

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PEPTÍDEOS DE FRUTOS DE *Capsicum annuum* SOBRE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS E DETECÇÃO EM FRUTOS DE OUTRAS
ESPÉCIES DO GÊNERO *Capsicum*

LAYRANA DE AZEVEDO DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2016

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PEPTÍDEOS DE FRUTOS DE *Capsicum annuum* SOBRE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS E DETECÇÃO EM FRUTOS DE OUTRAS
ESPÉCIES DO GÊNERO *Capsicum*

LAYRANA DE AZEVEDO DOS SANTOS

“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

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PEPTÍDEOS DE FRUTOS DE *Capsicum annuum* SOBRE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS E DETECÇÃO EM FRUTOS DE OUTRAS
ESPÉCIES DO GÊNERO *Capsicum*

LAYRANA DE AZEVEDO DOS SANTOS

“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 26 de fevereiro de 2016.

Comissão Examinadora:

Profª Drª Adriana Ferreira Uchôa (D. Sc em Biociências e Biotecnologia) – UFRN

Profª Drª Antônia Elenir Amâncio Oliveira (D.Sc em Biociências e Biotecnologia)
UENF

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

Profª. Valdirene Moreira Gomes (Drª em Ciências) – UENF
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado até aqui. Por me preencher de paz nos momentos angustiantes e renovar minha fé e minhas forças para continuar a caminhada. A gratidão é tão grande que não cabe no peito!!

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e a CAPES, pela oportunidade, apoio e suporte financeiro a esta pesquisa.

À minha orientadora, Val! Por ter sido muito mais que uma orientadora durante esses anos. Pela oportunidade, por me direcionar na vida acadêmica, pela paciência, por pensar nos detalhes desta defesa (quando eu já não conseguia mais pensar em nada, rs), por ser humana e entender as nossas dificuldades e sempre torcer por nós!!

Aos professores André de Oliveira Carvalho, Adriana Ferreira Uchôa e Antônia Elenir Amâncio Oliveira, por aceitarem participar tão prontamente desta banca.

À Dr^a Olga Lima Tavares Machado e a técnica Jucélia da Silva Araujo Giuli pela colaboração no sequenciamento de proteínas.

À Lídia Pereira pelos ensaios de α -amilase. Mas também pelo ser humano que é; e pela amizade em todos os momentos desta caminhada.

À Suzanna de Fátima Ferreira Ribeiro, por toda ajuda prestada e ensinamentos passados desde minha chegada ao LFBM. Muito obrigada, gata! Um caminho de muitas vitórias a você!!!

Ao Gabriel Taveira, por toda ajuda prestada nos ensaios de ROS e Sytox. Obrigada por tudo! E principalmente pela modéstia! rs

Aos técnicos, Noil, Luiz Carlos e Valéria Miguelote, pela manutenção e organização do nosso laboratório e também pelos momentos de descontração e amizade.

Ao José Daniel Valle, por nos receber tão bem no programa. Por sempre sanar nossas dúvidas, por ser sempre paciente e tão dedicado a sua profissão. Obrigada, Daniel!

A todos os grupos de pesquisa do LFBM, pelas conversas de bancada, risadas e claro, por toda ajuda e amizade. Muito obrigada, galera!

À minha amiga, companheira fiel de caminhada, Marciele Souza. Por TODOS os momentos vividos até aqui, pela paciência em me aturar (sei que não é fácil). Obrigada por tudo!

Ao meu namorado, Carlos Magno, por tantas coisas que nem cabe dizer. Mas acima de tudo por ser companheiro, por me motivar, me impulsionar a seguir em frente, por abrir mão de tantas coisas por mim. Obrigada por tudo!

Aos meus familiares e amigos, pelo incentivo e torcida de sempre! Obrigada por compreenderem minha ausência durante esses anos. Vocês sempre serão meu porto seguro!!

À minha sobrinha (Juju) e aos meus afilhados (são muitos, rs) por renovar minhas energias com as brincadeiras e gargalhadas! Eu sou muito feliz em tê-los em minha vida. Amo vocês!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS/ ESQUEMAS/TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 - Objetivo geral	4
2.2 - Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 – Mecanismos de defesa de plantas	5
3.2 – Peptídeos antimicrobianos de plantas	6
3.3 – Gênero <i>Capsicum</i>	12
3.4 – Doenças da cultura do gênero <i>Capsicum</i>	15
4- MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 – Material	18
4.1.1 – Material biológico	18
4.1.1.1 – Sementes	18
4.1.1.2 – Microrganismos	18
4.1.1.3 – Insetos	19
4.1.2 – Reagentes e outros materiais	19
4.2 – Extração e purificação de proteínas dos frutos	19

4.2.1 – Cultivo das plantas	19
4.2.2 – Extração proteica dos frutos	20
4.2.3 – Purificação dos peptídeos por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC	22
4.3 – Caracterização dos peptídeos	22
4.3.1 – Quantificação das proteínas	22
4.3.1.1 – Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS	22
4.3.1.2 – Preparo das amostras e condições da corrida	23
4.3.1.3 – Coloração com <i>Coomassie Blue</i> e descoloração do gel	23
4.3.2 – Identificação dos peptídeos	23
4.4 – Análise da atividade antimicrobiana e mecanismo de ação dos peptídeos	24
4.4.1 – Ensaio de inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos	24
4.4.2 – Análise morfológica dos fungos filamentosos tratados com a fração Fa5	25
4.4.3 – Efeito da fração Fa5 sobre a permeabilização de membranas fúngicas	25
4.4.4 – Ensaio de determinação da indução de ROS intracelular	26
4.5 – Avaliação da inibição da atividade amilásica	26
4.5.1 – Obtenção das amilases	26
4.5.2 – Ensaios de inibição da atividade da amilase salivar humana e do inseto <i>C. maculatus</i>	27
4.6 – Determinação da inibição da atividade da tripsina	27
4.7 – Análise estatística	28
5 – RESULTADOS	29
5.1 – Perfil eletroforético do extrato bruto dos frutos de <i>C. annuum</i>	29
5.2 – Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético das frações do extrato bruto dos frutos de <i>C. annuum</i>	30
5.3 – Efeito das frações peptídicas obtidas dos frutos de <i>C. annuum</i> sobre a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos	32
5.4 – Identificação da sequência de aminoácidos da fração Fa5 por espectrometria de massas	38
5.5 – Análise morfológica dos fungos filamentosos tratados com a fração Fa5	39

5.6 – Efeito da fração Fa5 sobre a permeabilização de membranas	41
5.7 – Efeito da fração Fa5 sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células fúngicas	44
5.8 – Efeito das frações sobre a inibição da atividade da amilase salivar humana e larval do inseto <i>Callosobruchus maculatus</i>	47
5.9 – Efeito das frações peptídicas obtidas dos frutos de <i>C. annuum</i> sobre a inibição da atividade da enzima tripsina	49
5.10 – Perfil eletroforético do extrato bruto dos frutos de <i>Capsicum</i>	50
5.11 – Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético das frações dos extratos bruto dos frutos de <i>Capsicum</i>	51
6 – DISCUSSÃO	55
7- CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS/ ESQUEMAS/TABELAS

- Tabela 1** - Peptídeos antimicrobianos de plantas e suas atividades biológicas. Adaptado de Ribeiro *et al.*, (2007a) por Gomes, (2011) 9
- Esquema 1:** Representação esquemática da extração e fracionamento das proteínas dos frutos de pimenta das espécies *Capsicum chinense* Jacq., (acesso UENF 1755), *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. (acesso UENF 1496) e *Capsicum annuum* L. (acesso UENF 1381) (Taveira *et al.*, 2014) 21
- Figura 1:** Modelos frequentemente citados para a atividade de peptídeos antimicrobianos. **(A)** difusão de AMPs através da solução; **(B)** adsorção de AMPs na membrana; **(C)** após a concentração limite ser alcançada, as moléculas de peptídeos começam a se reorientar na bicamada lipídica; **(D)** aduela de barril; **(E)** Modelo poro toroidal e **(F)** Modelo “tapete” (Nawrot *et al.*, 2014) 8
- Figura 2** – Frutos do gênero *Capsicum*. (A) *Capsicum annuum*; (B) *Capsicum baccatum* var. *pendulum*; (C) *Capsicum chinense*. Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Capsicum> 14
- Figura 3:** Visualização eletroferética do gel de tricina na presença de SDS do extrato bruto dos frutos de **(A)** *C. annuum* tratado com β -mercaptoetanol. **(M)** marcador de baixa massa molecular (kDa) 29

Figura 4: (A) Cromatograma do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* (acesso UENF 1381) em coluna de fase reversa C2/C18. Frações Fa1 – Fa8 obtidas após eluição da coluna com propanol. A cromatografia foi realizada utilizando-se um fluxo 0,5 mL.min⁻¹ a 38 °C. **(B)** Visualização eletroforética em gel de tricina na presença de SDS das frações obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* (acesso UENF 1381) após cromatografia em sistema HPLC. Todas as frações foram tratadas com β-mercaptoetanol. M – Marcador de baixa massa molecular (kDa) 31

