

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *CaTI*, UM INIBIDOR DE
PROTEINASE SERÍNICA DE *Capsicum annuum*, E PRESENÇA DE
INIBIDORES SIMILARES EM OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO
Capsicum

MARCIELE SOUZA DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO- UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO/2016

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *CaTI*, UM INIBIDOR DE
PROTEINASE SERÍNICA DE *Capsicum annuum*, E PRESENÇA DE
INIBIDORES SIMILARES EM OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO
Capsicum

MARCIELE SOUZA DA SILVA

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a Valdirene Moreira Gomes

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO/2016

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *CaTI*, UM INIBIDOR DE
PROTEINASE SERÍNICA DE *Capsicum annuum*, E PRESENÇA DE
INIBIDORES SIMILARES EM OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO
Capsicum

MARCIELE SOUZA DA SILVA

“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 25 de fevereiro de 2016.

Comissão Examinadora:

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

Dr^a. Viviane Veiga do Nascimento (D.Sc em Biociências e Biotecnologia) - UENF

Prof. Gonçalo Apolinário Souza-Filho (D.Sc em Biociências e Biotecnologia)
UENF

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por permitir que eu chegasse até aqui. Agradeço por todos os ensinamentos, por nunca me deixar desistir e por toda coragem que surge quando mais preciso.

À minha orientadora, Dr^a Valdirene Moreira Gomes, por toda dedicação, carinho, paciência, pela aprendizagem passada e por está sempre disposta quando mais precisamos.

À Dr^a Suzanna, minha eterna gratidão, por toda ajuda, pois mesmo estando longe, sempre perto e disposta a ajudar. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos e pelas palavras de conforto.

Aos membros da banca, Dr^a Adriana Ferreira Uchoa, Dr^a Viviane Veiga do Nascimento e ao Dr. Gonçalo Apolinário Filho por aceitarem o convite.

Ao meu conselheiro o Dr. André de Oliveira Carvalho, pela disposição em contribuir.

Aos amigos do grupo Gabriel e Érica por toda ajuda até mesmo de última hora, apesar da correria sempre dispostos a colaborar.

À minha amiga Layrana, pela amizade, por está há anos me aturando. Obrigada por sempre está ao meu lado! E mesmo estressadas conseguimos força e no final de alguma forma, uma sempre confortava a outra.

Aos técnicos Valéria e Luis pelo apoio, dedicação e manutenção do nosso laboratório.

Ao mais que secretário, o senhor Daniel, agradeço por toda ajuda e pelas dúvidas solucionadas.

Aos meus colegas do grupo da Val: Allan, Gabriela, Larrissa, Lídia, Rodrigo e Thainã e também as meninas do grupo do André: Flávia Camila, Géssica e Júlia Soares agradeço a todos de coração.

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

À minha família, por ter que conviver com uma pessoinha que às vezes é chata demais. Agradeço imensamente à minha mãe Ana, ao meu pai Eloir, por toda preocupação, por estar em casa e me proporcionar toda segurança do mundo quando mais preciso.

Ao meu noivo Jozimar por todo carinho, por sempre está ao meu lado em todos os momentos, pelo incentivo de me fazer chegar mais longe. Por ser a pessoa mais compreensiva do mundo, por suportar meu mau humor e ainda assim continua me amando a cada dia mais. TE AMO!!!

Aos meus irmãos Maria, Erivaldo e Thais pelo constante incentivo e por sempre falarem que sou o orgulho de todos.

Aos meus sobrinhos Natália, Júnior, aos pequeninos Davy, Erick e Lorrana por não me acharem uma tia chata, e por toda vez que falo que não posso brincar eles compreenderem e ainda sentarem ao meu lado com uma folha e caneta e falarem que também querem estudar.

Ao meu cunhado Everaldo e minha cunhada Renata pelo apoio e carinho.

Enfim, Obrigada a todos que embora não estejam mencionados aqui, foram importantes e contribuíram para o meu sucesso, meu crescimento como pessoa e para a realização desta dissertação.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS/TABELAS | vii |
| ABREVIATURAS | x |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 4 |
| 2.1 - Objetivo geral..... | 4 |
| 2.2 - Objetivos específicos..... | 4 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 3.1- O gênero <i>Capsicum</i> | 5 |
| 3.2- Defesa das plantas..... | 10 |
| 3.3- Peptídeos antimicrobianos de plantas..... | 11 |
| 3.4- Inibidores de proteinase serínica de plantas..... | 14 |
| 4- MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 4.1- Materiais biológicos..... | 19 |
| 4.1.1- Sementes..... | 19 |
| 4.1.2- Fungos Filamentosos..... | 20 |
| 4.2- Métodos..... | 20 |
| 4.2.1- Obtenção do inibidor de proteinase serínica (<i>CaTI</i>)..... | 20 |
| 4.2.1.1- Extração proteica..... | 20 |
| 4.3 - Isolamento do <i>CaTI</i> de outros inibidores de proteinases serínicas..... | 20 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1 - Cromatografia de troca catiônica (CM-Sepharose)..... | 20 |
| 4.3.2 - Cromatografia de fase reversa em HPLC..... | 21 |
| 4.4 - Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS..... | 22 |
| 4.5- Quantificação de Proteína..... | 22 |
| 4.6- Inibição da atividade da tripsina..... | 22 |
| 4.7- Análise da atividade antifúngica do CaTI..... | 23 |
| 4.7.1- Obtenção dos esporos dos fungos filamentosos..... | 23 |
| 4.7.2- Análise da inibição do crescimento dos fungos filamentosos..... | 23 |
| 4.8- Análise morfológica dos fungos filamentosos tratados com <i>CaTI</i> | 23 |
| 4.9- Ensaio para verificação da permeabilização de membranas dos fungos filamentosos | 24 |
| 4.10- Ensaio para verificação da indução das espécies reativas de oxigênio (ROS)..... | 24 |
| 4.11- Ensaio de determinação da indução de óxido nítrico (NO) intracelular..... | 25 |
| 4.12- Localização da <i>CaTI</i> conjugada ao FITC por microscopia óptica..... | 25 |
| 5- RESULTADOS | 26 |
| 5.1. Purificação do inibidor de proteinase <i>CaTI</i> | 26 |
| 5.2- Análise da atividade antifúngica de <i>CaTI</i> sobre fungos filamentosos..... | 28 |
| 5.3- Análise morfológica dos fungos filamentosos tratados com <i>CaTI</i> | 29 |
| 5.4- Ensaio para verificação da permeabilização de membranas dos fungos filamentosos..... | 31 |
| 5.5- Ensaio para verificação da indução das espécies reativas de oxigênio (ROS)..... | 32 |
| 5.6 - Ensaio de determinação da indução de óxido nítrico (NO) intracelular.. | 34 |
| 5.7- Localização de <i>CaTI</i> conjugada ao FITC por microscopia óptica..... | 35 |
| 5.8- Identificação da presença de inibidores de proteinases em diferentes espécies do gênero <i>capsicum</i> | 37 |
| 5.8.1- Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS..... | 37 |
| 5.9- Comparação e purificação parcial dos inibidores de proteinases de sementes de <i>Capsicum</i> | 38 |
| 5.9.1 - Cromatografia de troca catiônica (CM-Sepharose)..... | 38 |
| 5.9.2 – Cromatografia de fase reversa em HPLC..... | 39 |
| 5.10 - Ensaio de inibição da tripsina..... | 42 |

| | |
|---|----|
| 5.11- Eletroforese em gel de tricina das frações que inibiram a tripsina | 43 |
| 6.0- DISCUSSÃO | 45 |
| 6.1- Isolamento, atividade antimicrobiana e modo de ação de CaTI sobre fungos fitopatogênicos..... | 45 |
| 6.2- Identificação da presença de inibidores de proteinases em diferentes espécies do gênero <i>Capsicum</i> | 49 |
| 7- CONCLUSÕES | 51 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 52 |

LISTA DE FIGURAS/TABELAS

- Tabela 1** - Peptídeos antimicrobianos de plantas e suas atividades biológicas.....12
- Tabela 2** - Listagem dos peptídeos antimicrobianos isolados de sementes de diferentes famílias.....14
- Tabela 3** – Exemplos de famílias de inibidores de proteinases serínicas de plantas, suas fontes e proteases alvo.....16
- Figura 1** - O gênero *Capsicum* (A) *Capsicum chinense*; (B) *Capsicum baccatum* var. *pendulum*; (C) *Capsicum frutescens*; (D) *Capsicum annuum*.....7
- Figura 2** – Purificação de *CaTI* das sementes de *C. annuum*: (A) Cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sepharose. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 20 mM, pH 8,0. F1Ca foi eluído da coluna com tampão de equilíbrio, F2Ca foi eluído com tampão de equilíbrio contendo 0,1M de NaCl e F3Ca foi eluído com tampão de equilíbrio contendo 0,2 M de NaCl; (B) Cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 da fração F3Ca HPLC. A coluna foi equilibrada com uma solução de TFA 0,1 %. As frações foram eluídas através de um gradiente de acetonitrila de 0 a 80 %.....27

- Figura 3** – Efeito do *CaTI* sobre o crescimento dos fungos fitopatogênicos: *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* e *F. solani*. O crescimento dos fungos foi observado entre 48 a 54 h. (- ●) Controle; (- ■) 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; (- ▲) 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores são médias (\pm DP) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o tratado e o controle.....29
- Figura 4** - Microscopia óptica da estrutura das diferentes espécies de fungos fitopatogênicos crescidos na ausência e na presença de *CaTI*. (A, C, E, G) Células controle (crescidas na ausência de *CaTI*); (B, D, F e H) Células crescidas na presença 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *CaTI*. Barras de 10 μm30
- Figura 5** - Microscopia de fluorescência dos fungos filamentosos tratados com corante *Sytox Green*. (A, B, E, F, I, J, M, N) células controle (crescidas na ausência do *CaTI*). (C, D, G, H, K, L, O, P) Células crescidas na presença de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do *CaTI*. Barras de 10 μm32
- Figura 6** - Microscopia de fluorescência das células de diferentes fungos filamentosos tratados com o corante (H_2DCFDA (2',7' diclorofluoresceína diacetato). (A, B, E, F, I, J, M, N) células controle (crescidas na ausência do *CaTI*). (C, D, G, H, K, L, O, P) Células crescidas na presença de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do *CaTI*. Barras de 10 μm33
- Figura 7** - Microscopia de fluorescência das células de diferentes espécies de fungos filamentosos tratados com o corante (DAF_2DA (3-amino, 4 aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato). (A, B, E, F, I, J, M, N) células controle (crescidas na ausência de *CaTI*). (C, D, G, H, K, L, O, P) Células crescidas na presença de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *CaTI*. Barras de 10 μm35
- Figura 8** – Localização de *CaTI* no fungo *F. oxysporum*. Microscopia de fluorescência do fungo incubado por 24 h com 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *CaTI*-FITC. Em 8 A e 8 B foi observado o aumento em magnitudes de 20x, em 8 C e 8 D 40x e em 8 E e 8 F o aumento de 100x. Setas mostram os vacúolos. Barras de 10 μm36

| | |
|---|----|
| Figura 9 – Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS do extrato rico em peptídeos dos diferentes acessos de <i>Capsicum</i> . (1) <i>Capsicum baccatum</i> (acesso UENF 1732); (2) <i>Capsicum baccatum</i> (acesso UENF 1496); (3) <i>Capsicum chinense</i> (acesso UENF 1498); (4) <i>Capsicum frutescens</i> (acesso UENF 1775); (5) <i>Capsicum annuum</i> (acesso UENF 1381). (M) Marcador de massa molecular (kDa)..... | 38 |
| Figura 10 - Cromatografia de troca catiônica em resina CM-Sepharose dos peptídeos presentes no extrato rico em peptídeos dos diferentes acessos de pimentas. O fluxo utilizado foi de 60 mL.h ⁻¹ , e foram coletadas frações de aproximadamente 3 mL..... | 39 |
| Figura 11 - Cromatografia de fase reversa, em sistema de HPLC. A coluna utilizada foi a C2/C18. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL.min ⁻¹ | 41 |
| Figura 12 - Efeito das frações das diferentes espécies de <i>Capsicum</i> sobre a atividade da enzima tripsina..... | 43 |
| Figura 13 - Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS das frações que inibiram a enzima tripsina. (1) Primeiro pico de <i>C. baccatum</i> acesso UENF 1496; (2) Segundo pico de <i>C. baccatum</i> acesso UENF 1496; (3) Primeiro pico de <i>C. baccatum</i> acesso UENF 1732; (4) Segundo pico de <i>C. baccatum</i> acesso UENF 1732; (5) Primeiro pico de <i>C. chinense</i> acesso UENF 1498; (6) Segundo pico de <i>C. frutescens</i> acesso UENF 1775..... | 44 |

ABREVIATURAS

- **ACN** - Acetonitrila
- **AMPs** - Peptídeos Antimicrobianos
- **BAPNA** - N- Benzoil- DL-arginil- p- nitrianilida
- **CaTI** - Inibidor de tripsina de *Capsicum annum*
- **CM** - Carboximetil
- **DAD** - Detector de arranjo diodo
- **DAF₂DA**- 3-amino, 4 aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato
- **EDTA** - Ácido etilenodiaminotetraacético
- **FITC** - Isotiocianato de fluoresceína
- **HCl** - Ácido clorídrico
- **HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência
- **H₂DCFDA** - 2',7' diclorofluoresceína diacetato
- **KCl** - Cloreto de potássio
- **LTPs** - Proteínas Transportadoras de Lipídeos
- **M** - Marcador de massa molecular
- **NaCl** - Cloreto de Sódio
- **Na₂HPO₄** - Fosfato de sódio dibásico
- **NaH₂PO₄** - Fosfato de sódio monobásico
- **NaOH** - Hidróxido de sódio
- **NO** - Óxido nítrico
- **OVA** - Ovalbumina

- **ROS** - Espécies reativas de oxigênio
- **TFA** - Ácido trifluoroacético
- **Tris** - Tris (hidroximetil) amino etano
- **SDS** - Dodecil sulfato de sódio

RESUMO

SILVA, Marciele Souza; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2016; "ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *CaTI*, UM INIBIDOR DE PROTEINASE SERÍNICA DE *Capsicum annuum*, E PRESENÇA DE INIBIDORES SIMILARES EM OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Capsicum*"; Orientadora: Dr^a Valdirene Moreira Gomes; Conselheiros: Dr. Gonçalo Apolinário Souza-Filho e Dr. André de Oliveira Carvalho.

Nos últimos anos, devido à presença de um número cada vez maior de patógenos resistentes a diversos compostos, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) de plantas vêm despertando a atenção dos pesquisadores na tentativa de desenvolver novos agentes no controle de doenças e pragas. Desta forma, diferentes peptídeos com atividade antimicrobiana têm sido identificados em sementes de diferentes espécies de plantas. Diversos peptídeos antimicrobianos já foram identificados no gênero *Capsicum*, entre eles os da família das tioninas, das proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) e dos inibidores de proteinases serínicas. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica e o mecanismo de ação de um peptídeo denominado *CaTI*, isolado de sementes de *Capsicum annuum*, pertencente a família dos inibidores de proteinase serínicas, sobre fungos fitopatogênicos e detectar a presença de inibidores de proteinases em diferentes espécies do gênero *Capsicum*. Neste trabalho o peptídeo foi inicialmente extraído a partir de sementes de *C. annuum* e submetido a métodos cromatográficos para a sua purificação, como cromatografia de troca catiônica em

resina CM-Sepharose e cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando uma coluna C2/C18. Os resultados mostraram que *CaTI* foi capaz de inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum lindemuthianum*. Também foi observado que *CaTI* foi capaz de permeabilizar a membrana de todos os fungos testados (*C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*). Quando testamos a propriedade desse inibidor induzir as espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), pode-se observar uma indução de ROS e NO em todos os fungos. A detecção da localização de *CaTI* acoplado a FITC revelou a presença desse inibidor no interior das hifas do fungo *F. oxysporum*. A busca por inibidores de proteinase nas outras espécies de *Capsicum* revelou a presença de inibidores em todas as espécies testadas.

Palavras chaves: *Capsicum*; Inibidores de proteinase; Fungos fitopatogênicos.

ABSTRACT

SILVA, Marciele Souza; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; february, 2016; “*CaTI* ANTIFUNGAL ACTIVITY, A SERINE PROTEINASE INHIBITOR FROM *Capsicum annuum*, AND INHIBITORS SIMILAR PRESENCE IN OTHER SPECIES OF THE GENUS *Capsicum*”; Advisor: Dr^a Valdirene Moreira Gomes; Consultants: Dr. Gonçalo Apolinário Souza-Filho and Dr. André de Oliveira Carvalho.

In recent years, due to the presence of an increasing number of pathogens resistant to several compounds, plant antimicrobial peptides (AMPs) have attracted the attention of researchers as an attempt to develop new agents for controlling diseases and pests. Thus, different antimicrobial peptides have been identified in seeds of various plant species. In the *Capsicum* genus, a number of AMPs have been identified; among them, the family of thionins, lipid protein transporters (LTPs) and serine protease inhibitors. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity and mechanism of action of a serine protease inhibitor-type peptide, called *CaTI*, isolated from *Capsicum annuum* seeds, on fitopathogenic fungi, and to detect the presence of protease inhibitors in other species of this genus. The *CaTI* peptide was initially extracted from *C. annuum* seeds and subjected to chromatographic methods for its purification, such as cation exchange chromatography on CM-Sepharose resin and reverse phase C2C18 chromatography using an HPLC system. Our results showed that *CaTI* was able to inhibit the growth of the phytopathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum lindemuthianum*. It was also observed

that *CaTI* was able to permeabilize the membrane of all tested fungi (*C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*). When testing the property of the inhibitor to induce reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), it was observed an induction of ROS and NO in all fungi. By using *CaTI* coupled to FITC, it was possible to determine the presence of the inhibitor inside the hyphae of the *F. oxyporum* fungus. The search for protease inhibitors in other *Capsicum* species revealed their presence of inhibitors in all tested species.

Keywords: *Capsicum*; Protease inhibitors; Phytopathogenic fungi.

1. INTRODUÇÃO

Estatísticas revelam que em 2050 a população humana será de 9,1 bilhões de habitantes, e a produção agrícola destinada à alimentação terá de aumentar pelo menos 70%, assim, recursos básicos como água e alimentos tornar-se-ão escassos. Sabe-se que uma considerável parcela da produção de alimentos, perde-se devido ao ataque de insetos-praga, nematóides e fungos fitopatogênicos. Desta forma, há muito tempo o homem busca maneiras de combater as perdas agrícolas. A utilização de inseticidas químicos nas lavouras foi muito importante, porém, seus efeitos tóxicos são indesejados (Ferry *et al.*, 2004; Fao, 2009; Oliveira e Macedo 2011). Assim, a procura por agentes inseticidas que não apresentam efeitos indesejados sobre a saúde e ao meio ambiente tornou-se necessária. Por isso, vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de isolar proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana, estando, possivelmente, relacionados à defesa das plantas (Macedo *et al.*, 2011; Hill *et al.*, 2013).

As plantas são constantemente sujeitas a pressão dos estresses ambientais que promovem a seleção e desenvolvimento de várias formas de defesa bioquímicas e morfológicas que garantem a sobrevivência e evolução das espécies (Endara e Coley 2010). Para se proteger, as plantas produzem uma ampla gama de compostos para impedir ou retardar a penetração dos microrganismos em seus tecidos e dentre esses compostos encontram-se os peptídeos antimicrobianos (Zaslhoff 2002; Talas-Ogras, 2004; Brodgen, 2005;

Leonard *et al.*, 2011). Na última década, muitas pesquisas têm se concentrado no estudo desses peptídeos de plantas com propriedades antimicrobianas. Estas moléculas estão presentes em todas as espécies de plantas, podendo ser sintetizados nos diversos órgãos (Wang *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2004).

