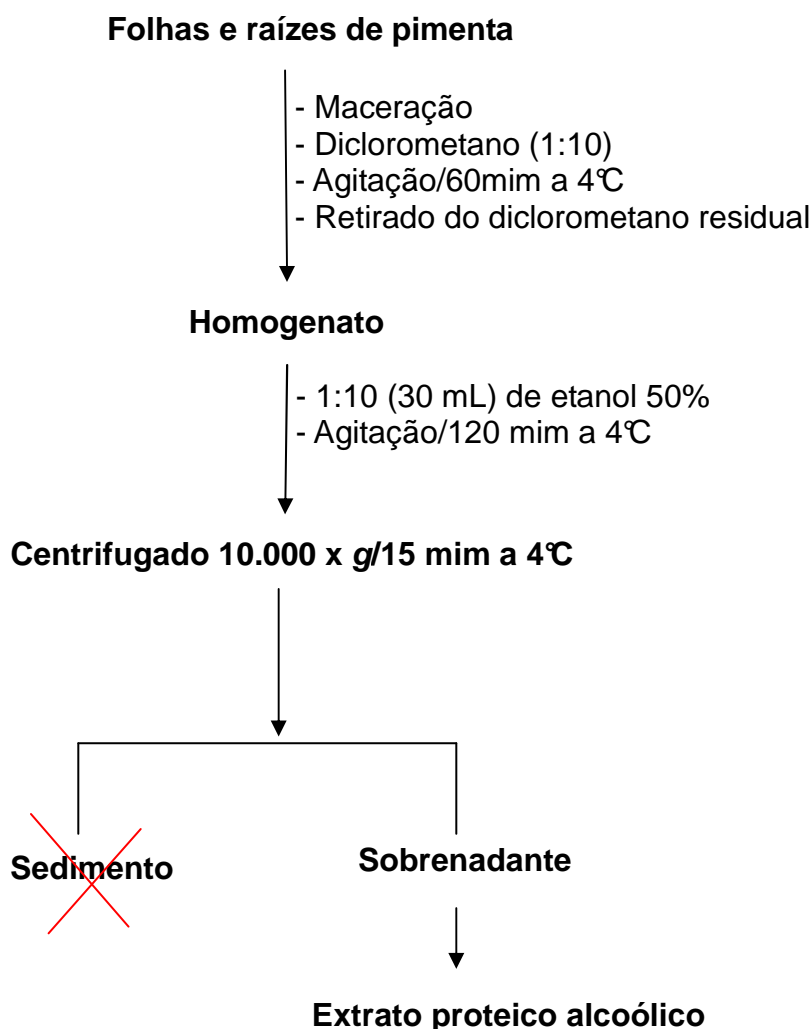
4.2.2 - Extração proteica das folhas e raízes de *C. annuum* L.

4.2.2.1 - Extração alcoólica

O extrato proteico foi obtido segundo metodologia descrita por Claeson et al., (1998). O processo se baseia na solubilidade de peptídeos na mistura de etanol e água (Esquema 1).

As folhas e raízes foram descongeladas e pesadas (3 g) e maceradas em nitrogênio líquido, separadamente, até obtenção de uma farinha fina. Em seguida foi adicionado diclorometano para a retirada do pigmento das folhas na proporção de 1:10 (30 mL) e o material foi mantido sob agitação por 60 min a 4°C. Este procedimento foi repetido sem obter a total retirada do pigmento das folhas. O

diclorometano foi retirado após o extrato ter sofrido decantação. As proteínas da farinha foram extraídas, em etanol 50% na proporção de 1:10 (30 mL) sob agitação por 180 min, a 4°C. O homogenato foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min a 4°C em centrífuga refrigerada. Após a centrifugação, o sedimento foi descartado e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45 µm. Posteriormente, o material foi dialisado a 4°C por três dias com três trocas diárias, sendo em seguida liofilizado e o teor proteico dosado pelo método do ácido bicinconínico, obtido da *Sigma Co, St Louisl, USA*. Os extratos foram denominados Ext1 (extrato alcoólico de folhas) e Ext3 (extrato alcoólico de raízes).

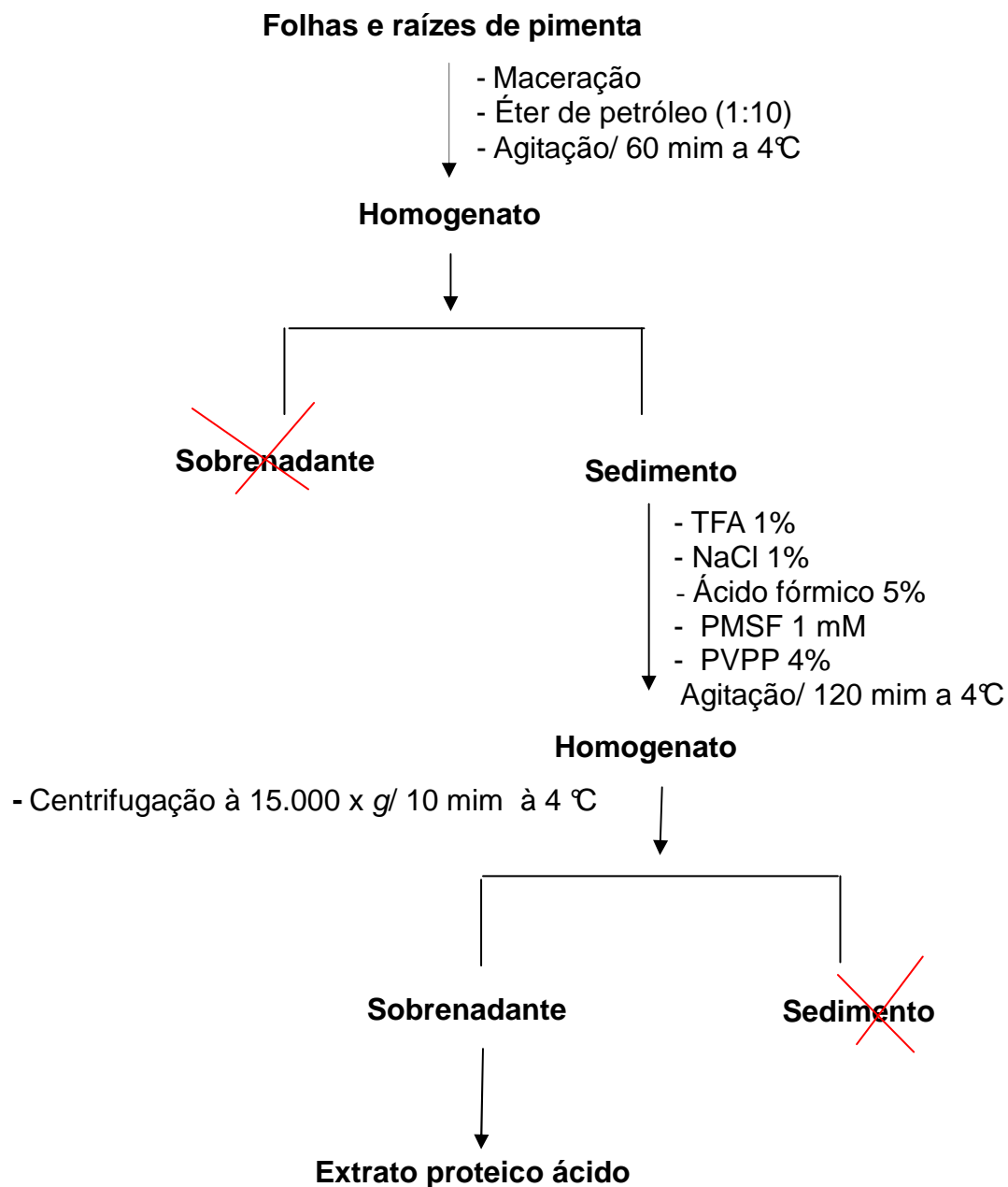


Esquema 1- Extração alcoólica de folhas e raízes de *C. annuum* L. a partir da extração descrita por Claeson et al. (1998).

4.2.2.2 - Extração ácida

O extrato proteico foi obtido segundo metodologia descrita por Egorov et al., (2005), com algumas modificações por extração. O processo se baseia na solubilidade e resistência dos peptídeos na mistura ácida empregada (Esquema 2).

As folhas e raízes foram pesadas (3g) e maceradas em nitrogênio líquido, separadamente, até obtenção de uma farinha fina. Em seguida foi adicionado éter de petróleo na proporção de 1:10 (30mL) e o material foi mantido sob agitação por 60 min a 4°C. Após a centrifugação, o sedimento foi descartado. Em um *bearker* foi adicionado a solução de extração proteica na proporção 1:10 (TFA 1%, NaCl 1%, PMSF 1 mM, e PVPP 4%, ácido fórmico 5%). O material foi agitado em ambiente refrigerado por 120 min. Após este período, o homogenato foi centrifugado a 15.000 x g por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o sedimento foi descartado e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45 µm. Posteriormente, o material foi dialisado a 4°C por três dias com três trocas diárias, sendo em seguida, liofilizado e o teor proteico dosado pelo método do ácido bicinonínico. Os extratos foram denominados Ext2 (extrato ácido de folhas) e Ext4 (extrato ácido de raízes).



Esquema 2- Extração ácida de folhas e raízes de *C. annuum* L. a partir da extração descrita por Egorov et al. (2005).

4.2.3 - Purificação parcial por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

Os extratos liofilizados e dosados foram submetidos à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, utilizando coluna C2/C18 (μ RPC C2/C18 ST

4.6/100, GE *Healthcare*) com coluna guarda C8 (*Pelliguard*, Sigma). A coluna foi equilibrada em acetonitrila 2% contendo TFA 0,1% (solução A), em fluxo de 0,5 mL/min. As proteínas foram separadas com gradiente da solução B (acetonitrila 80% contendo TFA 0,1%). Durante a eluição dos peptídeos foi utilizado um gradiente, como descrito abaixo:

TEMPO (minutos)	CONCENTRAÇÃO DE B (%)
0,01	0
10,00	0
80,00	100
85,00	100
85,1	0
95,00	0

4.3 - Eletroforese

4.3.1 - Eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE

A eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE foi realizada segundo metodologia descrita por Schagger e Von Jagow (1987). Foram usadas placas de vidro 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,5 mm.

4.3.2 - Preparo das amostras e condições de corrida

Alíquotas dosadas das amostras provenientes do processo de extração e purificação de peptídeos de folhas e raízes de *C. annuum* L., foram adicionadas ao tampão de amostra (Tris/HCl 125 mM pH 6,8; SDS 2,5%; sacarose 10%; azul de bromofenol 0,25%; β -mercaptoetanol 5%). Em seguida, o material foi aquecido por 5 min a 100°C, centrifugado a 10.000 x g por 2 min e o sobrenadante aplicado no gel de concentração. Para a corrida, utilizaram-se tampão catodo (Tris/HCl 0,1 M pH 8,3; SDS 0,2%) e tampão anodo (Tris/HCl 0,2 M pH 8,9; SDS 0,2%). A eletroforese transcorreu por, aproximadamente, 16 horas em uma corrente de 20 V. Para acompanhar a massa molecular dos peptídeos, foram utilizados os

seguintes marcadores de massa molecular: mioglobina (16.950 Da), mioglobina I + II (14.400 Da), mioglobina I + III (10.800 Da), mioglobina I (8.160 Da), mioglobina II (6.200 Da), glucagon (3.500 Da) e mioglobina III (2.500 Da) (SDS175, Sigma).

4.3.3. Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)

O perfil proteico dos extratos provenientes de ambas as extrações, ácida e alcoólica, foi avaliado por eletroforese bidimensional, utilizando o aparelho *Ettan IPG.Phor 3* (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante e de acordo com as metodologias descritas por O' Farrel, (1975), Bjellqvist et al., (1992) e Görg et al., (1998).

4.3.3.1 - Focalização Isoelétrica (Primeira dimensão)

Para a focalização isoeletrica, 100 µg dos extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L. foram solubilizados, separadamente, no tampão de rehidratação (ureia 7M; tiourea 2M, CHAPS 2%; anfólitos 0,5% e DTT 0,2 - 0,4%, azul de bromofenol 0,0002%) e aplicados na fita de gradiente de pH imobilizado (pH 3 - 10) de 7 cm.

A focalização das amostras foi realizada em sistema *Ettan IPG. Phor 3* (GE Healthcare) à temperatura de 20°C e corrente total de 50µA por fita de pH imobilizado de 7cm, utilizando a seguinte programação: 200 V por 12h (rehidratação), 200 V por 200 Vh (*step*), 500 V por 1000 Vh (*step*), 1000 V por 2000 Vh (*step*), 4000 V por 1 h (gradiente), 8000 V por 30000 Vh (*step*).

4.3.3.2 - Segunda dimensão em gel SDS-Tricina-PAGE

Após a focalização, a fita de pH imobilizado passou por dois passos de equilíbrio, em que foi imersa em solução de equilíbrio (ureia 6 M, Tris/HCl 75 mM pH 8,8, glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) contendo DTT (50 mg DTT para 5 mL de solução de equilíbrio) sob agitação por 15 min e, posteriormente, solução de equilíbrio contendo iodoacetamida (125 mg para 5 mL de solução de equilíbrio), também, sob agitação por 15 min.

Após o processo de equilíbrio, a fita de pH foi colocada no topo de um gel SDS-Tricina-PAGE selado com agarose 0,05%. A eletroforese transcorreu por, aproximadamente, 16 horas em uma corrente de 20 V. Para acompanhar a massa molecular dos peptídeos, foram utilizados os seguintes marcadores de massa molecular: mioglobina (16.950 Da), mioglobina I + II (14.400 Da), mioglobina I + III (10.800 Da), mioglobina I (8.160 Da), mioglobina II (6.200 Da), glucagon (3.500 Da) e mioglobina III (2.500 Da) (SDS175, Sigma).

4.3.4 - Visualização das proteínas

Para visualização das proteínas, o gel foi corado com nitrato de prata, segundo a metodologia descrita por Morrissey (1998). Após o término da corrida, o gel foi incubado por 40 min na solução 1 (ácido acético 10%, etanol 4%). Após este período, o gel foi lavado por 2 min em água ultrapura e em seguida incubado por 20 min na solução 2 (glutaraldeído 2%). O gel foi lavado por duas vezes de 10 min em água ultrapura e incubado na solução 3 (etanol 60%) por 20 min. O gel foi, então, incubado por 20 min na solução de coloração (etanol 20%, nitrato de prata 1%, hidróxido de amônio 30% e NaOH 40%), que foi preparada na hora do uso e mantido sob o abrigo da luz. Em seguida, o gel foi lavado por duas vezes de 10 min na solução três e incubado na solução reveladora (etanol 20%, formaldeído 37%, ácido cítrico 5,75 mM) até obter-se a coloração desejada. A coloração foi fixada com uma solução de fixação (ácido acético 10%, 0,5 mL de glicerol) por 10 min. Em seguida o gel foi armazenado em água destilada.

4.4 - Determinação da sequência de aminoácidos

Os peptídeos de folhas e raízes de *C. annuum* L. purificados por cromatografia de fase reversa, foram submetidos ao sequenciamento automático em sequenciador da *Shimadzu* (modelo PPFQ-33A). Foi empregada a metodologia desenvolvida por Edman (1950). A degradação de Edman é um processo cíclico em que resíduos de aminoácidos são clivados um a um (a cada ciclo) a partir da extremidade N-terminal da proteína, e são identificados como derivativos feniltioidantoínas (PTH-AA). Em cada ciclo são realizadas três etapas: acoplamento do fenil-isotiocianato (PITC) como resíduo amino-terminal, clivagem

do resíduo amino-terminal via ciclização em meio ácido, conversão do derivativo tiazolinona (AZT) formado para um derivativo mais estável, a tioidantoína (PTH), o qual pode ser identificado por cromatografia de fase reversa em coluna C18, usando um sistema de eluição isocrático (ACN 37%) (Allen, 1989).

Este experimento foi realizado em colaboração com a Dr^a. Ilka Maria Vasconcelos, da Universidade Federal do Ceará.

As sequências das frações purificadas foram comparadas com as sequências em bancos de dados relatados de aminoácidos e foram apresentados para o alinhamento automático, utilizando o sistema de busca NCBI-BLAST (Altschul et al., 1997).

4.5 - Ensaio de inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos

4.5.1 - Ensaio de inibição da germinação de esporos fúngicos em meio líquido

Os fungos filamentosos *C. lindemuthianum* e *C. gloeosporioides* foram cultivados em placas de Petri, contendo 30 mL de Ágar Sabouraud por um período de 11 dias a 30°C . Após o crescimento dos fungos, foram adicionados 10 mL de caldo Sabouraud na placa de Petri contendo os fungos, e com auxílio de uma alça de Drigalski, realizou-se a liberação dos esporos fúngicos. Essa suspensão foi filtrada em um tubo contendo gase, para a obtenção e quantificação dos esporos fúngicos em câmara de Neubauer, com uso do microscópico óptico. Posteriormente, os esporos fúngicos (2×10^3 cel.mL⁻¹) foram incubados em 100 µL de caldo Sabouraud contendo os extratos alcoólicos e ácidos (15,6; 31,5; 62,5; 125; 500; 250 e 1000 µg/mL) e as frações purificados de folhas e raízes de *C. annuum* L. (250 µg/mL). As frações obtidas a partir do extrato ácido de folhas (L1', L2', L3' e L4'), as frações do extrato alcoólico de folhas (L1 e L2'), a fração obtida do extrato ácido de raízes (R2') e a fração do extrato alcoólico de raízes (R2) foram testadas contra o fungo *C. lindemuthianum*.

O ensaio foi realizado em placas de cultura de células de 96 poços a 30°C por um período de até 54h, de acordo com o padrão de crescimento do fungo. A determinação da densidade óptica foi monitorada de 6 em 6h em leitor de microplacas a 620 nm. Todo o ensaio foi realizado em triplicata e sob condições

de assepsia em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert et al., (1990). Os dados para a inibição do crescimento fúngico foram avaliados pela ANOVA e as diferenças das médias de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* (versão 5.0 para Windows).

4.5.2 - Efeito dos peptídeos sobre a permeabilização das membranas fúngicas

O efeito dos peptídeos isolados de folhas e raízes de *C. annuum* L sobre a permeabilização de membrana dos fungos filamentosos *C. lindemuthianum* e *C. gloeosporioides*, foi avaliado utilizando o corante *Sytox gree*, que possui afinidade por ácidos nucleicos. Havendo um comprometimento na membrana dos microrganismos, o corante penetra na célula, liga-se ao DNA e emite fluorescência (Thevissen et al., 1999). Para avaliarmos se as frações L1', L2', L4', L8', L1, L2, R2 e R2' eram capazes de permeabilizar as membranas dos fungos *C. lindemuthianum* e com isso começarmos a entender o mecanismo de ação destes peptídeos, avaliamos alíquotas do teste de inibição (controle e tratado), que foram incubadas com o corante fluorescente *Sytox green* na concentração final de 0,2 μM , por 30 minutos ao abrigo da luz e sob leve agitação. Uma alíquota da cultura foi adicionada sobre uma lâmina, coberta com uma lamínula e observada em microscópio óptico de fluorescência. Todas as imagens de fluorescência foram captadas com o mesmo tempo de exposição.

4.6 - Antibiograma

Para avaliar o efeito dos extratos, alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L. sobre o crescimento da bactéria *Xantomonas euvesicatoria*, isolado T1.P3 (ENA - 4135), utilizou-se a metodologia descrita por Costa et al., (2012).

Com o objetivo de avaliar a formação de halos de inibição em diferentes tempos e concentrações, uma alçada da bactéria foi crescida em 30 mL de meio DYGS líquido, este foi mantido sob agitação em um *shaker* por um período de 24h a 28°C e 100 rpm. Após este período 100 μL deste meio líquido turvo, rico em bactérias, foi transferido para um erlenmeyer contendo 30 mL meio DYGS

semi-sólido 0,8%, para chegar à temperatura de 40°C . Foi utilizado banho-maria por, aproximadamente, 40 min e a temperatura foi medida com um termômetro descontaminado em hipoclorito 1% por 3min e, após este período, foi lavado por três vezes com água estéril. Assim o meio foi vertido sobre placas de Petri.