Figura 5: Visualização gráfica do crescimento do fungo filamentosso *F. laterithium* na ausência (controle) e na presença de 200 µg.mL⁻¹ das frações ricas em peptídeos, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*. O crescimento deste fungo foi observado até 54 h. **(A)** (-●-) Controle; (-■-) Fração Fa2; (-□-) Fração Fa3; (-▼-) Fração Fa4; (-◆-) Fração Fa5. **(B)** (-●-) Controle; (-◇-) Fração Fa6; (-▲-) Fração Fa7; (-○-) Fração Fa8. Os valores são médias (±SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças (p<0,05) entre o tratamento experimental e controle 33

Figura 6: Visualização gráfica do crescimento do fungo filamentosso *F. solani* na ausência (controle) e na presença de 200 µg.mL⁻¹ das frações ricas em peptídeos, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*. O crescimento deste fungo foi observado até 54 h. **(A)** (-●-) Controle; (-■-) Fração Fa2; (-□-) Fração Fa3; (-▼-) Fração Fa4; (-◆-) Fração Fa5. **(B)** (-●-) Controle; (-◇-) Fração Fa6; (-▲-) Fração Fa7; (-○-) Fração Fa8. Os valores são médias (±SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças (p<0,05) entre o tratamento experimental e controle 34

Figura 7: Visualização gráfica do crescimento do fungo filamentosso *F. oxysporum* na ausência (controle) e na presença de 200 µg.mL⁻¹ das frações ricas em peptídeos, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*. O crescimento deste fungo foi observado até 54 h. **(A)** (-●-) Controle; (-■-) Fração Fa2; (-□-) Fração Fa3; (-▼-) Fração Fa4; (-◆-) Fração Fa5. **(B)** (-●-) Controle; (-◇-) Fração Fa6; (-▲-) Fração Fa7; (-○-) Fração Fa8. Os valores são médias (±SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças (p<0,05) entre o tratamento experimental e controle 35

Fração Fa8. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle 36

Figura 8: Visualização gráfica do crescimento do fungo filamentosso *C. gloeosporioides* na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações ricas em peptídeos, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*. O crescimento deste fungo foi observado até 60 h. **(A)** (-●-) Controle; (-■-) Fração Fa2; (-□-) Fração Fa3; (-▼-) Fração Fa4; (-◆-) Fração Fa5. **(B)** (-●-) Controle; (-◇-) Fração Fa6; (-▲-) Fração Fa7; (-○-) Fração Fa8. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle 37

Figura 9: Identificação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas dos peptídeos 1 e 2 obtidos do peptídeo de massa molecular de aproximadamente 6,5 kDa obtida da fração Fa5 do extrato bruto de frutos de *C. annuum* (acesso UENF 1381) após cromatografia em sistema HPLC. **(A)** Alinhamento dos aminoácidos do peptídeo 1. **(B)** Alinhamento dos aminoácidos do peptídeo 2. (*) aminoácidos idênticos; (:) aminoácidos com fortes propriedades similares; (.) aminoácidos com fracas propriedades similares; (-) espaço foi introduzido para melhorar o alinhamento. Os números que flanqueiam as sequências indicam a posição dos resíduos em relação à sequência inteira 38

Figura 10 – Microscopia óptica da estrutura das diferentes espécies de fungos fitopatogênicos. (A, C, E, G) Células controle (crescidas na ausência da fração Fa5); (B, D, F e H) Células crescidas na presença $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração Fa5. Aglomeração Celular (*); Dificuldade de alongamento da hifa (seta aberta); Estreitamento da hifa (seta pontilhada); Inchaço da hifa (seta preenchida). Barras= $20 \mu\text{m}$ 40

Figura 11: Imagem de microscopia de fluorescência dos fungos *F. lateritium* e *F. solani* incubadas com o corante *Sytox Green*, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração Fa5. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $20 \mu\text{m}$ 42

Figura 12: Imagem de microscopia de fluorescência dos fungos *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides* incubadas com o corante Sytox Green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração Fa5. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm 43

Figura 13: Imagem de microscopia de fluorescência dos fungos *F. lateritium* e *F. solani* após serem incubadas com o corante para verificação de indução de ROS (2', 7' – diclorofluoresceína diacetato), após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração Fa5, por 24 h. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm 45

Figura 14: Imagem de microscopia de fluorescência dos fungos *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides* após serem incubadas com o corante para verificação da indução de ROS (2', 7' – diclorofluoresceína diacetato), após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração Fa5, por 24 h. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras= 20 μm 46

Figura 15: Visualização gráfica do efeito das frações, obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* após cromatografia em HPLC, sobre a atividade enzimática da amilase salivar humana (A) e da amilase larval do inseto *C. maculatus* (B). O ensaio foi realizado em uma concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores representam médias ($\pm\text{SD}$) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p<0,05$) entre o tratamento experimental e controle 48

Figura 16: Visualização gráfica do efeito das frações, obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* após cromatografia em HPLC, sobre a atividade enzimática da tripsina. Os valores representam as médias ($\pm\text{SD}$) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p<0,05$) entre o tratamento experimental e controle 49

Figura 17: Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS do extrato bruto dos frutos de (C) *C. chinense*, (B) *C. baccatum* tratados com β -mercaptoetanol. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa) 50

Figura 18: (A) Cromatograma do extrato bruto dos frutos de *C. chinense* (UENF 1755) em coluna de fase reversa C2/C18. Frações Fc1 – Fc8 obtidas após eluição da coluna com propanol. A cromatografia foi realizada utilizando-se um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ a 38 °C. **(B)** Visualização eletroforética em gel de tricina na presença de SDS das frações obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. chinense* (acesso UENF 1755) após cromatografia em sistema HPLC. Todas as frações foram tratadas com β-mercaptoetanol. M – Marcador de baixa massa molecular (kDa)..... 52

Figura 19: (A) Cromatograma do extrato bruto dos frutos de *C. baccatum* (acesso UENF 1496) em coluna de fase reversa C2/C18. Frações Fb1 – Fb8 obtidas após eluição da coluna com propanol. A cromatografia foi realizada utilizando-se um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ a 38 °C. **(B)** Visualização eletroforética em gel de tricina na presença de SDS das frações obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. baccatum* (acesso UENF 1496) após cromatografia em sistema HPLC. Todas as frações foram tratadas com β-mercaptoetanol. M – Marcador de baixa massa molecular (kDa) 54

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ABS** – Absorbância
- **AMPs** – peptídeos antimicrobianos (do inglês *antimicrobial peptides*)
- **ATP** – adenosina trifosfato (do inglês *adenosine triphosphate*);
- **BApNA**– N- Benzoil- DL-arginil- *p*- nitrianilida
- **BCA** – Ácido bicinconínico (do inglês *bicinchoninic acid*)
- **Bisacrilamida** – N,N'-metileno bisacrilamida
- **DAD** – Detector de arranjo de diodo
- **DNS** – do inglês *dinitrosalicylic acid*
- **EB** – Extrato bruto
- **EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- **HPLC** – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*);
- **NO** – óxido nítrico
- **ROS** – espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)
- **rpm**– Rotações por minuto
- **SDS** – dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate*)
- **TEMED** – N^{''},N^{'''},N^{''''},N^{''''''}- tetrametiletlenodiamino
- **TFA** – ácido trifluoroacético (do inglês *trifluoroacetic acid*)
- **Tris** – tris (hidroximetil) aminometano (do inglês *tris (hydroxymethyl) aminomethane*)
- **U** – Unidade de atividade
- **Fa5** – Fração rica em peptídeos oriunda do extrato dos frutos de *C. annuum*

RESUMO

SANTOS, Layrana de Azevedo; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2016; “CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS DE FRUTOS DE *Capsicum annuum* SOBRE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E DETECÇÃO EM FRUTOS DE OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Capsicum*”; Orientadora: Dr^a Valdirene Moreira Gomes; Conselheiros: Dr. Gonçalo Apolinário Filho e Dr. André de Oliveira Carvalho.

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae, tem grande relevância social, econômica e agrônômica. Este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar peptídeos presentes em frutos de pimenta das espécies de *Capsicum annuum* L., *Capsicum baccatum* e *Capsicum chinense* e avaliar o potencial fungicida de peptídeos dos frutos de *Capsicum annuum* L.. Inicialmente, as proteínas presentes nos frutos de *Capsicum* foram extraídas em tampão fosfato pH 5,4 e precipitadas com sulfato de amônio a 0-70 % de saturação. Os extratos resultantes das extrações foram submetidos à cromatografia de fase reversa usando coluna C2/C18 em sistema HPLC. Devido a uma maior disponibilidade de frutos, as frações (Fa2 – Fa8), obtidas do extrato bruto de *C. annuum* após cromatografia foram selecionadas e submetidas a ensaios antifúngicos contra *Fusarium laterithium*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides* numa concentração de 200 µg.mL⁻¹. Estas frações também foram submetidas à inibição *in vitro* da α-amilase salivar humana e de larvas do inseto *Callosobruchus maculatus* e da tripsina do pâncreas de suínos. A fração

antifúngica, denominada Fa5, apresentou alta atividade antimicrobiana sobre as espécies do gênero *Fusarium*, não apresentando atividade significativa contra o fungo *C. gloesporioides*. A fração Fa5 foi também selecionada e submetida a testes de permeabilidade de membranas e de indução de espécies reativas de oxigênio (ROS). A fração Fa5 apresentou duas bandas proteicas majoritárias de 17 e 6,5 kDa, e estas foram submetidas a identificação de sequência por espectrometria de massas. Dois peptídeos foram obtidos a partir da banda de 6,5 kDa, os quais resultaram, por análise comparativa em bancos de dados de proteínas, similaridade com peptídeos antimicrobianos. Os fungos *F. laterithium*, *F. solani*, *F. oxysporum*, e *C. gloesporioides* quando tratados com a fração Fa5 tiveram suas membranas permeabilizadas. Os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* também apresentaram um aumento na produção endógena de ROS, quando tratados com essa fração. A fração Fa5 foi também capaz de inibir 69 % da atividade das α -amilases salivar humana e 80 % da atividade larval do inseto *C. maculatus*, mas nenhuma atividade sobre a enzima tripsina foi detectada.