Os peptídeos antimicrobianos é um grupo de proteínas pequenas (com cerca de 100 resíduos de aminoácidos), que apresentam atividade sobre diversos microrganismos, como vírus envelopados, bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos (filamentosos e leveduriformes) e protozoários (Thomas *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2011; Aoki *et al.*, 2012; Khamis *et al.*, 2014; Dang *et al.*, 2015). Esses peptídeos antimicrobianos têm sido isolados de raízes, flores, caules, folhas e sementes a partir de uma grande variedade de espécies (Pelegri *et al.*, 2008; Nawrot *et al.*, 2014). Muitos desses peptídeos têm sido isolados de sementes, local em que podem ser encontrados em nível elevado se comparado a outros órgãos da planta (Broekaert *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001; Sels *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem isolando e caracterizando diferentes proteínas e peptídeos antimicrobianos presentes em sementes de diferentes espécies de plantas como *Adenantha pavonina*, *Coffea canephora*, *Passiflora flavicarpa*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculatae* *Capsicum annum* (Carvalho *et al.*, 2001; Agizzio *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2004; Diz *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Diz *et al.*, 2011; Mello *et al.*, 2011; Zottich *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2013). Neste contexto no ano de 2007, foi isolado um peptídeo de sementes de *C. annum* que apresentou similaridade de sequência com a família dos inibidores de proteases serínicas isolados de plantas. Este peptídeo, denominado *CaTI*, com massa molecular de 6 kDa, mostrou-se capaz de inibir o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida albicans* e, também foi capaz de induzir alterações morfológicas em suas estruturas, tais como: desorganização da parede celular, aglomeração celular e liberação de conteúdo citoplasmático (Ribeiro *et al.*, 2007). Nesse contexto, o presente trabalho visa dar continuidade ao estudo desse peptídeo (*CaTI*), avaliando a sua atividade e provável mecanismo de ação sobre fungos fitopatogênicos filamentosos. O modelo de estudo proposto são fungos fitopatogênicos de interesse agrônomo, responsáveis por grande perda da produtividade ocasionando várias doenças como, a antracnose pelo fungo

Colletotrichum gloeosporioides. Também se buscou verificar a presença de inibidores de proteinases em outras espécies do gênero *Capsicum*. A partir dos resultados aqui obtidos, pretende-se contribuir para um possível desenvolvimento de novos agentes de controle que possam atuar sobre esses patógenos de plantas auxiliando na diminuição de importantes doenças que levam a inúmeras perdas na agricultura.

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral:

Caracterizar a atividade antimicrobiana de um inibidor de proteinase serínica (*CaTI*) isolado de sementes de *Capsicum annuum* sobre diferentes fungos fitopatogênicos e detectar a presença de inibidores de proteinases em diferentes espécies do gênero *Capsicum*.

2.2- Objetivos específicos:

1. Purificar e acumular o inibidor de proteinase *CaTI* de semente de *C. annuum*;
2. Analisar o efeito de *CaTI* sobre o desenvolvimento de diferentes fungos fitopatogênicos através da determinação das curvas de crescimento;
3. Analisar a morfologia dos fungos através de microscopias óptica após crescimento na presença do inibidor;
4. Verificar o mecanismo de ação de *CaTI* através de ensaios para verificação da permeabilização de membranas dos fungos fitopatogênicos e a produção de espécies reativas de oxigênio;
5. Identificar a localização da interação de *CaTI* no fungo através da microscopia óptica;
6. Identificar a presença de outros inibidores de proteinases em diferentes espécies do gênero *Capsicum*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- O gênero *Capsicum*

As pimentas pertencem à família Solanacea e ao gênero *Capsicum* (do grego *kapto* que significa morder, picar). Este gênero é composto por 35 espécies, sendo que cinco dessas *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e *C. pubescens* são domesticadas e as outras são consideradas silvestres (Moscone *et al.*, 2007; Rêgo *et al.*, 2012; Carrizo *et al.*, 2013). As pimentas deste gênero são consideradas nativas das zonas tropicais e úmidas da América Central e do Sul (Reifschneider, 2000). O gênero *Capsicum* é identificado por suas características morfológicas, sendo conhecida pela morfologia da flor, incluindo a cor, constrição do caule e número de flores por axila (Ince *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2013).

As pimentas brasileiras podem variar em tamanho, forma, cor, sabor e pungência. A pungência das pimentas é uma característica peculiar deste gênero, e os responsáveis por essa característica são os capsaicinoides, constituídos por 12 ou mais alcaloides, capazes de interagir com os receptores vanilóides que ocorrem sobre a língua. A capsaicina e dihidrocapsaicina são os compostos mais predominantes responsáveis pelo sabor “quente” (Rêgo *et al.*, 2012; Giuffrida *et al.*, 2014).

As espécies que compõem este gênero estão distribuídas em três complexos gênicos distintos: o complexo *C. annum* reúne as espécies *C.*

annuum, *C. chinense* e *C. frutescens*; o complexo *C. baccatum* reúne *C. baccatum* var. *baccatum* (forma silvestres) e *C. baccatum* var. *pendulum* (forma cultivada) e o complexo *C. pubescens* reúne *C. pubescens* e algumas outras silvestres (Martins *et al.*, 2010). O Brasil contempla o maior número de espécies silvestres; e a região Sudeste apresenta-se como o principal centro de diversidade do Brasil (Reifschneider, 2000).

A espécie *C. chinense* (Figura 1A) foi originalmente encontrada na bacia do rio Amazonas, entretanto está comercialmente distribuída por todo o Sul e Norte do Brasil, devido a sua capacidade de adaptação a diferentes solos e climas, e seu popular aroma cítrico. As flores desta espécie apresentam corola branca esverdeada sem manchas. Os frutos exibem uma enorme variabilidade em tamanho, forma e cor, com diferentes intensidades variando do amarelo ao marrom (Reifschneider, 2000; Lannes *et al.*, 2007).

C. baccatum var. *baccatum* possui ampla distribuição geográfica. A ocorrência de *C. baccatum* var. *pendulum* (Figura 2B) abrange o noroeste da América do Sul, incluindo Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e sudoeste do Brasil. *C. baccatum* var. *baccatum* possui flores brancas com duas manchas esverdeadas na base (Reifschneider, 2000). A espécie *Capsicum baccatum* var. *pendulum* tem manchas amarelas e corola branca, anteras amarelas, caule ereto, uma flor por nó, fruto largo, alongado e persistente. O fruto maduro tem cor laranja (Tong e Bosland, 1999). Entre os cultivares de pimentas, *C. baccatum* tem um teor muito baixo de capsaicina e dihidrocapsaicina (Loizzo *et al.*, 2015).

C. frutescens (Figura 2C) está distribuída por toda a América Central e planícies da América do Sul e também em outras regiões tropicais e subtropicais, tais como: Ásia, África e Ilhas do Pacífico. *C. frutescens* é geralmente muito picante e tem um sabor característico. Esta espécie é constituída por plantas perenes e de maturação tardia; a altura varia de 1,5 - 2,0 m; corola branco-esverdeada; anteras púrpura a azul, às vezes amarelas; fruto imaturo variando de verde a branco amarelado; fruto geralmente vermelho a laranja escuro quando maduro; caules e folhas glabras a muito pubescentes; folhas maleáveis e mais largas do que as de *C. annuum* (Yamamoto e Nawata, 2005).

Capsicum annuum (Figura 2D) foi domesticada nas terras altas do México. Esta espécie inclui a maioria das pimentas mexicanas, pimentas quentes da África e Ásia e muitas das cultivares de pimenta doce crescidas em países

temperados. No entanto, estas espécies não estão bem adaptadas às planícies úmidas dos trópicos, onde, ao menos na América Latina, esta é substituída por *C. frutescens* e *C. chinense* (Pickersgill, 1997). Entre as pimentas, *C. annuum*, têm o maior conteúdo de fenóis e capsaicínoides (Loizzo *et al.*, 2015). De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), *C. 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 cor. A espécie *C. 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).



Figura 1 - O gênero *Capsicum* (A) *Capsicum chinense*; (B) *Capsicum baccatum* var. *pendulum*; (C) *Capsicum frutescens*; (D) *Capsicum annuum*. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Capsicum>

O gênero *Capsicum* é composto, em sua maioria, por espécies diplóides com $2n=2x=24$ cromossomos (Bosland, 1996; Blank, 1997; Belletti *et al.*, 1998) e autógamas (Allard, 1971). Entretanto, existe certo grau de polinização cruzada devido a alterações morfológicas na flor como estilete extenso, ou ainda, à ação de insetos polinizadores (Reifschneider, 2000). Variedades, plantadas juntas ou perto umas das outras, apresentam 16,5% aproximadamente, de polinização cruzada, o que acarreta aumento da variabilidade genética (Filho, 2002).

As plantas do gênero *Capsicum* são de grande importância econômica, já que são utilizadas na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. As pimentas vermelhas pertencem à classe do mais antigo e importante corante natural de comidas (Buttow *et al.*, 2010; Romo-Hualde *et al.*, 2012). Além disso, existe um grande comércio internacional de pimenta-vermelha, seca em pó, com ou sem sementes e com diversos níveis de pungência, e estas são utilizadas para o preparo de alimentos (Nascimento *et al.*, 2012).

Quanto à importância nutricional, as pimentas são fonte de três importantes antioxidantes naturais: as vitaminas C, E e os carotenóides. Produzem uma alta quantidade de vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina) e B3 (niacina) e também produzem a vitamina A (esta em menores concentrações). Os frutos de pimentas, também são fonte importante de fibras, elementos essenciais para manter uma boa digestão (Rêgo *et al.*, 2012; Wahyuni *et al.*, 2013).

Os frutos de *Capsicum* são fontes de fitoquímicos, tais como: fenóis, flavonóides e capsaicinóides. Estes compostos são fortes antioxidantes e desempenham um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e desordens neurológicas (Delgado-Vargas e Paredes-Lopez, 2003). Há evidências que o consumo de pimenta reduz o dano oxidativo que são causados pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e estas estão envolvidas na patogênese de várias doenças humanas (Loizzo *et al.*, 2015).

É importante ressaltar que os frutos de *Capsicum* são importantes fontes proteicas. Atualmente são vários os números de genes identificados nesta planta e que estão relacionados à expressão de proteínas com efeitos antimicrobianos, podendo vir a servir como ferramentas úteis para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Reifschneider *et al.*, 2000).

Para que os frutos das pimentas possam crescer saudáveis, estas precisam se defender de inúmeras doenças causadas por diferentes agentes

patogênicos. Entre elas encontram-se as doenças causadas por fungos como a Murcha de Fitóftora, causada pelo fungo fitopatogênico, *Phytophthora capsici*, que ocasiona a murcha repentina e necrose seguida de morte da planta. Os sintomas aparecem nas folhas, caule, ramos e frutos, onde são observadas lesões encharcadas, necrose e apodrecimento. O oídio, doença causada pelo fungo *Oidiopsis sicula*, apresenta um sintoma inicialmente observado na face superior das folhas e consiste de manchas cloróticas. Na face inferior, observa-se o desenvolvimento de um micélio pulverulento branco, pouco denso. Em condições favoráveis à doença, ocorre desfolha acentuada das plantas, a partir das folhas mais velhas, com conseqüente redução na produtividade (Reis *et al.*, 2011).

Os fungos do gênero *Colletotricum*, são causadores da antracnose, uma das doenças de grande importância que atingem plantas de diversas culturas. Esta doença é caracterizada por causar danos diretos nos frutos, inviabilizando sua comercialização, os sintomas da doença iniciam-se com pequenas áreas arredondadas e deprimidas. Em pimentão e pimentas aqui do Brasil, o principal agente causador da doença é o fungo *C. gloeosporioides* (Mendes *et al.*, 1998; Azevedo *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2011). 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 acontecem principalmente na pós-colheita (Serra e Silva, 2005; Tavares, 2004).

O gênero *Fusarium*, por exemplo, constitui um dos grupos de fungos filamentosos mais estudados, uma vez que é responsável por diversos tipos de infecções em várias espécies de plantas, sendo a mais conhecida a murcha de *Fusarium* que causa perdas significativas em diversas plantações (Brown *et al.*, 2006). Fungos deste gênero apresentam facilidade em formar diversas colônias nas plantas e, conseqüentemente, espalham-se rapidamente para o solo e outras plantas (Burgess, 1981).

Diante dessas inúmeras doenças que podem causar diversos prejuízos a cultura da pimenta, várias pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de isolar compostos que possam atuar na defesa destes vegetais.

3.2- Defesas das plantas

As plantas constituem o maior grupo de forma de vida autotrófica da terra e são fontes de nutrientes e energia para diversos organismos. Seu material orgânico serve como fonte nutricional para todos os organismos heterotróficos. Estas possuem um estilo de vida sedentário, com extensas estruturas aéreas e subterrâneas que lhes permite obter luz e nutrientes do ambiente, porém, por outro lado, as tornam particularmente vulneráveis a ação de diferentes agentes externos, tais como: fungos, vírus, bactérias, protozoários, herbívoros, bem como a diferentes alterações climáticas como: variações de temperatura, umidade e pH (Mithofer e Boland, 2012; Dang *et al.*, 2015).

Apesar de serem organismos incapazes de se locomover, ao longo da evolução desenvolveram diversos mecanismos de defesa, sejam eles bioquímicos ou morfológicos, que as tornaram capazes de perceber e responder a essas diferentes alterações ambientais facilitando a sua sobrevivência (Hammond-Kosack e Jones, 2000; Castro e Fontes, 2005; Cushnie *et al.*, 2014).

Essas defesas das plantas podem ser agrupadas em duas grandes categorias: as constitutivas (pré-formadas) e as induzidas (pós-contato). As defesas constitutivas fazem parte do programa de desenvolvimento normal da planta e são produzidas continuamente, protegendo-as em um primeiro momento. Esta é uma questão custo *versus* benefício, uma vez que os mecanismos de defesa de plantas são custosos energeticamente. Assim, as plantas combinam crescimento e desenvolvimento com a defesa (Ferreira *et al.*, 2007; Furstenberg-Hagg *et al.*, 2013). 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, geração concomitante de espécies reativas de oxigênio (ROS), 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 (Stamp, 2003; Heil, 2010).

As repostas produzidas pelas barreiras físicas e químicas fazem parte tanto da defesa constitutiva quanto da defesa induzida. As defesas físicas incluem estruturas que exercem funções protetoras como os pêlos, os espinhos, os tricomas, as ceras e o tegumento resistente nas sementes, que impedem ou

dificultam o ataque dos patógenos. Nas defesas químicas, as plantas utilizam a liberação de moléculas antimicrobianas, por exemplo, compostos do metabolismo secundário como as fitoalexinas e do metabolismo primário como proteínas e diversos peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Leitner *et al.*, 2005; Egorov e Odintsova, 2012; Mithofer e Boland, 2012).

Desta forma, diferentes classes de proteínas têm sido identificadas funcionando como importantes componentes da defesa de plantas. Entre estas incluem as lectinas, as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), os inibidores de protease, as ureases e os peptídeos antimicrobianos (Dang *et al.*, 2015).

3.3- Peptídeos antimicrobianos de plantas

Como parte da resposta de defesa, as plantas produzem um elevado número de moléculas tóxicas, dentre essas moléculas encontram-se os peptídeos antimicrobianos (AMPs). A grande maioria desses peptídeos age diretamente sobre o agressor impedindo seu desenvolvimento, exibindo assim atividades antimicrobianas e/ou inseticidas (Castro e Fontes, 2005; Nawrot *et al.*, 2014; Dang *et al.*, 2015). Estas moléculas são importantes na defesa contra infecções por diferentes tipos de patógenos (Minami *et al.*, 1998; Lowenberger *et al.*, 1999; Gallo *et al.*, 2002; Brogden, 2005), podendo representar potencialmente uma nova classe de drogas antifúngicas (Zasloff, 2002; Hancock e Sahl, 2006; Schneider *et al.*, 2010).

Estes peptídeos antimicrobianos são moléculas de baixa massa molecular podendo variar de 3 a 10 kDa, apresentam uma ampla atividade inibitória contra diversos microrganismos como bactérias, fungos, vírus envelopados e protozoários (Guaní-Guerra *et al.*, 2010; Dang *et al.*, 2015). Pertencem a um grupo diverso e abundante de moléculas que são produzidas tanto pelas plantas quanto por animais (Gallo *et al.*, 2002; Brogden, 2005; Mihajlovic *et al.*, 2010). A maior parte desses peptídeos antimicrobianos consiste de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, são anfipáticos, ou seja, carregam uma porção elevada de resíduos hidrofóbicos (cerca de 30%) e carregam uma carga líquida positiva em pH fisiológico (Van't Hof *et al.*, 2001; Giuliani *et al.*, 2007). Os AMPs podem ser classificados como aqueles que possuem ou não pontes dissulfeto (Yeaman e Yount 2003), sendo os mais clássicos aqueles que as possuem, sendo possível

observar a presença de cisteínas em número par (4, 6 ou 8) as quais encontram-se interconectadas formando pontes dissulfeto, o que irá conferir alta estabilidade a esses peptídeos (Broekaert *et al.*, 1997; Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser divididos levando-se em consideração, principalmente, suas características estruturais. Geralmente, esses peptídeos presentes em plantas possuem estrutura tridimensional globular, estabilizada pela presença das pontes dissulfeto. Entre eles estão: as snakinas, peptídeos do tipo heveína, peptídeos do tipo knotinas, peptídeos MBP-1, peptídeos macrocíclicos, proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs), defensinas, e as tioninas (García-Olmedo *et al.*, 2001, Ribeiro *et al.*, 2007). Seguem na tabela 1, as principais características dessas famílias.

Tabela 1 – Peptídeos antimicrobianos de plantas e suas atividades biológicas

| Nome | Atividade inibitória | Referências |
|---------------------------------------|---|---|
| Defensinas | Bactéria G+, fungos e α -amilase de inseto | Thomma <i>et al.</i> , 2002; Bloch Jr. C and Richardson M, 1991 |
| Proteínas transportadoras de lipídeos | Bactéria G+ e fungos | Kader, 1996; Carvalho and Gomes, 2007 |
| Tioninas | Bactéria G+ e G-, e fungos | Broekaert <i>et al.</i> , 1997 |
| knotinas | Bactéria G+ e fungos | Broekaert <i>et al.</i> , 1997 |
| Snakinas | Bactéria G+ e G-, e fungos | Segura <i>et al.</i> , 1999 |
| Ac-AMP-1, Ac-AMP-2 e Ar-AMP1 | Fungos | Broekaert <i>et al.</i> , 1992; Lipkin <i>et al.</i> , 2005 |
| Mj-AMP1 e Mj-AMP2 | Bactéria G+ e G-, e fungos | Cammue <i>et al.</i> , 1992 |
| MBP-1 | Bactéria G+ e fungos | Duvick <i>et al.</i> , 1992 |
| inibidores de proteinase | Fungos | Ribeiro <i>et al.</i> , 2007; Sels <i>et al.</i> , 2008 |

Fonte: Ribeiro *et al.*, 2007., adaptado por Gomes, 2011.

Os AMPs possuem um mecanismo de ação pouco estudado, mas sabe-se que devido à sua natureza catiônica e anfipática, estes podem interagir, por forças eletrostáticas, com cargas negativas da parede e/ou das cabeças polares dos fosfolipídios na membrana, permitindo assim o acúmulo desse peptídeo. Desta

forma, os peptídeos em alguns organismos podem causar a ruptura da membrana, já em outros a membrana não se rompe e o AMP pode atravessar a membrana e interagir com alvos intracelulares (Pellegrini e Franco 2005; Nguyen *et al.*, 2011; Aoki *et al.*, 2012; Bahar e Ren, 2013). A maioria dos peptídeos conhecidos atuam na formação de poros da membrana, resultando no vazamento de metabólitos, despolarização, interrupção dos processos respiratórios, e morte celular (Pellegrini *et al.*, 2011). Em relação aos alvos intracelulares, sabe-se que AMPs se translocam pela membrana e bloqueiam processos celulares, como inibição da síntese de DNA e de proteínas, da atividade enzimática e podem causar dano mitocondrial (Friedrich *et al.*, 2000; Cudic e Otvos Jr, 2002; Powers e Hancock, 2003; Brogden, 2005). Além disso, podem inibir a síntese de parede celular e aumentar os efeitos no metabolismo e nas vias bioenergéticas (Brumfitt *et al.*, 2002; Luque-Ortega *et al.*, 2008; Wimley, 2010).