Após a solidificação do meio foram colocados sobre ele cinco discos de papel de aproximadamente 6mm de diâmetro e sob cada disco foram adicionados 5 µL dos extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L.. Em um dos discos foram adicionados 5µL de água como controle. As concentrações testadas de cada extrato foram de 40, 80, 160, 320 µg/mL. As placas foram avaliadas no período de 24 e 48h, com um paquímetro eletrônico digital da marca *Stainless Hardened*.

4.7 - Determinação da inibição da atividade da tripsina

A atividade inibitória da enzima tripsina pelos extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L. foi determinada medindo-se a atividade hidrolítica residual da tripsina (1 mg/mL) com o uso do substrato *BAPNA* (0,0625 mM), após pré-incubação dos extratos. A atividade proteolítica foi medida pelo uso de um peptídeo sintético derivado da *p*-nitroanilida em tampão Tris-HCl, pH 8,0, a 37°C, num volume final de 200 µL. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato foi acompanhada fotometricamente pela medida de absorbância liberada pelo *p*-nitroanilida a 405 nm (Macedo et al., 2007). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* (versão 5.0 para Windows) .

4.8 - Determinação da inibição da atividade da α-amilase salivar humana

O ensaio de atividade enzimática da α-amilase salivar humana foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Bernfeld (1955). Alíquotas dos extratos alcoólicos (75, 150 e 300 µg/mL) e ácidos de folhas (375; 18,75; 37,5; 75; 150; 300 µg/mL) de *C. annuum* L. foram misturadas a 10U de α-amilase salivar humana e incubadas por 15 min a 37 °C. Após este período foi adicionado amido 1%, totalizando um volume final de 50 µL, e a mistura retornou para o banho-maria por mais 15 min. As amostras foram retiradas do banho e após o resfriamento foram adicionados 200 µL da solução de DNS (hidróxido de sódio

4%, 3,5- ácido dinitrosalicílico 1%, tartarato duplo de sódio e potássio 45 g, fenol cristalino 2 g). As amostras do ensaio foram, então, fervidas por 5 min e 200 µL de água foram adicionadas a cada amostra. A hidrólise do substrato pela enzima foi determinada após leitura da absorbância a 540 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata e foi calculado o desvio padrão para cada um deles. Uma unidade de α -amilase foi definida como a variação de 0,1 de ABS a 540 nm por 30 minutos de reação, como descrito por Franco e et al. (2000). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* (versão 5.0 para Windows).

5. RESULTADOS

5.1 - Eletroforese unidimensional SDS-Tricina-PAGE dos extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L.

O perfil eletroforético dos extratos proteicos alcoólico e ácido de folhas de *C. annuum* L. revelou bandas majoritárias em torno de 6 a 8 kDa, com bandas superiores a 14 kDa para o extrato alcoólico e bandas entre 8 e 10 kDa para o extrato ácido. (Figura 1, raias 1 e 2). Nas raízes, a extração alcoólica obtiveram-se bandas majoritárias entre 6 e 8 kDa. Já para o extrato ácido bandas superiores obtiveram-se 6 kDa (Figura ,1 raias 3 e 4).

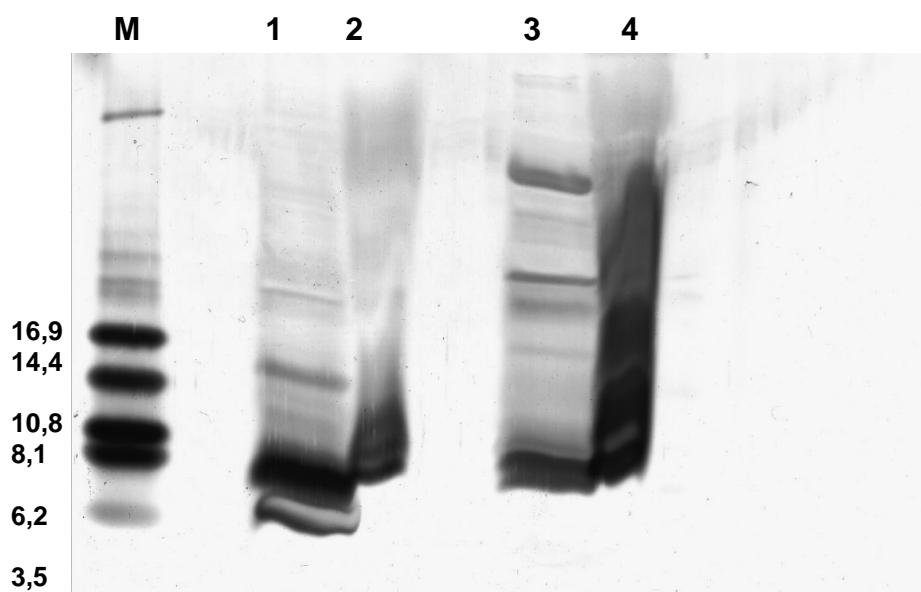


Figura 1 - Perfil eletroforético em gel unidimensional SDS-Tricina-PAGE dos extratos alcoólico e ácido de folhas e raízes de *C. annuum* L.. **M** - marcador de baixo peso molecular (kDa), **1** - Extração alcoólica folhas; **2** - Extração ácida folhas; **3** - Extração alcoólica raiz; **4** - Extração ácida raiz. O gel foi revelado por precipitação com nitrato de prata.

5.2 - Eletroforese bi-dimensional SDS-Tricina-PAGE dos extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L.

Avaliou-se a composição proteica dos extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L., através da eletroforese bi-dimensional SDS-Tricina-PAGE.

No perfil eletroforético do extrato alcoólico de folhas, observaram-se proteínas majoritárias com massa molecular entre 7 e 8 kDa e pI variando entre 4 e 5, e proteínas com massa molecular superior a 14 kDa com pI entre 4 e 7 (Figura 2).

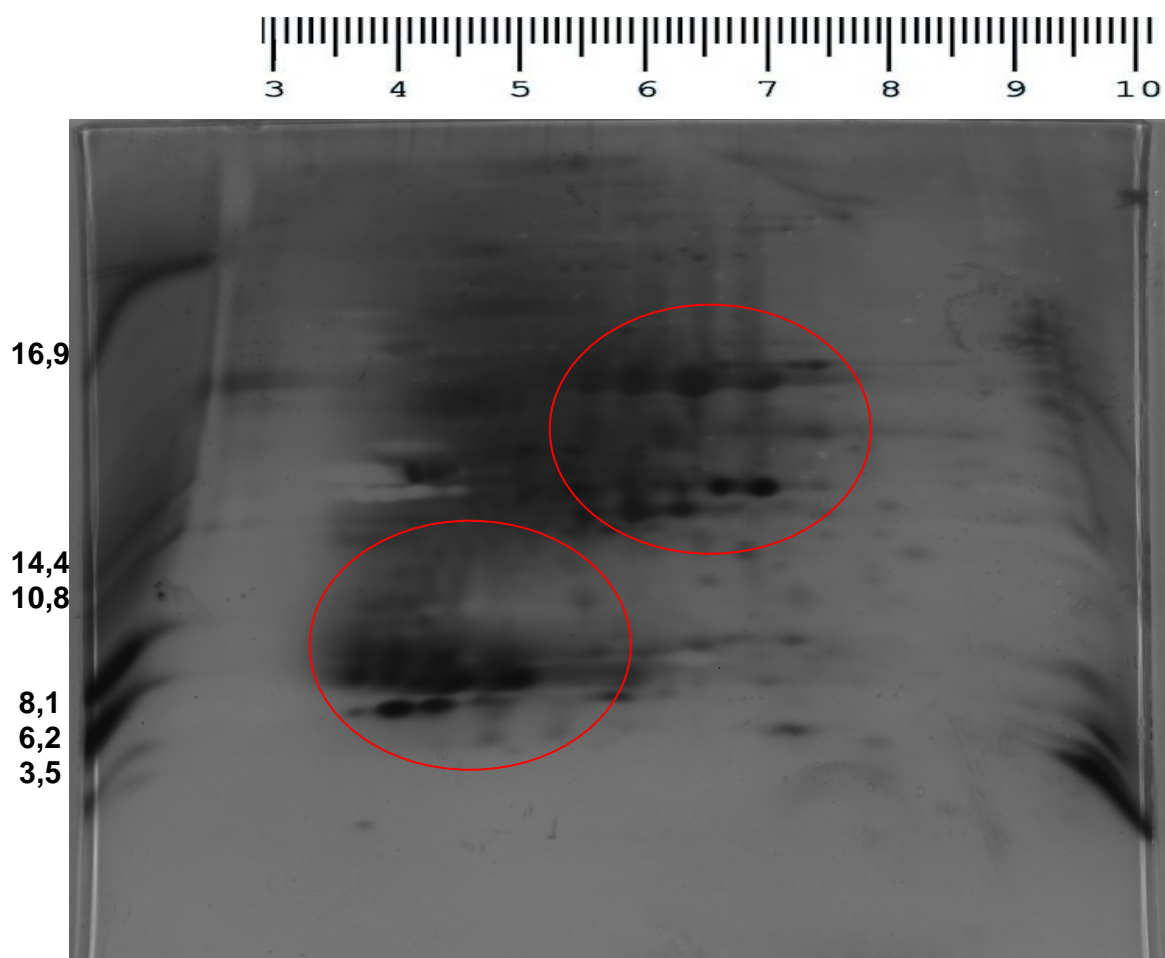


Figura 2 - Perfil eletroforético em gel bi-dimensional SDS-Tricina-PAGE do extrato alcoólico de folhas de *C. annuum* L. O gel foi corrido por 24h.

No perfil eletroforético do extrato ácido de folhas, observaram-se proteínas entre 6 kDa e com pI variando entre 3 a 6,5, proteínas majoritárias entre 3 e 8 kDa e pI variando entre 8 e 9,5 (figura 3).

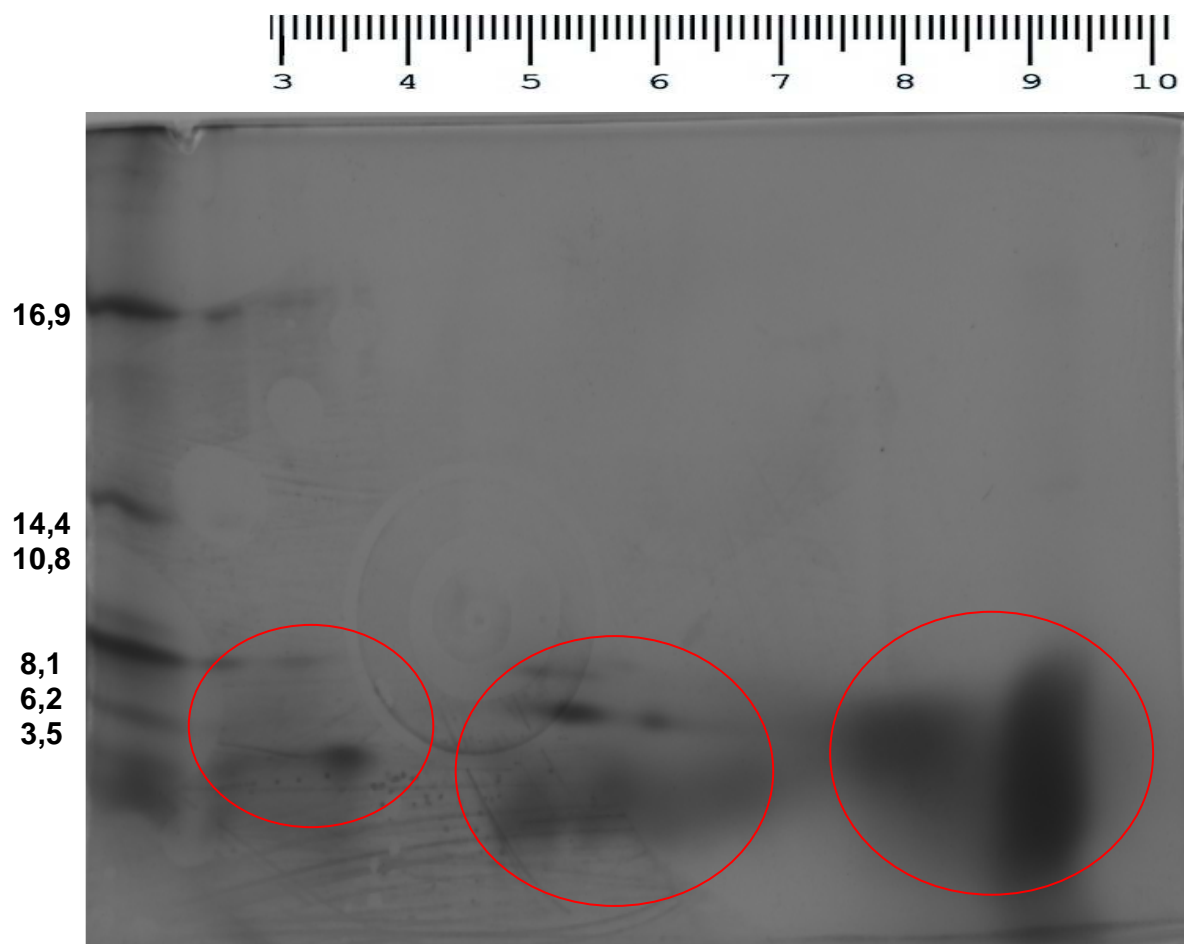


Figura 3 - Perfil eletroforético em gel bi-dimensional SDS-Tricina-PAGE do extrato ácido de folhas raízes de *C. annuum* L. O gel foi corrido por 24h.

No perfil eletroforético do extrato alcoólico de raízes, observaram-se proteínas de massa molecular majoritárias de aproximadamente 8 e 14 kDa , estas proteínas apresentam pI entre 4 á 5 (Figura 4).

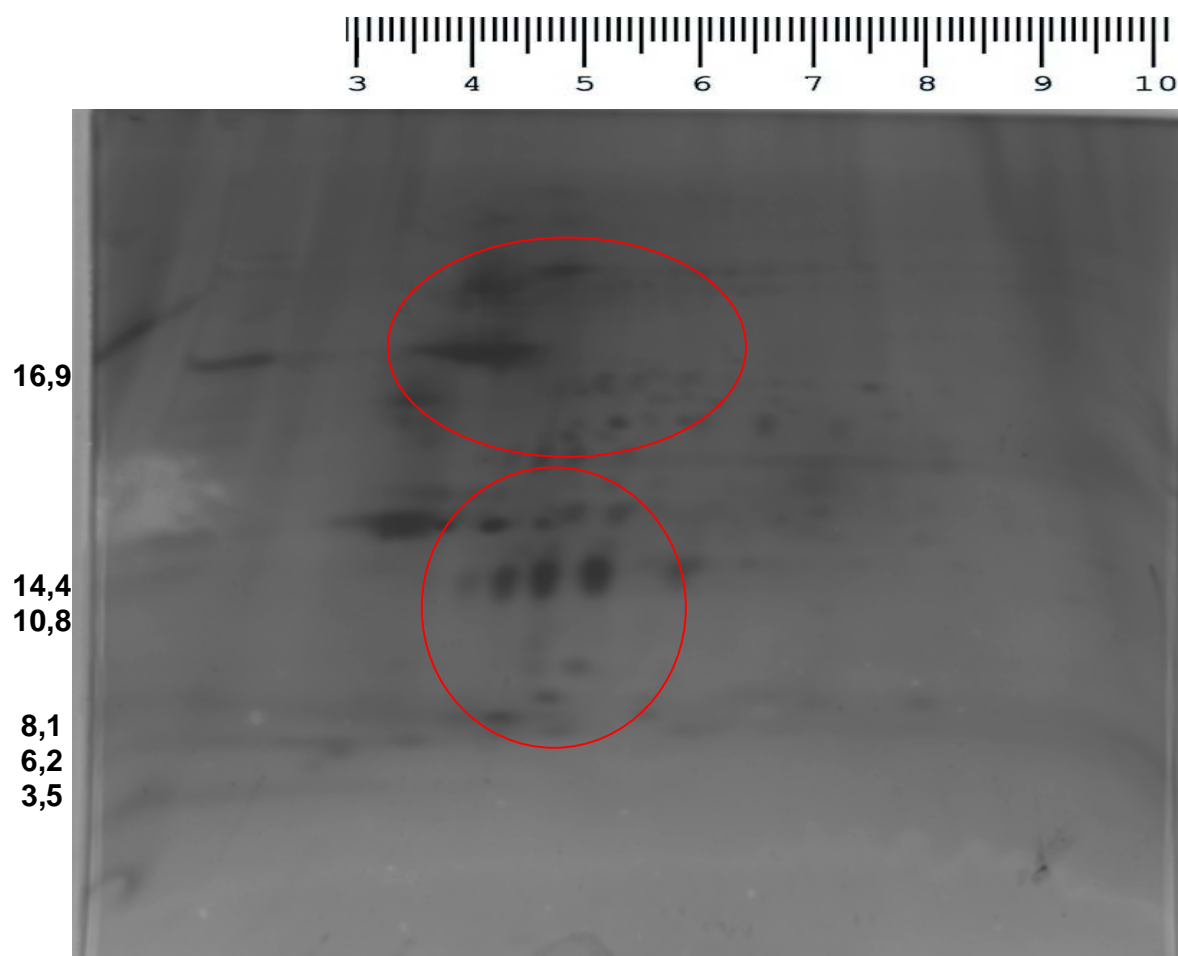


Figura 4 - Perfil eletroforético em gel bi-dimensional SDS-Tricina-PAGE do extrato alcoólica de raízes de *C. annuum* L. O gel foi corrido por 24h.

No perfil eletroforético do extrato alcoólico de raízes, observaram--se proteínas de massa molecular variando entre aproximadamente 8 e 14 kDa e proteínas maiores que 14 kDa . Estas proteínas apresentam pI entre 6 á 9 (Figura 5).

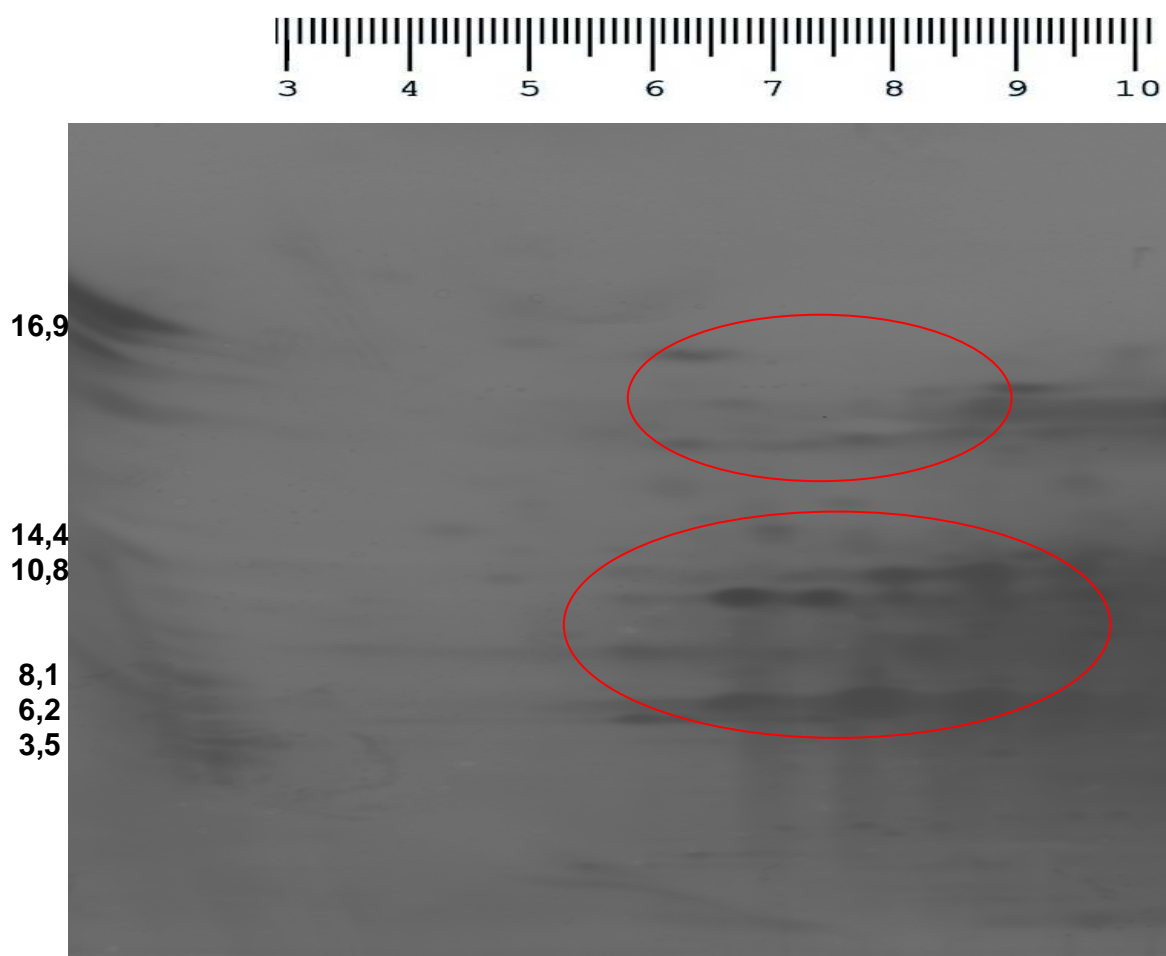


Figura 5 - Perfil eletroforético em gel bi-dimensional SDS-Tricina-PAGE do extrato ácido de raízes de *C. annuum* L. O gel foi corrido por 24h.