Palavras-chaves: peptídeos; *Capsicum annuum*; atividade antimicrobiana

ABSTRACT

SANTOS, Layrana de Azevedo; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2016; "CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PEPTIDE FROM *Capsicum annuum* FRUITS ON PHYTOPATHOGENIC FUNGAL AND DETECTION IN OTHER SPECIES OF THE GENUS *Capsicum* FRUITS"; Advisor: Dr^a Valdirene Moreira Gomes; Consultants: Dr. Gonçalo Apolinário Filho e Dr. André de Oliveira Carvalho.

The genus *Capsicum* belongs to the Solanaceae family, it has great social relevance, economic and agronomic. This study aimed to purify and characterize peptides present in pepper fruits of the species *Capsicum annuum* L., *Capsicum baccatum* and *Capsicum chinense* and evaluate the potential fungicide of peptides from the *Capsicum annuum* L. fruits. Initially, the proteins present in *Capsicum* fruits were extracted in pH 5.4 phosphate buffer and precipitated with ammonium sulfate at 0-70% saturation. The extracts resulting from extractions were subjected to reverse phase chromatography using C2/C18 column on HPLC system. Due to the increased availability of fruits, the fractions (Fa2 – Fa8), obtained from crude extract of *C. annuum* after chromatography were selected and subjected to antifungal tests against *Fusarium laterithium*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum gloeosporioides* at a concentration of 200 µg.mL⁻¹. These fractions were also subjected to *in vitro* inhibition of the α-amylases from human salivary and larvae of *Callosobruchus maculatus* insect and the trypsin from porcine pancreas. Antifungal fraction, called Fa5, has high antimicrobial activity against the species of *Fusarium* genus and no significant activity against

C. gloeosporioides fungus. The Fa5 fraction was also selected and subjected to membrane permeability assay and induction of reactive oxygen species (ROS). The Fa5 fraction showed two major protein bands of 17 and 6.5 kDa, and these were subjected to sequence identification by mass spectrometry. Two peptides were obtained of the 6.5 kDa band, which resulted in protein databases similarity to antimicrobial peptides by comparative analysis. The fungi *F. laterithium*, *F. solani*, *F. oxysporum* and *C. gloeosporioides* when treated with Fa5 fraction had their membranes permeabilized. Fungi belonging to the *Fusarium* genus also showed an increase in the endogenous production of ROS, when treated with this fraction. The Fa5 fraction was also able to inhibit 69% of the activity of human salivary and 80% activity of larval insect *C. maculatus* α -amylases, but no activity on the enzyme trypsin was detected.

Keywords: peptides; *Capsicum annuum*; antimicrobial activity

1. INTRODUÇÃO

As plantas são susceptíveis a várias doenças causadas por diversos vírus, bactérias, fungos e/ou herbívoros (Castro e Fontes, 2005). De acordo com estimativas os danos causados por essas doenças podem custar perdas de bilhões de dólares por ano (Maor e Shirasu, 2005). A perda na produção devido a patógenos e pragas de plantas atinge cerca de 30 a 40% por ano nos países em desenvolvimento (Flood, 2010).

Desta forma, a demanda de alimentos em decorrência do crescimento populacional tem sido uma grande preocupação, pois diante das inúmeras doenças que causam grandes perdas nas culturas agrícolas torna-se necessária um aumento da produtividade para suprir esta demanda crescente (Rosegrant *et al.*, 2001; Buarque, 2011). Segundo diagnóstico divulgado pela Organização das Nações Unidas, a população mundial chegou a 7,3 bilhões e estima-se que em 2050 pode chegar a 9 bilhões (ONU, 2015).

O controle de doenças bacterianas e fúngicas dependem principalmente de agrotóxicos, incluindo antibióticos e fungicidas. Estes produtos químicos têm impacto negativo sobre a saúde humana e o ambiente. Além disso, o uso extensivo de produtos agroquímicos pode induzir resistência nos patógenos, fazendo com que os pesticidas convencionais sejam menos eficazes (Komárek *et al.*, 2010, Kummerer, 2004). Para compensar estes fenômenos, diversas estratégias têm sido desenvolvidas e empregadas com o objetivo de aumentar a produção de alimentos com melhor qualidade e diminuição dos danos. Entre as

estratégias mais comumente utilizadas estão: o uso de variedades de plantas artificialmente selecionadas mais resistentes às doenças; melhores práticas de agricultura, como a rotação das culturas e o uso de fertilizantes. Entretanto, muitas destas estratégias têm demonstrado resultados não satisfatórios refletindo na necessidade de um aprofundamento nos estudos de doenças em plantas, além de tudo, das defesas dessas plantas às infecções (Castro e Fontes, 2005). No caso específico de resistência a doenças, várias abordagens vêm sendo realizadas com o objetivo de mitigar esta problemática. Nos últimos anos, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm despertado o interesse da engenharia genética para o desenvolvimento de variedades com melhores habilidades defensivas contra patógenos, de forma a reduzir, significativamente, o uso excessivo de produtos químicos na agricultura (Reddy *et al.*, 2004; Holaskova *et al.*, 2015).

Os AMPs formam um importante e antigo mecanismo de resistência inata fornecendo uma linha rápida e metabolicamente barata de defesa contra várias bactérias patogênicas, parasitas, vírus e fungos (Egorov *et al.*, 2005). Esses peptídeos de baixa massa molecular são considerados potenciais agentes terapêuticos, devido ao seu amplo espectro de atividade, baixa citotoxicidade para células de mamíferos e modo de ação que dificulta o surgimento de resistência do patógeno devido à rapidez com que os microrganismos são mortos (Reddy *et al.*, 2004).

Vários trabalhos vêm demonstrando o grande potencial destes AMPs tanto na proteção das plantas quanto na produção de novos fitoterápicos (Matsuzaki, 1999; Maróti *et al.*, 2011). Molina e Garcia-Olmedo (1997) mostraram que quando o gene *Itp2* de *Hordeum vulgare* é superexpresso em *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana*, a tolerância para patógenos bacterianos é aumentada. Outro exemplo do papel dos AMPs também foi mostrado por Padovan *et al.*, (2010) onde uma defensina denominada *VrD1*, isolada de sementes de feijão mungo, *Vigna radiata*, apresentou atividade inseticida e atividade inibidora sobre α -amilase.

Além da possibilidade de aplicação dos AMPs na medicina, estas moléculas têm grande potencial para ser empregados no desenvolvimento de abordagens inovadoras na agricultura, buscando a resistência de plantas a doenças, de modo a superar as perdas em produtividade, qualidade e segurança

dos produtos agrícolas, e principalmente, contribuindo para o melhoramento dos processos biotecnológicos (Montesinos, 2007; Holaskova *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivos gerais

Detectar, isolar e caracterizar peptídeos em frutos de diferentes espécies de *Capsicum* e analisar a atividade antimicrobiana sobre fungos fitopatogênicos e algumas atividades enzimáticas.

2.2 – Objetivos específicos

I – Detectar e purificar parcialmente peptídeos de frutos dos acessos de pimenta *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. annuum* L.;

II – Determinar a massa molecular dos peptídeos isolados dos frutos de acessos de pimenta *C. Chinense* Jacq., *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. annuum* L.;

III – Analisar o efeito dos peptídeos isolados dos frutos de *C. annuum* L. sobre os fungos filamentosos *Fusarium laterithium*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*;

IV – Analisar a ação dos peptídeos isolados de frutos de *C. annuum* L. sobre permeabilização de membranas fúngicas;

V – Analisar a ação dos peptídeos isolados de frutos de *C. annuum* L. sobre a produção de espécies reativas de oxigênio;

VI – Analisar o efeito dos peptídeos isolados de frutos de *C. annuum* L. sobre a atividade das enzimas tripsina do pâncreas de suínos e amilase salivar humana e larval do intestino do inseto *Callosobruchus maculatus*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Mecanismos de defesa de plantas

Constantemente as plantas sofrem a ação de fatores físicos do ambiente, tais como: temperatura, umidade, radiação ultravioleta e fatores mecânicos. Elas também são expostas a uma grande variedade de organismos fitopatogênicos. Por isso, para se defenderem de predadores e patógenos, as plantas vêm ao longo do processo evolutivo, travando uma batalha contra seus inimigos a fim de garantir sua sobrevivência (Maor e Shirasu, 2005). Elas desenvolveram várias formas de defesas, que incluem mecanismos gerais que independem do organismo agressor ou se é decorrente de um estresse abiótico, e específico, que estão diretamente ligados a um patógeno em particular (Reignault e Sanchole, 2005). Todo esse arsenal de defesa de plantas está dividido em dois grandes grupos: as defesas constitutivas ou pré-formadas e as defesas induzidas. As defesas constitutivas estão relacionadas a estruturas e compostos sintetizados durante o plano de desenvolvimento normal da planta, funcionando como barreiras químicas e físicas. Essas defesas pré-formadas protegem as plantas sem a obrigatoriedade de um ataque ou agressão (George e Tudzynski, 1997; Hématy *et al.*, 2009; Van Loo *et al.*, 2006). Já as defesas induzidas são aquelas evidentes somente após a invasão do patógeno ou quando a planta sofre algum tipo de injúria.