O papel dos AMPs de plantas na defesa tem sido confirmado pela observação do aumento da resistência a doenças em plantas transgênicas; regulação positiva de genes de AMPs em resposta à infecção; localização predominante em camadas de células periféricas e em tecidos especialmente sensíveis à infecção e propriedades antimicrobianas diretas (Rivas *et al.*, 2010; Pellegrini *et al.*, 2011; Odintsova e Egorov, 2012; Yount e Yeaman 2013). Vários trabalhos vêm demonstrando o papel desses peptídeos de plantas. Nosso grupo, por exemplo, vem isolando e caracterizando diferentes proteínas e peptídeos presentes nas sementes de diferentes espécies de plantas, os quais estão envolvidos nos mecanismos de defesa dessas plantas. Na tabela 2, observa-se a listagem desses peptídeos, sua respectiva família, planta de origem e sua atividade antimicrobiana.

Tabela 2- Listagem dos peptídeos antimicrobianos isolados de sementes de diferentes famílias

| FAMÍLIA | ORIGEM | ATIVIDADES BIOLÓGICAS | REFERÊNCIA |
|------------------------|---|---|-------------------------------|
| Defensina | Feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>) | Antifúngica | Carvalho <i>et al.</i> , 2001 |
| Albumina 2S | Maracujá amarelo (<i>Passiflora edulis flavicarpa</i>) | Antifúngica | Agizzio <i>et al.</i> , 2003 |
| LTP | Feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>) | Antifúngica | Carvalho <i>et al.</i> , 2004 |
| LTP | Pimenta (<i>Capsicumm annuum</i> L.) | Antifúngica | Diz <i>et al.</i> , 2006 |
| Inibidor de proteinase | Pimenta (<i>Capsicumm annuum</i> L.) | Antifúngica | Ribeiro <i>et al.</i> , 2007 |
| LTP | Pimentão (<i>Capsicumm annuum</i> Var. <i>Ikeda</i>) | Antifúngica | Cruz <i>et al.</i> , 2010 |
| LTP | Pimenta (<i>Capsicumm annuum</i> L.) | α -amilases de insetos e mamíferos | Diz <i>et al.</i> , 2011 |
| LTP | Café (<i>Coffea canephora</i>) | α -amilases de insetos e mamíferos | Zottich <i>et al.</i> , 2011 |
| Defensina | Feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>) | Anti-Parasita | Souza <i>et al.</i> , 2013 |

Fonte: Silva, 2014

3.4- Inibidores de proteinase serínica de plantas

Nas plantas, é possível encontrar uma grande diversidade de biomoléculas. Dentre os metabólitos presentes nos extratos de plantas com possíveis aplicações industriais, encontra-se a classe proteica dos inibidores de proteinases (PIs, do inglês *proteinase inhibitor*). Sua existência na natureza foi relatada pela primeira vez no século XIX, por Fermi e Pernossi (1894). Estas moléculas podem ser encontradas em diversas espécies de plantas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas, estando presentes em órgãos vegetativos, reprodutivos e de reserva (Hap *et al.*, 2004; Macedo *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011). Os inibidores

de proteinase são proteínas, cuja massa molecular varia entre 4 e 85 kDa, capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, bloqueando reversível ou irreversivelmente a sua atividade catalítica (Richardson 1991; Chye *et al.*, 2006).

Os inibidores, em geral, são caracterizados por serem moléculas estáveis, com resistência ao calor, variação de pH e a proteólise por proteinases, presentes no meio intra e extracelular (Macedo e Xavier, 1993; Habid e Fazili, 2007; Jamal *et al.*, 2013). Estudos mostram que nas plantas, os inibidores apresentam diversas funções, podendo atuar como reguladores de proteases endógenas, proteínas de reserva e como agentes de defesa vegetal contra insetos, microrganismos e outros animais herbívoros (Oliveira *et al.*, 2011).

Os inibidores de proteinases são classificados de acordo com a classe de enzima inibida, podendo ser da família dos inibidores serino proteinases, cisteíno proteinases, proteinases aspárticas e metalo proteinases. A inibição da atividade catalítica é alcançada pela interação entre o inibidor e o sítio catalítico enzimático. A região molecular responsável pela formação do complexo enzima-inibidor é chamada de sítio reativo e apresenta uma composição de aminoácidos diferentes para cada classe de inibidor. Logo, o sítio reativo é então reconhecido pela enzima, ocorrendo à formação do complexo (Lawrence e Koundal, 2002; Ramos *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011).

Baseado nas homologias evidentes das suas estruturas primárias, localização das pontes dissulfeto e posição de seus sítios reativos, os inibidores de serino proteinase de plantas têm sido agrupados em diferentes famílias. Estas famílias diferem principalmente nos seus pesos moleculares, no conteúdo das pontes dissulfeto e nas suas estruturas tri-dimensionais. As famílias conhecidas são: inibidor de tripsina da soja (Kunitz), inibidor Bowman-Birk, inibidor de tripsina da cevada, inibidores I e II da batata e do tomate, inibidor da abóbora, dentre outros (tabela 3) (Norton *et al.*, 1991; Hayashi *et al.*, 1994; Farran *et al.*, 2002; Ledoigt *et al.*, 2006).

Tabela 3 – Exemplos de famílias de inibidores de proteinases serínicas de plantas, suas fontes e proteases alvo

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

Fonte: Adaptada de Habib e Fazili, 2007.

Entre os inibidores, a família Kunitz é a melhor caracterizada em decorrência de sua maior abundância nas sementes (Oliva *et al.*, 2011). Estas são proteínas com peso molecular geralmente entre 18-22 kDa, constituídas de uma ou duas cadeias polipeptídicas. Poucos resíduos de cisteína estão presentes (normalmente 4 resíduos formando duas pontes dissulfeto) e há presença de um resíduo de arginina em seu único sítio reativo (Park *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2011). Os membros desta família são principalmente ativos contra serino

proteínases e foram mostradas para inibir a tripsina, quimotripsina e subtilisina (Laing e McManus, 2002). Algumas diferenças entre estruturas primárias e topologia são observadas, no entanto, a estrutura e mecanismo de ação são bem preservados entre os inibidores de serinoproteases (Oliveira *et al.*, 2011).

Nas plantas, os IPs podem ser encontrados como componentes constitutivos presentes nos tecidos de reserva de tubérculo e de sementes ou serem expressos em resposta ao ataque de insetos e patógenos, inibindo a ação de proteases digestivas presentes, sobretudo nos mamíferos e insetos, assim como enzimas presentes nas bactérias e nos fungos (Bariani *et al.*, 2012; Dang *et al.*, 2015).

Durante as últimas décadas, os inibidores de proteases ganharam muita atenção devido ao seu forte papel na defesa das plantas (Valueva e Mossolov, 2004; Kim *et al.*, 2009). Em um trabalho recente, plantas transgênicas que expressam em excesso inibidores de protease foram construídas de modo que aumentasse a resistência aos patógenos, insetos e nematóides. Dunse *et al.* (2010a) utilizando uma combinação do tipo de inibidores de proteases I e II da batata, conseguiram aumentar a resistência do algodão contra os danos causados pelo inseto *Helicoverpa armigera* em condições de laboratório, e de campo (Lawrence e Koundal, 2002).

São vários os trabalhos que demonstram a capacidade dos IPs inibir a atividade de proteases específicas; e ao mesmo tempo possuírem atividade antimicrobiana. Ye *et al.* (2001) purificaram de uma leguminosa um inibidor de tripsina/quimiotripsina de 7,5 kDa que possui atividade contra os fungos *Mycosphaerella arachidicola*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*. Yang *et al.* (2006) isolaram um inibidor de tripsina de sementes *Psoralea corylifolia* L. denominada de *Psa-AFP* com massa molecular de 18 kDa, e que também possui atividade antimicrobiana contra os fungos *Alternaria niger*, *Aspergillus brassicae*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia cerealis*. Isoformas de inibidores de proteases serínicas foram purificados de sementes de *Acacia plumosa* Lowe e denominados *ApTIA*, *ApTIB* e *ApTIC*, estes possuem massa molecular de 20 kDa e foram testados contra diferentes fungos fitopatogênicos e pode-se observar que estes inibiram o crescimento de *Aspergillus Niger*, *Thielaviopsis paradoxa* e *Colletotrichum* spp. Dias *et al.* (2013) isolaram um inibidor de sementes de *C. chinense*, denominado *PEF2* que foi capaz de inibir o crescimento das leveduras

Candida albicans, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus* além de causar aglomerações celulares em todas as leveduras testadas.

Com o objetivo de isolar e caracterizar diferentes peptídeos, alguns trabalhos foram realizados utilizando sementes de *Capsicum annum* L. (Diz *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007). No trabalho descrito por Ribeiro *et al.*, 2007, umas das frações resultantes, denominada F3Ca, enriquecida em peptídeos básicos, variando de 6 a 11 kDa, foi submetida a cromatografia de fase reversa em HPLC, resultando em 3 outras frações denominadas RR1, FR2 e FR3. A análise em banco de dados revelou similaridade da fração FR2, a qual continha um único peptídeo de 6 kDa, com inibidores de proteinases serínicas da família Kunitz. Durante testes de atividade biológica esta fração foi capaz de inibir o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Pichia membranifaciens*, *C. parapsilosis*, *Kluyveromyces marxianus* and *C. guilliermondii*. Este inibidor de proteinase, agora denominado de CaTI, foi objeto de estudo deste trabalho, o qual é extensivo ao esclarecimento da atividade antimicrobiana deste inibidor contra os fungos fitopatogênicos de relevância agrônômica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Materiais biológicos

4.1.1- Sementes

As sementes de *Capsicum annuum* L. (Acesso UENF 1381), *Capsicum baccatum* (Acesso UENF 1732), *Capsicum baccatum* (Acesso UENF 1496), *Capsicum chinense* (Acesso UENF 1498) e *Capsicum frutescens* (Acesso UENF 1775), foram selecionadas no banco de germoplasma e fornecidas para plantio 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. Inicialmente as plantas foram cultivadas em câmara de crescimento a 28 °C e 80 UR com fotoperíodo de 16 h para o dia e 8 h para à noite. Os plantios das sementes foram realizados 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. Posteriormente foram transplantadas para casa de vegetação e cultivadas sob a mesma forma de tratamento durante o período de três meses para início do aparecimento de frutos. Em seguida, deu-se continuidade ao mesmo tratamento anteriormente falado durante todo o período necessário para obtenção de uma quantidade suficiente de sementes para realização das extrações.

4.1.2- Fungos Filamentosos

Os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* (5522), *Colletotrichum lindemuthianum* (5771), *Fusarium oxysporum* (5845) e *Fusarium solani* (4014) foram crescidos e mantidos em culturas conservadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismo (LFBM), no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

4.2- Métodos

4.2.1- Obtenção do inibidor de proteinase serínica (*CaTI*)

4.2.1.1- Extração proteica

Sementes dos diferentes acessos do gênero *Capsicum* foram inicialmente maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de uma farinha de fina granulação. As proteínas da farinha obtida foram extraídas segundo metodologia desenvolvida por Ribeiro *et al.* (2007). Inicialmente o material foi extraído em tampão fosfato pH 5,4 (Na_2HPO_4 0,01 M; NaH_2PO_4 0,015 M; KCL 0,1 M; EDTA 1,5 %) na proporção de 1:10 (farinha:tampão), por 3 h, a 4°C, sob agitação constante. O homogeneizado resultante foi centrifugado a 15.400 x g por 30 min a 4°C, e o sobrenadante resultante submetido à precipitação com sulfato de amônio a 90% de saturação. Após 16 h, este material foi novamente submetido a uma centrifugação (15.400 x g por 30 min a 4°C) e o precipitado resultante ressuspenso em 10 mL de água destilada e aquecido por 15 min a 80°C. Em seguida, novamente, centrifugado (8.000 x g por 10 min a 4°C). O sobrenadante assim obtido, denominado extrato rico em peptídeos (ERP), foi ressuspenso e dialisado contra água destilada.

4.3 - Isolamento do *CaTI* e de outros inibidores de proteinases serínicas

4.3.1 - Cromatografia de troca catiônica (CM-Sepharose)

Uma coluna catiônica CM-Sepharose (1,5 x 50 cm) foi primeiramente empregada para o isolamento dos inibidores. A resina foi empacotada sob fluxo constante, sendo lavada sequencialmente com água destilada, HCl 0,1 M, novamente com água destilada, NaOH 0,1 M, novamente em água destilada e, por fim, equilibrada com tampão de equilíbrio da coluna, tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0. Após ativação e equilíbrio da coluna, 20 mg dos extratos proteico, liofilizado, foram dissolvidos em 5 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0, centrifugado por 5 min, a 16.000 x g, a temperatura ambiente e aplicados à coluna. Foram coletadas frações de 3 mL, num fluxo contínuo de 30 mL.h⁻¹. As primeiras 15 frações foram eluídas com tampão de equilíbrio. Em seguida foi feito um gradiente, com molaridades crescentes de NaCl, a cada 15 frações. As absorvâncias das frações foram monitoradas a 280 nm. A fração F3 (eluída com 0,2 M de NaCl) já identificada como rica em inibidores no trabalho de Ribeiro *et al.*, 2007 foi a escolhida para as etapas seguintes de análise de todos os acessos.

4.3.2 - Cromatografia de fase reversa em HPLC

Uma coluna de fase reversa C2/C18 equilibrada com 0,1% de TFA foi empregada sequencialmente no processo de isolamento dos inibidores. A fração F3 de cada acesso obtida após cromatografia em coluna CM-Sepharose foi solubilizada em TFA 0,1% e 450 µL foram injetados na coluna. Sendo que 400 µL foi da fração F3 e 50 µL foi de TFA 0,1%. As cromatografias foram desenvolvidas utilizando-se um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, numa temperatura de 30 °C em sistema de HPLC. Para a eluição das proteínas da coluna, foi feito um gradiente de ACN (0 - 80%). Inicialmente, nos 10 primeiros minutos, a coluna foi lavada com TFA 0,1% e ACN 2% em água ultrapura (Solução A) e, em seguida, um gradiente foi sendo formado, pela mistura da solução A e 80% de ACN em TFA 0,1% (Solução B), por cerca de 48 min. Após este período, a coluna foi lavada com 100% da solução B totalizando 60 min. A eluição da coluna foi acompanhada por um detector do tipo DAD, sendo as absorvâncias lidas a 220 nm. As frações peptídicas obtidas de cada acesso e o *CaTI* foram acumulados e secos em liofilizador e utilizados nos respectivos ensaios.

4.4 - Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS

A eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE foi feita segundo método de Schaggner e Von Jagow (1987). Foram usadas placas de vidro 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 mm. Cada uma das amostras foram ressuspensas em tampão de amostra e preparadas na presença de β -mercaptoetanol (5%). As amostras foram aquecidas por 5 min a 100°C e centri fugadas a 15.000 x g por 5 min. Após este procedimento 20 μ L das amostras foram aplicadas no gel. A corrida foi realizada a uma voltagem constante de 24 V, por 16 h.

Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado em uma solução corante (Coomassie Blue R 0,05% por aproximadamente duas horas). Após esse período o corante foi retirado e o gel mantido em uma solução descorante até a visualização das bandas proteicas.

4.5 - Quantificação de Proteína

As determinações quantitativas de proteínas foram feitas através do método do ácido bicinconínico, descrito por Smith *et al.* (1985), com modificações. Ovalbumina foi utilizada como proteína padrão.

4.6 - Inibição da atividade da tripsina

A atividade inibitória dos peptídeos foi determinada medindo-se a atividade hidrolítica residual da tripsina através do uso dos substratos BApNA (estoque 5 mM), após pré-incubação com os peptídeos. A atividade proteolítica foi determinada pela incubação de 10 μ L dos peptídeos com 10 μ L de tripsina e 25 μ L de BApNA em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) a 37°C, num volume final de 200 μ L. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato foi acompanhada fotometricamente pela medida de absorvância de *p*-nitroanilida liberada a 405 nm. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows) (Adaptado de Macedo *et al.*, 2007).

4.7- Análise da atividade antifúngica do *CaTI*

4.7.1- Obtenção dos esporos dos fungos filamentosos

Discos contendo os fungos filamentosos foram colocados para crescer em placas de Petri contendo ágar *Sabouraud* por um período de 11 dias, a 30°C. Após esse período, os fungos foram utilizados em ensaios isolados no qual, foi adicionado 10 mL de meio de cultura (caldo *Sabouraud*) sobre as placas e com auxílio de uma alça de *Drigalski*, os esporos foram retirados. Os fungos filamentosos foram filtrados em gazes para se obter esporos sem a presença de hifas. Posteriormente, foi realizada a quantificação dos esporos dos fungos filamentosos em câmara de *Neubauer* através do uso de um microscópio óptico.

4.7.2- Análise da inibição do crescimento dos fungos filamentosos

Em placa de 96 poços, o inibidor *CaTI* foi adicionado em diferentes concentrações junto a 2×10^3 esporos.mL⁻¹ dos fungos filamentosos e meio de cultura, em um volume final de 100 µL. Para observação da inibição do crescimento fúngico, a densidade óptica foi monitorada a partir de leituras em leitor de microplacas num comprimento de onda de 620 nm. A leitura da placa foi feita a cada 6 h, num período total de 48 ou 54 horas. A placa foi incubada em estufa a 30°C. Todo o ensaio foi realizado em triplicada e sob condições de assepsia em capela de fluxo laminar, segundo metodologia descrita por Broekaert *et al.* (1990), com modificações. 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) .

4.8- Análise morfológica dos fungos filamentosos tratados com *CaTI*

Após ensaio de inibição do crescimento, os esporos dos fungos filamentosos, tanto os crescidos na ausência quanto os crescidos na presença do *CaTI*, foram retirados da placa de 96 poços e visualizados em microscópio óptico (Axio Zeiss, Imager, A,2).

4.9- Ensaio para verificação da permeabilização de membranas dos fungos filamentosos

A permeabilização das membranas dos fungos tratados na ausência e na presença de *CaTI* ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$), foi avaliada através da utilização do corante fluorescente *SYTOX Green*, segundo metodologia descrita por Thevissen *et al.*, 1999, com algumas modificações. *SYTOX Green* é um corante que possui alta afinidade por ácidos nucleicos (DNA) que penetra facilmente nas células quando sua membrana está comprometida, ao se ligar a ácidos nucleicos, se torna fluorescente. Após 24 a 30 horas do ensaio de inibição do crescimento dos fungos, alíquotas foram incubadas sob agitação constante por 30 min com o *SYTOX Green* a uma concentração de $0,2 \mu\text{M}$ de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Posteriormente, os fungos foram analisados em microscópio óptico equipado com um conjunto de filtros fluorescentes (Axio Zeiss, Imager A,2).

4.10- Ensaio para verificação da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A indução da produção endógena de ROS em células de fungos tratadas com *CaTI* foi avaliada através da utilização do corante fluorescente H_2DCFDA (2',7' diclorofluoresceína diacetato), segundo metodologia descrita por Mello *et al.* (2011). Após 24 a 30 horas do ensaio de inibição do crescimento, os $100 \mu\text{L}$ das células das diferentes espécies de fungos filamentosos, crescidas na ausência e na presença de *CaTI* ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram incubada sob agitação constante com o corante fluorescente a uma concentração final de $20 \mu\text{M}$, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Este corante é um composto estável, não fluorescente, lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células. As espécies reativas de oxigênio produzidas oxidam este corante, o qual emite fluorescência. Após 2 h de incubação, a temperatura ambiente com agitação constante, as células foram analisadas em microscópio de fluorescência (Axiophoto Zeiss) equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para

detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 - 490 nm e emissão de 500 nm). Os resultados representam experimentos em triplicata.

4.11 - Ensaio de determinação da indução de óxido nítrico (NO) intracelular

A indução da produção endógena de NO em células de fungos crescidos na ausência e presença de *CaTI* foi analisada como descrito no item 4.10, com a seguinte diferença: foi usado um corante fluorescente específico para o óxido nítrico, DAF₂DA (3-amino, 4 aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato) à concentração final de 20 µM, segundo metodologia descrita por Mello *et al.* (2011).