5.3 - Isolamento de peptídeos de folhas *C. annuum* L.

Na figura 6A observou-se o perfil cromatográfico da extração alcoólica de folhas de *C. annuum* L. vários picos foram selecionados, sendo os majoritários denominados de frações L1, L2, L3, L4, L5, L6 e L7, com os tempos de retenção de 28,5, 29,3, 45,9, 47,8, 48,9, 51,3, e 53,4 min, respectivamente.

No perfil cromatográfico da extração ácida de folhas de *C. annuum* L., observou-se a presença de diferentes picos, sendo os majoritários denominados frações L1', L2', L3', L4', L5', L6', L7' e L8', com os tempos de retenção de 29,24, 29,8, 30,04, 30,5, 31,6, 35,3, 35,3 e 55,3 min, respectivamente. (Figura 6B).

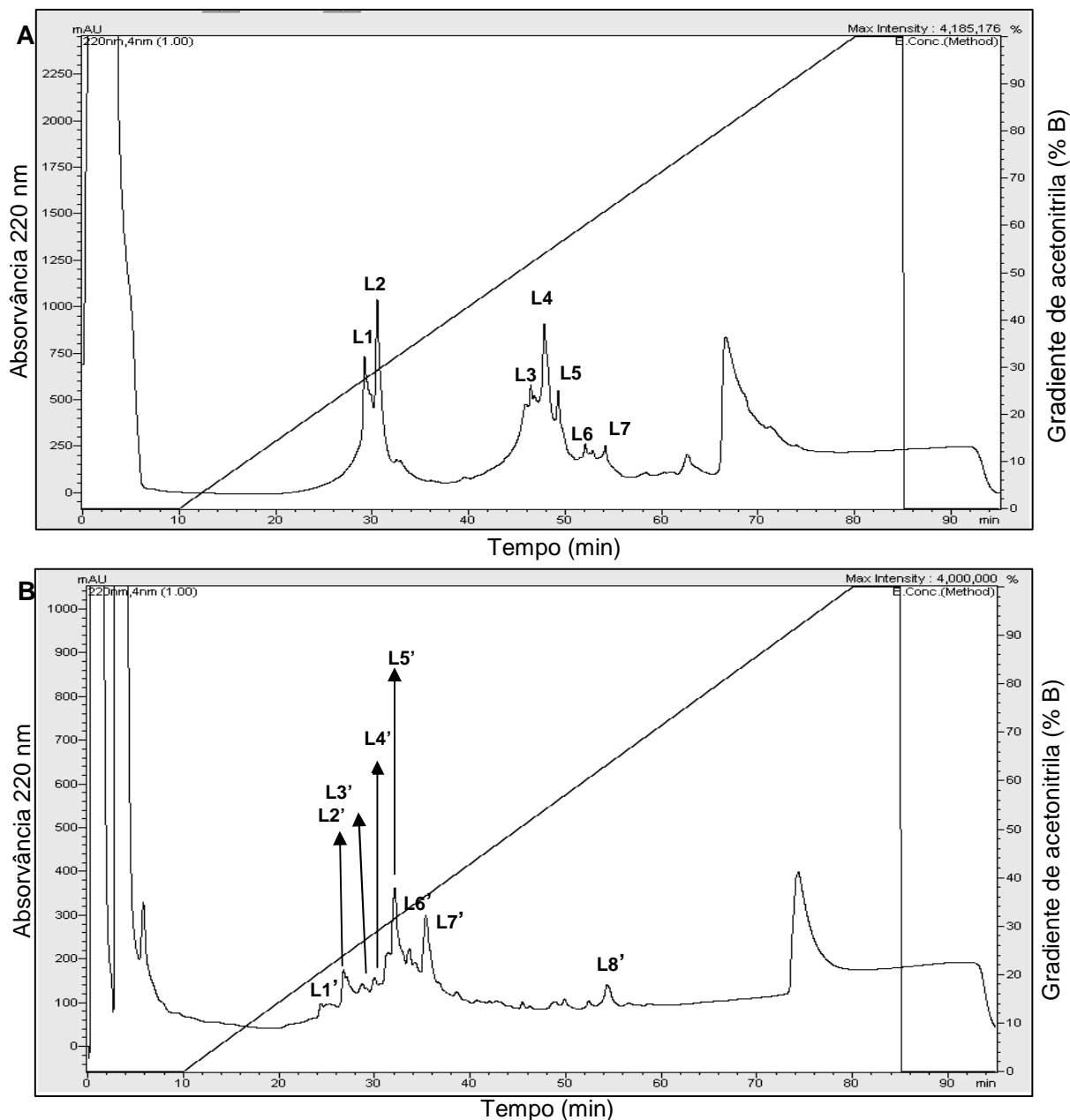


Figura 6 - Perfil cromatográfico dos extratos proteicos provenientes das extrações alcoólica e ácida de folhas de *C. annuum* L. após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna C2/C18 com coluna guarda C8. **A** - Perfil cromatográfico da extração alcoólica. **B** - Perfil cromatográfico da extração ácida. A cromatografia foi realizada com fluxo de 0,5 mL/min, a 33 °C, tendo como eluentes as soluções A (acetonitrila 2% contendo TFA 0,1%) e B (acetonitrila 80% contendo TFA 0,1%). O gradiente de eluição é representado pela linha preta.

5.4 - Eletroforese unidimensional SDS-Tricina-PAGE das frações purificadas do extrato alcoólico e ácido de folhas

No perfil proteico do extrato alcoólico de folhas de *C. annuum* L., não se observou na fração NR, a presença de banda proteica. As frações L1 e L2 apresentam bandas proteicas isoladas, ambas com massa molecular de aproximadamente 7 kDa. As demais frações L3, L4, L5, L6 e L7 apresentam várias bandas majoritárias entre 6 e 14 kDa e bandas superiores a 14 kDa.

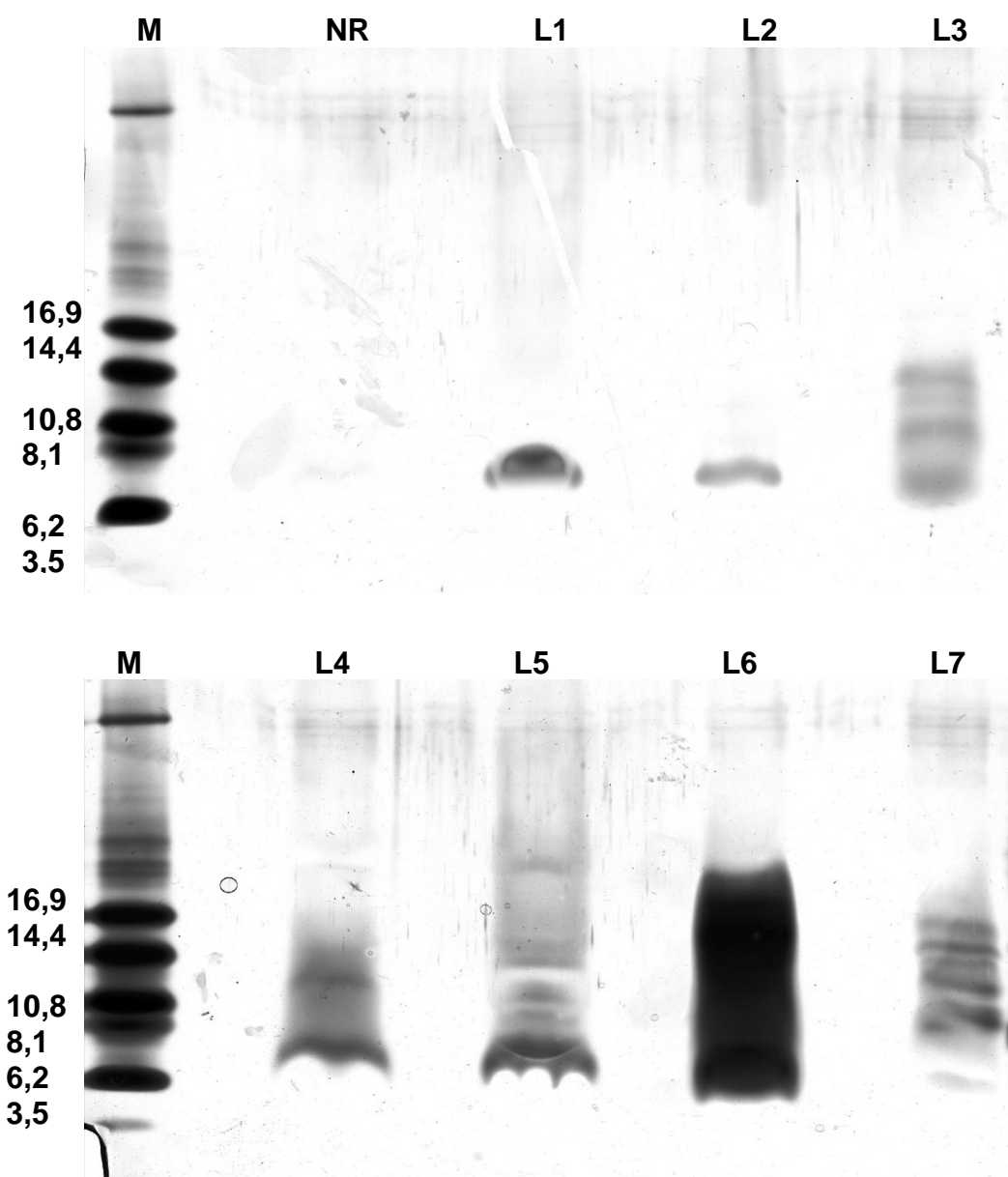


Figura 7 - Perfil eletroforético em gel unidimensional SDS-Tricina-PAGE das frações provenientes do extrato alcoólico de folha de *C. annuum* L., obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. (A) M- marcador de baixo peso molecular (kDa); NR- (fração não retida); L1- (28,5 min); L2- (29,3 min); L3- (45,9 min). (B) L4- (47,8 min); L5- (48,9 min); L6- (51,3 min) e L7- (53,4 min). O gel foi revelado por precipitação com nitrato de prata.

No perfil proteico do extrato ácido de folhas de *C. annuum* L., observou-se que as frações L1' e L2' apresentam bandas isoladas de aproximadamente 6 kDa. Em F3' observou-se uma banda de aproximadamente 6 kDa e uma banda de aproximadamente 7 kDa. E as frações L4', L5', L6', L7' e L8', apresentam bandas isoladas entre 6 e 7 kDa. (Figura 8).

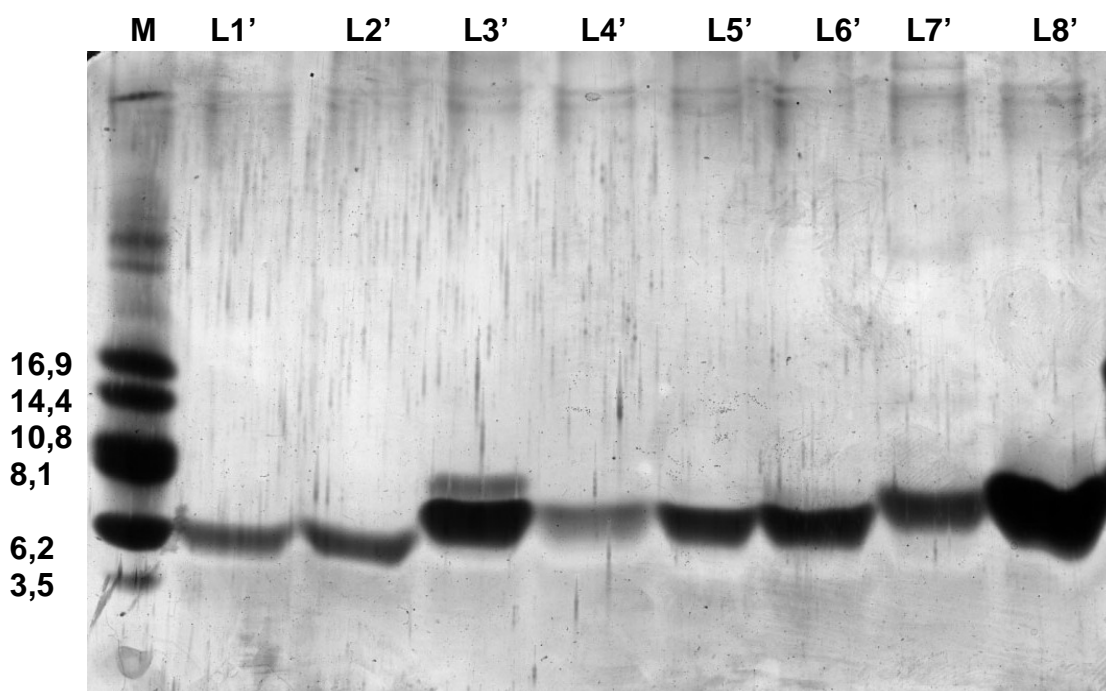


Figura 8 - Perfil eletroforético em gel unidimensional SDS-Tricina-PAGE das frações proveniente do extrato ácido de folhas de *C. annuum* L., obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. **M** - marcador de baixo peso molecular (kDa); **L1'** - (29,24 min); **L2'** - (29,8 min); **L3'** - (30,04 min); **L4'** - (30,5 min); **L5'** - (31,6 min); **L6'** - (35,3 min); **L7'** - (35,3 min) e **L8'** - (55,3 min). O gel foi revelado por precipitação com nitrato de prata.

5.5 - Isolamento de peptídeos de raízes de *C. annuum* L.

No figura 9, observou-se o perfil cromatográfico da extração alcoólica de raízes de *C. annuum* L., as frações coletadas foram denominadas NR1, NR2, R1 e R2, e com os respectivos tempos de retenção de 2,2, 3,3, 54,08 e 61,17 mim. Na figura 9B, observou-se o perfil cromatográfico da extração ácida de raízes de *C. annuum* L., onde os picos coletados foram denominados R1', R2', R3' e R4', com tempos de retenção de 18,2, 28,2, 41,3 e 42,6 mim, respectivamente.

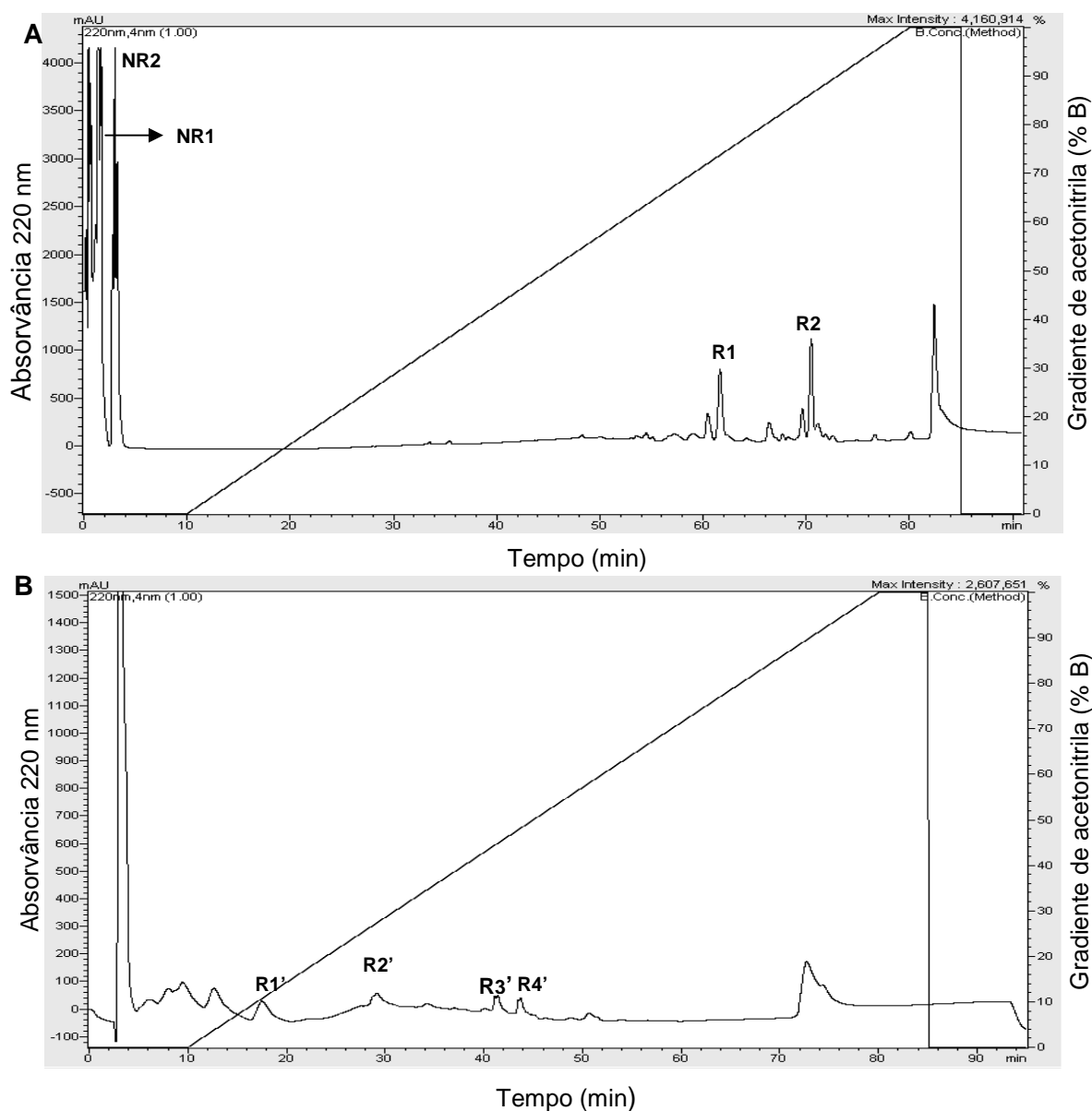


Figura 9 - Perfil cromatográfico dos extratos proteicos provenientes das extrações alcoólica e ácida de raízes de *C. annuum* L. após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna C2/C18 com coluna guarda C8. **A** - Perfil cromatográfico da extração alcoólica. **B** - Perfil cromatográfico da extração ácida. A cromatografia foi realizada com fluxo de 0,5 mL/min, a 33 °C, tendo como eluentes as soluções A (acetoneitrila 2% contendo TFA 0,1%) e B (acetoneitrila 80% contendo TFA 0,1%). O gradiente de eluição é representado pela linha preta.

5.6 - Eletroforese unidimensional SDS-Tricina-PAGE das frações purificadas do extrato alcoólico e ácido de raízes

No perfil proteico do extrato alcoólico de raízes observou-se que a fração R1 apresenta banda proteica de aproximadamente 8 kDa e R2 bandas maiores que 16 kDa. As frações NR1 e NR2 não apresentaram bandas proteicas.