Nas respostas da defesa induzida há a resposta de hipersensibilidade (HR), que é caracterizada por uma rápida morte celular no local da infecção. Em reação ao ataque, as plantas desenvolvem uma série de mudanças fisiológicas, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mudanças no pH intracelular que levam a um fluxo efêmero de íons, fortalecimento da parede celular próximo ao sítio de infecção, liberação de moléculas sinais secundárias tais como: o óxido nítrico (NO) e o aumento na concentração ou síntese de diversos peptídeos antimicrobianos e proteínas relacionadas à patogênese (Cohn, 2001; Heil, 2010).

Dentre as principais proteínas que participam desses mecanismos de defesa pode-se citar: as quitinases, as β -1,3 glucanases, lectinas, os inibidores de proteinase e amilases, as proteínas inativadoras de ribossomos, peroxidases, vários peptídeos antimicrobianos e ainda as proteínas de reserva de sementes como albuminas 2S, vicilinas, proteínas ricas em glicina (Carlini e Grossi-de-Sá, 2002; Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

3.2 – Peptídeos antimicrobianos de plantas

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas de defesa de baixa massa molecular ativos contra uma ampla gama de organismos, incluindo vírus, bactérias, fungos filamentosos, leveduras, insetos e outros (Zasloff, 2002; Hoskin e Ramamoorthy, 2008). Estes pertencem a um grupo diverso e abundante de moléculas que são produzidas tanto em plantas quanto em animais, agindo como componentes importantes da imunidade inata (Broekaert *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2011). Esses componentes vêm sendo isolados de diferentes espécies de plantas e de diferentes órgãos como flores, folhas, frutos, tubérculos, raízes, e especialmente sementes (Broekaert *et al.*, 1997; Pelegrini *et al.*, 2008, Benko-Iseppon *et al.*, 2010; Nawrot *et al.*, 2014)

Os AMPs de plantas possuem características em comum, tais como: massa molecular menor que 10 kDa, carga líquida positiva em pH fisiológico, propriedades anfipáticas, a presença de resíduos de cisteínas que se conectam em pares (2, 3 ou 4), formando pontes dissulfeto, conferindo alta estabilidade a esses peptídeos (Broekaert *et al.*, 1997; Astafieva *et al.*, 2013). Os AMPs possuem a capacidade de interagir com determinadas membranas celulares e, dessa forma, conferem uma eficiente atividade antimicrobiana contra determinados

agentes patogênicos, devido a este fato é que se tem observado, nos últimos anos, um grande interesse em se estudar esse grupo de proteínas (Teixeira *et al.*, 2012). O mecanismo exato pelo qual eles exercem suas propriedades antimicrobianas ainda não é completamente conhecido, 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 (Guaní-Guerra *et al.*, 2010; Bahar e Ren, 2013). Assim podem causar em alguns organismos a ruptura da membrana, já em outros a membrana não se rompe e o AMP pode atravessar a membrana e interagir com alvos intracelulares (Powers e Hancock, 2003; Brogden, 2005). Em relação ao mecanismo de ruptura da membrana, são propostos três modelos principais: aduela de barril, poro toroidal e modelo “tapete” (Brogden, 2005; Chan *et al.*, 2006; Bahar e Ren, 2013; Nawrot *et al.*, 2014).

No modelo da aduela de barril, o poro na membrana é formado apenas pelos peptídeos, que ficam com seus resíduos hidrofílicos voltados para o interior do poro enquanto seus resíduos hidrofóbicos ficam alinhados com as caudas dos fosfolipídios localizados na região periférica do poro (Figura 1D). No modelo poro toroidal, o interior do poro na membrana é formado pelos peptídeos e pela cabeça polar dos fosfolipídios da membrana que foram induzidos a formar uma curvatura mais positiva. Ambos estão com a parte hidrofílica voltada para o poro (Figura 1E). No modelo “tapete” ocorre à desestruturação da membrana plasmática, onde os peptídeos atuam como detergentes. Estes ficam orientados paralelamente à bicamada lipídica formando uma camada contínua ou “tapete” que pode levar a formação de micelas (Figura 1F).

Vale ressaltar que os modelos citados são característicos de AMPs com conformação em α -hélice e estabelecidos para interações com membranas de bactérias, porém são modelos que podem ser utilizados para os demais AMPs por suas características gerais (Giuliani *et al.*, 2007; Torrent *et al.*, 2012).

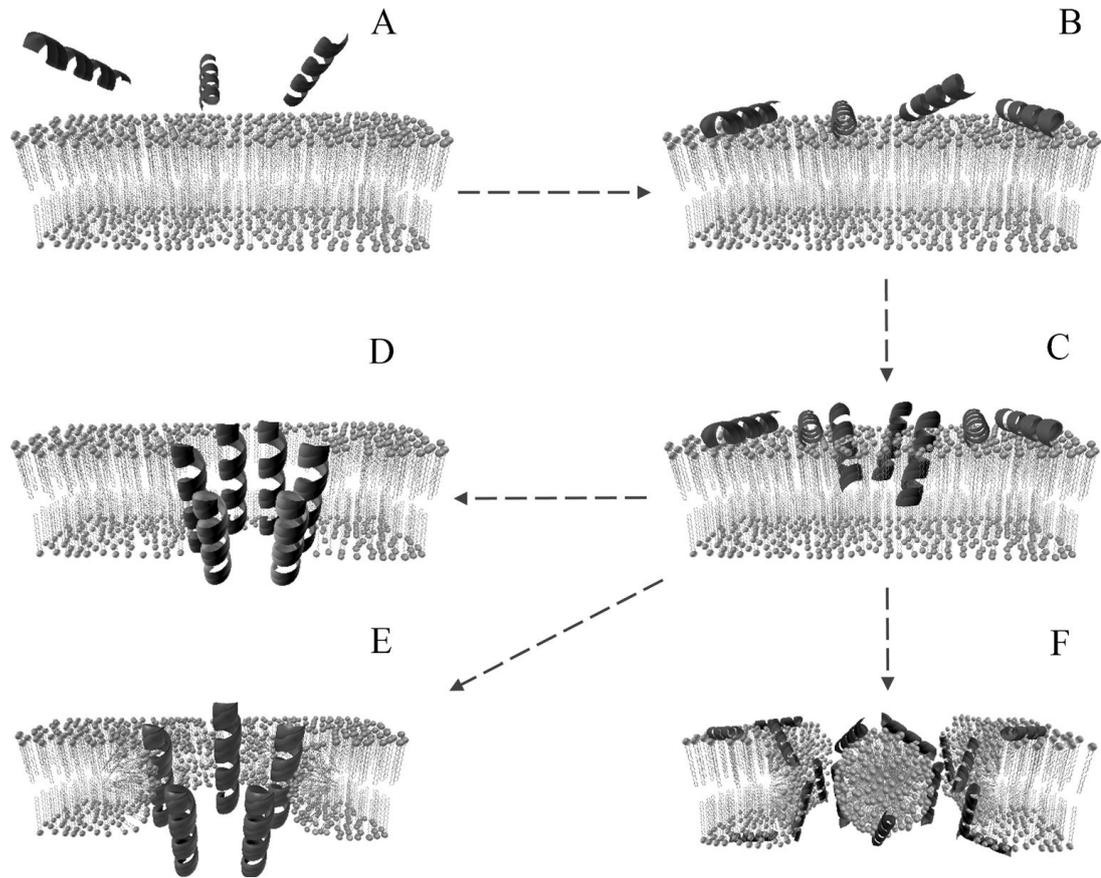


Figura 1: Modelos frequentemente citados para a atividade de peptídeos antimicrobianos. **(A)** difusão de AMPs através da solução; **(B)** adsorção de AMPs na membrana; **(C)** após a concentração limite ser alcançada, as moléculas de peptídeos começam a se reorientar na bicamada lipídica; **(D)** aduela de barril; **(E)** Modelo poro toroidal e **(F)** Modelo “tapete” (Nawrot *et al.*, 2014).