4.12 - Localização de *CaTI* conjugada ao FITC por microscopia óptica

Para o acoplamento de *CaTI*, 192 µg.mL⁻¹ foi ressuspensão em 100 µL de tampão bicarbonato de sódio 750 mM, pH 9,5 contendo FITC (isotiocianato de fluoresceína) a 50 µg.mL⁻¹ (anteriormente solubilizado em DMSO). Esta solução foi incubada com agitação constante a 500 rpm durante 2 h a 30 °C. Após esta incubação, a amostra foi submetida à cromatografia de filtração em gel usando a coluna Sephadex G25 (Sigma) para a eliminação do FITC-livre e recuperação do *CaTI* acoplado ao FITC. A coluna foi equilibrada com Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 a um fluxo de 0,3 mL.mim⁻¹. Após o acoplamento, 64 µg.mL⁻¹ de *CaTI* -FITC foi incubada com os esporos do fungo *F. oxysporum*, durante 24 h em microplacas de 96 poços. As células foram analisadas por DIC em microscópio óptico (Axiovision 4, Zeiss) equipado com um filtro de fluorescência para detecção da fluoresceína (comprimento de onda de excitação, 450-490 nm, comprimento de onda de emissão de 500 nm). Todo o ensaio foi realizado protegido da luz segundo metodologia descrita por Taveira *et al.* (2016).

5. RESULTADOS

5.1. Purificação do inibidor de proteinase *CaTI*

A cromatografia de troca catiônica em coluna de CM-Sepharose do extrato total mostrou a presença de três diferentes picos, os quais foram denominados de F1Ca, F2Ca e F3Ca (Figura 2A). O terceiro pico denominado F3Ca foi submetido à cromatografia de fase reversa como etapa final no processo de purificação do inibidor *CaTI*. A figura 2B, mostra que esta fração foi sub-fracionada em três picos denominados FR1, FR2 e FR3, apresentando diferentes tempos de eluição. O resultado obtido foi o mesmo descrito por Ribeiro *et al.*, 2007. No pico FR2 encontra-se obtido com o tempo de retenção de aproximadamente 25,31 min, o inibidor purificado como mostrado no “insert” da figura 2.

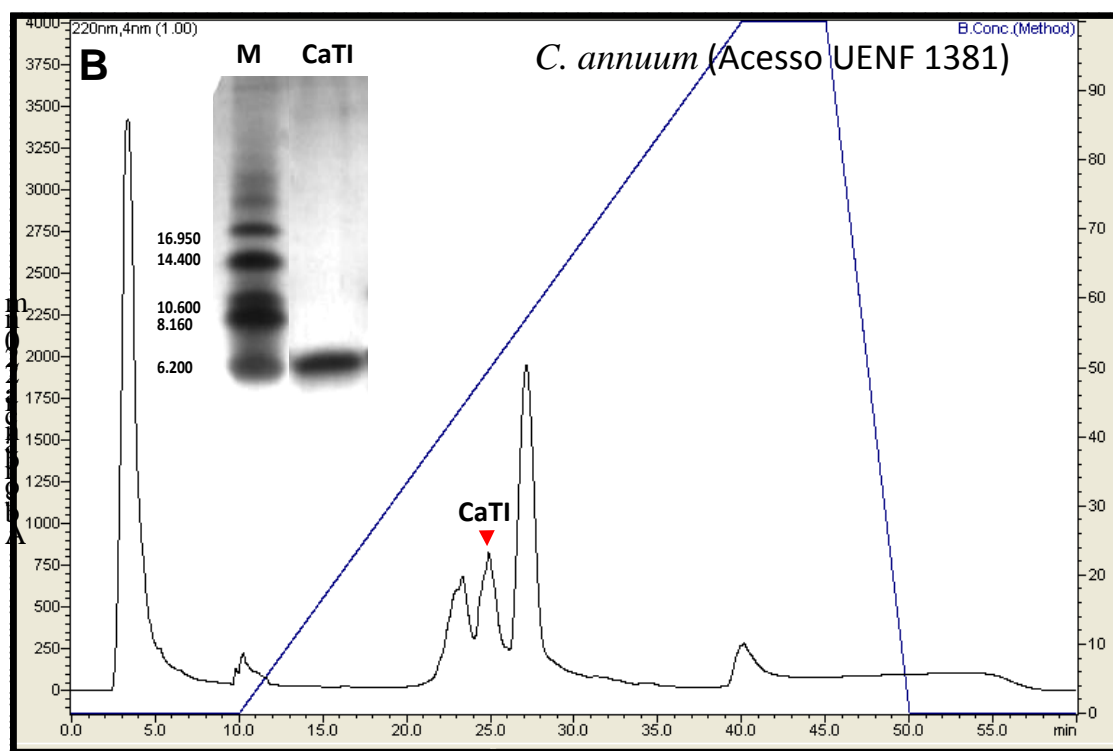
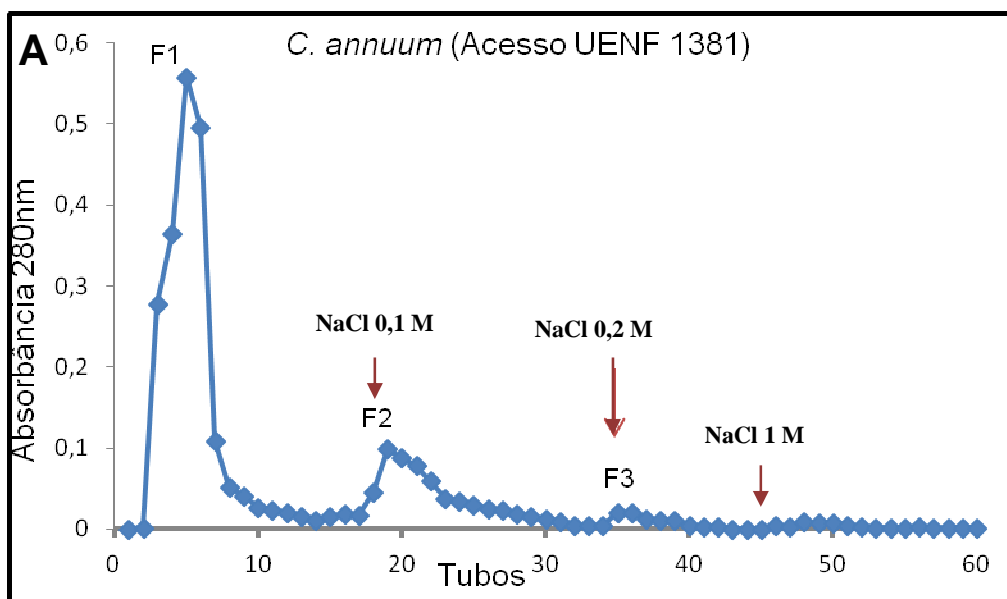


Figura 2 – Purificação de *CaTI* das sementes de *C. annuum*: **(A)** Cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sepharose. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 20 mM, pH 8,0. F1Ca foi eluído da coluna com tampão de equilíbrio, F2Ca foi eluído com tampão de equilíbrio contendo 0,1M de NaCl e F3Ca foi eluído com tampão de equilíbrio contendo 0,2 M de NaCl; **(B)** Cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 da fração F3Ca HPLC. A coluna foi equilibrada com uma solução de TFA 0,1 %. As frações foram eluídas através de um gradiente de acetonitrila de 0 a 80 %.

5.2- Análise da atividade antifúngica de *CaTI* sobre fungos filamentosos

Um ensaio quantitativo, para analisar o efeito de *CaTI* sobre o crescimento de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos foi realizado. Na figura 3, foi possível observar o crescimento dos fungos na presença de 64 e 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do *CaTI*, em tempos que variaram de 48 a 54 h (dependendo da espécie fúngica testada). As análises foram iniciadas, verificando o efeito do *CaTI* sobre o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, uma espécie considerada fitopatogênica para espécies do gênero *Capsicum*. Consta-se que na presença de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do *CaTI*, o fungo teve o seu crescimento inibido em 32% ($p < 0,05$) e quando crescido na presença de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, essa inibição foi de 28%, ($p < 0,05$).

Para o crescimento de *Colletotrichum lindemuthianum*, pode-se observar que, quando crescido em meio contendo 64 e 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *CaTI*, houve uma inibição significativa ($p < 0,05$) do seu crescimento em torno de 21 e 30 %, respectivamente.

Verificou-se também o efeito de *CaTI* sobre o crescimento de *Fusarium oxysporum*. Foi possível notar que, este fungo quando crescido em meio contendo 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do *CaTI*, sofreu uma inibição em torno de 20%. Quando crescido na presença de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, nenhuma inibição foi observada.

Já ao observar o gráfico do crescimento do fungo *Fusarium solani*, verifica-se que o *CaTI* não foi capaz de inibir o crescimento deste fungo em nenhuma das concentrações testadas.

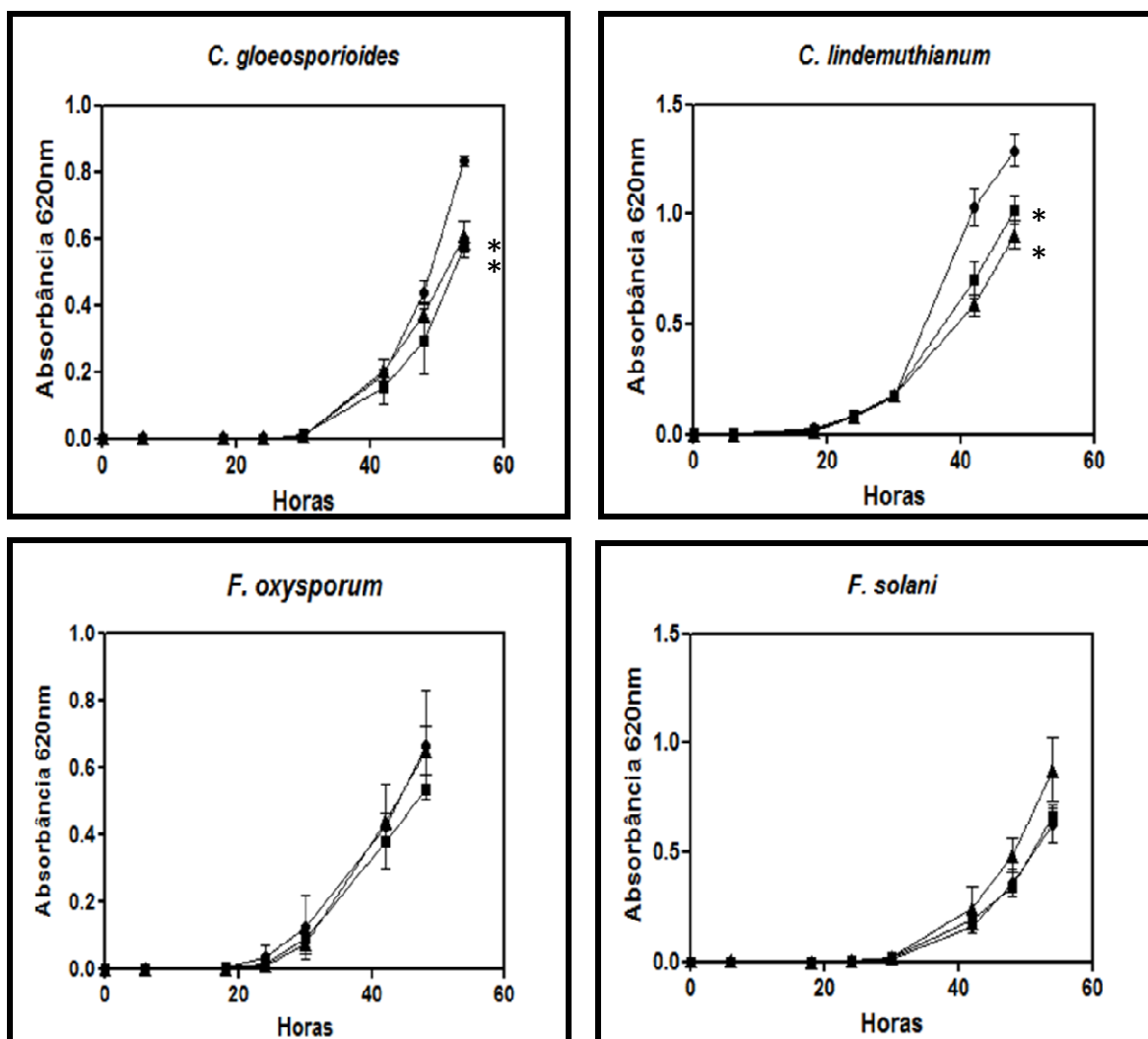


Figura 3 – Efeito do *CaTI* sobre o crescimento dos fungos fitopatogênicos: *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* e *F. solani*. O crescimento dos fungos foi observado entre 48 a 54 h. (- ●) Controle; (- ■) 64 µg.mL⁻¹; (- ▲) 128 µg.mL⁻¹. Os valores são médias (± DP) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças significativas (P < 0,05) entre o tratado e o controle.

5.3- Análise morfológica dos fungos filamentosos tratados com *CaTI*

Na figura 4, foi observada as imagens dos diferentes gêneros fúngicos crescidos na presença e na ausência do *CaTI*. Na figura 4 **B**, foi possível verificar o fungo *C. gloeosporioides* crescido na presença de 64 µg.mL⁻¹ do *CaTI* e observou-se que as hifas do fungo apresentam-se reduzidas quando comparamos as células controle (fungo crescido na ausência do *CaTI* Figura 4 **A**).

Nas imagens do fungo *C. lindemuthianum* (Figura 4 **D**) e do fungo *F. oxysporum*, (Figuras 4 **F**) foi observado que na presença de 64 µg.mL⁻¹ do *CaTI*

as hifas apresentaram alterações estruturais (setas) diferentes das observadas no controle, bem como também foi possível verificar uma redução do número de hifas (Figura 4 **C** e 4 **E**).

Para o *F. solani*, percebe-se as hifas (seta) e esporos aglomerados quando crescido na presença de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do *CaTI* (Figura 4 **H**), e essa aglomeração não foi observada nas hifas do controle, onde o fungo cresceu normalmente (Figura 4 **G**).

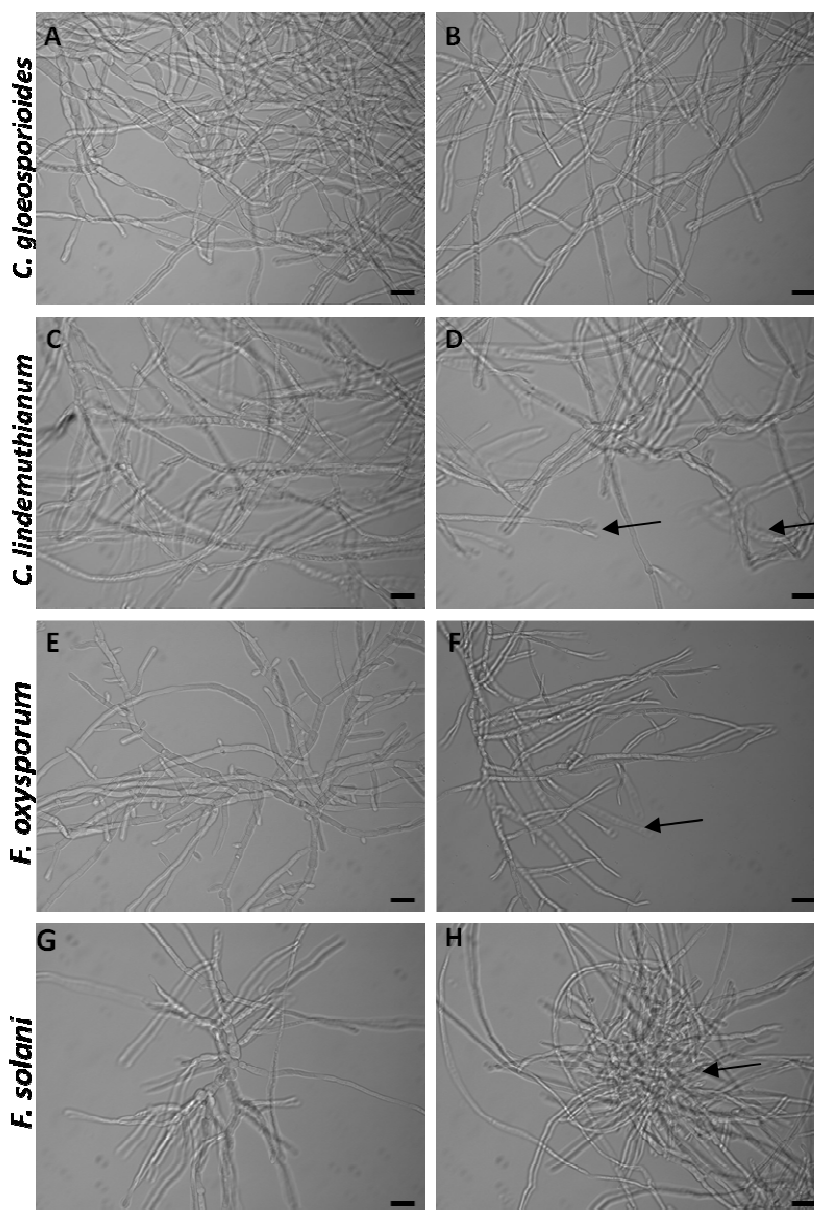


Figura 4 - Microscopia óptica da estrutura das diferentes espécies de fungos fitopatogênicos crescidas na ausência e na presença de *CaTI*. (A, C, E, G) Células controle (crescidas na ausência de *CaTI*); (B, D, F e H) Células crescidas na presença $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *CaTI*. Barras de $10 \mu\text{m}$.

5.4- Ensaio para verificação da permeabilização de membranas dos fungos filamentosos

Na figura 5, foi observado o efeito de *CaTI* sobre a permeabilização de membranas das diferentes espécies de fungos fitopatogênicos estudados. Todas as imagens apresentadas representam os fungos crescidos na ausência e na presença de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do *CaTI*.

Quando se observa a marcação no fungo *C. gloeosporioides* crescido na presença de *CaTI*, verifica-se que este inibidor foi capaz de permeabilizar a membrana plasmática desse fungo, o que tornou possível a entrada e a marcação do corante. Este resultado pode ser ratificado quando comparado as marcações entre o fungo crescido na presença de *CaTI* onde observa-se uma grande quantidade de hifas marcadas (Figura 5 **D**) e na ausência de *CaTI* (Figura 5 **B**), onde as marcações aparecem apenas em uma hifa.

Resultados semelhantes foram observados nos demais fungos testados: fungo *C. lindemuthianum* crescido na presença do *CaTI* (Figura 5 **H**), observou-se um maior número de hifas marcadas, e mais intensas que as imagens do fungo crescido na ausência do inibidor (Figura 5 **F**); para o fungo *F. oxysporum* crescido na presença de *CaTI* (Figura 5 **L**), foi possível observar todas as hifas marcadas, quando comparadas ao controle (Figura 5 **J**); e para o fungo *F. solani* (Figura 5 **P**), as hifas apresentam-se marcadas em sua maioria quando comparado com as imagens do fungo crescido na ausência deste inibidor, onde uma marcação significativa não pôde ser observada. (Figura 5 **N**).