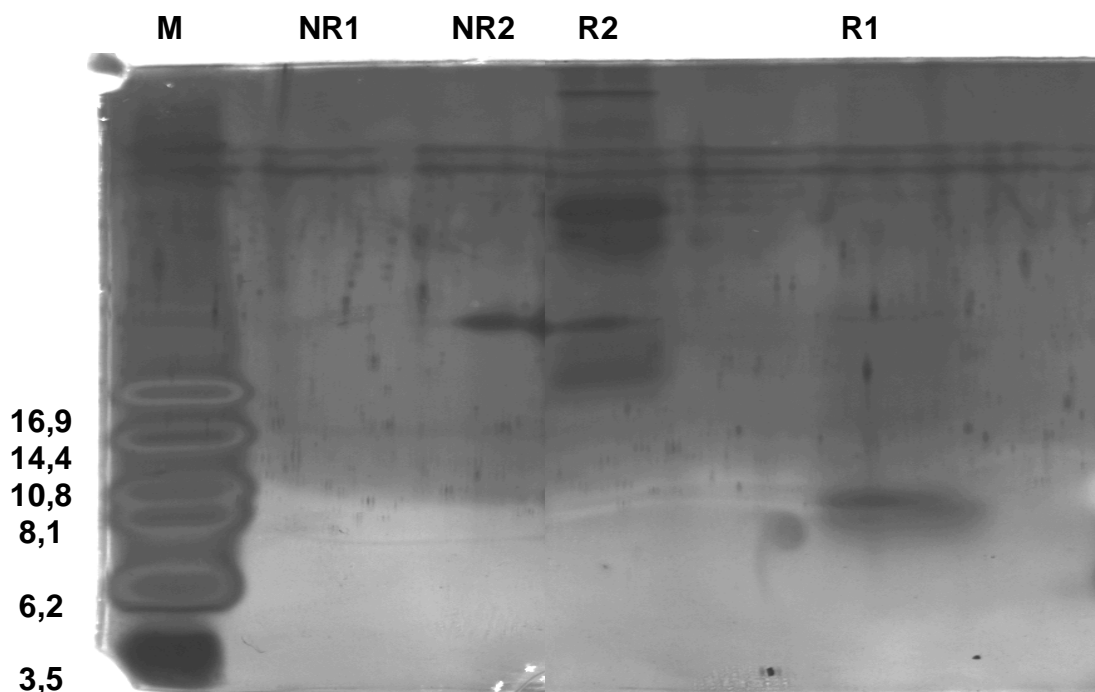


Figura 10 - Perfil eletroforético em gel unidimensional SDS-Tricina-PAGE das frações provenientes do extrato alcoólico de raízes de *C. annuum* L., obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. **M** - marcador de baixo peso molecular (kDa); **NR1**- (fração não retida no tempo de 2,2 min); **NR2** (fração não retida no tempo de 3,4 min); **R1**- (60,8 min); **R2**- (70,6 min). O gel foi revelado por precipitação em nitrato de prata.

No perfil proteico do extrato ácido de raízes de *C. annuum* L. (Figura 11) observou-se que a fração R2' apresenta uma banda com peso molecular de, aproximadamente, 8 kDa. Na fração R3', observou-se uma banda de, aproximadamente, 8 kDa e outra banda de peso molecular superior a 16 kDa. Nas frações R4' e R1', não foi possível observar bandas, constatou-se que estas frações estavam em concentração muito baixas e por este motivo não conseguimos visualizá-las no gel.

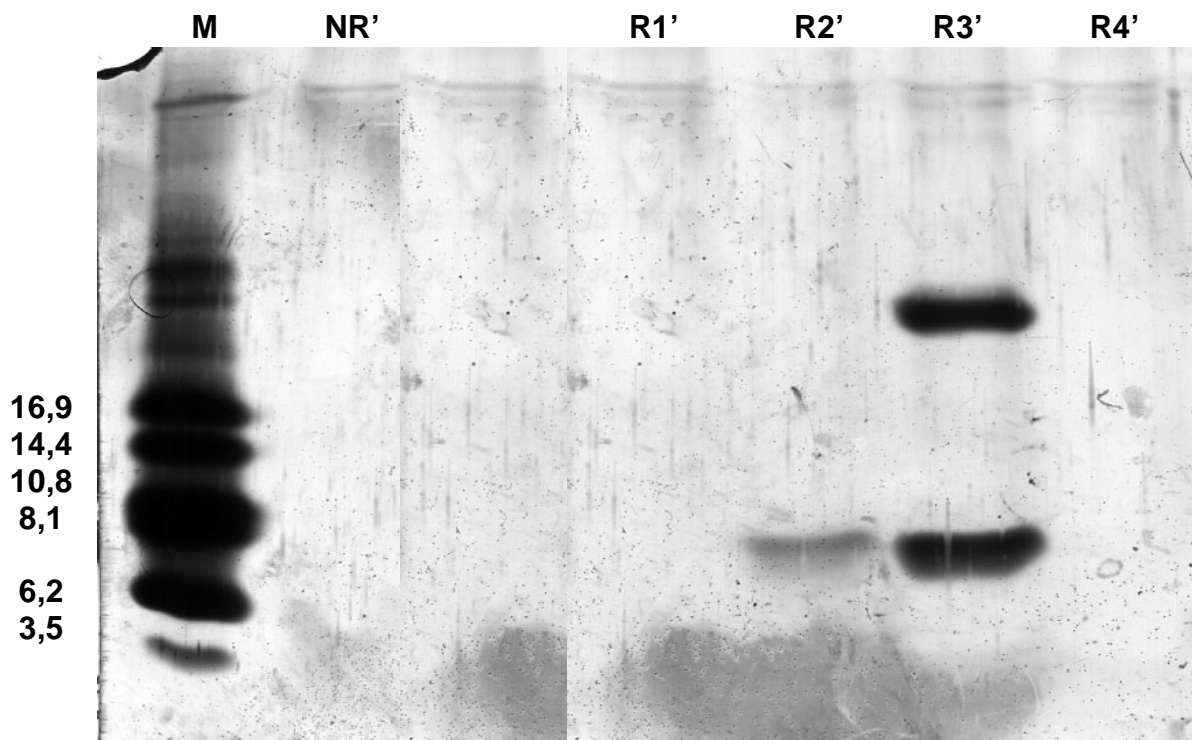


Figura 11 - Perfil eletroforético em gel unidimensional SDS-Tricina-PAGE do extrato ácido de raízes de *C. annuum* L., obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. **M** - marcador de baixo peso molecular (kDa); **NR'** - (fração não retida); **R1'** - (18,2 min); **R2'** - (28,2 min); **R3'** - (41,3 min) e **R4'** - (42,6 min). O gel foi revelado por precipitação com nitrato de prata.

5.7 - Sequenciamento de aminoácidos

As frações utilizadas neste ensaio foram as frações L1', L2', L4' e L8', referentes à extração ácida de folhas, com os tempos de retenção de 29,24, 29,28, 31,6 e 55,3 min, respectivamente. As frações L1 e L2, referentes à extração alcoólica de folhas, com os tempos de retenção de 28,5 e 29,3 min, foram denominadas A5 e A6, respectivamente. A fração R2', referente à extração ácida de raízes no tempo de retenção de 28,2, foi denominada A7 e a fração R2, referente à extração alcoólica de raízes no tempo de retenção de 61,17 min, foi denominada A8.

As frações L1', L2', L4', L8', L1, L2, R2' e R2 foram enviadas para o sequenciamento N-terminal, onde foi empregada a metodologia desenvolvida por Edman (1950).

A sequência apresenta 26 resíduos de aminoácidos e 85% de similaridade com um trecho de uma proteína de *C. annuum* L., relacionada à defesa de plantas,

denominada proteína U-Lim de, aproximadamente, 14,5 kDa e 5,8 de pI (Figura 12).

```

A1      -----HYYGGGGYKHGGYHKG-CY----- 18
U-Lim   MISSEVVARELSETPNTEKEVDVDHYYGGGGYKGGYHKGCCYHKCKYHKCCTYEEYMAL 60

A1      -----YHKCYHK----- 26
U-Lim   GIATESETPNLTETPNSEKEVDVDHYYGGGGYKGGYHKGCCYHKCKYHKCCTYEEYMALG 120

A1      -----
U-Lim   IATESEPQN 129

```

Figura 12 - Alinhamento de sequência da Fração L1' e da proteína U-Lim de *C. annuum* L. As cisteínas pareadas estão marcadas de amarelo.

5.8 - Efeito dos extratos de folhas e raízes de *C. annuum* L. sobre a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos em meio líquido

Na figura 13, observa-se em A que os extratos Ext 1, Ext 2, Ext 3 e Ext 4, foram capazes de inibir o crescimento do fungo *C. lindemuthianum* na concentração testada de 1000 µg/mL. Em B, observa-se que apenas Ext 3 foi capaz de inibir significativamente o crescimento do fungo *C. gloeosporioides* na concentração de 1000 µg/mL. Os demais extratos testados não foram capazes de inibir significativamente o crescimento do fungo na mesma concentração testada. Assim, a partir dos resultados obtidos, seguiu-se com os ensaios de inibição, agora com diferentes concentrações dos diferentes extratos para o fungo *C. lindemuthianum* e utilizou-se apenas o Ext 3 para o fungo *C. gloeosporioides*. Na figura 14, observa-se o ensaio de inibição de crescimento do fungo *C. lindemuthianum*, visualiza-se que os extratos foram capazes de inibir o crescimento do fungo.

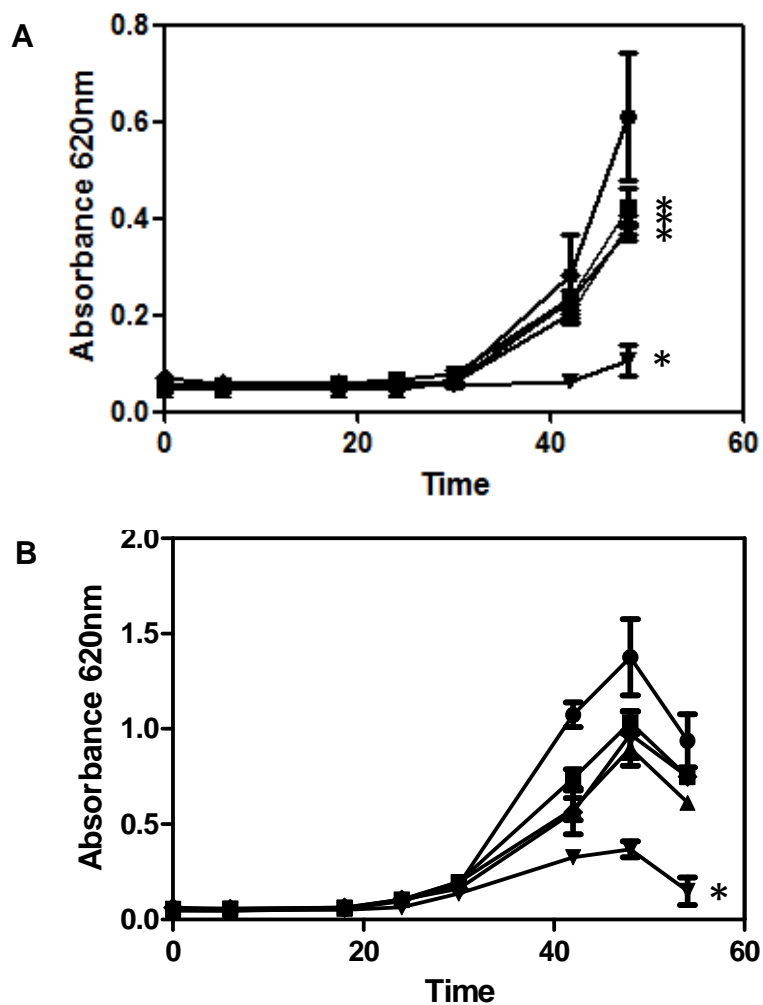


Figura 13 - Efeito dos extratos proteico alcoólico e ácido de folhas e raízes de *C. annuum* L. (1000 µg/mL) sobre o crescimento dos fungos (A) *C. gloeosporioides* e (B) *lindemuthianum*. O crescimento dos fungos foi observado até 54 h. (-●-) Controle; (-■-) Ext1; (-▲-) Ext2; (-▼-) Ext3; (-◆-) Ext4. Os valores são médias (± DP) de triplicados. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle nas 48 h de experimento

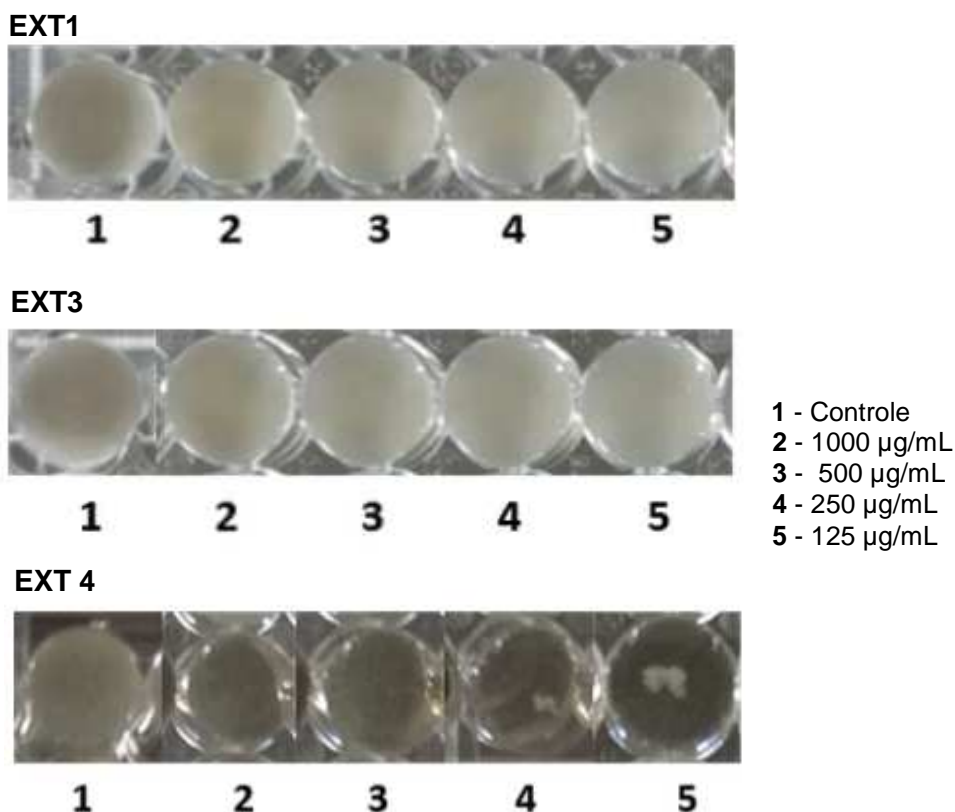


Figura 14 - Fotografias do ensaio do extrato proteico de *C. annuum* L. (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo *C. lindemuthianum*. Ext1 (extrato alcoólico de folhas), Ext3 (extrato alcoólico de raízes) e Ext 4 (extrato ácido de raízes) sobre o crescimento dos fungos O crescimento do fungo foi observado até 48 h.

Na figura 15, observa-se a curva de crescimento do fungo *C. lindemuthianum*, na presença dos diferentes extratos em diferentes concentrações. Para o Ext.1, as concentrações utilizadas foram de 125, 500, 250 e 1000 µg/mL, a concentração de 125 µg/mL inibiu 31%, a concentração de 250 µg/mL inibiu 41%, a concentração de 500 µg/mL inibiu 44% e a concentração de 1000 µg/mL foi capaz de inibir 44% do crescimento do fungo *C. lindemuthianum*.

Para o Ext. 2, também foram utilizadas as mesmas concentrações, a concentração de 125 µg/mL inibiu 36%, a concentração de 250 µg/mL inibiu 26%, a concentração de 500 µg/mL inibiu 27% e a concentração de 1000 µg/mL foi capaz de inibir 23% do crescimento do fungo *C. lindemuthianum*.

Nos testes com o Ext. 3, as concentrações utilizadas foram as de 62,5, 125, 500, 250 e 1000 µg/mL, a concentração de 62,5 µg/mL inibiu 25%, a concentração de 125 µg/mL inibiu 52%, a concentração de 250 µg/mL inibiu 59%,

a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 27% e a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de inibir 69% do crescimento do fungo *C. lindemuthianum*.

Para o Ext. 4, as concentrações utilizadas foram de 15,6, 31,5, 62,5, 125, 500, 250 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, a concentração de 15,6 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 16%, a concentração de 31,5 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 28%, a de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 24%, a concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 22%, a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 89%, a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 96% e a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de inibir 100% do crescimento do fungo *C. lindemuthianum*.

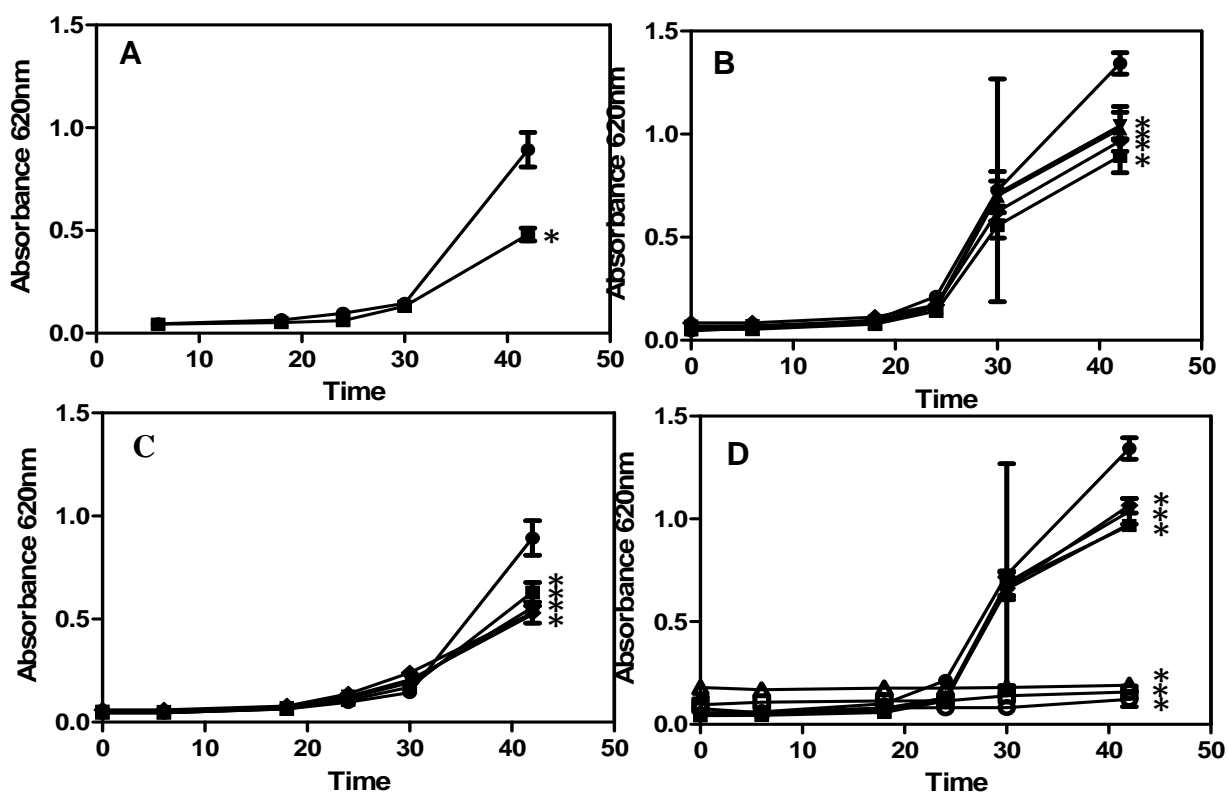


Figura 15 - Curva de crescimento do fungo *C. lindemuthianum*. (A) - Extrato alcoólico de folhas; (●) Controle; (■) 125 $\mu\text{g/mL}$ (▲) 250 $\mu\text{g/mL}$ (▼) 500 $\mu\text{g/mL}$. (B) - Extrato ácido de folhas; (●) Controle; (■) 125 $\mu\text{g/mL}$; (▲) 250 $\mu\text{g/mL}$ (▼) 500 $\mu\text{g/mL}$. (C) - Extrato alcoólico raízes; (●) Control; (■) 125 $\mu\text{g/mL}$; (▲) 250 $\mu\text{g/mL}$ (▼) 500 $\mu\text{g/mL}$. (D) - Extrato ácido raízes; (●) Control; (■) 15,6 $\mu\text{g/mL}$; (▲) 31,5 $\mu\text{g/mL}$; (▼) 62,5 $\mu\text{g/mL}$; (◆) 125 $\mu\text{g/mL}$; (○) 250 $\mu\text{g/mL}$; (□) 500 $\mu\text{g/mL}$. Os asteriscos indicam diferenças significativas (P < 0,05) entre o tratamento experimental e controle nas 48 h de experimento

Na figura 16, observa-se a curva de crescimento do fungo *C. gloeosporioides* na presença do Ext 3, para este teste foram utilizadas as concentrações de 62,5, 125, 500, 250 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ do respectivo extrato. O fluconazol (128 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado como controle positivo, um antifúngico já utilizado convencionalmente na área médica. Todas as concentrações utilizadas neste ensaio foram capazes de inibir o crescimento do fungo *C. gloeosporioides*. A concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 32%, a concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 38%, a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 52%, a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ inibiu 73% e a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de inibir 100% e o fluconazol foi capaz de inibir 100% do crescimento do fungo *C. gloeosporioides*.