Os AMPs podem ser divididos em diferentes famílias (Tabela 1) levando-se em consideração, principalmente, suas características estruturais. Dentre estas, estão: as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs); as snakinas, que foram inicialmente isoladas de batata (*Solanum tuberosum*); as defensinas de planta, inicialmente isoladas de sementes de cevada (*Hordeum vulgare*); as tioninas, sendo a purotionina, isolada de trigo (*Triticum aestivum*), a primeira proteína cuja atividade contra patógenos de plantas foi detectada *in vitro*; os peptídeos tipo-heveína, descritos inicialmente como os peptídeos mais abundantes do látex de seringueiras; os peptídeos tipo-kotinas, isolados inicialmente de sementes de maravilha (*Mirabilis jalapa*); peptídeos MBP-1, isolados de milho (*Zea mays*); pequenos peptídeos denominados lb-AMPs isolados de sementes de balsamina

(*Impatiens balsamina*); os peptídeos circulares, conhecidos como ciclotídeos encontrados nas famílias das Rubiaceae e Violaceae e, os inibidores de proteinase isolados de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.) (Ribeiro *et al.*, 2007a). Dentre os peptídeos antimicrobianos mais estudados destacam-se as defensinas, as tioninas e as LTPs.

Tabela 1. Peptídeos antimicrobianos de plantas e suas atividades biológicas. Adaptado de Ribeiro *et al.*, 2007a) por Gomes, (2011)

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)
Alguns inibidores de proteinase (menores que 10 kDa)	Fungos	Ribeiro <i>et al.</i> , (2007); Sels <i>et al.</i> , (2008)

As defensinas de plantas foram inicialmente isoladas de sementes de *Hordeum vulgare* (cevada) e *Triticum turgidum* (trigo), por Collilla e colaboradores em 1990. São peptídeos pequenos, com estrutura primária de 45 a 54 resíduos de aminoácidos, apresentam massa molecular entre 5 e 8 kDa, altamente básicos, ricos em cisteínas (oito resíduos) estritamente conservados entre eles (Carvalho e Gomes, 2009). As defensinas de plantas apresentam diferentes atividades biológicas *in vitro* (Thevissen *et al.*, 2003). Estas incluem atividade antibacteriana (Osborn *et al.*, 1995; Carvalho e Gomes, 2011), inibição de amilases de intestino

de insetos (Bloch e Richardson, 1991; Santos *et al.*, 2010) inibição de tripsina (Melo *et al.*, 2002), inibição da síntese de proteína (Wong *et al.*, 2006), inibição do crescimento de um grande número de fungos em concentrações micromolares (Broekaert *et al.*, 1997), entre outras. No reino vegetal, as defensinas podem ser encontradas na maioria, se não em todas as plantas (Broekaert *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2006). Isoladas a partir de várias espécies, podem ser encontradas em diferentes partes da planta, por exemplo, nas folhas de rabanete da espécie *Raphanus sativus* (Terras *et al.*, 1992) e nas sementes de *Phaseolus vulgaris* (Games *et al.*, 2008). Chen *et al.*, (2002, 2004) e Wong *et al.*, (2006) relataram a presença de defensinas com a capacidade de inibir a síntese proteica em sementes de *Vigna radiata* e *Phaseolus vulgaris*, respectivamente. Em 2005, Chen *et al.*, mostraram a clonagem e caracterização de uma defensina (*VaD1*), isolada de sementes de *V. angularis*. Foi mostrado que quando a *VaD1* foi incorporada a sementes artificiais, o desenvolvimento de *Callosobruchus chinensis* foi inibido. Mello *et al.*, (2011) revelaram que uma defensina (denominada *PvD1*) de *Phaseolus vulgaris*, na concentração de 100 µg/mL, foi capaz de causar permeabilização da membrana celular das leveduras *Candida albicans* e *Candida guilliermondii*, e ainda induzir a produção ROS na levedura *C. albicans* e no fungo *Fusarium oxysporum*.

As tioninas foram isoladas de trigo (*Triticum aestivum*) por Balls e colaboradores, em 1942. Constituem uma família de peptídeos básicos, com massa molecular em torno de 5 kDa, ricos em cisteínas (Castro e Fontes, 2005). Apresentam uma cadeia primária constituída por 45 a 47 resíduos de aminoácidos e apresentam de 3 a 4 pontes dissulfeto que são importantes na manutenção de sua conformação e assim da sua atividade biológica (Broekaert *et al.*, 1997). Sua estrutura apresenta duas α -hélices antiparalelas e uma folha β , com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos segregados a superfície externa das hélices e resíduos hidrofílicos na superfície interna da hélice. Essa distribuição anfipática é importante para a sua habilidade de romper membranas microbianas e lipossomas fosfolipídicos (Caaveiro *et al.*, 1997). As tioninas foram à primeira família de AMPs de plantas cuja atividade antimicrobiana foi detectada “*in vivo*” (Garcia-Olmedo *et al.*, 1992). Desde então tem sido proposto para as tioninas um importante papel na defesa de plantas e sua localização no vacúolo e na parede celular dos tecidos das plantas sustentam essa função, sendo muitas delas

tóxicas para fungos fitopatogênicos e bactérias (Lee *et al.*, 2000). Kido *et al.*, (2010) mostraram o aumento da resistência à fitopatógenos fúngicos e bacterianos em plantas transgênicas expressando genes para uma tionina, mostrando assim que essa superexpressão foi capaz de desequilibrar a interação planta-patógeno.

As proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs), que possuem essa denominação devido à sua capacidade de transferência de fosfolípidos e ácidos graxos entre as membranas artificiais *in vitro* (Kader, 1996) e por isso, inicialmente, acreditavam-se participar do transporte de lipídeos entre organelas. Constitui uma família de peptídeos catiônicos amplamente distribuídos no reino vegetal (Carvalho e Gomes, 2007). Em geral, apresentam pequeno tamanho, oito resíduos de cisteínas distribuídos na estrutura primária, estrutura terciária formada por α -hélices e a presença de uma cavidade hidrofóbica na estrutura terciária que possibilita estes AMPs se ligarem e transportarem moléculas lipídicas (Yeats e Rose, 2008; Odintsova e Egorov, 2012). As LTPs podem ser agrupadas em duas diferentes subfamílias: as LTPs do tipo 1 (LTPs1) e as LTPs do tipo 2 (LTPs2). As LTPs1, possuem uma massa molecular em torno de 9 kDa, são básicas, possuem de 91 – 95 resíduos de aminoácidos e apresentam ponto isoelétrico entre 9 e 10. Possuem uma estrutura compacta consistindo de quatro α -hélices conectadas por voltas, além de um braço flexível na porção C-terminal sem estrutura secundária definida que encerra uma cavidade hidrofóbica em formato de túnel (Kader, 1996). Já as LTPs2 têm uma massa molecular em torno de 7 kDa, possuem, em geral, 70 resíduos de aminoácidos e um alto ponto isoelétrico. Sua estrutura secundária é semelhante as LTPs1, diferindo apenas no número de α -hélices, já que as LTPs2 possuem três α -hélices e duas voltas simples na região C-terminal (Samuel *et al.*, 2002). Para a família LTPs2 existem poucos estudos estruturais, mas já se sabe que sua cavidade hidrofóbica possui um formato triangular e menor, quando comparada com a família LTPs1 (Yeats e Rose, 2008).

Vários trabalhos evidenciam a presença das LTPs em diversas espécies, por exemplo, LTPs extraídas de folhas de *Spinacia oleracea* (espinafre), *Hordeum vulgare* (cevada), *Zea mays* (milho), *Beta vulgaris* (beterraba) e de sementes de *Triticum aestivum* (trigo), *Raphanus sativus* (rabanete), *Helianthus annuus* (girassol), *Capsicum annuum* (pimenta), entre outras. Apresentam propriedades

inibitórias contra fitopatógenos, como, *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride* e *Cercospora beticola* (Segura *et al.*, 1993; Dubreil *et al.*, 1998; Kristensen *et al.*, 2000; Regente e de la Canal, 2000; Velazhahan *et al.*, 2001). Apesar de conhecida a atividade antimicrobiana das LTPs, pouco se conhece sobre o seu mecanismo de ação. Acredita-se que as LTPs interagem com membranas biológicas levando a sua permeabilização. Regente *et al.*, (2005) mostraram pela primeira vez a capacidade de uma LTP isolada de girassol, Ha-AP10, de permeabilizar a membrana plasmática do fitopatógeno *F. oxysporum*. Diz *et al.*, (2006) relataram a capacidade de uma LTP isolada de pimenta (*Capsicum annuum* L.) em inibir o crescimento das leveduras *Candida albicans*, *Saccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae*, além de permeabilizar a membrana plasmática desta última levedura.

3.3 – Gênero *Capsicum*

As espécies do gênero *Capsicum* pertencem à Divisão Spermatophyta, Filo Angiospermae, Classe Dicotyledoneae, Ordem Solanales e Família Solanaceae (Andrews, 1995). As plantas do gênero *Capsicum* são, preferencialmente, autógamas com flores hermafroditas, com $2n = 2x = 24$ cromossomos, mas outras espécies, principalmente as silvestres, podem apresentar $2n = 2x = 26$ cromossomos (Moscone *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2010). Diferenças no número de cromossomos podem ocorrer em plantas da mesma espécie ou plantas de espécies diferentes (Pozzobon *et al.*, 2006).