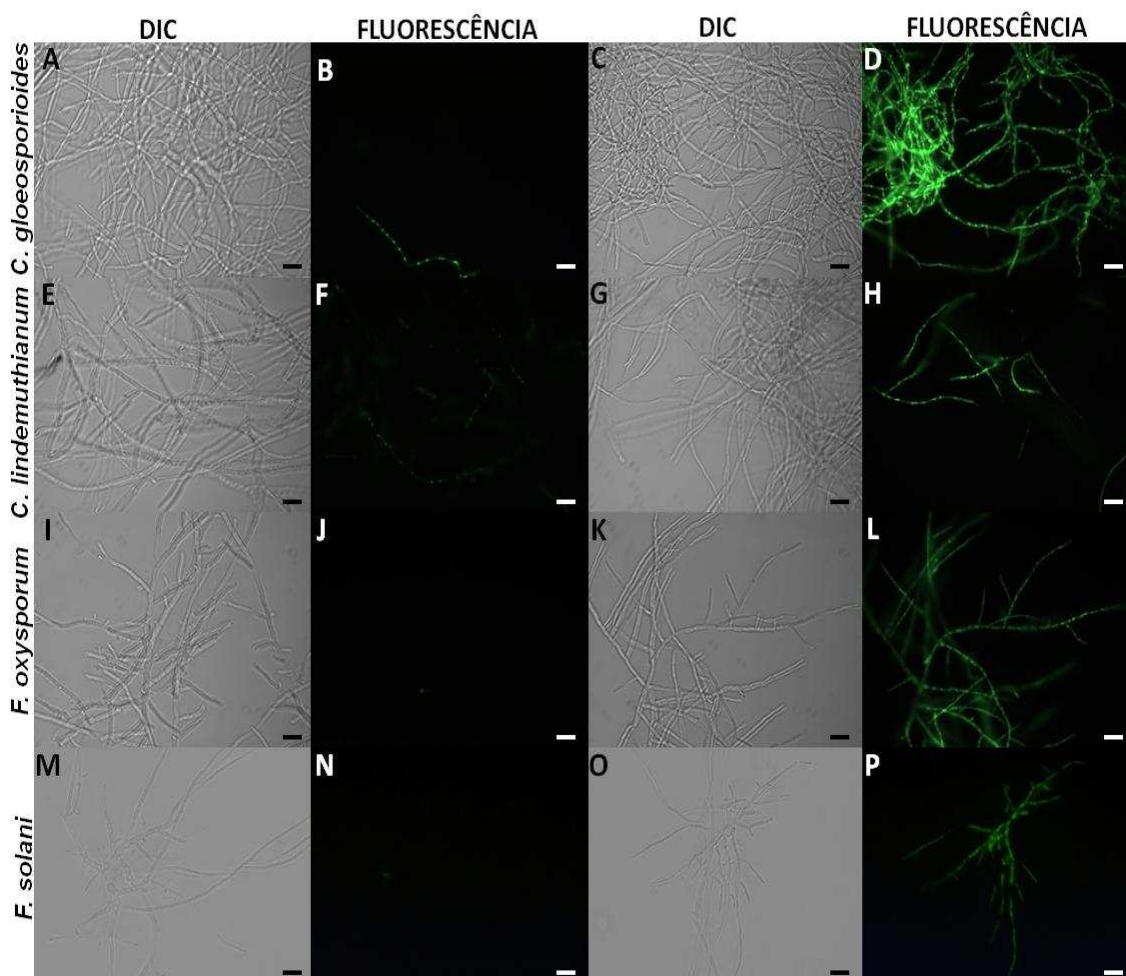


Figura 5 - Microscopia de fluorescência dos fungos filamentosos tratados com corante *Sytox Green*. (A, B, E, F, I, J, M, N) células controle (crescidas na ausência do *CaTI*). (C, D, G, H, K, L, O, P) Células crescidas na presença de $64\mu\text{g.mL}^{-1}$ do *CaTI*. Barras de $10\ \mu\text{m}$.

5.5- Ensaio para verificação da indução das espécies reativas de oxigênio (ROS)

Na figura 6, observa-se o efeito de *CaTI* sobre a indução de ROS nas diferentes espécies de fungos filamentosos testados. A concentração do *CaTI* utilizada para a realização deste teste foi de $64\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para os controles foram observados os crescimentos do fungo sem pré incubação com o *CaTI*.

Neste ensaio, foi notado que todos os fungos testados foram capazes de induzir o aumento de ROS quando crescidos na presença de *CaTI*. Esse resultado foi visto para o fungo *C. gloeosporioides* (Figura 6 **D**), para o fungo *C.*

lindemuthianum (Figura 6 H), para o fungo *F. oxysporum*, em todos houve uma intensa marcação do corante nas células crescidas na presença do *CaTI*, indicando que houve indução de ROS (Figura 6 L) e também para o fungo *F. solani*, onde observou-se uma marcação mais intensa do corante nas células crescidas com o inibidor (Figura 6 P). Uma pequena marcação endógena é visualizada nas hifas controle (Figura 6 B, F, J, N).

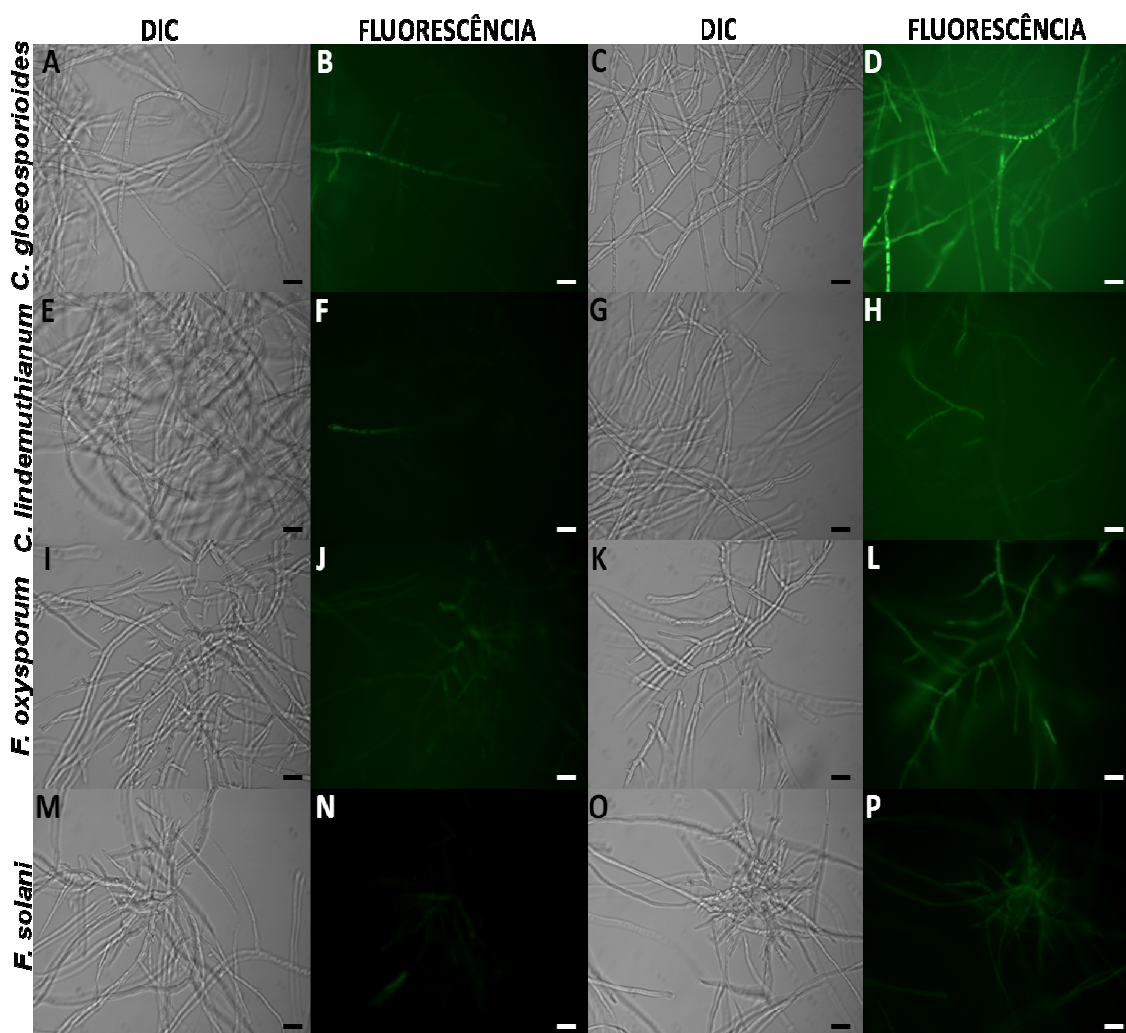


Figura 6 - Microscopia de fluorescência das células de diferentes fungos filamentosos tratados com o corante (H_2DCFDA (2,7' diclorofluoresceína diacetato)). (A, B, E, F, I, J, M, N) células controle (crescidas na ausência do *CaTI*). (C, D, G, H, K, L, O, P) Células crescidas na presença de $64\mu g.mL^{-1}$ do *CaTI*. Barras de $10\mu m$.

5.6 - Ensaio de determinação da indução de óxido nítrico (NO) intracelular

Também foi observado o efeito de *CaTI* ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre a indução de NO, nas diferentes espécies de fungos testados (Figura 7 **A – P**). Quando o fungo *C. gloeosporioides* foi pré-incubado com *CaTI*, observa-se um maior número de hifas marcadas (Figura 7 **D**), indicando um aumento na produção de NO, quando comparadas ao controle (Figura 7 **B**). O mesmo resultado foi verificado para o fungo *C. lindemuthianum*, o qual crescido na presença de *CaTI* foi capaz de induzir a produção de NO neste microrganismo (figura 7 **H**). Nas células controle (Figura 7 **F**), essa marcação foi vista de maneira bem menos intensa. Para o fungo *F. oxysporum*, crescido na presença de *CaTI*, observou-se todas as hifas marcadas com o corante, aqui verificou-se a maior indução de NO quando comparado aos outros fungos testados (Figura 7 **L**). E este dado pôde ser confirmado quando comparamos com as hifas crescidas sem uma pré-incubação com *CaTI*, no qual observa-se uma marcação menos intensa do corante, representando a sua produção em nível basal (Figura 7 **J**). Para o fungo *F. solani*, houve uma pequena indução de NO, porém com uma marcação menos intensa se comparamos aos demais fungos testados (Figura 7 **P**). Essa indução pôde ser relacionada à presença do inibidor, já que nas imagens das hifas controle, não foi possível observar marcação (Figura 7 **N**).

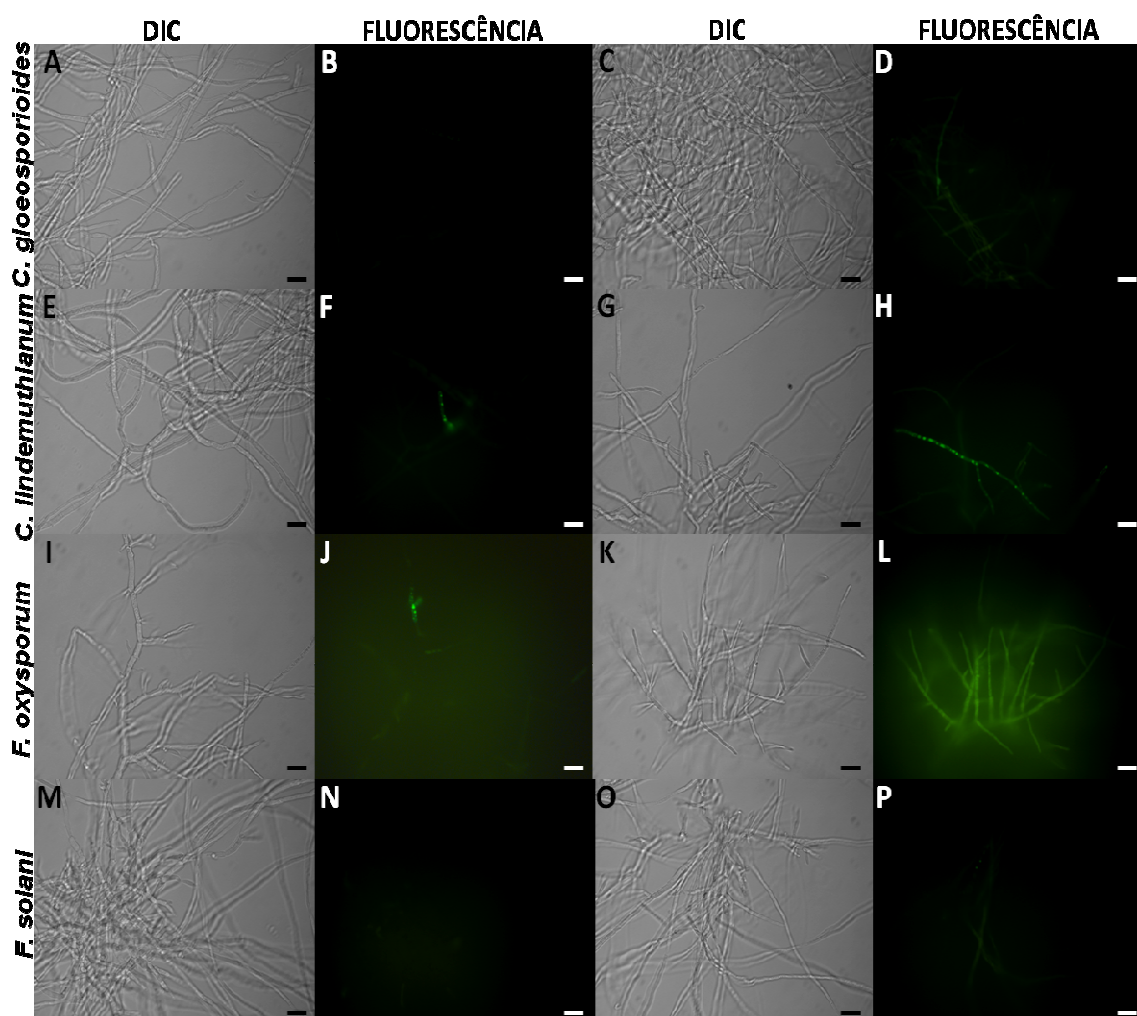


Figura 7 - Microscopia de fluorescência das células de diferentes espécies de fungos filamentosos tratados com o corante (DAF₂DA (3-amino, 4 aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato). (A, B, E, F, I, J, M, N) células controle (crescidas na ausência de *CaTI*). (C, D, G, H, K, L, O, P) Células crescidas na presença de 64 µg.mL⁻¹ de *CaTI*. Barras de 10 µm.

5.7- Localização de *CaTI* conjugada ao FITC por microscopia óptica

Para determinar a localização intracelular de *CaTI* no *F. oxysporum*, FITC foi ligado covalentemente ao *CaTI*, e o *CaTI*-FITC foi empregado em um ensaio de atividade antifúngica a 64 µg.mL⁻¹. Na figura 8, notou-se em todas as imagens, marcações fluorescentes no interior das hifas em diferentes aumentos, indicando que *CaTI* é capaz de ser internalizado e pode ter alvos intracelulares. Nas figuras 8 **A** e 8 **B**, foi possível perceber aumento em magnitudes 20x e nas figuras 8 **C** e

8 D 40x. Entretanto de forma interessante quando se visualiza a imagem em um aumento ainda maior (100 x) observou-se que a marcação realmente encontra-se no citoplasma da hifa e que os vacúolos presentes não se encontram marcados (seta) (Figuras 8 E e 8 F).

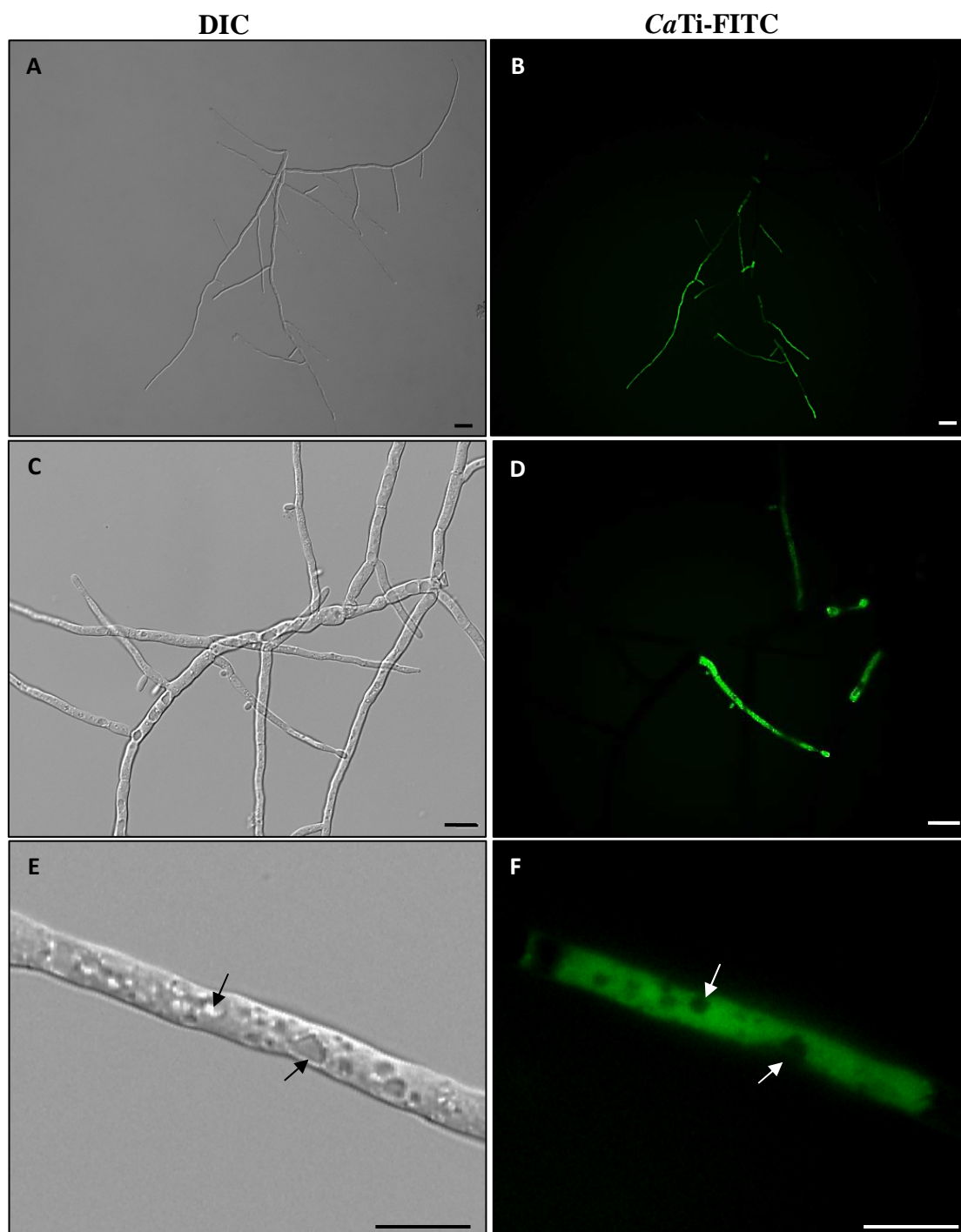


Figura 8 – Localização de CaTi no fungo *F. oxysporum*. Microscopia de fluorescência do fungo incubado por 24 h com $64\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CaTi-FITC. Em 8 A e 8 B observa-se o aumento em magnitudes de 20x, em 8 C e 8 D 40x e em 8 E e 8 F o aumento de 100x. Setas mostram os vacúolos. Barras de $10\mu\text{m}$.

5.8- Identificação da presença de inibidores de proteinases em diferentes espécies do gênero *capsicum*

5.8.1- Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS

Na figura 9, foi observado o perfil proteico dos extratos rico em peptídeos dos diferentes acessos de *Capsicum*. Na raia 1, foi possível verificar o perfil do extrato total de *C. baccatum* (acesso UENF 1732), onde foi visualizado duas bandas de baixo peso molecular com massas moleculares entre 8 e aproximadamente 16 kDa, além de duas bandas de alto peso molecular. Na raia 2, o extrato de *C. baccatum* (acesso UENF 1496), onde pode-se observar duas bandas de baixo peso molecular, também entre 8 e aproximadamente 16 kDa, além de duas bandas de alto peso molecular. Na raia 3, verificou-se o perfil do extrato *C. chinense* (acesso UENF 1498). Nela, nota-se a presença de duas bandas com massas moleculares variando entre 8 e 16 kDa, além de duas bandas de alto peso molecular. Na raia 4, o extrato de *C. frutescens* (acesso UENF 1775), onde da mesma forma que para os demais extratos analisados, observa-se a presença de duas bandas de baixo peso molecular de 8 e 16 kDa, e duas bandas de alto peso. E, na raia 5, observa-se o extrato de *C. annuum* (acesso UENF 1381), também verificou-se duas bandas de baixo peso molecular entre 8 e 16 kDa e duas bandas de alto peso molecular. M representa o marcador de massa molecular.

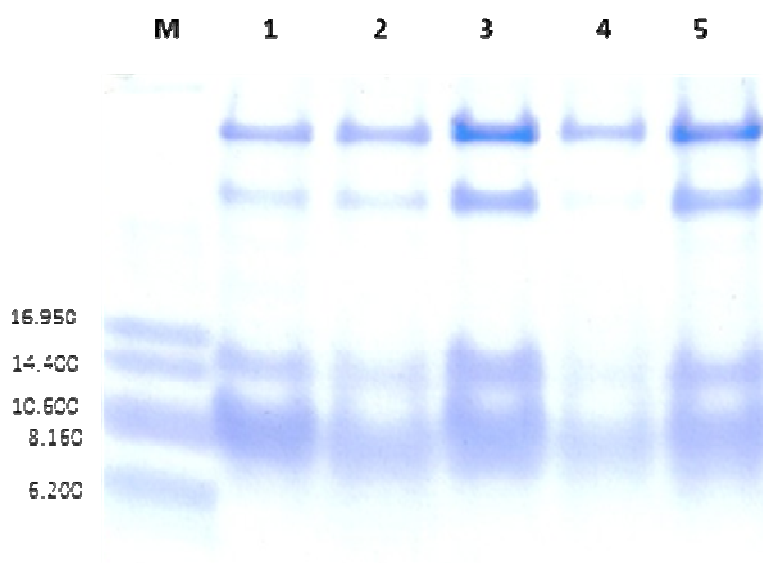


Figura 9 – Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS do extrato rico em peptídeos dos diferentes acessos de *Capsicum*. (1) *Capsicum baccatum* (acesso UENF 1732); (2) *Capsicum baccatum* (acesso UENF 1496); (3) *Capsicum chinense* (acesso UENF 1498); (4) *Capsicum frutescens* (acesso UENF 1775); (5) *Capsicum annuum* (acesso UENF 1381). (M) Marcador de massa molecular (kDa).