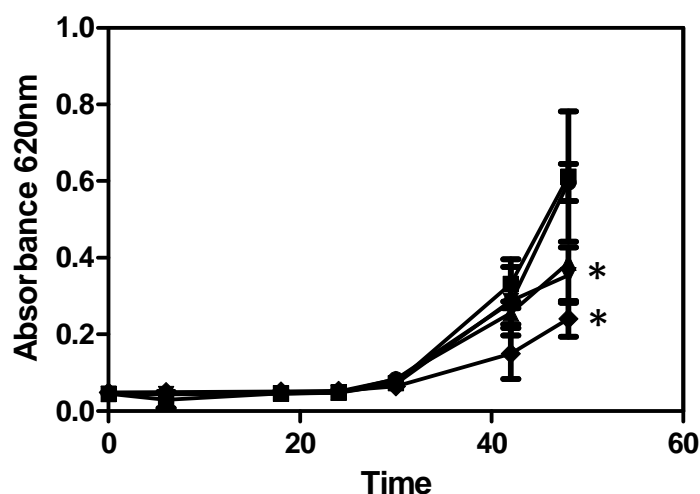


Figura 16 - Curva de crescimento do fungo *C. gloeosporioides*. Extrato alcoólico de raízes. (-●-) Controle; (-■-) 62.5 $\mu\text{g/mL}$; (-▲-) 125 $\mu\text{g/mL}$ (-▼-) 250 $\mu\text{g/mL}$ (-◆-) 500 $\mu\text{g/mL}$. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle nas 48 h de experimento.

5.9 - Efeito das frações purificadas de folhas e raízes de *C. annuum* L. sobre a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos em meio líquido

Para o fungo *C. lindemuthianum*, observou-se que A1 foi capaz de inibir aproximadamente 6% e que a fração A2 foi capaz de inibir aproximadamente 19% do seu crescimento. Já as frações A3, A4, A5 e A7 não foram capazes de inibir o

crescimento deste fungo. A6 inibiu, aproximadamente, 5%, e a fração A8 inibiu, aproximadamente, 25% do seu crescimento do fungo (Figura 17).

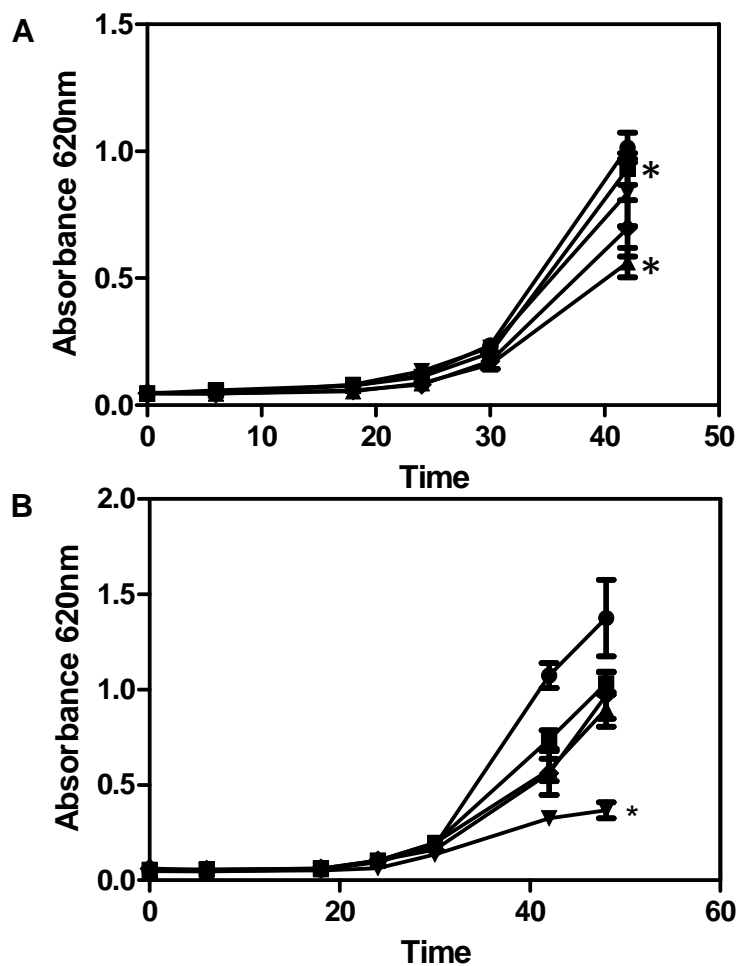


Figura 17 - Curva de crescimento do fungo *C. lindemuthianum* na presença de 250 µg/mL das frações **(A)** (-●-) Controle; (-■-) L1'; (-▲-) L2'; (-▼-) L4'; (-◆-) L8' e (-◇-) R2. **(B)** (-●-) Controle; (-■-) L1; (-▲-) L2; (-▼-) R2'; (-◇-) R2. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle nas 48 h de experimento.

5.10 - Efeito das frações purificadas de folhas e raízes de *C. annuum* L., sobre a permeabilização de membranas de fungos fitopatogênicos

No ensaio de permeabilização de membranas de fungos fitopatogênicos (Figuras 18, 19, 20 e 21), observou-se o efeito das frações L1', L2', L4', L8', L1, L2, R2' e R2 sobre o fungo *C. lindemuthianum*. Observou-se, também, que a maioria das frações na concentração testada não foi capaz de permeabilizar a membrana do fungo quando comparado ao controle. A fluorescência observada pode ser comparada ao *background* observado para o controle. Apenas as frações L2', L1 e L2 parecem mostrar uma maior fluorescência quando comparadas ao controle. Assim, constatou-se que estes peptídeos na concentração testada não apresentam a propriedade de permeabilização sobre as membranas destes fungos, podendo agir por outros mecanismos de ação.

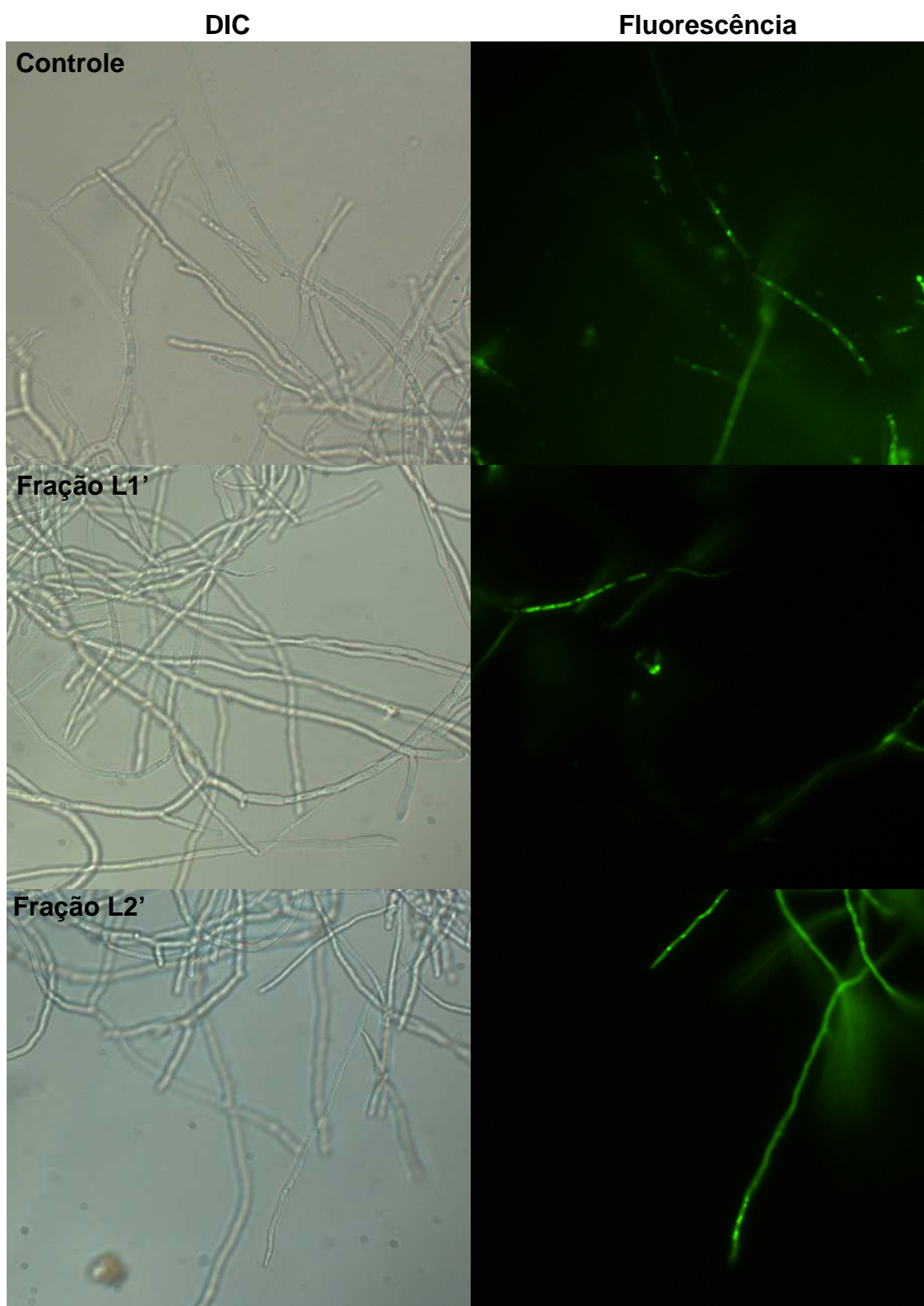


Figura 18 - Microscopia de campo claro e fluorescência do fungo *C. lindemuthianum* na presença de 250 $\mu\text{g/mL}$ das frações L1' e L2' e do corante *Sytox green*. Aumento: 200x.

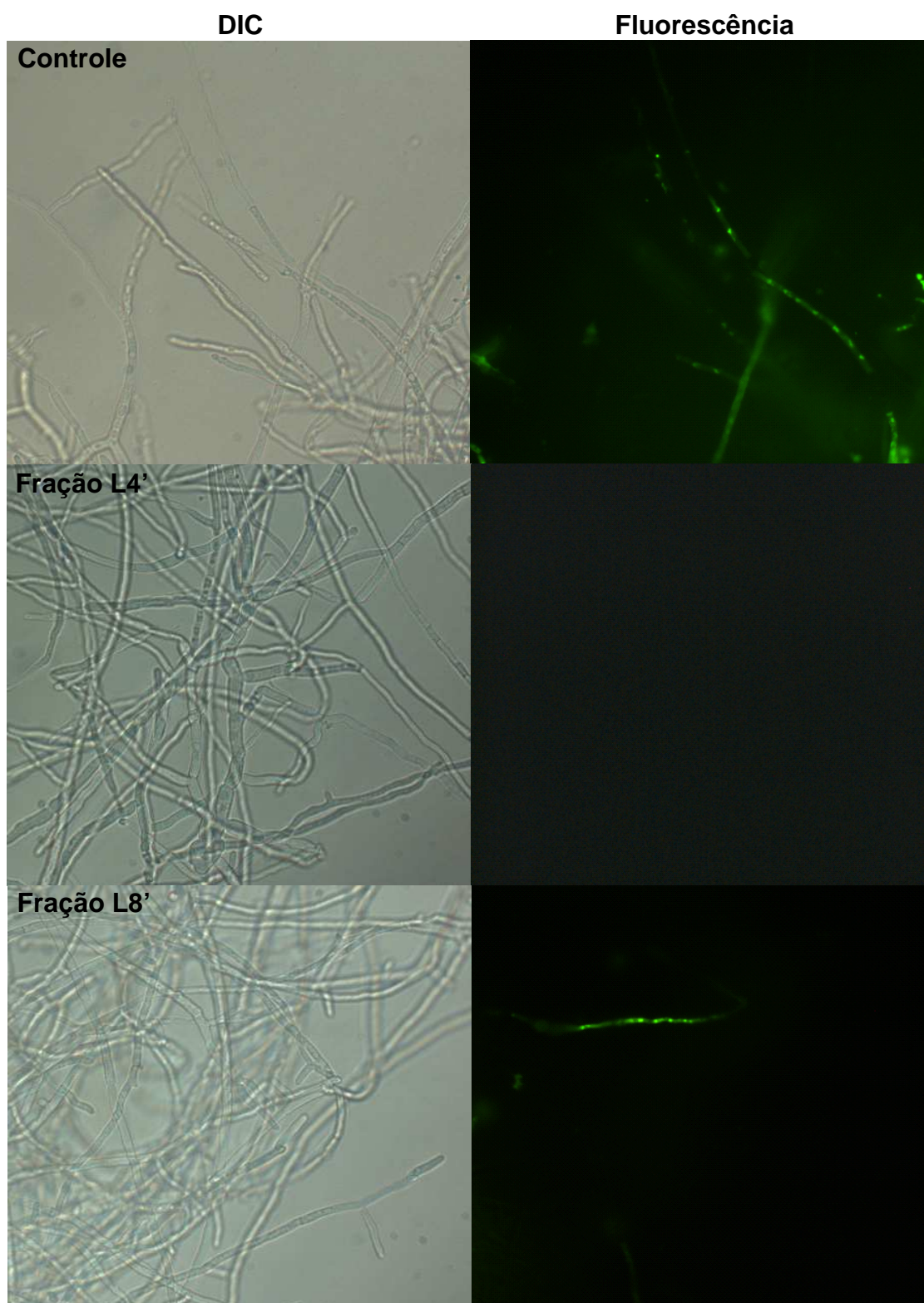


Figura 19- Microscopia de campo claro e fluorescência do fungo *C. lindemuthianum* na presença de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das frações L4' e L8' e do corante Sytox green. Aumento: 200x.

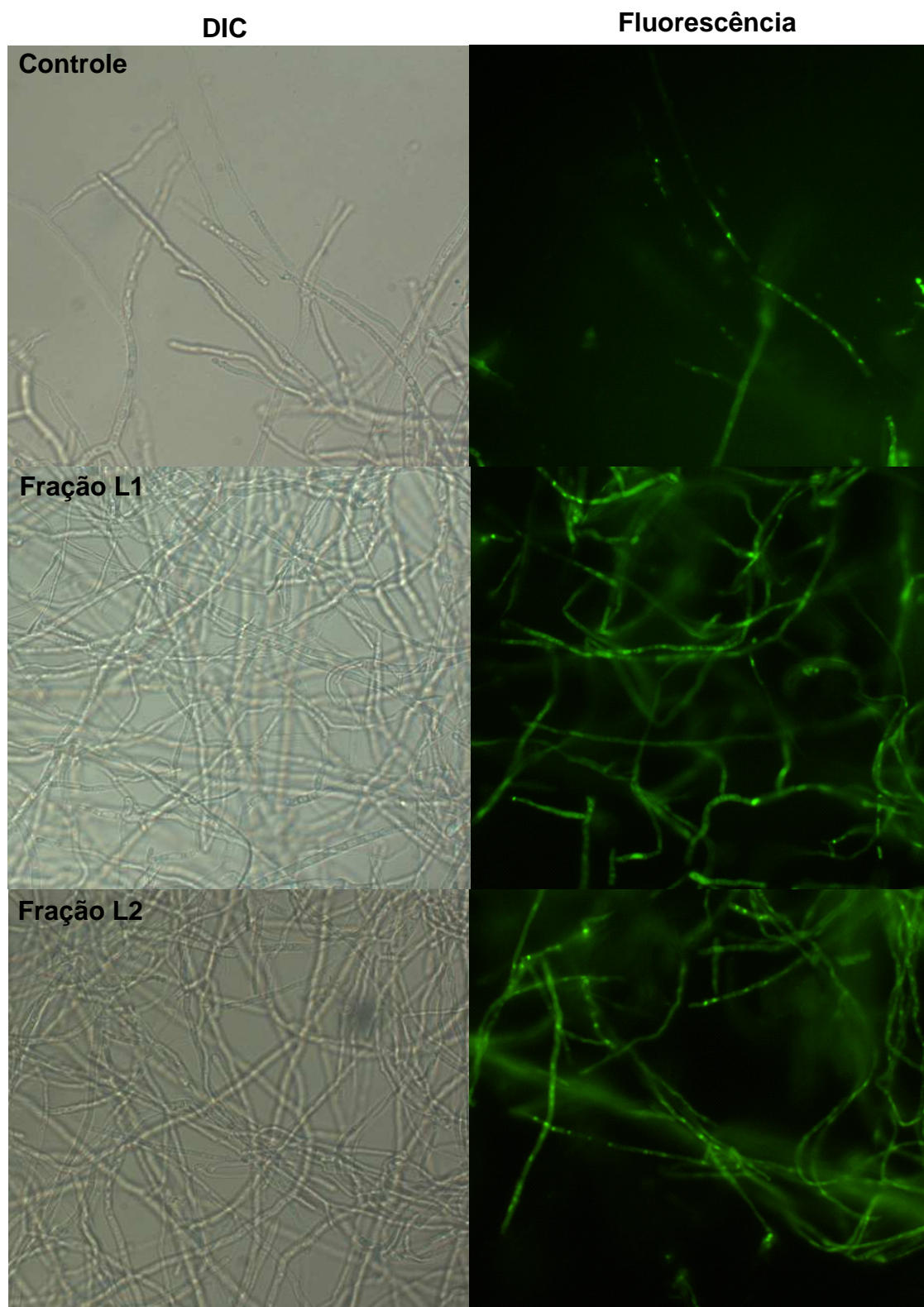


Figura 20 - Microscopia de campo claro e fluorescência do fungo *C. lindemuthianum* na presença de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das frações L1 e L2, e do corante Sytox green. Aumento: 200x.