São nativos dos trópicos e subtropicais da América, mas tem se espalhado pelos trópicos da África e Ásia, sugerida por Hunziker (2001) como os centros de distribuição de *Capsicum*.

Os nomes vulgares das espécies do gênero *Capsicum* variam em diversos sinônimos, como; pimenta, colorau, malagueta, pimentão, pimenta espanhola entres outros, dependendo do continente e tradições locais (Derera *et al.*, 2005).

O Brasil é considerado um grande produtor mundial de pimenta (Ristori *et al.*, 2002). A maior parte da população cultiva e usa pimentas, o qual requer diferentes genótipos adaptados para cada região (Rêgo *et al.*, 2012). As diversas formas de uso dos seus frutos estão relacionadas a aspectos multiculturais e étnicos, fazendo com que esse seja o resultado da grande diversidade genética

que é observada em cada região do país, pois o Brasil é, hoje, considerado um dos grandes centros de diversidade de *Capsicum* (Sudré *et al.*, 2010). Anualmente, no Brasil, cerca de 12.000 hectares são cultivados com espécies de *Capsicum*, com produção de mais de 348.000 toneladas de frutos por ano (Ribeiro *et al.*, 2008). A crescente demanda interna, correspondente a ganhos de R\$ 80 milhões/ano, tem impulsionado o aumento de área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio de *Capsicum* muito expressivo (Rêgo *et al.*, 2011). O cultivo de pimenta ocorre praticamente em todos os estados brasileiros, porém a maior produção está concentrada nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (Rufino e Penteado, 2006).

As pimentas do gênero *Capsicum* são utilizadas como matéria-prima para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Bento *et al.*, 2007; Büttow *et al.*, 2010), existindo um intenso comércio internacional de pimenta-vermelha, seca e em pó, com ou sem sementes e com diversos níveis de pungência. Esses produtos são utilizados no preparo de alimentos, no processamento de conservas e na indústria de embutidos. Os frutos também são comercializados na forma de geléias, molhos e “*blends*” (vidros com misturas de frutos usados como peças para decoração) (Nascimento *et al.*, 2012).

Uma característica do gênero *Capsicum* é a pungência atribuída à presença de alcalóides, mais precisamente de dois capsaicinóides: a diidrocapsaicina e capsaicina. Tais alcalóides acumulam-se na superfície da placenta e são liberados quando o fruto sofre qualquer dano físico (Carvalho, 2003). Além da placenta, estas substâncias estão presentes em menores quantidades nas sementes e no pericarpo (Reifschneider, 2000).

Este gênero possui 31 espécies confirmadas, sendo constituído por cinco espécies domesticadas e as demais silvestres (Moscone *et al.*, 2007). As espécies que compõem este gênero estão distribuídas em três complexos gênicos distintos com base na cruzabilidade. O complexo *Capsicum annum* reúne as espécies *C. annum*, *C. chinense* e *C. frutescens*; o complexo *Capsicum baccatum* reúne *C. baccatum* var. *baccatum* (forma silvestre) e *C. baccatum* var. *pendulum* (forma cultivada); e o complexo *C. pubescens* reúne algumas espécies silvestres e apenas uma cultivada, *C. pubescens* (Pickersgill, 1991; Martins *et al.*, 2010).



Figura 2 – Frutos do gênero *Capsicum*. (A) *Capsicum annuum*; (B) *Capsicum baccatum* var. *pendulum*; (C) *Capsicum chinense*. Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Capsicum>

A espécie *C. chinense* é também, vulgarmente, conhecida como pimenta de cheiro ou pimenta de bode. A pimenta de cheiro são aquelas pimentas em tom amarelo, amarelo-claro, amarelo-forte, alaranjado, salmão, vermelho e até preto e predominam no Nordeste, Norte e Centro-oeste do Brasil. Já na região Sudeste é mais comum o cultivo da pimenta de bode, cujas plantas produzem frutos arredondados com cerca de 1 cm de diâmetro, e as cores creme e vermelho são as mais comuns (Reifschneider, 2000; Lannes *et al.*, 2007). Esta espécie foi originalmente encontrada na bacia do rio Amazonas, mas está comercialmente distribuída por todo o Sul e Norte do Brasil, devido a sua adaptabilidade a diferentes solos e climas, e seu popular aroma cítrico. Possuem duas a cinco flores por nó, pedicelo ereto, pendente ou inclinado na antese, corola branca ou branca esverdeada com lóbulos retos que não dobram nem possuem manchas na base (Lannes *et al.*, 2007).

A espécie *C. baccatum*, também conhecida como dedo de moça ou "chifre de veado". Possui o seu centro de diversidade na Bolívia, sugerindo-se que possivelmente a espécie tenha seu centro de origem na mesma região (Moscone *et al.*, 2007). É uma das pimentas mais difundidas em todo o mundo, inclusive no Brasil (Lannes *et al.*, 2007; Rêgo *et al.*, 2009). Dentre as duas variedades botânicas (*C. baccatum* var. *pendulum* e *C. baccatum* var. *baccatum*) a espécie *C. baccatum* var. *pendulum*, encontra-se difundida principalmente na região que abrange da costa do Peru ao Brasil (Albrecht *et al.*, 2012), e é caracterizada por possuir flores de corola branca com manchas amareladas e uma única flor por nó (Lim, 2012). A outra variedade, *C. baccatum* var. *baccatum*, possui distribuição

semelhante a *C. baccatum* var. *pendulum*, contudo diferencia-se da primeira por possuir manchas esverdeadas nas corolas e duas a três flores por nó, sendo essas as únicas diferenças entre essas variedades (Viñals *et al.*, 1996). Os frutos são de várias cores e formas, geralmente pendentes, com polpa firme e as sementes apresentam cor creme (Carvalho e Bianchetti, 2004).

A espécie *C. annuum*, vulgarmente conhecida como pimenta doce, são plantas de fácil cultivo, vigorosas e de ótima produtividade, representando uma das espécies de pimenta mais conhecidas e difundidas no mundo, de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2007). Trata-se de uma planta herbácea, com flores brancas, que dão origem a frutos de diferentes tamanhos e cores. A variedade *C. annuum* é largamente utilizada na indústria de alimentos devido as 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).

Embora o gênero *Capsicum* seja considerado um importante componente do mercado de hortaliças frescas, sua produção é limitada diante das inúmeras doenças que afetam esta cultura (Kurozawa e Pavan, 1997).

3.4 – Doenças da cultura do gênero *Capsicum*

Existem vários agentes causadores de doenças como bactérias, fungos, nematóides e vírus, que podem incidir sobre espécies do gênero *Capsicum* (Kurozawa e Pavan, 1997). A Murcha-de-fitóftora é uma das principais doenças da cultura de pimenta e pimentão no Brasil, causada por *Phytophthora capsici*. Este é responsável pelas maiores perdas da cultura no período do verão, por ser favorecida pela alta temperatura e alta umidade do solo. As plantas afetadas apresentam murcha repentina observada inicialmente nas horas mais quentes do dia (Santos e Goto, 2004). A antracnose, causada por *Colletotrichum* sp., é a mais comum e destrutiva doença das Solanaceas, especialmente no período de cultivo quente e úmido (Lobo *et al.*, 2001). A doença ocorre principalmente em frutos, causando podridões com lesões em forma de depressões circulares, com coloração escura, e diâmetro variável (Kurozawa e Pavan, 1997). O oídio ocorre, sobretudo, em casas de vegetação. Causada pelo fungo *Oidiopsis taurica*, que infectam as folhas, apresentando manchas que se tornam necróticas ou com

muitas pontuações negras. A superfície inferior da folha fica recoberta com estruturas esbranquiçadas do fungo, podendo levar a uma clorose geral da folha. As folhas muito atacadas podem cair, mas os frutos não são atacados pela doença (Blat *et al.*, 2005).

As espécies de fungos do gênero *Fusarium* também são causadores de muitos danos nesta cultura, principalmente pós-colheita, onde o pedúnculo dos frutos é atacado pelo fungo causando podridão e comprometendo a qualidade visual destes. Além de causar a redução do desenvolvimento da planta, amarelecimento e até morte (EMBRAPA, 2007). No sul do Novo México, 43% dos produtores de pimenta relataram a murcha como a doença mais frequente (Skaggs *et al.*, 2000). Rivelli (1989) identificou que o fungo *F. oxysporum* era patogênico para várias espécies de *Capsicum* e não patogênico para algodão, melão, pepino, berinjela, quiabo e melancia. Dentre os sintomas apresentados, estão a clorose foliar e murchamento das plantas de pimenta.

Além da relação dos fungos com doenças na cultura da pimenta/pimentão, também há os danos provocados por bactérias, sendo a *Ralstonia solanacearum* a que mais causa danos a estas culturas, ocorrendo na maioria dos centros produtores, sobretudo na fase de viveiro (Coelho Netto *et al.*, 2004). Contudo, existem relatos da sua disseminação nos campos de cultivo limitando os plantios em algumas áreas (Kurozawa e Pavan, 1997). Outra doença bacteriana que limita o cultivo da pimenta e do pimentão é a mancha-bacteriana causada pela *Xanthomonas campestris* sp. *vesicatoria*. A doença é favorecida com temperatura entre 22 e 28 °C e umidade relativa entre 95 e 100 %, associada com a presença de água livre. A mancha-bacteriana é mais severa em locais onde ocorrem chuvas associadas a ventos fortes (Barreto e Scoloppi, 2007).