5.9- Comparação e purificação parcial dos inibidores de proteinases de sementes de *Capsicum*

5.9.1 - Cromatografia de troca catiônica (CM-Sepharose)

A Figura 10 representa o perfil cromatográfico dos acessos de *Capsicum* utilizados neste experimento. No gráfico de *C. baccatum* (acesso UENF 1732), observa-se a presença de três frações: a fração F1, não retida, eluída com tampão de equilíbrio da coluna. A fração F2, correspondente à fração retida na coluna, eluída com o tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,1 M. A fração F3 também corresponde a fração retida na coluna, contudo essa foi eluída com o tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,2 M. Em seguida está representado o perfil proteico de *C. baccatum* (acesso UENF 1496), *C. chinense* (acesso UENF 1498) e por último o perfil proteico de *C. frutescens* (acesso UENF 1775). Pode-se observar o mesmo perfil proteico para todos os extratos, onde todos eles apresentam da mesma forma, a presença de três picos protéicos, os quais também foram denominados de F1, F2 e F3.

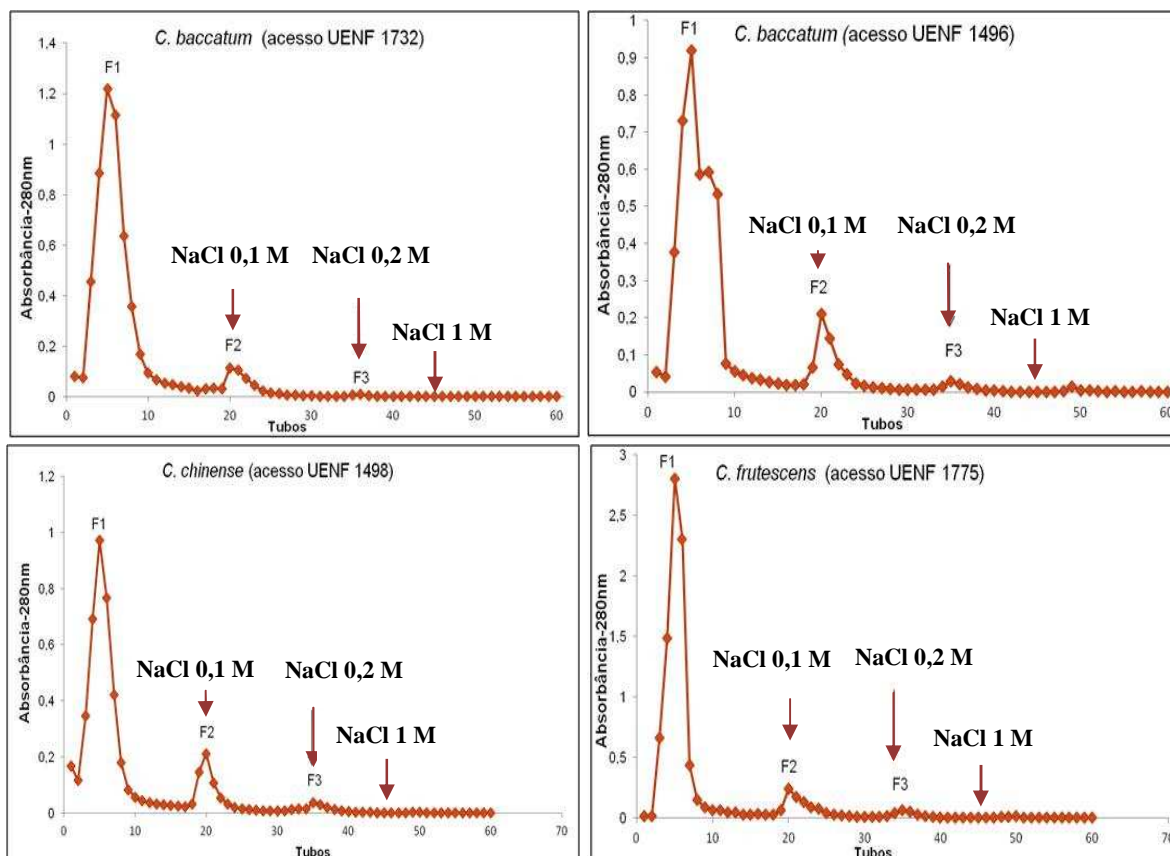


Figura 10 - Cromatografia de troca catiônica em resina CM-Sepharose dos peptídeos presentes no extrato rico em peptídeos dos diferentes acessos de *Capsicum*. O fluxo utilizado foi de 60 mL.h^{-1} , e foram coletadas frações de aproximadamente 3 mL.

5.9.2 – Cromatografia de fase reversa em HPLC

Dando continuidade ao processo de purificação, submetemos a fração F3 obtida na cromatografia de troca aniônica dos extratos testados a um segundo passo cromatográfico, agora numa cromatografia de fase reversa, em sistema HPLC, utilizando coluna C2/C18.

Na figura 11, observa-se o cromatograma de todas as espécies aqui testadas do gênero *Capsicum*. Primeiramente, observou-se o cromatograma de *C. baccatum* (acesso UENF 1732), onde nota-se a presença de três picos proteicos distintos os quais foram chamados de pico 1, 2 e 3, com os tempos de retenção de 24,26, 24,88 e 26,78 min, respectivamente.

Em seguida, o cromatograma de *C. baccatum* (acesso UENF 1496) e foi possível perceber a presença de cinco picos, denominados de pico 1, 2, 3, 4 e 5,

com os tempos de retenção de 24,10, 24,81, 26,59, 32,07 e 39,95 min, respectivamente.

Posteriormente, observou-se o perfil de *C. chinense* (acesso UENF 1498), no qual nota-se a presença de apenas dois picos, os quais foram denominados pico 1 e 2, com os tempos de retenção de 26,04 e 26,65 min, respectivamente.

Também foi observado o cromatograma da *C. frutescens* (acesso UENF 1775). Neste foi verificado a presença de três picos que foram denominados de pico 1, 2, 3, 4 e 5, com os tempos de retenção de 24,36, 26,04, 28,07, 32,10, 33,05 min, respectivamente.

Em todos os cromatogramas, observa-se uma similaridade nos tempos de retenção de alguns picos, da mesma forma que se observa no cromatograma de *C. annuum* acesso 1381, de onde obtemos o inibidor *CaTI*, no qual também verifica-se a presença de três picos que foram denominados de FR1, FR2 e FR3, com os tempos de retenção de 24,55, 26,08 e 27,07 min, respectivamente. O inibidor de proteinase encontrava-se no segundo pico com tempo de retenção de 26,08 min.

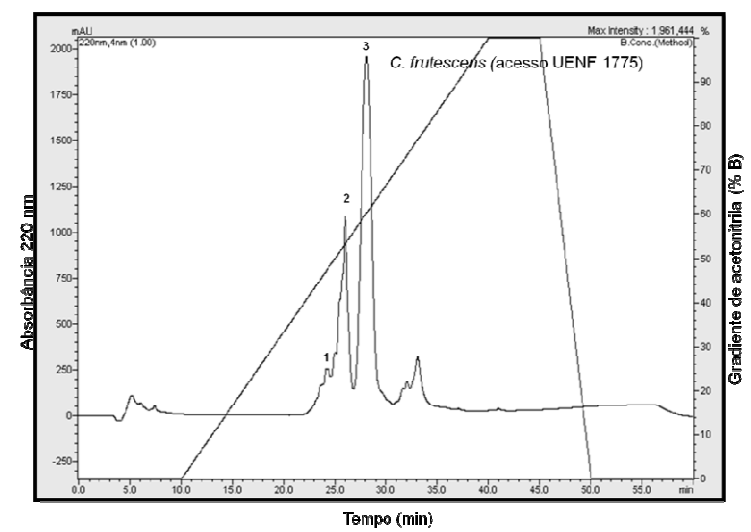
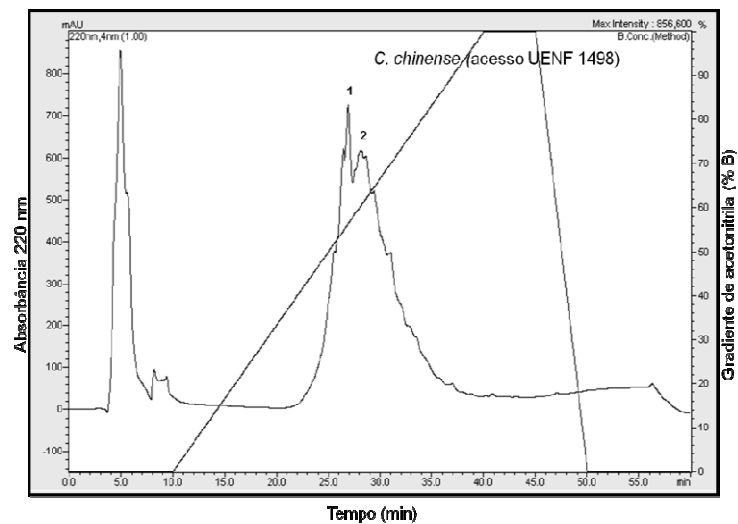
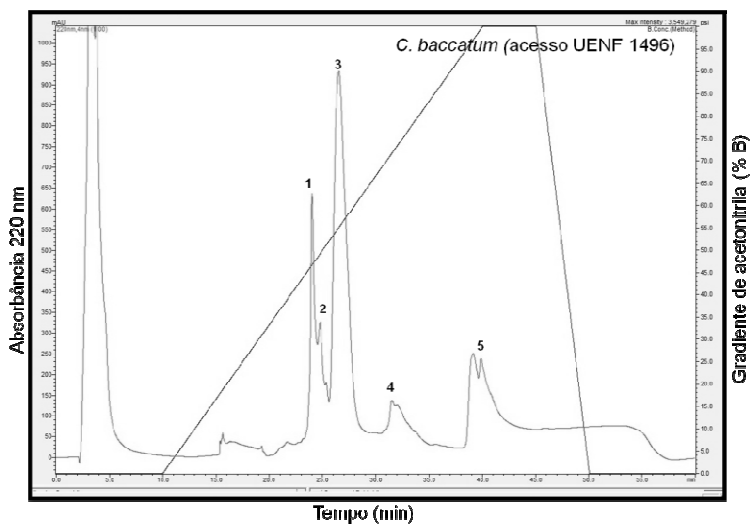
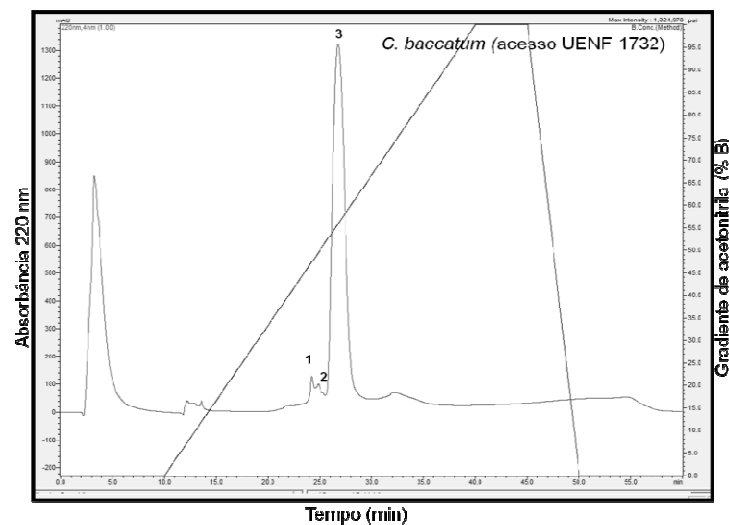


Figura 11 - Cromatografia de fase reversa, em sistema de HPLC. A coluna utilizada foi a C2/C18. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL.min⁻¹

5.10 - Ensaio de inibição da tripsina

Na figura 12, observa-se o efeito das frações obtidas após cromatografia de fase reversa das diferentes espécies do gênero *Capsicum* sobre a atividade da enzima tripsina. Foi possível perceber que, o primeiro e o segundo pico de *C. baccatum* acesso UENF 1732 foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,05$) 90 % e 94 %, respectivamente da atividade da enzima. Para o terceiro pico nenhuma inibição foi notada. Nesse caso, o inibidor encontra-se presente nas duas frações.

O primeiro e segundo pico de *C. baccatum* (acesso UENF 1496) também foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,05$) 96% e 94%, respectivamente, a atividade da enzima. Provavelmente, neste caso como no anterior, o inibidor encontra-se presente nas duas frações. Para o terceiro, quarto e quinto pico nenhuma inibição foi notada.

Para *C. chinense* (acesso UENF 1498) verificou-se que o primeiro pico foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$) 29% a atividade da enzima tripsina. Essa inibição foi significativa, porém quando comparada com as outras espécies foi bem baixa, acredita-se que em *C. chinensis* a presença de inibidores de proteinases pode estar em menor concentração. Para o segundo pico nenhuma inibição foi observada.

Em *C. frutescens* (acesso UENF 1775) o segundo pico foi o único capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$), 96% da atividade enzimática. Para os demais picos não foi observado nenhuma inibição da enzima tripsina.

Comparando os gráficos do HPLC, pode-se notar que todos os picos que apresentaram atividade contra a tripsina, tiveram o tempo de retenção próximo a 25 e 26 min, entretanto em algumas frações um pouco antes do que pode ser observado quando comparamos estes resultados com o inibidor *CaTI* presente em sementes de *C. annuum* (acesso UENF 1381).

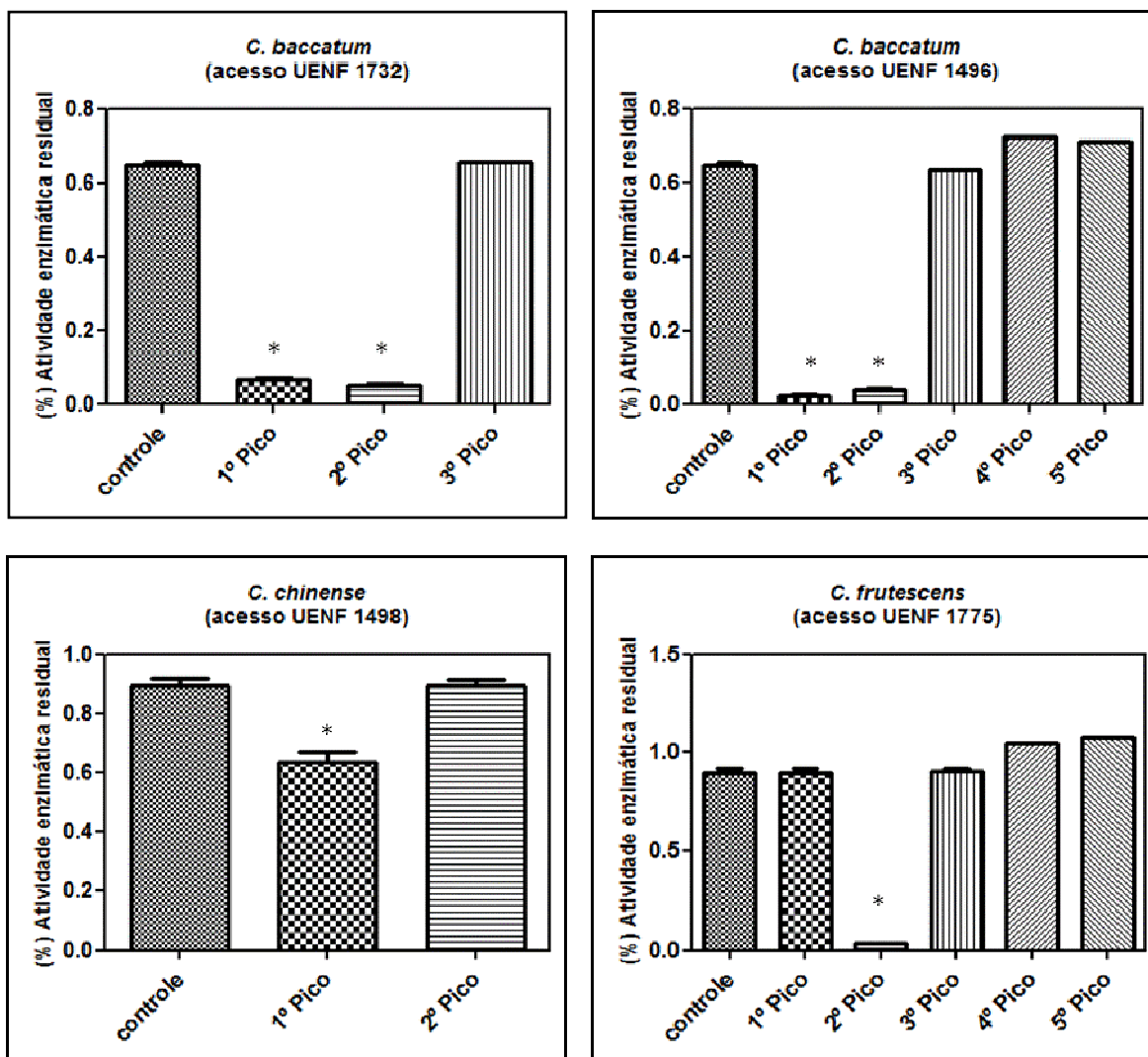


Figura 12 - Efeito das frações das diferentes espécies de *Capsicum* sobre a atividade da enzima tripsina.

5.11 – Eletroforese em gel de tricina das frações que inibiram a tripsina

Na figura 13, observa-se o perfil proteico das frações dos diferentes acessos de *Capsicum* que inibiram a tripsina. Nas raias 1 e 2, verifica-se respectivamente, o primeiro e segundo pico de *C. baccatum* (acesso UENF 1496), para o primeiro pico foi visualizado duas bandas majoritárias de baixo peso molecular, uma com massa molecular de aproximadamente 6 kDa, e outra inferior a 6 kDa. Para o segundo pico foi visualizado a presença de uma única banda majoritária com massa molecular de 6 kDa. Nas raias 3 e 4, observou-se respectivamente, o primeiro e segundo pico de *C. baccatum* (acesso UENF 1732), onde para ambos foi verificado a presença de uma banda majoritária de 6 kDa. Na raia 5, visualiza-se o primeiro pico de *C. chinense* (acesso UENF 1498). Nele,

nota-se a presença de uma banda molecular de aproximadamente 6 kDa, contudo essa banda está bem fraca. Acredita-se que esse inibidor encontra-se presente em uma concentração menor quando comparado com as outras espécies. Na raia 6, observa-se o segundo pico de *C. frutescens* (acesso UENF 1775), onde nota-se duas bandas majoritárias, uma com massa molecular de 6 kDa e outra com massa molecular de aproximadamente 14 kDa. M representa o marcador de massa molecular.

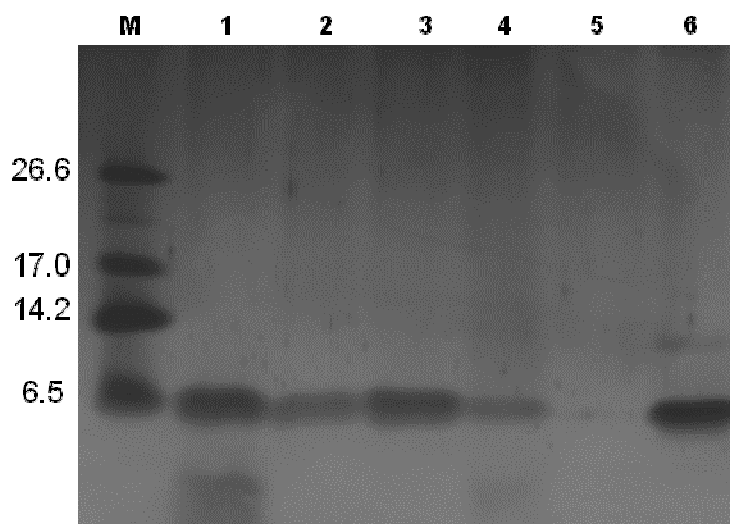


Figura 13 - Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS das frações que inibiram a enzima tripsina. **(1)** Primeiro pico de *C. baccatum* acesso UENF 1496; **(2)** Segundo pico de *C. baccatum* acesso UENF 1496; **(3)** Primeiro pico de *C. baccatum* acesso UENF 1732; **(4)** Segundo pico de *C. baccatum* acesso UENF 1732; **(5)** Primeiro pico de *C. chinense* acesso UENF 1498; **(6)** Segundo pico de *C. frutescens* acesso UENF 1775.