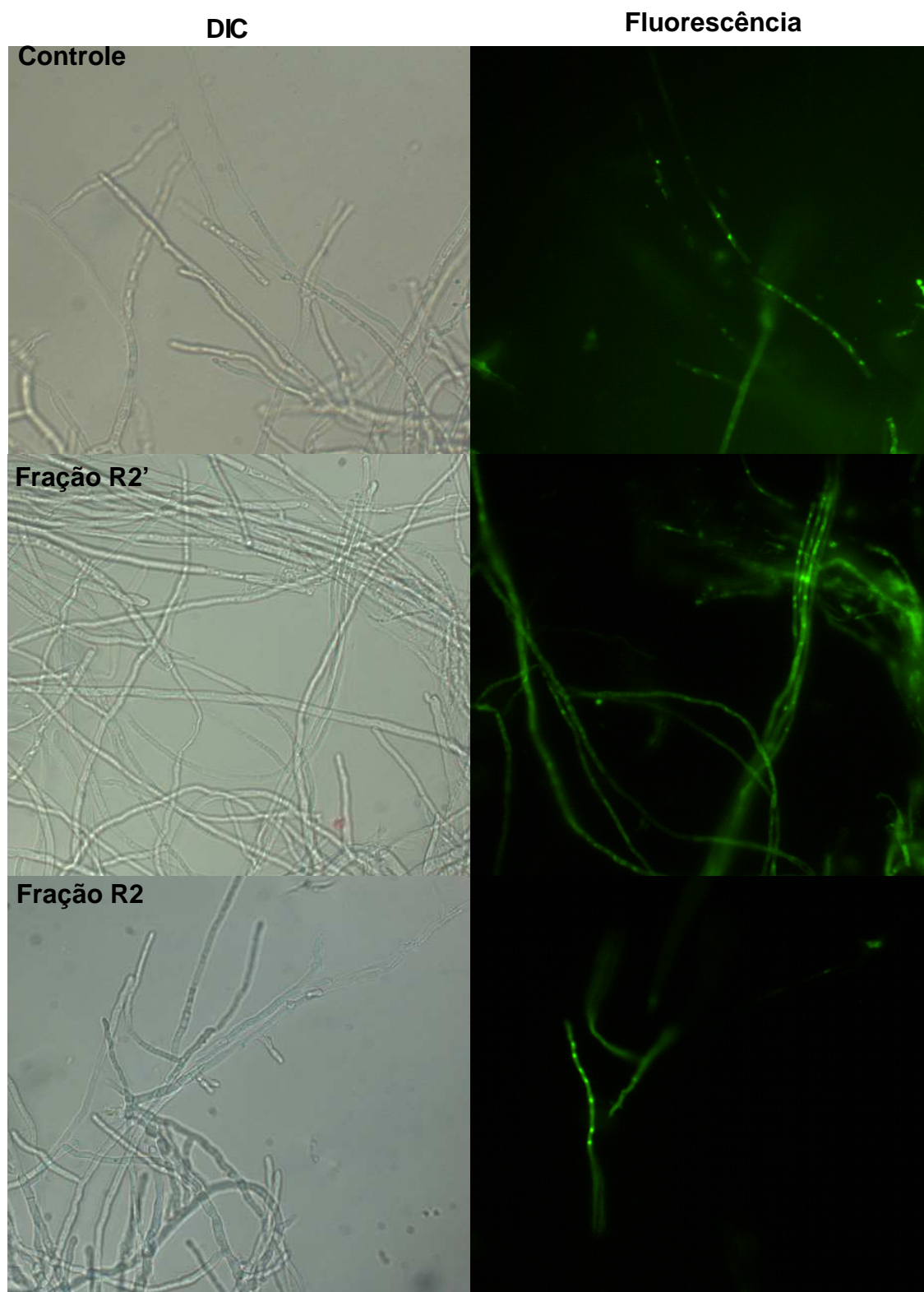


Figura 21 - Microscopia de campo claro e fluorescência do fungo *C. lindemuthianum* na presença de 250 µg/mL das frações R2' e R2 e do corante Sytox green. Aumento: 200x.

5. 11 - Antibiograma

Avaliou-se o efeito dos extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L. sobre o crescimento da bactéria *Xanthomonas euvesicatoria*, mediu-se a formação de halos de inibição no período de 24 e 48h (Figura 22). Observou-se que no período de 24h o extrato alcoólico de folhas (Ext 1) não foi capaz de formar halo de inibição de crescimento em nenhuma das concentrações testadas. No teste com extrato ácido de folhas (Ext 2), observou-se a formação de halos de inibição de crescimento, com 40 µg/mL observou-se um halo de 0,46 mm de diâmetro, com 80 µg/mL um halo de 1,22 mm de diâmetro, com 160 µg/mL um halo de 0,32 mm de diâmetro e com 320 µg/mL um halo de 0,89 mm de diâmetro. O extrato alcoólico de raízes (Ext 3) não apresentou formação de halo de inibição de crescimento. No extrato ácido de raízes (Ext 4), observou-se a formação de halos de inibição de crescimento, com 40 µg/mL um halo de 0,61 mm de diâmetro, com 80 µg/mL não foi possível observar formação de halo de inibição, com 160 µg/mL não foi possível observar a formação de halo de inibição de crescimento e com 320 µg/mL foi possível observar um halo de 4,91mm de diâmetro.

No período de 48h, o extrato alcoólico de folhas (Ext 1) não apresentou halo de inibição de crescimento em nenhuma das concentrações testadas. No extrato ácido de folhas (Ext 2), observou-se a formação de halos de inibição de crescimento, com 40 µg/mL um halo de 0,41 mm de diâmetro, com 80 µg/mL um halo de 1,48 mm de diâmetro, com 160 µg/mL um halo de 0,40 mm de diâmetro e com 320 µg/mL um halo de 0,40 mm de diâmetro. O extrato alcoólico de raízes (Ext 3) não apresentou formação de halo de inibição de crescimento. No extrato ácido de raízes (Ext 4), observou-se a formação de dois halos de inibição de crescimento apenas com 320 µg/mL, um denominado A com 2,42 mm e outro denominado B com 4,37 mm de diâmetro (Figura 23).

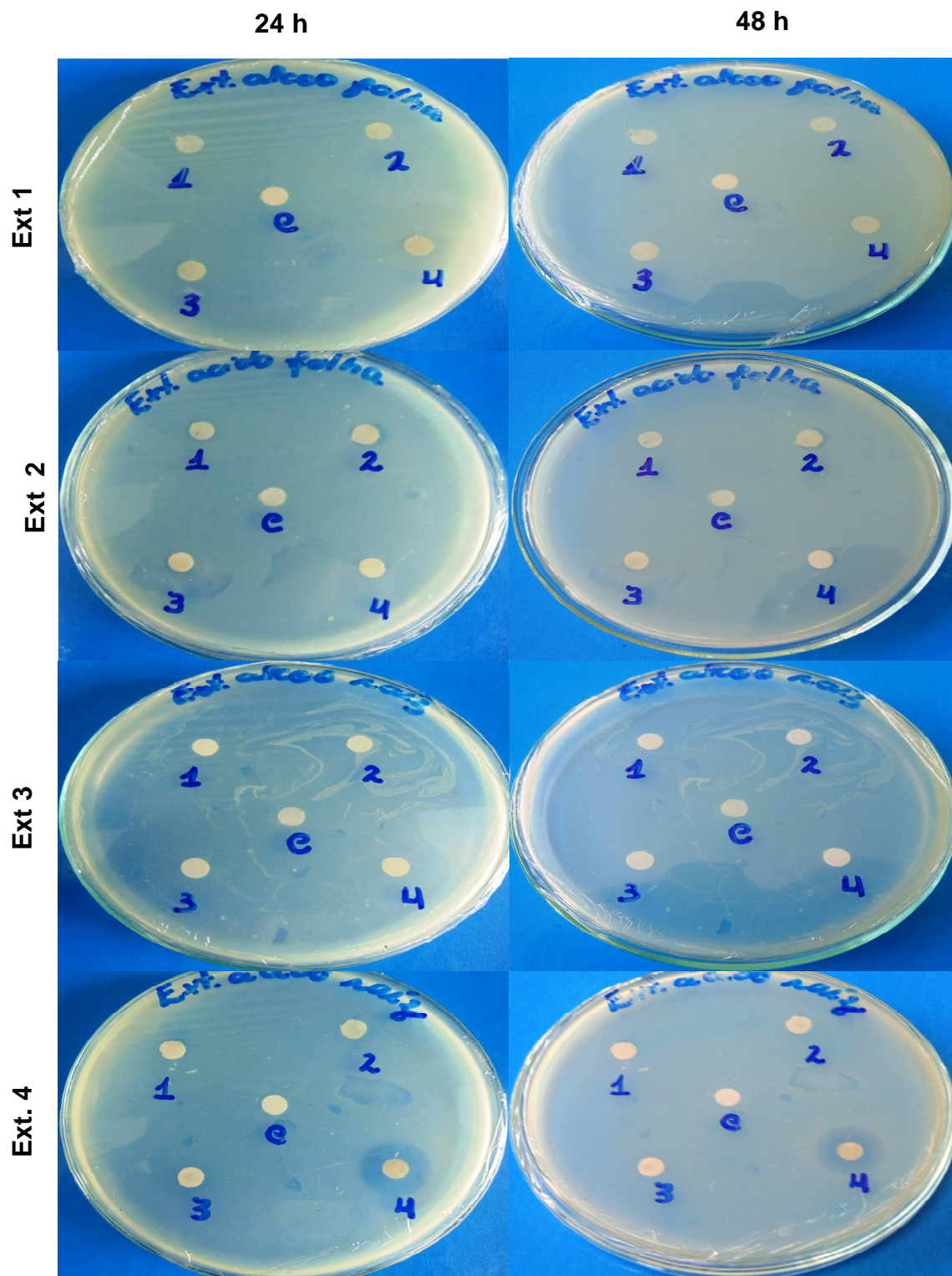


Figura 22- Antibiograma da bactéria *Xanthomonas euvesicatoria*, na presença dos extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L.. **Ext 1** - Extrato alcoólico folha; **Ext 2** - Extrato ácido folha; **Ext 3** - Extrato alcoólico raiz e **Ext 4** - Extrato ácido de raízes. 1- 40 µg/mL; 2 - 80 µg/mL; 3 - 160 µg/mL; 4 - 320 µg/mL dos respectivos extratos e **C** - controle. As placas foram avaliadas no período de 24 e 48h.

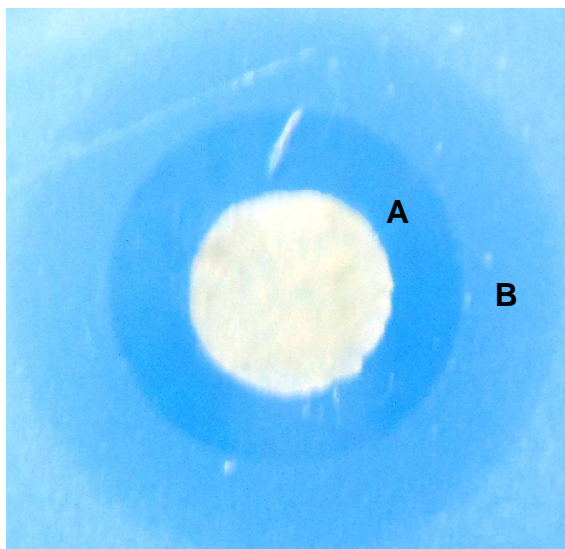


Figura 23 - Antibiograma da bactéria *Xanthomonas euvesicatoria*, na presença de 320 µg/mL do extrato ácido de raízes de *C. annuum* L. A placa foi avaliada no período de 48h. Em (A) halo com 2,42 mm de diâmetro e, em (B) halo de 4,37 mm de diâmetro.

5.12 - Ensaio de inibição da tripsina

Avaliou-se o efeito dos extratos alcoólico e ácido de folhas de *C. annuum* L. sobre a atividade da enzima tripsina. Observou-se que a extração alcoólica de folhas na concentração de 75 µg/mL foi capaz de inibir 35%, a concentração de 150 µg/mL foi capaz de inibir 76%, a concentração de 300 µg/mL foi capaz de inibir 94% e a concentração de 600 µg/mL foi capaz de inibir, aproximadamente, 95% da inibição da enzima (Figura 24A). Na figura 24B, a extração ácida de folhas na concentração de 75 µg/mL foi capaz de inibir 56%, a concentração de 150 µg/mL foi capaz de inibir 93%, a concentração de 300 µg/mL foi capaz de inibir 94% e a concentração de 600 µg/mL foi capaz de inibir, aproximadamente, 98% da atividade enzimática.

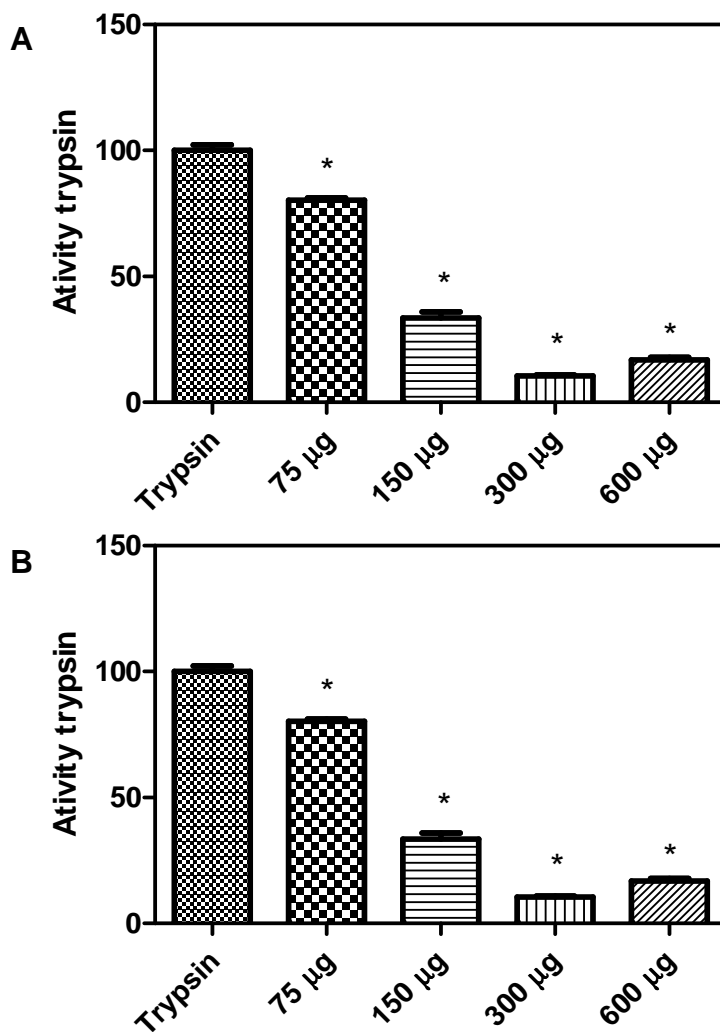


Figura 24 - Efeito do extrato alcoólico e ácido de folhas de *C. annuum* L. sobre a atividade da tripsina. (A) Extrato alcoólico de folhas e (B) Extratos ácido de folhas.

5. 13 - Ensaio de inibição da α -amilase salivar humana

A atividade inibitória enzimática foi realizada com o extrato alcoólico e ácido de folhas de *C. annuum* L.. A extração alcoólica de folhas, nas concentrações testadas, não foi capaz de inibir a atividade da enzima. (Figura 25A). Em nossos resultados, apenas o extrato ácido de folhas mostrou especificidade para α -amilase observou-se que todas as concentrações testadas foram capazes de inibir 100% da atividade da enzima (Figura 25B).

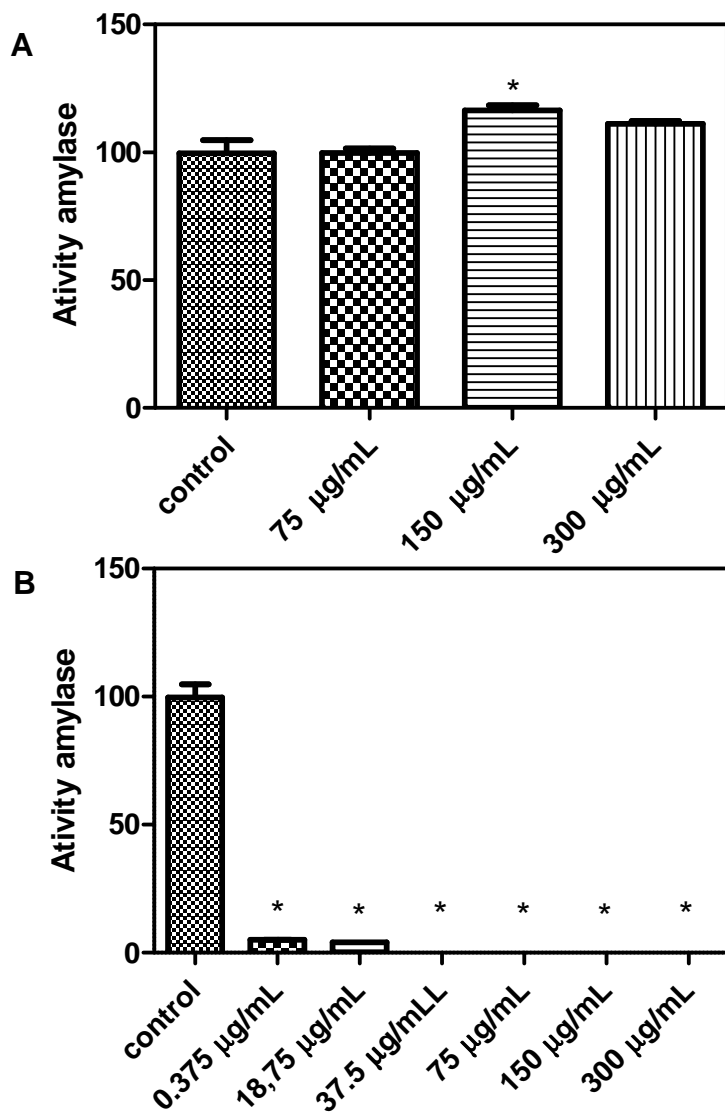


Figura 25 - Efeito do extrato alcoólico e ácido de folhas de *C. annuum* L. sobre a atividade da α -amilase salivar humana. **(A)** Extrato alcoólico de folhas e **(B)** Extratos ácido de folhas.

6. DISCUSSÃO

Diferentes famílias de AMPs foram identificadas e caracterizadas em vários tipos de organismos, especialmente nas plantas. Os AMPs fazem parte do sistema de defesa inato e participam da defesa contra uma gama de microrganismos invasores. Em plantas já foram identificadas e purificadas várias proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana. Os AMPs mais descritos na literatura são as tioninas, defensinas e LTPs, estes, assim como as outras famílias de AMPs, já foram descritos em várias espécies de plantas, e já foram vistos atuando simultaneamente em uma mesma planta e em diferentes órgãos (Terras et al., 1993; Mosolov e Valueva, 2005; Castro e Fonte 2005; Egorov et al., 2005;).

O presente trabalho buscou identificar e caracterizar AMPs em folhas e raízes de *Capsicum annuum* L. onde, ainda estuda-se a ação dos extratos proteicos e das frações purificadas de folhas e raízes de *C. annuum* L. sobre o crescimento dos fungos fitopatogênicos *C. lindemuthianum* e *C. gloeosporioides* e, sobre a bactéria *Xantomonas euvesicatoria*. A ação desses extratos sobre as enzimas tripsina e α -amilase salivar humana também foi avaliada.

Iniciamos o trabalho com a extração proteica para qual foram utilizadas duas metodologias: extração alcoólica e extração ácida. Estas duas extrações foram escolhidas objetivando uma comparação para melhor avaliação da obtenção de peptídeos antimicrobianos. O protocolo utilizado para extração alcoólica, em etanol 50%, foi o descrito por Claeson e colaboradores (1998).

Neste trabalho, a extração alcoólica foi utilizada para extração de polipeptídeos das partes aéreas da planta *Viola arvensis*, resultando em uma fração que apresentava um peptídeo cíclico de 29 resíduos de aminoácidos, denominado Varv. O protocolo para extração ácida foi realizado de acordo com Egorov e colaboradores (2005), que demonstraram pela primeira vez a presença e a diversidade, simultaneamente, de diferentes classes de AMPs em sementes de trigo.

Com base nas metodologias acima citadas, os extratos provenientes das extrações alcoólica e ácida de folhas apresentaram bandas majoritárias em torno de 6 kDa e bandas superiores a 10 kDa. Na extração alcoólica e ácida de raízes, observaram-se bandas majoritárias entre 6 e 10 kDa e ainda era possível observar bandas superiores a 16 kDa. Como todos os extratos apresentaram proteínas de baixa massa molecular, seguiu-se com o processo de purificação de peptídeos de ambos os extratos (Figura 1).

O perfil cromatográfico do extrato alcoólico de folhas é apresentado na figura 7 e mostra que apenas as frações F1 e F2 apresentaram bandas isoladas e de baixa massa molecular, ambas apresentando uma banda com aproximadamente 7 kDa. O perfil cromatográfico do extrato ácido de folhas (Figura 8) apresentou oito diferentes frações, com bandas majoritárias variando de 6 a 8 kDa. Com estes dados, concluiu-se que a extração ácida de folhas foi mais eficiente no processo de separação das proteínas em relação à extração alcoólica de folhas. O perfil cromatográfico do extrato alcoólico e ácido de raízes de *C. annuum* L. também apresentou uma diversidade de bandas proteicas, tanto de baixa massa molecular (6 a 8 kDa) como também superiores a 16 kDa (Figura 10 e 11). Concluiu-se, também, que o extrato ácido de raízes foi mais eficiente no processo de separação de proteínas do que o extrato alcoólico de raízes. Vários trabalhos já demonstraram a presença de peptídeos e proteínas em diferentes partes das plantas. Para Li et. al (2014), além de obterem diferentes frações, separam por eletroforese bidimensional proteínas de folha, caule, raiz, da semente e do calo de *Arabidopsis thaliana*. Neste trabalho, foram caracterizados ao todo 41 'spots' por massa molecular e ponto isoelétrico. Para uma melhor caracterização das frações provenientes das extrações alcoólica e ácida de folhas e raízes de *C. annuum* L., realizou-se eletroforese bidimensional. Verificou-se que os extratos, além da diversidade de bandas de baixa massa molecular,

também mostraram diversidade em relação aos pontos isoelétricos detectados (Figura 2 - 5).