Entre os agentes causadores de doenças na cultura do pimentão também estão os vírus, onde se destaca o PVY “Potato vírus Y”, relacionado à doença denominada mosaico do pimentão. Essa doença dificulta o cultivo do pimentão em diversas regiões do Centro-Sul do país, ocorrendo principalmente nos períodos em que a temperatura oscila entre 18 e 22 °C, o que favorece a proliferação do pulgão, seu principal vetor (Kurozawa e Pavan, 1997).

Vários artrópodes também estão associados com os danos, as pimenteiras desde a sementeira até a colheita dos frutos. Os artrópodes, associados à cultura da pimenteira, que podem causar danos indiretos são os pulgões e tripses e os

vetores de virose. E os que podem causar danos diretos, são os besouros, as lagartas, minadores de folhas, percevejos, cochonilhas e ácaros (EMBRAPA, 2007).

Diante do exposto, plantas do gênero *Capsicum* tem sido alvo de vários estudos, entre eles a busca de proteínas e/ou genes relacionados com a defesa da planta. Jung e colaboradores (2003) estudaram três genes isolados de plantas do gênero *Capsicum*, estes genes foram denominados *CALTPI*, *CALTPII* e *CALTPIII* onde foi observado que estes genes codificavam para LTP. Nos últimos anos nosso grupo também vem identificando AMPs em diferentes partes de plantas do gênero *Capsicum*. Diz *et al.*, (2006) e Ribeiro *et al.*, (2012) relataram em seus estudos que peptídeos isolados de sementes de pimenta da espécie *C. annuum* L. afetam negativamente o crescimento de leveduras de diferentes gêneros como: *Candida*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces* e *Pichia*, e também causam alterações nas estruturas celulares destas leveduras. Dias *et al.*, (2013) isolaram diferentes frações enriquecidas em peptídeos (PEFs) denominadas PEF1, PEF2 e PEF3, os quais também exibiram forte atividade antifúngica contra diferentes leveduras. Sequências N-terminais de PEF2 e PEF3 foram mostradas ser altamente similares com inibidores de proteinases (IP) serínicas, quando analisados com base em bancos de dados comparativos. Mais recentemente, Taveira *et al.*, (2014, 2016) identificaram em frutos de *C. annuum* L. uma proteína similar a tionina, com atividade antifúngica e antibacteriana.

Este trabalho se fundamenta nestas mesmas perspectivas, no qual se pretende avaliar a participação desses AMPs no controle de determinados patógenos, sobretudo de interesse agrônomo, buscando determinar o melhor uso e aplicação dessas moléculas. Dos trabalhos dispostos na literatura, poucos são os que estudam os AMPs isolados de frutos de pimenta, assim sendo neste trabalho foram selecionados frutos do gênero *Capsicum* para o desenvolvimento esta pesquisa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Material

4.1.1 – Material biológico

4.1.1.1 – Sementes

As sementes de *Capsicum chinense* Jacq., (acesso UENF 1755), *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. (acesso UENF 1496) e *Capsicum annuum* L. (acesso UENF 1381), foram fornecidas pela Prof^a Dr^a Rosana Rodrigues, do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Brasil.

4.1.1.2 – Microrganismos

Os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* (4014), *Fusarium laterithium* (5456), *Fusarium oxysporum* (5845) e *Colletotrichum gloeosporioides* (5522) foram cultivados em meio de cultura ágar Sabouraud e mantidos conservados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

4.1.1.3 – Insetos

Os insetos da espécie *Callosobruchus maculatos* foram cedidos pela Prof^a Dr^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira, do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

4.1.2 – Reagentes e outros materiais

- Substrato adubado com formulação (4N/14P/8K) – foi adquirido da comercial Vivatto ®;
- NaH₂PO₄; Na₂HPO₄; KCl; EDTA; (NH₄)₂SO₄; Caldo e Ágar Sabouraud – foram adquiridos da Merck S/A Indústria Química;
- Tripsina (Tipo II-S, pancreática suína); BA_pNA; Ovalbumina; Ácido trifluoroacético; propanol; Membranas de celulose (com poro de retenção de moléculas com massa molecular acima de 1.000 Da) – foram adquiridas da Sigma Chemical Company;
- Coluna C2/C18 (µRPC C2/C18 ST 4.6/100) – foi adquirida da GE Healthcare;
- SYTOX Green – foi adquirido da Molecular Probes Invitrogen.

Todos os demais reagentes utilizados na realização deste trabalho foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

4.2 – Extração e purificação de proteínas dos frutos

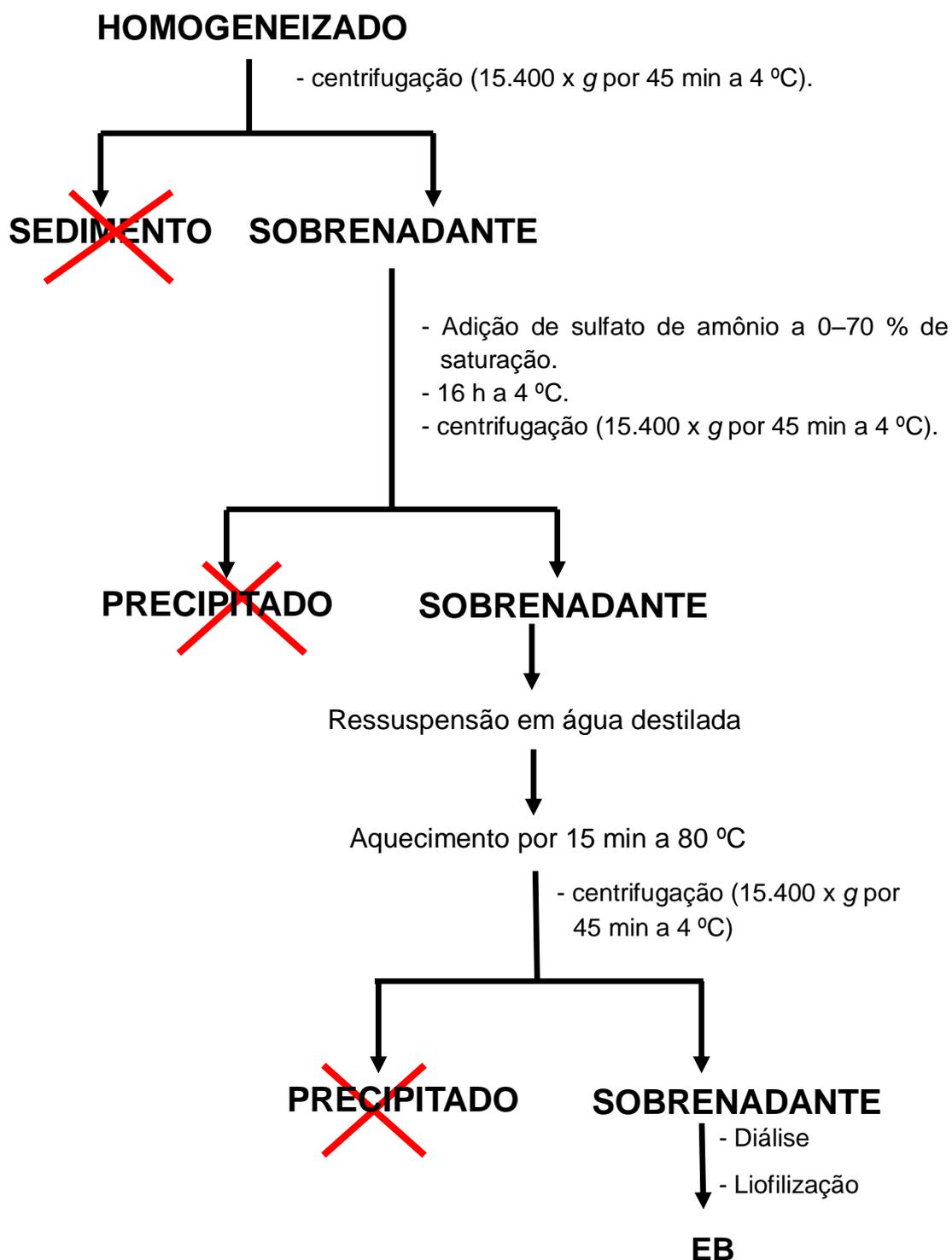
4.2.1 – Cultivo das plantas

O semeio das sementes de *Capsicum chinense* Jacq., (acesso UENF 1755), *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. (acesso UENF 1496) e *Capsicum annuum* L. (acesso UENF 1381) foi feito em bandejas de isopor de 72 células com substrato adubado com formulação (4N/14P/8K). As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento a 28 °C. Após o surgimento de dois pares de folhas definitivas, as mudas foram transferidas individualmente para vasos plásticos contendo uma mistura de solo e substrato (na proporção 2:1). Em seguida os

vasos foram transferidos para casa de vegetação aclimatada. As plantas foram irrigadas uma vez ao dia até a retirada dos frutos maduros. O período para início do aparecimento de frutos foi de aproximadamente 90 dias.