6. DISCUSSÃO

6.1- Isolamento, atividade antimicrobiana e modo de ação de CaTI sobre fungos fitopatogênicos

Os inibidores de proteinases (IPs) têm sido isolados e caracterizados a partir de um grande número de organismos incluindo plantas, animais e microrganismos (Valueva e Mosolov, 2004; Mosolov e Valueva, 2005). Nas plantas os inibidores estão comumente presentes em órgãos e tecidos de reserva, onde são relevantes moléculas de defesa, em resposta ao ataque de patógenos, através da inibição de proteases digestivas (Koiwa *et al.*, 1997).

Ribeiro *et al.* (2007) conseguiram isolar e caracterizar um inibidor de proteinase de sementes de *Capsicum annuum*, o qual foi denominado *CaTI*. Baseado na alta similaridade de sequência de aminoácidos da região N-terminal de *CaTI* com os inibidores de proteinases pertencentes à família Kunitz, foi visto que este é um membro pertencente a esta família de inibidores de proteinases de plantas. Além disso, o *CaTI* também apresentou atividade antifúngica contra diferentes leveduras (Ribeiro *et al.*, 2007, Ribeiro *et al.*, 2012). Diversos estudos sugerem a aplicação dos IPs como ferramentas biotecnológicas no combate às diversas pragas agrícolas, que podem provocar enormes prejuízos econômicos e limitar o crescimento da produção mundial de alimentos (Fao, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Stevens *et al.*, 2013).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação do inibidor de proteinase *CaTI*, sobre fungos fitopatogênicos e identificar a presença de inibidores de proteinases em outras espécies do gênero *Capsicum*.

A obtenção do *CaTI* e dos outros possíveis inibidores de proteinases, foi feita segundo a metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2007). Após a extração proteica dois métodos cromatográficos foram realizados, inicialmente uma cromatografia de troca aniônica seguida de uma cromatografia de fase reversa (figura 2). Ribeiro *et al.* (2007) obtiveram resultados similares ao dessa pesquisa. Outros pesquisadores também já demonstraram que muitos inibidores têm sido purificados e isolados através da utilização de técnicas semelhantes (Macedo *et al.*, 2000; Mello *et al.*, 2001; Dias *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2013).

Após o processo de obtenção do inibidor *CaTI*, foram realizados testes antifúngicos a fim de avaliar seu potencial antimicrobiano. Nestes testes observou-se que *CaTI* foi capaz de inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum*, essa inibição fica ainda mais evidenciada pela redução do número de hifas na presença de *CaTI* quando observadas por microscopia óptica (Figuras 3 e 4, respectivamente). Diversos trabalhos já mostraram o efeito antimicrobiano *in vitro* de alguns IPs de plantas. Dias *et al.* (2013) isolaram inibidores de proteinases presentes em sementes de *C. chinense* e verificaram que estes eram capazes de inibir o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Pichia membranifaciens* e *Kluyveromyces maxiannus* e causar alterações morfológicas nessas células. Dokka e Davuluri (2014) identificaram em semente de *Abelmoschus moschatus*, um inibidor de tripsina com atividade contra diferentes fungos como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *A. flavus*, *S. cerevisiae*, *C. glaba* e *A. niger*. Koiwa *et al.* (1997) mostraram que WTI, um inibidor de proteases encontrado em trigo apresentava a capacidade de inibir o crescimento das hifas de diferentes fungos fitopatogênicos, dentre esses o *Colletotrichum acutatum*.

No entanto, quando testamos a atividade do *CaTI* contra fungos do gênero *Fusarium*, verificou-se que o inibidor não foi capaz de inibir seu crescimento (Figura 3). Mas, através de imagens obtidas por microscopia óptica, observou-se uma intensa aglomeração das hifas de um dos fungos testados o *F. solani* (Figura 4). Essa aglomeração de hifas pode resultar em um aumento da densidade ótica

(explicação para o efeito a $128 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), o que pode ser visto no gráfico de inibição do crescimento onde a absorbância do fungo na presença do inibidor é maior que a do controle. Resultado semelhante foi observado por Silva *et al.* (2015) onde o inibidor de tripsina de mamona RcTI, não foi capaz de inibir o crescimento do fungo *F. oxysporum*.

Em relação ao mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos, já foi visto que estes podem atuar na membrana e como consequência, causar sua ruptura e agir sobre alvos intracelulares (Pellegrini e Franco 2005; Nguyen *et al.*, 2011; Bahar e Ren, 2013). Uma das consequências da permeabilização de membrana é o rápido colapso do potencial membranar. Além disso, acredita-se que a alteração da permeabilidade esteja correlacionada com a redução dos níveis de ATP intracelular e com o desequilíbrio dos íons de Na^+ e K^+ , refletindo na perturbação do potencial de membrana (Mangoni *et al.*, 2005).

Durante este trabalho também foi verificado se o inibidor *CaTI* foi capaz de causar alguma alteração na membrana citoplasmática dos fungos fitopatogênicos testados levando a sua permeabilização. Pode-se observar que, quando as células fúngicas foram incubadas com o *CaTI*, foi possível perceber a marcação dessas células pelo corante, indicando, assim, que este inibidor foi capaz de causar danos às células de todos os fungos testados (Figura 5). Como já dito anteriormente, a permeabilização da membrana pode ser vista através da marcação das células pelo corante fluorescente *Sytox green* que se liga a ácidos nucleicos, no entanto só consegue atravessar a membrana, quando a mesma encontra-se comprometida.

Em um estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2012) com *CaTI*, foi visto que este inibidor também foi capaz de permeabilizar a membrana das leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Diversos trabalhos corroboram com os resultados dessa pesquisa, mostrando a ação dos AMPs na permeabilização de membranas. Regente *et al.* (2005) estudaram uma LTP isolada de *Helianthus annuus*, e mostraram a habilidade desse peptídeo causar a permeabilização da membrana do fungo *F. solani*. Diz *et al.* (2006; 2011) demonstraram que peptídeos isolados de sementes de *C. annuum* agiam sobre a membrana plasmática das leveduras *S. cerevisiae* e *C. tropicalis*, causando sua permeabilização.

Vale ressaltar que a permeabilização de membranas e a inibição do crescimento de microrganismos não são fenômenos obrigatoriamente

relacionados, visto que foi possível encontrar peptídeos com atividade antimicrobiana, capazes de induzir a permeabilização de membranas, porém não apresentaram um efeito fungicida e vice-versa, (Koshlukova *et al.*, 1999; Steffen *et al.*, 2006; Vylkova *et al.*, 2007). Neste trabalho, observou-se que os fungos *F. oxyporum* e *F. solani* apresentaram a permeabilização de membrana, todavia não apresentaram uma inibição significativa do crescimento desses fungos.

Estudos descrevem a mitocôndria como o principal local do metabolismo oxidativo da célula e seu envolvimento na produção e degradação de ROS, de modo que estas moléculas são geradas por processos de redução de oxigênio, por exemplo, durante a cadeia transportadora de elétrons (Ježek e Hlavatá, 2005; Kowaltowski *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015).

Na tentativa de descobrir a possível causa da inibição destes microrganismos e assim tentar elucidar um possível mecanismo de ação para o inibidor *CaTI*, foi verificado se este era capaz de induzir o aumento da produção endógena de ROS. Foi observado um aumento na produção de ROS em todos os fungos testados (Figura 6). As espécies reativas de oxigênio são produzidas em níveis basais nas células quando crescidas sob condições normais, livres de estresse e esse fato pode explicar a baixa fluorescência nas células controle (Figura 6B, F, J e N). Outros peptídeos também mostraram a capacidade de aumentar os níveis de ROS nas células. Um peptídeo denominado *VtA₃* foi capaz de induzir ROS no fungo *F. solani* (Giudici *et al.*, 2006). Aerts *et al.* (2007) também mostraram que a defensina *RsAFP2* isolada do rabanete, além disso foi capaz de induzir ROS nas células da levedura *C. albicans*.

Outra via de estresse oxidativo para a indução da morte celular, é a produção do óxido nítrico (NO). O NO possui diversas funções biológicas, dentre elas, uma resposta a estresses e ativação de morte celular programa do patógeno. A produção dessas espécies reativas é mais intensa quando a célula se encontra em situação de defesa. Neste trabalho foi possível observar que o *CaTI* foi capaz de induzir o aumento da produção endógena de NO em todos os fungos testados (Figura 7). Ribeiro *et al.* (2012) também demonstrou que o inibidor de tripsina *CaTI*, é capaz de causar a indução de NO nas células das leveduras *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *Kluyveromyces marxianus*, no entanto, nenhuma marcação nas células foi observada para os níveis de ROS. Outro trabalho comprovou que a defensina *PvD₁* isolada de sementes de *Phaseolus*

vulgaris L. foi capaz de induzir o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS e NO) nas células do fungo *F. oxysporum* e da levedura *C. albicans* (Mello *et al.*, 2011). As espécies reativas de oxigênio são moléculas que aparecem nos momentos iniciais do processo apoptótico. Estudos têm demonstrado que o aumento de ROS no meio pode ser tóxico aos organismos, levando à destruição de vários tipos celulares através de vias apoptóticas (De Felice *et al.*, 2007; Maiese *et al.*, 2010).

Alguns peptídeos são capazes de entrar na célula após a interação inicial com a membrana citoplasmática (Brodgen, 2005; Nicolas, 2009). Com o objetivo de melhor investigar o mecanismo de ação do inibidor *CaTI* nas células do fungo filamentosso *F. oxysporum*, estas foram incubadas com o *CaTI* acoplado ao isotiocianato fluoresceína (FITC) por 24 h. Observou-se a marcação do *CaTI*-FITC dentro das células de *F. oxysporum*, o que leva a sugerir que o *CaTI* pode estar atuando em um possível alvo intracelular (Figura 8). A introdução de AMPs de plantas para o citoplasma de fungos, como verificado aqui, já foi observado em outros trabalhos. A defensina *NaD1* (isolada a partir de *Nicotiana glauca*) foi observada no citoplasma das hifas do fungo *F. oxysporum* (Van der Weerden *et al.*, 2008). Lobo *et al.* (2007) trataram o fungo *N. crassa* com a defensina *Psd1*, isolada de *P. sativum*, conjugada ao FITC e após tratamento deste fungo com DAPI mostraram a colocação, *in vivo*, da defensina, no núcleo. Da mesma forma, Taveira *et al.* (2016) mostraram que a tionina *CaThi* é capaz de entrar nas células das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*, e que para *C. tropicalis* o possível alvo intracelular é o núcleo. Os resultados e estudos relacionados sugerem que as atividades antifúngicas dos AMPs de plantas não se restringem apenas à membrana plasmática dos fungos, mas sim, podem entrar nas células e interagir com diferentes alvos intracelulares.

6.2- Identificação da presença de inibidores de proteinases em diferentes espécies do gênero *Capsicum*

Este trabalho também teve como objetivo identificar inibidores de proteinases em sementes de diferentes espécies do gênero *Capsicum*. Seguindo a metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (2007) e, após todo o processo de extração e purificação, foi possível observar através de eletroforese em gel de

tricina, a presença de peptídeos de baixa massa molecular nas diferentes espécies de *Capsicum* (Figura 9). Em seguida, após purificação (Figuras 10 e 11) foi verificado se essas frações obtidas poderiam apresentar atividade inibitória de tripsina, que é uma enzima da classe serino protease que pode ser encontrada em diversos organismos patogênicos que colonizam tecidos vegetais e observou-se que para cada espécie de *Capsicum*, a atividade inibitória de tripsina estava presente (Figura 12). Todas as frações que foram capazes de inibir a enzima tripsina possui uma banda em torno de 6 kDa, assim como, o *CaTI* (Figura 13). Outros trabalhos vêm caracterizando e isolando diferentes IPs presentes no gênero *Capsicum*. Dois inibidores de *C. annuum*, CapA1 e CapA2 foram capazes de inibir a atividade da tripsina em aproximadamente 68 e 91% (Tamhane *et al.*, 2005). Moulin *et al.* (2014), identificaram inibidores de tripsina em folhas de *Capsicum baccatum* var. pendulum que foram inoculados com PepYMV (Pepper yellow mosaic virus).

Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores, Torres-Castillo *et al.* (2009) confirmaram que sementes de *Opuntia streptacantha* também são fontes de IPs com especificidade para enzimas similares à tripsina. Wang e Rao (2010) mostraram que o IP limenina inibiu a atividade tripsina e quimotripsina, e a eficácia da limenina para tripsina foi maior, quando comparado ao observado para tripsina de soja preta e soja selvagem (Broze *et al.*, 1990).

A investigação do modo de ação de *CaTI* contra fitopatógenos é relevante e oportuna visto que, no Brasil, muitas culturas de plantas economicamente importantes têm sua produtividade diminuída devido à ocorrência de doenças causadas por fungos fitopatogênicos (Di Maro *et al.*, 2010). Neste trabalho, foi demonstrado que *CaTI* tem atividade antifúngica contra *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum*, esta atividade antimicrobiana pode estar relacionada com permeabilização da membrana e indução estresse oxidativo. Além disso, apresentou-se evidências que sugerem um alvo intracelular para o inibidor de tripsina *CaTI*. Desta forma, os resultados obtidos nessa pesquisa, podem ajudar a elucidar o real modo de ação dos peptídeos antimicrobianos, para que futuramente sejam utilizados como ferramenta biotecnológica para o controle de fungos fitopatogênicos.

7- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

- *CaTI* foi capaz de inibir de forma significativa o crescimento dos fungos *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum*;
- *CaTI* age sobre as membranas dos fungos *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* e *F. solani* permitindo a permeabilização das mesmas;
- *CaTI* induz um aumento da produção de ROS e NO nos fungos *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* e *F. solani*;
- *CaTI* é capaz de entrar nas células do fungo *F. oxysporum*, podendo agir em um possível alvo intracelular;
- Identificou-se a presença de inibidores de proteinases em todas as espécies estudadas do gênero *Capsicum* onde obteve-se alguma fração com bandas em torno de 6 kDa, que foram capazes de inibir a atividade da enzima tripsina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, A.M., François, I.E., Meert, E.M., Li, Q.T., Cammue, B.P., Thevissen, K. (2007) The antifungal activity of *RsAFP2*, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 13:243-247.
- Agizzio, A.P., Carvalho, A.O., Ribeiro, S.F.F., Machado, O.L.T., Alves, E.W., Okorokov, L.A., Samarão, S.S., Bloch Jr. C., Prates, M.V., Gomes, V.M. (2003) A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 416:188-195.
- Allard, R.W. (1971) Princípios do melhoramento genético das plantas. São Paulo: Edgard Blucher, 381p.
- Aoki, W., Kuroda, K., Ueda, M. (2012) Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines. *Journal of bioscience and bioengineering*, 114:365-370.
- Azevedo, C.P., Filho, A.C., Henz, P. G., Reis, A. (2006) Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas. EMBRAPA, 1414-9850.
- Bahar, A.A., Ren, D. (2013) Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6:1543-1575.

- Bariani, A., Gonçalves, J.F.C., Chevreuil, L.R., Cavallazzi, J.R.P., Souza, L.A.G., Bentes, J.L.S., Pando, S.C. (2012) Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos proteicos sobre fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, 38:131-138.
- Belletti, P., Marzachi, C., Lanteri, S. (1998) Flow cytometric measurement of nuclear DNA content in *Capsicum* (*Solanaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 209:85-91.
- Benko-Iseppon, A.M., Galdino, S.L., Calsa, T.J., Kido, E.A., Tossi, A., Belarmino, L.C., Crovella, S. (2010) Overview on plant antimicrobial peptides. *Current Protein and Peptide Science*, 11:181-188.
- Blank, A.F. (1997) Teste precoce da capacidade combinatória de linhagens de pimentão (*Capsicum annuum* L.). Tese (Doutorado em Melhoramento de Plantas), Lavras - MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 71p.
- Bloch Jr, C., Richardson, M. (1991) A new family of a small (5kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat g-purothionins. *Federation of European Biochemical Societies* 279:101-104.
- Bosland, P.W. (1996) Capsicums: innovate veuses of an ancient crop. In: Janick, J. (Ed.), *Progress in New Crops*. ASHS Press, Arlington, 479:487p.
- Brodgen, K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore fermers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3:238-250.
- Broekaert, W.F., Terras, F.F.G., Cammue, B.P.A., Vanderleyden, J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters*, 69:55-60.
- 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., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Sambland, G.W., Osborn, R.W. (1997) Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 267:2228-2233.
- Brown, D.W., Butchko, R.A., Proctor, R.H. (2006) *Fusarium* genomic resources: Tools to limit crop diseases and mycotoxin contamination. *Mycopathologia*, 162:191-199.
- Broze, G.J., Girard, T.J., Novotny, W.F. (1990) Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry*, 29:7539-7546.
- Brumfitt, W., Salton, M.R., Hamilton-Miller, J.M. (2002) Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50:731-734.
- Burgess, L.W., Dodman, R.L., Pont, W., Mayers, P. (1981) *Fusarium* diseases of wheat, maize, and grain sorghum in Eastern Australia. P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R.J. Cook (eds). The Pennsylvania State University Press. University Park, PA, IN: *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. 64-76.
- Buttow, M.V., Barbieri, R.L., Neitzeke, R.S., Heiden, G., Carvalho, F.I.F. (2010) Diversidade genética entre acessos de pimentos e pimentos da Embrapa Cilma Temperado. *Ciência Rural* (online), 40:1264-1269.
- Cammue, B.P.A., De Bolle, M.G.C., Terra, F.R.G., Proost, P., Van Damme, J., Ress, S.B., Vanderleyden, J., Broekaert, W.F. (1992) Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 267:2228-2233.
- Carrizo, G.C., Sterpetti, M., Volpi, P., Ummarino, M., Saccardo, F. (2013) Wild Capsicums: identification and in situ analysis of Brazilian species. XVth EUCARPIA Meeting on genetics and breeding of Capsicum and Eggplant. Torino, Italy, P. 205-213.
- Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2007) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology - a concise review. *Peptides*, 28:1144-1153.

- Carvalho, A.O., Machado, O.L.T., Da Cunha, M., Santos, I.S., Gomes, V.M. (2001) Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39:137-46.
- Carvalho, A.O., Teodoro, C.E.S., Da Cunha, M., Okorokova-Façanha, A.L., Okorokov, L.A., Fernandes, K.V.S., Gomes, V.M. (2004) Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. *Physiologiae Plantarum*, 122:328-36.
- Castro, M.S. e Fontes, V.M. (2005) Plant defensins- Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30:1007-1020.
- Chye, M.L., Sin, S.F., Xu, Z.F., Yeung, E.C. (2006) Serine proteinase inhibitor proteins: exogenous and endogenous functions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 42:100-108.
- Cruz, L.P., Ribeiro, S.F.F., Carvalho, A.O., Vasconcelos, I.M., 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*, 17:311-318.
- Cudic, M. Otvos, Jr. (2002) Intracellular targets of antibacterial peptides. *Current Drug Targets*, 3:101-106.
- Cushnie, T.T., Cushnie, B., Lamb, A.J. (2014) Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44:377-386.
- Dang, L., Els, J.M., Damme, V. (2015) Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, 117:51-64.
- De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T. Klein, W.L (2007) A beta oligomers induce neuronal oxidative stress through a N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *Journal of Biological Chemistry*, 282:11590-11601.
- Delgado-Vargas, F., Paredes-Lopes, O. (2003) Natural colorants for food and nutraceutical uses. Boca Raton, Fla; *CRV Press*, 257-305.