A determinação das sequências de aminoácidos foi utilizada como passo final de caracterização química das frações. A sequência N-terminal de L1' revelou que esta proteína apresenta 85% de similaridade com trecho da sequência de uma proteína, relacionada à defesa de plantas em *C. annuum*, denominada proteína U-Lim (Figura 12). A bioprospecção da atividade antimicrobiana em plantas de pimenta e pimentão tem mostrado que parte desta atividade está associada com a presença de proteínas e peptídeos (catiônicos e aniônicos) contidos nos seguintes órgãos da planta: folhas, frutos e sementes, como descritos por Moguel-Salazar (2011). Neste trabalho, os autores descrevem o potencial terapêutico e agrônômico de peptídeos antimicrobianos do gênero *Capsicum*. Peptídeos de plantas vêm sendo descritos como potentes inibidores do crescimento de microrganismos. Muitos destes peptídeos possuem uma ampla atividade contra bactérias Gram-negativas e/ou Gram-positivas, vírus, protozoários e fungos (Diz et al., 2006; Ribeiro et al., 2007; Carvalho e Gomes, 2009; Berrocal-Lobo et al., 2009; Pelegrini et al., 2011). Nos últimos anos, nosso grupo tem mostrado peptídeos de plantas do gênero *Capsicum* como potentes inibidores do crescimento de fungos e de protozoários. Diz et al. (2006) isolaram e caracterizaram uma proteína transportadora de lipídeo bem como Ribeiro et al. (2007), isolaram e caracterizaram um potente inibidor de proteinase com alta atividade antimicrobiana de sementes deste gênero. Cruz et al. (2010) isolaram e caracterizaram um peptídeo de sementes de pimentão de 9 kDa. Esse peptídeo isolado apresentou homologia de sequência com a LTPs, um peptídeo antimicrobiano já bem caracterizado. Neste trabalho, os autores ainda constataram a atividade antifúngica do peptídeo isolado sobre os fungos *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum* e também sobre as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens*, *Candida tropicalis* e *Candida albicans*. Dias et al. (2013) isolaram AMPs de sementes de *Capsicum chinense* e verificaram que eles eram capazes de inibir o crescimento das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *P. membranifaciens* e *Kmaxiannus* e ainda, demonstraram que esses peptídeos eram capazes de causar alterações morfológicas nas células das leveduras testadas. Recentemente, dois novos

peptídeos, com atividade antimicrobiana, foram isolados também de sementes de gênero *Capsicum* por Bard et al., (2014 e 2015).

Além disso, um trabalho inovador, realizado por Pereira (2013) demonstrou a purificação de proteínas isoladas de folhas de *Capsicum baccatum*. Em seus experimentos, foram comparadas duas diferentes metodologias de extração: alcoólica e aquosa. Neste trabalho foi observado o efeito inibitório do extrato proteico, proveniente da extração alcoólica, sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Observou-se que o extrato proteico foi capaz de inibir aproximadamente 70% da proliferação do parasita na concentração de 200 µg/mL e 100 % na concentração de 500 µg/mL, no período de 48h.

Tendo em vista a presença de peptídeos nos extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L., os extratos e as frações purificados foram testados em ensaios de inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos. Primeiramente, os extratos na concentração de 1000 µg/mL foram testados e verificou-se que os extratos, alcoólicos e ácidos, de folhas e raízes, de *C. annuum* L. foram capazes de inibir o crescimento do fungo *C. lindemuthianum* e que apenas o extrato alcoólico de folhas foi capaz de inibir o crescimento do fungo *C. lindemuthianum* e *C. gloeosporioides* (Figura 13 e 14). Também, testou-se o extrato alcoólico e ácido de folhas para o fungo *C. lindemuthianum* em concentrações menores e verificou-se que estes extratos não foram capazes de inibir o crescimento do fungo *C. lindemuthianum* nas concentrações testadas. Porém, quando testados os extratos, alcoólico e ácido, de raízes, estes se mostraram eficientes na inibição do crescimento deste fungo (Figura 15). Para o fungo *C. gloeosporioides*, apenas o extrato alcoólico de raízes foi testado, visto ser o único extrato que inibiu este fungo na concentração de 1000 µg/mL, e verificou-se, neste ensaio, que houve inibição em todas as concentrações testadas (Figura 16).

Desta forma, como já descritos acima, vários trabalhos vêm demonstrando a atividade dos AMPs, inclusive os isolados de gênero *Capsicum* contra diferentes espécies de fungos (Molina et al., 1993; Terras et al., 1995; Diz et al., 2006; Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2012; Taveira et al., 2014; Bard et al., 2014; Bard et al., 2015). Estes resultados mostram o potencial biotecnológico dos AMPs, já que estas moléculas agem sob uma gama de microrganismos patogênicos.

Realizou-se também, ensaios de inibição do crescimento dos fungos *C. lindemuthianum* e *C. gloeosporioides*, agora utilizando 250 µg/mL das frações purificadas. Nesta concentração não se observou inibição do crescimento do fungo, sendo que as frações L2' e R2, as que apresentaram ação, inibiram 19% e 25%, respectivamente, o crescimento do fungo *C. lindemuthianum* (Figura 16). Já é reportado na literatura proteínas de plantas que agem de forma sinérgica em seu sistema de defesa e que frente à agressão de um patógeno tem sua virulência reduzida, os resultados obtidos em nestes estudos mostraram bastante diferença na porcentagem de inibição dos extratos e das frações purificadas em sistema HPLC. Essa diferença pode ser da falta de sinergismo das frações purificadas em relação aos extratos de folhas e raízes de *C. annuum* L. (Carvalho et al., 2001; Diz et al., 2006).

A ação dos AMPs permeabilizando as membranas de microrganismos já vem sendo demonstrada por vários autores como um dos principais mecanismos de ação destas moléculas (Regente et al., 2005; Brogden, 2005, Zottich et al., 2011; Taveira et al., 2014). Para verificar se as frações purificadas eram capazes de permeabilizar a membrana do fungo *C. lindemuthianum*, utilizou-se o corante *Sytox green* como marcador, visto que, se a membrana da célula estiver deteriorada o corante entra na célula e se liga a ácidos nucleicos. Observou-se que as frações não foram capazes de permeabilizar as membranas dos fungos, na concentração testada, apesar de sugerir que as frações L2', L1 e L2 apresentaram uma maior fluorescência nas células tratadas com relação ao controle (Figura 18, 19, 20 e 21).

Neste trabalho, além dos ensaios com fungos fitopatogênicos, realizou-se um antibiograma com a bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* (Figura 21). Vários trabalhos utilizam-se desta, sendo de grande utilidade para área médica e agrônômica, visto que é uma das formas mais rápidas de avaliar qual o antibiótico que melhor combate um determinado microrganismo. Trabalhos também demonstram esta metodologia sendo utilizada na área agrônômica, para avaliação de possíveis antimicrobianos, já que várias culturas sofrem com danos causados por microrganismo fitopatogênicos (Poupard et al., 1994).

Filho e Romeiro (2009) avaliaram o crescimento da bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* frente a fármacos antimicrobianos, com o objetivo de desenvolver um meio semi-seletivo, sendo essa semi-seletividade avaliada pela

suplementação do meio com 50 fármacos antimicrobianos distintos, e dos 50 fármacos apenas três não foram capazes de inibir o crescimento da bactéria. Notavelmente, foi observado o efeito sinérgico dos antimicrobianos, quando estes foram combinados. Estes resultados mostram a eficiência do uso de substâncias antimicrobianas para o controle de microrganismo fitopatogênicos.

Outro exemplo foi descrito por Loguercio et al. (2005), que avaliaram a atividade antimicrobiana de plantas medicinais de diversas espécies, dentre elas a de folhas jambolão (*Syzygium cumini* L.). Neste trabalho, foi avaliada a existência de um efeito antibacteriano no extrato hidro-alcoólico de folhas desta planta. Foram utilizados 17 isolados de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Não houve inibição significativa de crescimento nos tratamentos realizados com salina e etanol, entretanto, o extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão foi capaz de inibir o crescimento de 100% das bactérias testadas. Os isolados das bactérias Gram-positivas apresentaram um halo médio de 19,5mm, enquanto o das bactérias Gram-negativas foi observado um halo de 18,8mm. Desta forma, observou-se neste trabalho que não há diferença de sensibilidade do extrato testado para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

No antibiograma realizado neste trabalho, avaliou-se o crescimento da bactéria *Xantomonas euvesicatoria in vitro* na presença dos extratos de *C. annuum* L.. Os resultados evidenciaram que os extratos alcoólicos, de folhas e raízes, não foram capazes de inibir o crescimento da bactéria. Porém, para o extrato ácido de folhas, as diferentes concentrações usadas apresentaram a formação de halos de inibição. Para o extrato ácido de raízes também foi observada a formação de halos, mas não em todas as concentrações usadas nem seguindo uma inibição dose-dependente. Para a não observação desta inibição nas concentrações referidas, sugerimos que a dosagem possa ter interferido em nossos resultados, visto o excesso de coloração destes durante a dosagem.

Segundo Ximenes (2004), na avaliação do antibiograma não existe um consenso sobre os critérios de interpretação dos valores obtidos através dos resultados obtidos em um antibiograma. Vários métodos automáticos e escalas são utilizados para a interpretação desta técnica, porém muitos destes métodos ainda precisam ser aprimorados para uma melhor compreensão dos resultados obtidos. Assim, neste trabalho, objetivou-se apenas observar se os extratos

alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L. eram capazes de inibir o crescimento da bactéria *Xanthomonas euvesicatoria* nas concentrações testadas.

Neste trabalho, também, avaliou-se a capacidade dos extratos, alcoólico e ácido, de folhas de *C. annuum* L. em inibir a atividade da tripsina, uma enzima da classe serino protease que pode ser encontrada em organismos patogênicos que colonizam tecidos vegetais. Estes microrganismos dependem de um conjunto de proteases como fator de virulência. Em paralelo, as plantas desenvolveram genes que codificam para inibidores de proteinases (PIs), sendo estes inibidores regulados em diferentes fases do desenvolvimento da planta, em órgão de armazenamento tais como: sementes, tubérculos, flores e frutos, bem como apresentando diferentes funções biológicas e farmacológicas (Laskowski et al., 1980; Gomes et al., 2011). Desta forma, vários trabalhos já identificaram PIs em diferentes espécies de plantas, inclusive em *Capsicum*. Ribeiro et al. (2007), que também isolaram um peptídeo com alta atividade inibitória contra tripsina. Moulin et al. (2014), por exemplo, identificaram inibidores de tripsina em folhas de *Capsicum baccatum* var. pendulum que foram inculados com PepYMV (*Pepper yellow mosaic virus*). Dokka e Davuluri (2014) identificaram, em semente de *Abelmoschus moschatus*, um inibidor de tripsina com atividade contra diferentes fungos (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Asperigillus flavus*, *Sacchamycetes cerevisiae*, *Candida glabra* e *Asperigillus niger*) e bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus phyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae* e *Streptococcus pyogenes*).

Neste trabalho, constatou-se que o extrato alcoólico e ácido de folhas de *C. annuum* L. apresentou especificidade para tripsina, isto foi constatado através da porcentagem de inibição da enzima na qual foi visualizada inibição em todas as concentrações utilizadas (Figura 24).

Analisou-se, também, os extratos alcoólico e ácido de folhas de *C. annuum* L. sobre a atividade da enzima α -amilase salivar humana. Várias proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana e capacidade de inibir a α -amilase já foram descritas em várias espécies de plantas. A α -amilase é uma enzima de grande importância para o crescimento e desenvolvimento de insetos e os inibidores, por sua vez, inibem a atividade α -amilase, participando da defesa da planta frente a um ataque causado por pragas (Svensson et al., 2004; Payan,

2004; Silva et al, 2014; Macz3 et al., 2014). Interessantemente, vem sendo descrito esta nova propriedade de inibir α -amilase para alguns pept3deos antimicrobianos, especialmente os da fam3lia das defensinas e das prote3nas transportadoras de lip3deos (LTPs) (Diz et al., 2011; Zottich et al., 2011; Carvalho e Gomes 2011).

Para o ensaio com a enzima α -amilase salivar, testaram-se diferentes concentra33es do extrato alco3lico e 3cido de folhas (Figura 25A). Os resultados mostraram que o extrato alco3lico de folhas n3o foi capaz de inibir a enzima em nenhuma das concentra33es testadas e que apenas o extrato 3cido de folhas foi capaz de inibir a atividade da enzima em todas as concentra33es testadas, sendo esta inibi33o de 100% para todas as concentra33es (Figura 25B).

Observou-se nos ensaios realizados com as enzimas tripsina e α -amilase salivar humana, que o extrato proveniente da extra33o 3cida de folhas 3 capaz de inibir as duas enzimas, o que nos leva a acreditar que podemos ter neste extrato um inibidor bifuncional. V3rios trabalhos descrevem prote3nas bifuncionais com atividade para tripsina e α -amilase (Strobl et al., 1998). Em 2001 G3mez-Leyva e Blanco-Labra, relataram em seu trabalho uma protease de milho com peso molecular de 22 kDa, com atividade para tripsina e alfa-amilase. Saxena et al. (2010) purificaram uma prote3na da planta *Eleusine coracana* de 14 kDa, com atividade para tripsina e α -amilase. Assim, com os resultados obtidos neste trabalho espera-se contribuir para o uso de pept3deos antimicrobianos como ferramenta biotecnol3gica para o controle de insetos e microrganismos pat3genos de planta.

7. CONCLUSÃO

- Metodologias de extração padronizadas foram eficientes no processo de concentração de proteínas de baixo peso molecular e todos os extratos obtidos de folhas e raízes de *C. annuum* L. apresentaram bandas proteicas isoladas, com baixa massa molecular variando de 6 - 8 kDa;
- O perfil eletroforético bi-dimensional do extrato alcoólico de folhas apresentou uma maior diversidade de *spots* quando comparado ao extrato ácido de folhas. Os extratos apresentaram bandas majoritárias ente 6 e 10 kDa e bandas maiores que 14 kDa com pls variando de 4 - 9,5;
- O perfil eletroforético bi-dimensional do extrato alcoólico de raízes, apresentou uma maior diversidade de *spots* quando comparado ao extrato ácido de raízes, apresentando bandas majoritárias de 8 e maiores que 14 kDa com pls variando de 4 - 5 para o extrato alcoólico e 7 - 9 para o extrato ácido
- A sequência de aminoácidos da fração A1 (extração ácida de folhas de *C. annuum* L.) apresentou 85 % de similaridade com um trecho de uma proteína de *C. annuum*, relacionada à defesa de plantas, denominada proteína U-Lim;
- Os extratos alcoólicos e ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L. foram capazes de inibir o crescimento do fungo *C. lindemuthianum* e apenas a extração alcoólica de raízes foi capaz de inibir o crescimento do fungo *C. gloeosporioides*;
- As frações isoladas não foram capazes de inibir o crescimento do fungo *C. lindemuthianum* na concentração testada e não foram capazes de permeabilizar as membranas desses fungos de forma significativa;

- Apenas os extratos ácidos de folhas e raízes de *C. annuum* L. foram capazes de inibir o crescimento da bactéria *Xanthomonas euvesicatoria*;
- Os extratos alcoólico e ácido de folhas foram capazes de inibir a enzima tripsina em todas as concentrações testadas e apenas o extrato ácido de folhas de *C. annuum* L. foi capaz de inibir a enzima α -amilase salivar humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, G. (1989) Sequencing of proteins and peptides. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier, Bundon R. H. & Knipperg, P. H. editors, 2^a edition.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Research*. 25: 3389 - 3402.
- Arroyo, A. G., Iruela-Arispe, M. L. (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular Research*, 86: 226 - 235.
- Azevedo, C. P., Filho, Filho, A. C.; Henz, P. G., Reis, Ailton. (2006) Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas. *EMBRAPA*, 1414-9850.
- Bard, G. C. V., Nascimento, V. V., Oliveira, A. E., Rodrigues, R., Da Cunha, M., Vasconcelos, I M., Carvalho, A. O., Gomes, V. M. (2014) Vicilin-like peptides from L. seeds are α -amilase inhibitors and exhibit antifungal against important yeasts in medical mycology . *Biopolymers*, 1: 1- 1.

- Bard, G. C. V., Nascimento, V. V., Ribeiro, S. F., Rodrigues, R., Pereles, J. F., I M., Carvalho, A. O., Fernandes, K. V. S., Gomes, V. M. (2015) Characterization of peptides from *Capsicum annum* hybrid seeds with inhibitory activity α - amylase, serine proteinase and fungi. *The Protein Journal*, in Press.
- Baumann, C., Kampfer, U., Schurch, S., Schaller, J., Largiader, C., Nentwig, W., Kuhn-Nentwig, L. (2010) Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (16): 2787 - 2798.
- Benko-Iseppon, M. A., Galdino, L. S., Calsa, T. Jr., Kido, A. E., Tossi, C. L. B., Crovella, S. (2010) Overview on plant antimicrobial. *Peptides Current Protein and Peptide Scienc*, 11: 181 - 188.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Rodríguez-Palenzuela, P., García-Olmedo, F., Rivas, L. (2009) Leishmania donovani: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Experimental Parasitology*, (3):247- 259.
- Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., Lopez, G., Garcia-Olmedo, F., Molina, A. (2002) Snakin-2 an antimicrobial peptide from potato whose gene locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiology*, 128(3): 61 - 95.
- Bjellqvist, B. E. K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., Postel, W. (1992) Isoelectric focusing in immobilized pH gradient principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methodos*, 6: 317-339.
- Bohlmann, A., Vignutelli, B., Hilpert, O., Miersch, C., Wasternack, K. (1998) Wounding and chemicals induce expression of the Arabidopsis thaliana gene Thi2.1, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. *Febbes Letters Microbial*, 437: 281 - 286.

- Boman, H. G. (2003) Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*, 3: 197- 215.
- Bonaldo, S. M., Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Dauri, J. Tessmann D. J., Scapim, C. A (2004) Fungitoxidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, n.2, p.128- 134.
- Brogden, K. (2005) Antimicrobial peptides: pore formes or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 3, No. 3, 238-250, 1740-1526.
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevisssem, K., De Samblanx, G., Osborn, W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Plant Science*, 16(3): 219 - 323.
- Broekaert, W. F., Marien, W., Terras, F. R., De Bolle, M. F., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B., Vanderleyden, J. (1992) Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/ glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, 31: 4308 - 4314.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P., Osborn, R., W., (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, 108: 1353 - 1358.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P., Vanderleyden, J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *Febbs Letters Microbial*, 69: 65 - 60.
- Bosland, P. W. (1994) Chiles: history, cultivation, and uses. p. 347-366. In: G. Charalambous (ed.), Spices, herbs, and edible fungi. Elsevier Publ., New York.

- Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Terras, F. R. G., Proost, P., Damme, J. V., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Borekaert, W. F. (1992) Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *Journal Biology Chemistry*, 267: 2228 - 2233.
- Carvalho, A. O., Gomes, V. M. (2009) Plant defensin - Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*. 30: 1007 -1020.
- Carvalho, A. O., Gomes, V. M. (2011) Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Current Pharmaceutical*, 17: 4270 - 4293.
- Carvalho, A. O., Machado, O. L. T., Da Cunha, M., Santos, I. S., Gomes, V. M. (2001) Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna guiculata* seeds. *Plant Physiology Biochemical*, 39: 137- 146.
- Castro, M. S., Fontes, W. (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters*, 2: 11 - 16.
- Claeson, P., Goransson, U., Johansson, S., Luijendijk, T., Bohlin, L. (1998) Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. *Journal of Nature Products*, 61:77 - 81.
- Costa, R. F. L., Andrad, D. M. M., Costa, A. E. Macchiavello, B. (2012) Metodo automático para identificação de Rótulos alfanumericos de antibioticos posicionados em antibiograma. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Automática, CBAISBN: 978-85-8001-069-5.
- Craik, D. J., Cemazar, M., Daly, N. L. (2006) The cyclotides and related macrocyclic peptides as scaffolds in drug design. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 9 (2) 251-60.
- Cruz, P. L., Ribeiro, S. F., Carvalho, A. O. Vasconcelos, M. I., Rodrigues, R., Da Cunha, M., Gomes, V. M. (2010) Isolation and partial characterization of a

novel lipid transfer protein (LTP) and antifungal activity of peptides from chilli pepper seeds. *Protein and Peptide Letters*, 17 (3): 311-318.

Deepa, N., Kaur, C., Singh, B., & Kapoor, H. C. (2006) Antioxidant activity in some red sweet pepper cultivars. *Journal of Food and Composition and Analysis*, 19, 572 - 578.

Dias G. B., Gomes, V. M., Zottich, U., Ribeiro, S. F., Carvalho, A. O., Rodrigues, R., FBernandes, K., Valevski, S., Machado, O. L. T., Ferreira, A. T., Perales, J., Cunha, M. D. (2013) Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. Seeds. *The Protein Journal*, (32): 15 - 26.

Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., Rodrigues, R. Ferreira, A. G. C. N., Da Cunha, M, Alves, E. W., Okorokova-Façanha, A. L., Oliveira, M. A., Perales, J., Machado, O. L. T., Gomes, V. M. (2006) Antimicrobial peptides de chilli pepper seeds causes yeast plasma membrana permeabilization and inhibits the acidification of the médium by yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760:1323- 1332

Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., Ribeiro, S. F. F., Da Cunha, M., Beltramini, R., Nascimento, V. V., Machado, O. L. T., Gomes, V. M. (2011) Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of lipid transfer protein from chilli pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α - amylase inhibitory properties. *Physiology Plantarum*, 142:233-246.

Dokka, K. M., Davuluri, P. S. (2014) Antimicrobial activity of a trypsin inhibitor from the seeds of *Abelmoschus moschatus* L.. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5: 184 - 199.

Dubin, A., Mak, P., Dubin, G., Rzychon, M., Stec-Niemczyk, J., Wladyka, B. (2005) New generation of peptide antibiotics. *Acta Biochimica Polonica* 52: 633 - 638.

- Duvick, J. P., Rood, T. A. G., Marshak, D. R. (1992) Purification and characterization of a novel antimicrobial peptides from maize (*Zea mays L.*). *Journal of Biological Chemistry*, 26: 18814 - 20.
- Egorov, T. A., Odintsova, I. T., Pukhalsky, A. V., Grishin, V. E. (2005) Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, 26: 2064 - 2070.
- Embrapa. (2013) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 30 set. 2013.
- Epple, P., Epple, P., Apel K, I. K., Bohlmann, H. (1997) Overexpression of an endogenous thionin give enhanced resistance of *Arabidopsis thaliana* against *Fusarium oxysporium*. *Plant Cell*, 9: 509 - 520.
- Edman, P. (1950) Method for determination of amino acid sequences in peptides. *Acta Chemica Scandinavica*, 28: 283 - 293.
- Filho, L. R., Romeiro, D. S. R. (2009) Sensibilidade de *Xanthomonas vesicatoria* a antibióticos para desenvolvimento de um meio semi-seletivo. *Ciências Agrárias e Biológicas V. 3, N. 1, p. 28.*
- Fiori, A. C. G., Schwan-Estra., Schwan-Estra, K. R. F., Vida, J. B., Scapim, C. A. Cruz, M. E. S., Pascholati, S. F. (2000) Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *Journal of Phytopathology*, 483 - 487.
- Franco, O. L., Ridegen, D, J., Melo, F, R., Bloch Junior, C. B., Silva, C. P., Grossi-de-Sá, M. F. (2000) Activity of wheat alpha-amylase towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. *European. Journal of Biochemistry*, v.267, p.2166-2173.
- Franzener, G., Martinez-Franzener, A. S., Stangarlin, J. R., Czepark, P. M., Schwan-Estrada, K. R. F., Cruz, M. E. S. (2007) Atividades antibacteriana,

antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. *Semina: Ciências Agrárias*, 28:29 - 38.

Games, P. D., Santos, S. I., Mello, O. E., Diz, S.S., Carvalho, A. O., Filho, G. A., Ferreira, B. S., Gomes, V. M. (2008) Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus L. vulgaris*. *Seeds Peptides*, 29 (12): 2090 - 2100.

Gao, A. G., Hakimi, S. M., Mittanck, C. A., Wu, Y., Woerner, B. M., Stark, D. M., Shah, D. M., Liang, J., Rommens, C. M. (2000) Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology*, 18(12):1307-10.

García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molin, A., Alamillo, J. M., Lopes-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., Pozuela, P. C. (2001) Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxy-nitrite in plant defense. *Febbs Letters*, (2-3): 219 - 222.

Gennaro, R., Zanetti, M. (2000) Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55 (1):31 - 49.

Ghini, R., Kimati, H. (2000) Resistência de fungos a fungicidas. *Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente*, 78p.

Gomes, M. T., Oliva, M. L. V., Lopes, M. T., Sala, C. E. (2011) Plant proteinases and inhibitors: an overview of biological function and pharmacological activity. *Current Protein and Peptide Science*, 12:417-436.

Gómez-Leyva, F. J., Blanco-Labra, A. (2001) Bifunctional α -amylase/trypsin inhibitor activity previously ascribed to the 22KDa TL protein, resided in a contaminant protein of 14KDa. *Journal of Plant Physiol*, 158. 177 - 183.

Görg, A., Postel, W., Günther, S., (1998) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 9: 531-546.

- Guzman, I., Hamby, S., Romero, J., Bosland, P. W., O'Connell, M. A. (2010) Variability of carotenoid biosynthesis in orange Colored *Capsicum* spp. *Plant Science*, 179 (2): 49 - 59.
- Hancock R. E. W., Scott, M. G. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defeses. *Colloquium*, 97:8856 -8861.
- Heath, M. C. (1997) Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal parasites. In *The Mycota V, Part B, Plant Relationships*. Edited by Carroll G. C., Tudzynski P. Berlin, Springer, 257 - 276.
- Heath, M. C. (2000) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:406 - 416.
- Heil, M. (2010) Plastic defence expression in plants. *Evolutionary. Ecology*, 24: 555 -569.
- Huang, R. H., Xiang, Y., Liu, X. Z., Zhang, Y., Hu, Z., Wang, D. C. (2002) Two novel antifungal peptides distinct with a five disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Olive. *Febbs Letters*, 521: 87 - 90.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., Schaad, W. N. (2004) Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper system. *Journal of Applied Microbiology*, 27: 755 -762.
- Jung, H. W., Kim, W. Hawang, B. K. (2003) Three pathogen- inducible genes encoding lipid transfer protein from peper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant Cell Enviromnet*, 26 (6): 915 - 928.
- Jung, H. W., Lim, C. W., Hwang, B. K. (2006) Isolation and functional analysis of pepper lipid transfer protein III (CALTP III) gene promoter during signaling to paphogen, abiotic and environmental stresses. *Plant Science*. 170: 258 - 266.
- Koo, J. C., Lee, S. Y., Chun, H. J., Cheong, Y. H., Choi, J. S., Broekaert, W. F., Marien, W., Terras, F. R., De Bolle, M. F., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B., Vanderleyden, J. (1992) Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/ glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, 31: 4308 - 4314.
- Kouassi, K. C., Koffi-Nevry, R. (2012) Avaliação de la connaissance et des variétés utilização de piment (*Capsicum*) cultivées en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6 (1): 175 - 185.

- Laskowski, M. Jr., Kato, I. (1980) Protein Inhibitor of Proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 593 - 626.
- Lay, Y., Gallo, R. L., (2009) Amped up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunology*, 30: 131 - 4.
- Leonard, T., Nguyen, E., Haney, F., Hans, J., V. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 10: 10 - 16.
- Li, S., Mhamdi, A., Trotta, A., Kangasjärvi, S., Noctor, G. (2014) The protein phosphatase subunit PP2A-B'γ is required to suppress day length-dependent pathogenesis responses triggered by intracellular oxidative stress. *New Phytologist Journal*, 1 :145-60.
- Liu, Y. J., Cheng, Lai, S. M., Hus, M. P., Chen, C. C., Luy, P. C. (2006). Solution structure of the plant defensin Vr D1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. *Proteins*, 63: 777 - 786.
- Loguercio, P. A., Battisti, A., Vargas, C. A., Henzel, A., Wit, M. N. (2005) Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* L). *Ciência Rural*, volume. 35.
- Lopes, C. A; Ávila. C. (2003) Doenças do pimentão: diagnóstico e controle. Brasília, Embrapa hortaliças.
- Luning, P. A., Yuksel, D., Vuurst-Devries, R. V., Roozen, J. P. (1995) Aroma changes in fresh bell peppers (*Capsicum annuum*) after hot air drying. *Journal Food Science*, 60: 269 -1276.
- Macedo, M. L., Garcia, V. A., Freire, M. G., Richardson, M. (2007) Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, 68: 1104 -1111.

- Macz3, A., Cucu, T., Meulenaer, D. B., Gelencs3r, E. (2014) Comparison of the alpha-amylase inhibitor-1 from common beans and transgenic pea expressing the bean alpha-amylase inhibitor-1 by means of LC–TOF–MS. *Food Research International*, 6: 10 - 16.
- Maria, S., Zapata, P. J., Castillo, S., Guill3n, F., Mart3nez-Romero, D. (2010) Antioxidant and nutritive constituents during sweet pepper development and ripening are enhanced by nitrophenolate treatments. *Food Chemistry*, 118: 497 - 503.
- Mar3n, A., Ferreres, F., Tom3s-Barber3n, F. A., Gil, M. I. (2004) Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3861 - 3869.
- Marshall, S. H., Arenas, G. (2003) Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6: 271- 284.
- McLeod, M. J., Guttman, S. I., Eshbaugh, W. H. (1982) Early evolution of chili peppers (*Capsicum*). *Journal Economic Botany*, 36: 361 - 366.
- Mello, E. O., Ribeiro, S. F., Carvalho, A. O., Santos, S. I., Da cunha, M., Santa-Catarina, C., Gomes, V. M. (2011) Antifungal defensin Pv D1 plasma membrane permeabilization involves the inhibition of medium acidification and induction of ROS in fungal cells. *Current Microbiology*, 62:1209 - 1217.
- Mendes, M. A. S., Silva, V. L., Dianese, J. C., Ferreira, M. A. S. V., Santos, C. E. N., Gomes Neto, E., Urban, A. F., Castro, C. (1998) Fungos em plantas no Brasil. Brasil, SPL, 555.
- Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M.R., Conforti, F., Statti, G., de Cindio, B., Houghton, P.J., Menichini, F.(2009) The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Habanero. *Food Chemistry*, 114: 553 - 560.

- Meyer, B. G., Houlne, J., Pozueta-Romero, M. L., Schantz, R. (1996) Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. *Plant Physiology*, 112: 615 - 622.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M. and Roch, Ph. (2000) Envolvement of mytilins in mussel antimicrobial defence. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 2954 - 2962.
- Moguel-Salazar, F., Brito-Argáez, L., Díaz-Brito, M., and Islas-Flores, I. (2011) A review of a promising therapeutic and agronomical alternative: Antimicrobial peptides from *Capsicum* sp.. *African Journal of Biotechnology*, 10(86): 19918-19928.
- Molina, A., García-Olmedo, F. (1997) Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biotecnología, E.T.S.I. Agrónomos UPM, E-28040 Madrid, Spain.
- Molina, A. Segura, A., García-Olmedo, F. (1993) Lipid transfer (nsLTP) from barley and maize leaves are proteins inhibitors of bacterial and fungal pathogens. *Febs Letters*, 316(2) 119-122.
- Mosolov, V. V.; Valueva, T. A., (2005) Proteinase Inhibitors and their function in plants: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41: 227 - 246.
- Moulim, M. M., Rodrigues, R., , Ribeiro, F. F. S., Gonçalves, L. F. A., . Bento, C. S., Sudré, S. P., Vasconcelos, I. P., Gomes, V. M. (2014) Trypsin inhibitors from *Capsicum baccatum* var. pendulum leaves involved in Pepper yellow mosaic virus resistance. *Genetics and Molecular Research* 13 (4): 9229-9243.
- Nielsen, K. K., Nielsen, J. E., Madrid, S. M., Mikkelsen, J. D. (1997) Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. *Plant Physiology*, 113: 83 - 91.

- Nishimura, M. T., Dangl, J. (2010) Arabidopsis and the plant immune system. *Journal Plant*, 61: 1053 - 1066.
- O' Farrel, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250: 4007 - 4021.
- Obradovic, A., J. B. Jones, M. T. Momol, B. Balogh, and S. M. Olson. (2004) Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Disease*, 88: 736 - 740.
- Payan, F. (2004). Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1696:171-180.
- Park, J. C., Park, B. C., Hong, S. S., Lee, H. S., Lee, Y. S., Kim, C. (2000) Characterization and cDNA cloning of two glycine and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherds purse, *Capsella bursapastoris*. *Plant Molecular Biology*, 44: 187-197.
- Pelegriani, P. B., Del Sarto, R. P., Silva, O. N., Franco, O. L., Grossi-De-Sa, M. F. (2011) Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. *Biochemistry Research International*, 6: 250 - 349.
- Pereira, L. S. (2013) Peptídeos de folhas de *Capsicum baccatum* com atividade inibitória contra *Leishmania amazonensis*. Monografia (Biologia Celular) - Campos dos Goytacazes – RJ. UENF, p. 26 - 40.
- Peschel, A., Hans-Georg, S. (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 529 - 536.
- Peters, B. M., Shirliff, M. E., Jabra-Rizk, M. A. (2010) Antimicrobial Peptides: Primeval molecules or future drugs? *Plos Pathogens*, 3: 6 -10.

- Pickersgill, B. (1991) Citogenetics and evolution of *Capsicum* L. in : Tsuchia, T, Gupta, P.K. (ed) Chromosome engineering plants: genetics, breeding evolution. Amsterdam, p. 139 - 160.
- Poupard, J., Rittenhouse, S. and Walsh, L. (1994) The evolution of antimicrobial susceptibility testing methods, *Antimicrobial susceptibility testing*, p. 3 -14.
- Pozzobon, M. T., Wittmann, M. T., (2006) A meiotic study of the wild and semi-domesticated Brazilian species of genus *Capsicum* L. (Solanaceae). *Cytologia*, 71: 275 - 287.
- Ribeiro, S. F., Da Cunha, A. O., Rodrigues, M., Melo, V. M., Vasconcelos, I. M., Melo, E. J. T., Cruz, L. P., Gomes, V. M. (2007) Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon*, 50: 600 – 611.
- Ribeiro, S. F., Silva, M. S., Cunha, M., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Rabelo, G., Mello, E. O., Santa-Catarina, C., Rodrigues, R., Gomes, V. M. (2012) *Capsicum annuum* L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal*, 101: 657 -670.
- Rios, J. L., Recio, M. C. (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 1:80 - 84.
- Ritchie, D.F. (2000) Bacterial spot of pepper and tomato. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1027-01.
- Riva, E. M., Rodrigues, R., Pereira, M. G., Sudré, C. P., Karasawa, M., Amaral, Júnior, A. T. (2004) Inheritance of bacterial spot disease in *Capsicum annuum* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4: 490 - 494.
- Romo-Hualde, A. I. Yetano-Cunchillos, C. González-Ferrero, M. J. Sáiz-Abajo, C. J. González, N. (2012) Supercritical fluid extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red pepper (*Capsicum annuum* L.) by-products. *Food Chemistry*, 133:1045 - 1049.

- Saxena, L., Iyer, B. K., Ananthanarayan, L. (2010) Purification of a bifunctional amylase/protease inhibitor from ragi (*Eleusine coracana*) by chromatography and its use as an affinity ligand. *Journal of Chromatography*, 19:1549 -1554.
- Serra, I. M. R. S., Silva, G. S. (2005) Caracterização morfofisiológica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* agentes de antracnose em frutíferas. *Embrapa*, 6: 1679-8869.
- Silva, M. S., Koehnlein, A. E., Adelar, C. R., Morais, R. G., Baesso, L. M., Peralta, A. R., Souza, M. G. C., Sá-Nakanishi, B. A., Sá-Nakanishi, B. A., Peralta, M. R. (2014) Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Food Research International*, 56: 1 - 8;
- Stec, B. (2006) Plant thionins-the structural perspective. *Celular and Molecular Life Sciences*, 63: 1370 - 1385.
- Strobl, S. Maskos, K. Wiegand, G. Huber, R. Gomis-Rüth, X. F., Glockshuber, R. (1998) I strategy for inhibition of α -amylases: yellow meal worm α -amylase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. *Current Biology*, 6: 9112 - 1921.
- Svensson, B., Fukuda, k., Nielsen, k. P., Bønsager, C. B. (2004) Proteinaceous alfa-amylase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696: 145 - 156.
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P. A., Evans, I. J., Osborn, R. W., Ray, J. A., Rees, S. B., Broekaert, W. F. (1997) A novel family of smal cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor. *Journal Biological of Chemistry*, 272: 2408 - 2448.
- Tavares, G. M. (2004) Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na pós-colheita. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004. 55p.

- Taveira, B. G., Mathias I., Motta, V. O., Machado, T. L. O., Rodrigues, R., Carvalho, O. A., Teixeira- Ferreira, A. Perales, J., Vasconcelos, M.I., Gomes, M. V. (2014) Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Peptides Science*, 102: 30 -39.
- Teixeira, V., Feio, J. M., Bastos, M. (2012) Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51:149 - 177.
- Terras, F. R. G., Ergermont, K. kovalena, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W. Kester, A., Ress, S. B., Torrekens, S., Van lauden, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., BroeKaert, W. F. (1995) Small cystein-rich antifungal protein from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 7: 573-588.
- Terras, F. R., G., Schoofs, H. M., De Bolle, M. F., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 15301 - 15309.
- Terras, F. R. G., TorreKens, S., Van Leuven, F., Osborn, R. W., Vandeleyden, J., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F. (1993) A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae especies. *Febbs Letters*, 316: 233 - 240.
- Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G. W., Brownlee, C., Osborn, R. W., Broerkaert, W. F. (1996) Fugal membrane responses induced by plant defensins and thioninis. *Journal Biology Chemistry*, 271: 1518 - 1525.
- Thevissen , K., Kristensen, H-H., Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A., François, I. E. J. A. (2007) Therapeutc potencial of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discovery Today*, 12: 966 -971.

- Thevissen, K., Terras, F. R. G., Broekaert, W. F. (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 5451- 5458.
- Thevissen, K., Warnecke, D. C., François, I. E. J. A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zahrinder, U., Thomma, B. P. H. J., Ferket, K. A. (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *Journal Biology Chemistry*, 6: 3900 - 3905.
- Topuz, A., Odzemir, F. (2007) Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some capsaicinoides selected pepper cultivars (*Capsicum annum*). *Journal of Food and Drug Analysis*, 20: 596-60.
- Van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. J. (2006) Significance of inducible defense- related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathol*, 44: 135-162.
- Wit, P. J. G. M. (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves cellular and molecular. *Life Sciences Switzerland*, 64: 2726 - 2732.
- Ximenes, J. (2004) Avaliação dos resultados quali-quantitativos de discos para Antibiograma Marca Sensifar, Laes & Laes, Edição 146.
- Zimmer, A. R., Leonardi, B., Miron, D., Schapoval, E., Oliveira, J. R., Gosmann, G. (2012) Antioxidant and anti-inflammatory - Property Pepper baccatum: From traditional use scientific approach. *Ethnopharmacology*, 139: 233 - 2283.
- Zottich, U., Da Cunha, M., Carvalho, A, Dias, G. B., Silva, N., Santos, I. S., do Nascimento, V., Miguel, E. C., Machado, O., Gomes, V M. (2011) Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochimica ET Biophysica Acta*, 1810: 375-383.