- Dias G.B., Gomes, V.M., Zottich, U., Ribeiro, S.F., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Fernandes, K., Valevski, S., Machado, O.L.T., Ferreira, A.T., Perales, J., Cunha, M.D. (2013) Isolation, Characterization and Antifungal Activity of Proteinase Inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. Seeds. *The Protein Journal*, 32:15-26.
- Di Maro, A., Terracciano, I., Sticco, L., Fiandra, L., Ruocco, M., Corrado, G., Parente, A., Rao, R. (2010) *Journal of Biotechnology*, 147:1-6.
- Diz, M.S.S., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A.G., Da Cunha, M., Alves, E.W., Okorova-Façanha, A.L., Oliveira, M.A., Perales, J., Machado, O.L., Gomes, V.M. (2006) Antimicrobial peptides from chill pepper seeds cause yeast plasma membrane permeabilization and inhibit the acidification of the médium by yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760:1323-1332.
- Diz, M.S., Carvalho, A.O., Ribeiro, S.F.F., Da Cunha, M., Beltramini, L., Rodrigues, R., Nascimento, V.V., Machado, O.L.T., Gomes, V.M. (2011) Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chilli pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. *Physiologiae 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.
- Duvick, J.P., Rood, T., Rao, A.G., Marshak, D.R. (1992) Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Biological Chemistry*, 267:18814-18820.
- Endara, M.J., Coley, P.D. (2010) The resource availability hypothesis revisited: a meta-analysis. *Functional Ecology*, 25:389-398.
- Egorov, Ts. A., Odintsova, T.I. (2012) Defense peptides os plant immunity. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 38:1-9.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 22 de outubro de 2015.
- Fao. (2009) How feed the world in 2050. Roma, Itália. p. 1:35

- Farran, I., Sanchez, S.J.I., Medina, J.F., Prieto, J.E Mingo-Castel, A.M. (2002) Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. *Transgenic Research*, 1:337-346.
- Fermi, C., Pernossi, L. (1984) Untersuchungenuber die Enzyme. Vergleichendes Studie. *Z Hyg Infeektionskr*, 18:83-89.
- Ferreira, R.B. Monteiro, S. Freitas, R. Santos, C.N. Chen, Z. Batista, L.M. Duarte, J. Borges, A. Teixeira A.R. (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 8:677-700.
- Ferry, N., Eduwards, M.G., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R. (2004) Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 15:155-161.
- Filho, H. Pimentas Quentes. (2002) www.geosites.com/napavalley/1819/index.htm 10/09/12, página mantida por Ring of Fire.
- Friedrich, C.L., Moyles, D., Beveridge, T.J. Hancock, R.E. (2000) Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:2086-2092.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., Bak, S. (2013) Plant Defense against Insect Herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, 14:10242-10297.
- Gallo, R.L., Murakami, M., Ohtake, T., Zaiou, M. (2002) Biology and clinical relevance of naturally accruing antimicrobial peptides. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110:823-831.
- Garcia-Olmedo, F., Rodriguez-Palenzuela, P., Molina, A. (2001) Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Letters*, 498:219-222.
- Giudici, M., Poveda, J.A., Molina, M.I., De La Canal, I., Gonzalez-Ros, J.M. (2006) Antifungal effects and mechanism of action of viscotoxiin A3. *FEBS journal*, 273:72-83.

- Giuffrida, D., Dugo, P., Torre, G., Bignardi, C., Cavazza, A., Corradini, C., Dugo, G. (2014) Evaluation of carotenoid and capsaicinoid contents in powder of red chili peppers during one year of storage. *Food Research International*, 65:163-170.
- Giuliani A., Pirri G. e Nicoletto S.F. (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2:1-33.
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S.O., Terán, L.M. (2010) *Clinical Immunology*, 135:1–11.
- Habib, H., Fazili, K.M. (2007) Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology*, 2:68-85.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (2000) Responses to plant Pathogens In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. BB Buchanan, W., Gruissem e R. L., Jones (eds.), *American Society of Plant Physiology*, 1102-1156.
- Hancock, R.E.W., Sahl, H.G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24:1551-1557.
- Haq, S.K., Atif, S.M., Khan, R.H. (2004) Protein proteinase inhibitor genes in combat against insect, pests and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431:145-159.
- Hayashi, K., Takehisa, T., Hamato, N., Takano, R., Hara, S., Miyata, T., Kato, H. (1994) Inhibition of serine proteinases of the blood coagulation system by squash family protease inhibitors. *Journal of Biochemistry*, 116:1013-1018.
- Heil, M. (2010) Plastic defence expression in plants. *Evolutionary Ecology*, 24:555-569.
- Hill, T.A., Ashrafi, H., Wo, R.C.S., Yao, J., Stoffel, K., Truco, J.M., Kozik, A., Michelmore, R.W., Deynze, A.V. (2013) Characterization of *Capsicum annuum* Genetic Diversity and Population Structure Based on Parallel Polymorphism Discovery with a 30K Unigene Pepper GeneChip. *Plos One*, 8:1-16.
- Ince, A.G., Karaca, M., Onus, A.N. (2010) Genetic Relationships Within and Between *Capsicum* Species. *Biochemical Genetics*, 48:83-95.

- Jamal, F., Pandey, P.K., Singh, D., Khan, M.Y. (2013) Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemical Review*, 12:1-34.
- Ježek, P., Hlavatá, L. (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37:2478-2503.
- Kader, J.C. (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47:627-654.
- Khamis, A.M., Essack, M., Gao, X., Bajic, V.B. (2014) Distinct profiling of antimicrobial peptide families. *Bioinformatics*, p.738.
- Kim, J.Y., Park, S.C., Hwang, L., Cheong, H., Nah, J.W., Hahm, K.S., Park, Y. (2009) Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 10:2860-2872.
- Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (1997) Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, 2:379-384.
- Koshlukova, S.E., Lloyd, T.L., Araujo, M.W. Edgerton, M. (1999) Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 274:18872-18879.
- Kowaltowski, A.J., De Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 47:333-343.
- Laing, W.A., McManus, M.T. (2002) In Protein Protein interactions in plants, (McManus, M.T., Laing, W.A. and Allan, A.C. eds.) *Sheffield Academic Press*. 7:77-119.
- Lannes S.D., Finger F.L., Schuelter A.R., Casali V.W.D. (2007) Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. *Scientia Horticulturae*, 112:266-270.
- Lawrence, P.K., Koundal, K.R. (2002) Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5:5-6.

- Ledoigt, G., Griffaut, B., Debiton, E., Vian, C., Mustel, A., Evray, G., Maurizis, J.C., Madelmont, J.C. (2006) Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38:268-271.
- Leitner, M., Boland, W., Mithofer, A. (2005) Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 167:597-606.
- 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.
- Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E., Egorov, T. (2005) An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry*, 66:2426-2431.
- Lobo, D.S., Pereira, I.B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L.N., Cabral, L.M., Faria, J., Bellio, M., Campos, R.C., Linden, R, Kurtenbach, E. (2007) Antifungal *Pisum sativum* defensin1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry*, 46:987-996.
- Loizzo, M.R., Pugliese, A., Bonesi, M., Menichini, F., Tundis, R. (2015) Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from *Capsicum annum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* and *Capsicum chinense*: A comparison between fresh and processed peppers. *LWT - Food Science and Technology*, 64:623-631.
- Lowenberger, C., Charlet, M., Vizioli, J., Kamal, S., Richman, A., Christensen, B.M., Bulet, P. (1999) Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry*, 274:20092-20097.
- Luque-Ortega, J.R., Van't Hof, W., Veerman, E.C., Saugar, J.M., Rivas, L. (2008) Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. *The FASEB Journal*. 22:1817-1828.

- Macedo, M., De Matos, D., Machado, O., Marangoni, S., Novello, J. (2000) Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: Purification and properties. *Phytochemistry*, 54:553-558.
- Macedo, M.L.R., Xavier-Filho, J. (1993) Purification and partial characterization of trypsin inhibitors from seeds of *Clitoria ternatea*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58:55-58.
- Macedo, M.L.R., Garcia, V.A., Freire, M.G.M., Richardson, M. (2007) Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, 68:1104-1111.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Franco, O.L., Migliolo, L., Oliveira, C.F.R. (2011) Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *homalinotus coriaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 158:164-172.
- Machado, S.W., Oliveira, C.F.R., Bezerra, C.D.S., Freire, M.G.M., Kill, M.R., Machado, O.L.T., Marangoni, S., Macedo, M.L.R. (2013) Purification of a Kunitz-type inhibitor from *Acacia polyphylla* DC seeds: Characterization and insecticidal properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera Pyralidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:2469-2478.
- Maiese, K., Chong, Z.Z., Hou, J., Shang, Y.C. (2010) Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Experimental gerontology*, 45:217-234.
- Mangoni, M.L., Saugar, J.M., Dellisanti, M., Barra, D., Simmaco, M., Rivas, L. (2005) Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280:984-990.
- Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, 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.
- Martins, K.C., Pereira, T.N.S., Souza, S.A.M., Costa, F.R. (2010) Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. *Ciência Rural* (online). 40:1746-1751.

- Mello, E.O., Ribeiro, S.F.F., Carvalho, A.O., Santos, I.S., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., Gomes, V.M. (2011) Antifungal activity of Pv D1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. *Current Microbiology*, 62:1209-1217.
- Mello, G., Oliva, M., Sumikawa, J., Machado, O., Marangoni, S., Novello, J., Macedo, M. (2001) Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. *Journal of protein chemistry*, 20:625-32.
- 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.
- Mihajlovic, M. e Lazaridis, T., (2010) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798:1485-1493.
- Minami, Y., Higuchi, S., Yagi, F., Tadera, K. (1998) Isolation and some properties of the antimicrobial peptide (Pa-AMP) from the seeds of pokeweed (*Phytolacca Americana*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62:2076-2078.
- Mithofer, A., Boland, W. (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63:431-450.
- Monteiro, E.R., Bastos, E.M., Lopes, A.C.A., Gomes, R.L.F., Nunes, J.A.F. (2010) Diversidade genética entre acessos de espécies cultivadas de pimentos. *Ciência Rural*, Santa Maria. 40:283-288.
- Moscone, E.A., Escaladaferro, M.A., Gabrielle, M., Cecchini, N.M., Garcia, Y.S., Jarret, R., Davinã, J.R., Ducasse, D.A., Barboza, G.E., Ehrendorfer, F. (2007) The evolution of the chili pepper (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Horticulture*, 745:137-169.
- Mosolov, V.V. e Valueva, T.A. (2005) Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 41:261-282.
- 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*, 13:9229-9243.

- Nascimento, K.O., Vicente, J., Saldanha, T., Barbosa Júnior, J.L., Barbosa, M.I.M.J. (2012) Caracterização química e informação nutricional de geleia de pimenta Cambuci orgânica (*Capsicum baccatum* L.). *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 7:283-288.
- Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., Goździcka-Józefiak, A. (2014) Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica*, 59:181-196.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F., Vogel, H.J. (2011) The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology*, 29:464-472.
- Nicolas P. (2009) Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS Journal*, 276:6483-96.
- Norton, G., D Mello, J.P.F., Duffus, C.M., Duffus, J.H. (1991) Protease inhibitors. In: Toxic substances in crop plants. *Royal Society of Chemistry*, 1:68-106.
- Odintsova, T., Egorov, T.A. (2012) Plant antimicrobial peptides. Plant Signaling Peptides: *Springer*, 16:107-133.
- Oliva, M.L.V., Ferreira, R.S., Ferreira, J.G., De Paula, C.A.A., Salas, C.E., Sampaio, M.U. (2011) Structural and Functional Properties of Kunitz Proteinase Inhibitors from Leguminosae: A mini Review. *Current Protein and Peptide Science*, 12:348-357.
- Oliveira, C.F.R., Macedo, M.L.R. (2011) Emprego de inibidores de protease vegetais como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. *Ciências biológicas da saúde*, 1-1.
- Park, Y., Choi, B.H., Kwak, J.S., Kang, C.W., Lim, H.T., Cheong, H.S., Hahm, K.S. (2005) Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:6491-6496.
- Pelegriani, P.B, Franco, O.L. (2005) Plantgamma-thionins: novel insightson the mechanism of action of amulti-functional class of defense proteins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37:2239-2253.

- Pelegriani, P.B., Murad, A.M., Silva, L.P., dos Santos, R.C.P., Costa, F.T., Tagliari, P.D. (2008) *Peptides*, 29:1271-9.
- 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*, 2011:2011-250349.
- Pickersgill, B. (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96:129-133.
- Powers, J.P.S., Hancock, R.E. (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24:1681-1691.
- Ramos, V.S., Silva, G.S., Freire, M.G.M., Machado, O.L.T., Parra, J.R.P., Macedo, M.L.R. (2008) Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:11348-11355.
- Regente, M.C., Giudici, A.M., Villala, J., De la Canal, L. (2005) The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Letters in Applied Microbiology*, 40:183-189.
- Rêgo, E.R., Finger, F.L., Rêgo, M.M. (2012) Consumption of pepper in Brazil and its implications on nutrition and health of humans and animal. M.A. Salazar and J.M. Ortega. 7:1-12.
- Reifschneider, F.J.B. (2000) *Capsicum*: pimentas e pimentões do Brasil. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia- *Embrapa Hortaliças*, p 113.
- Reis, A., Duval, A.M.Q., Inoue-Nagata, A.K., Ávila, A.C., Lopes, C.A. (2011) Manejo de Doenças em Pimentas no Brasil. Embrapa Hortaliças. II Encontro Nacional do Agronegócio Pimentas (*Capsicum* spp.).
- Ribeiro, S.F., Da Cunha, A.O., Rodrigues, M., Melo, V.M., Vasconcelos, I.M., Melo, E.J.T., Cruz, L.P., Gomes, V.M. (2007) Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicom*, 50:600-611.
- Ribeiro, S.F.F., Silva, M.S., Da Cunha, M., Carvalho, A.O., Dias, G.B., Rabelo, G., Mello, É.O., Santa-Catarina, C., Rodrigues, R., Gomes, V.M (2012) *Capsicum*

- annuum* L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 3:657-670.
- Richardson, M. (1991) Seed storage proteins: the enzymes inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*, 5:259-305.
- Rivas L, Luque-Ortega J, Fernandez-Reyes M, Andreu D (2010) Membrane-active peptides as ant- infectious agents. *Journal of applied biomedicine*, 8:159-167.
- Romo-Hualde, A.I., Yetano-Cunchillos, C., González-Ferrero, M.J., Sáiz-Abajo, C.J. (2012) González-Navarro Supercritical fluid extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red pepper (*Capsicum annum* L.) by-products. *Food Chemistry*, 133: 1045-1049.
- Schagger, H., Von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166:368-379.
- Schneider, T., Kruse, T., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A.K., Mygind, P.H., Ravento's, D.S., Neve, S., Ravn, B., Bonvin, A.M., De Maria, L., Andersen, A.S., Gammelgaard, L.K., Sahl, H.G., Kristensen, H.H. (2010) Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor lipid II. *Science*, 328:1168-1172.
- Segura, A., Moreno, M., Madueno, F., Molina, A., GarciaOlmedo, F. (1999) Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12:16-23.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M., Cammue, B.P., De Bolle, M.F. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46:941-950.
- 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. (2014) Caracterização de peptídeos antimicrobianos de sementes de *Canavalia ensiformis* e atividade inibitória sobre diferentes espécies de leveduras. Monografia (Licenciatura em Biologia) Campos dos Goytacazes, RJ,

- centro de Biociências e Biotecnologia – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 6p.

- Silva, R.G.G., Vasconcelos, I.M., Filho, A.J.U.B., Carvalho, A.F.U., Souza, T.M., Gondima, D.M.F., Varela, A.L.N., Oliveira, J.T.A. (2015) Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. *Industrial Crops and Products*, 70:48-55.
- Smith, P.K., Hermanson, G.T., Maallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Goeke, N.M., Osion, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150:76-85.
- Souza, G.S., Nascimento, V.V., Carvalho, L.P., Melo, E.J.T., Fernandes, K.V., Machado, O.L.T., Retamal, C.A., Gomes, V.M., Carvalho, A.O. (2013) Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leshmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, 135:116-125.
- Stamp, N. (2003) Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Quarterly Review of Biology*, 78:23-55.
- Steffen, H., Reig, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H.G., Peschel, A., Gotz, F., Garbe, C. Schitteck, B. (2006) Naturally processed dermicidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrobial agents chemotherapy*, 50:2608-2620.
- Stevens, J.A., Dunse, K.M., Guarino, R.F., Barbeta, B.L., Evans, S.C., West, J.A., Anderson, M.A. (2013) The impact of ingested potato type II inhibitors on the production of the major serine proteases in the gut of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43:197-208.
- Talas-Ogras, T. (2004) Screening antimicrobial activities of basic protein fractions from dry and germinated wheat seeds. *Biologia Plantarum*, 48:583-588.
- Tamhane, V.A., Chougule, N.P., Giri, A.P. (2005) In vivo and in vitro effect of *Capsicum annuum* protease inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2:156-167.

- 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, G.B., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Trindade, F.G., Da Cunha., M, Gomes, V.M. (2016) Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. *BMC Microbiology*, 16:12.
- Thevissen, K., Terras, F.R.G., Broekaert, W.F. (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensin inhibits fungal growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:5451-5458.
- Thomas, S., Karnik, S., Barai, R.S., Jayaraman, V.K., Idicula-Thomas, S. (2009) A useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, p.1021.
- Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., Thevissen, K. (2002) Plantas defensins. *Planta*, 216:193-202.
- Tong, N., Bosland, P.W. (1999) *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, 109:71-77.
- Torres-Castillo, J.A., Jacobo, C.M., Blanco-Labra, A. (2009) Characterization of a highly stable trypsin-like proteinase inhibitor from the seeds of *Opuntia streptacantha* (*O. streptacantha* Lemaire) *Phytochemistry*, 79:1374-1381.
- Valueva, T.A., Mosolov, V.V. (2004) Role the inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry*, 69:1305-1309.
- Van der Weerden, N.L., Lay, F.T., Anderson, M.A. 2008 The plant defensin, *NaD1*, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *Journal of Biological Chemistry*, 283:14445-14452.
- Van't Holf, W., Veerman, E.C.I., Helmerhorst, E.J., Nieuw, A.A.V. (2001) Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biological Chemistry*, 382:597-619.

- Vylkova, S., Nayyar, N., Li, W., Edgerton, M. (2007) Human β -defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrobial agents chemotherapy*, 51:154-161.
- Wahyuni, Y., Ballester, A.R., Tikunov, Y., Vos, R.C.H., Pelgron, T.B.K., Maharijaya, A., Sudarmonowati, E., Bino, J.R., Bovy, A.G. (2013) Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. *Metabolomics*, 9:130-144.
- Wang, K., Dang, W., Xie, J., Zhu, R., Sun, M., Jia, F., Zhao, Y., Umxiaoping., Qiu, S., Li, X., Ma, Z., Yan, W., Wang, R. (2015) Antimicrobial peptide protonectin disturbs the membrane integrity and induces ROS production in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848:2365-2373.
- Wang, S., Rao, P. (2010) A leguminous trypsin-chymotrypsin inhibitor Limenin with antifungal activity from *Phaseolus limensis*. *European Food Research and Technology*, 231:331-338.
- Wang, X., Bunkers, G.J., Walters, M.R., Thoma, R.S. (2001) Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malva passiflora*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282:1224-1228.
- Wimley, W.C. (2010) Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS chemical biology*, 5:905-917.
- Yamamoto, S., Nawata, E. (2005) *Capsicum frutescens* L. in southeast and east Asia, and its dispersal routes into Japan. *Economic Botany*, 59:18-28.
- Yang, X., Li, J., Wang, X., Fang, W., Bidochka, M.J., She, R., Xiao, Y., Pei, Y. (2006) Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. *Peptides*, 27:1726-1731.
- Ye, X.Y., Ng, T.B., Rao, P.F. (2001) A Bowman-Birk-type trypsin-chymotrypsin inhibitor from broad beans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289:91-96.
- Yeaman, M.R., Yount, N.Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55:27-55.

- Yeung, A.T., Gellatly, S.L., Hancock, R.E. (2011) Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68:2161-2176.
- Yount N.Y, Yeaman MR (2013) Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277:127-138.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415:389-395.
- Zottich, U., Da Cunha, M., Carvalho, A.O., Dias, G.B., Silva, N.C.M., Santos, I.S., Nascimento, V.V., Miguel, E.C., Machado, O.L.T., Gomes, V.M. (2011) Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810:375-383.