4.2.2 – Extração proteica dos frutos

A extração proteica dos frutos foi realizada segundo a metodologia descrita por Taveira *et al.*, (2014). Inicialmente, oitenta gramas dos frutos maduros e sementes de *Capsicum chinense* Jacq., (acesso UENF 1755), *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. (acesso UENF 1496) e *Capsicum annuum* L. (acesso UENF 1381) foram triturados individualmente, em 400 mL de tampão fosfato (Na_2HPO_4 10 mM; NaH_2PO_4 15 mM; KCl 0,1 M; EDTA 1,5 % e pH 5,4) com o auxílio de um processador de alimentos (Mix 3x1, Philips) até a obtenção de um “homogenato”. Após a obtenção do “homogenato”, as proteínas foram extraídas por 2 h, sob agitação constante a 4 °C. O homogeneizado obtido foi submetido à centrifugação a 15.400 x g por 45 min a 4 °C, ao sobrenadante resultante foi adicionado sulfato de amônio a 0-70 % de saturação. O material obtido foi mantido por 16 h a 4 °C. Após este tempo, o material foi submetido a uma nova centrifugação a 15.400 x g por 45 min a 4 °C. O precipitado resultante foi então ressuspenso em 10 mL de água destilada e aquecido a 80 °C por 15 min. Após o aquecimento, submetido a mais uma centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4 °C, onde o precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido dialisado contra água destilada, liofilizado e denominado extrato bruto (EB) (Esquema 1), o qual foi submetido à cromatografia de fase reversa em HPLC. Todo este processo foi realizado separadamente para os frutos das espécies utilizadas.



Esquema 1: Representação esquemática da extração e fracionamento das proteínas dos frutos de pimenta das espécies *Capsicum chinense* Jacq., (acesso UENF 1755), *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. (acesso UENF 1496) e *Capsicum annuum* L. (acesso UENF 1381) (Taveira *et al.*, 2014).

4.2.3 – Purificação dos peptídeos por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

Os peptídeos extraídos dos frutos de *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. annuum* foram purificados, separadamente, através de cromatografia de fase reversa em HPLC utilizando uma coluna C2/C18 a qual foi equilibrada com TFA 0,1 % (Taveira *et al.*, 2014).

Inicialmente, o extrato bruto foi filtrado em filtro de 0,2 µm (Millex-GV, Millipore) e diluído em TFA 0,1 % (v/v). Em seguida 500 µL (900 µL da amostra + 100 µL TFA) desta mistura foi injetada na coluna. A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, numa temperatura de 38 °C sendo a eluição das amostras efetuada em gradiente linear de propanol 100 % em 0,1 % de TFA (solução B). Inicialmente, a coluna foi lavada com TFA 0,1 % e água ultrapura (solução A) e em seguida um gradiente linear foi se formando pela adição da solução B. A eluição da coluna foi acompanhada por um detector do tipo DAD, sendo as absorbâncias monitoradas a 280 nm.

4.3 – Caracterização dos peptídeos

4.3.1 – Quantificação das proteínas

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

4.3.1.1 – Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS

A eletroforese em gel de tricina-SDS foi feita segundo o método de Schägger e Von Jagow (1987). Foram utilizadas placas de vidro 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,5 mm.

4.3.1.2 – Preparo das amostras e condições da corrida

As amostras contendo as proteínas de interesse (correspondendo de 20 a 30 µg/µL de proteína) foram acrescidas de tampão de amostra duas vezes concentrado (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 2,5 %; sacarose 15 %; azul de bromofenol 0,25 %; β-mercaptoetanol 5 %), aquecidas por 5 min a 100 °C e posteriormente, centrifugadas a 16.000 x g por 5 min a temperatura ambiente. Após este procedimento, 15 µL as amostras foram aplicadas no gel de concentração. Para a corrida, foi utilizado tampão catodo (Tricina 0,1 M ; Tris-HCl 0,1 M pH 8,31; SDS 0,1 %) e tampão anodo (Tris-HCl 0,2 M pH 8,9; SDS 0,2 %). A eletroforese transcorreu por 16 horas, aproximadamente, em uma corrente de 20 V.

Para estimar a massa molecular dos peptídeos foi usado o marcador de baixa massa molecular composto das seguintes massas moleculares de proteínas em Da 17,000, 14,200, 6,500, 3,496 e 1,060 (MW-SDS-17S, Sigma®).

4.3.1.3 – Coloração com *Coomassie Blue* e descoloração do gel

Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente colocado em uma solução de fixação (metanol 40 % e ácido acético 10 %) por 30 min, e em seguida colocado em uma solução de coloração (*Coomassie Blue G* 0,025 %, ácido acético 10 % em água destilada) em agitação por aproximadamente 1 h. Após a coloração do gel por *coomassie*, o gel foi transferido para uma solução descorante (ácido acético 10 % em água destilada). O gel foi mantido na solução descorante até a visualização das bandas proteicas e em seguida armazenado em água destilada. A digitalização dos géis foi realizada em um fotodocumentador LAS 500 (GE *Healthcare*).

4.3.2 – Identificação dos peptídeos

Para identificação por espectrometria de massas dos peptídeos derivados da fração Fa5 (fração que apresentou maior atividade antimicrobiana), obtida dos frutos de *C. annuum* L., após a eletroforese em gel de tricina o gel foi retirado das placas e submetido às etapas de coloração e descoloração (item 4.3.1.3). As bandas proteicas de interesse foram retiradas do gel com auxílio de uma lâmina

de bisturi. As bandas foram descoradas, as proteínas digeridas por tripsina e os peptídeos foram extraídos de acordo com Gharahdaghi e colaboradores (1999). As bandas, retiradas do gel foram colocadas em um micro-tubo de 1,5 mL e adicionado 200 µL da solução de bicarbonato de amônio 25 mM e 50 % de acetonitrila e armazenado na geladeira por 24 h. Em seguida retirou-se o descorante e foi adicionado 350 µL de água ultra pura por 5 min. Foi retirada a água, e adicionado 190 µL de acetonitrila 100 %, fortemente agitado por 20 min até que os pedaços de gel ficassem opacos. Em seguida a acetonitrila foi removida em Speed-Vac (30 °C) por 15 min. Posteriormente, as proteínas foram preparadas para a digestão, segundo o método descrito por Rodrigues *et al.*, (2014). Os peptídeos foram separados utilizando cromatografia de alta performance em nanoescala utilizando um nanoACQUITY UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro de massas SYNAPT G2 Si HDMS (Waters). Os peptídeos separados foram analisados com o aparelho operando de uma forma *data-independent* acoplado com um *ionmobility* (HDMS^E). O espectrômetro de massa foi programado para etapas energia de colisão entre baixo (4 eV) e elevada (14-40 eV) na câmara de colisão *Triwave*, usando um *scan time* de 0,9 s por função sobre 50-2,000 m/z. A identificação da proteína foi obtida usando ProteinLynx Global SERVER (PLGS) para proteômica e um banco de dados UniProt.

O alinhamento da sequência de aminoácidos foi feito usando-se o algoritmo do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/Blast>) com os parâmetros database “UniProtKB/Swiss-Prot(Swissprot)” e do Clustal Omega (<http://www.expasy.org>) (Sievers *et al.*, 2011).

4.4 – Análise da atividade antimicrobiana e mecanismo de ação dos peptídeos

4.4.1 – Ensaio de inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos

Inicialmente os esporos dos fungos *F. laterithium*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides* foram colocados para crescer em uma placa de Petri contendo ágar *Sabouraud* por 11 dias a 30 °C. Após esse período 10 mL de caldo *Sabouraud* foram vertidos sobre essa placa e os esporos foram liberados com o

auxílio de uma alça de *Drigalski*. Essa suspensão foi devidamente filtrada em gases para retirar/eliminar a passagem de restos miceliais. Esses esporos foram quantificados em câmara de Neubauer através de microscópio óptico (Axioplan, Zeiss). Posteriormente os esporos fúngicos (2×10^3 cel.mL⁻¹) foram incubados em 100 µL de caldo *Sabouraud* contendo as diferentes frações proteicas de frutos de *C. annuum*. O ensaio foi realizado em placas de cultura de 96 poços (NUNC, Nuclein Surface) a 30 °C por um período de 54 a 60 h, variando de acordo com o crescimento da espécie fúngica testada. A determinação da densidade ótica, foi monitorada de 6 em 6 h em leitor de microplacas, num comprimento de onda de 620 nm. Todo o ensaio foi feito em triplicata e sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert *et al.*, (1990), com modificações.

4.4.2 – Análise morfológica dos fungos filamentosos tratados com a fração Fa5

Após 24 h do ensaio de inibição do crescimento, os esporos dos fungos filamentosos, tanto os crescidos na ausência quanto os crescidos na presença da fração Fa5, foram retirados da placa de 96 poços e visualizados em microscópio óptico (Axio Zeiss, Imager, A,2).

4.4.3 – Efeito da fração Fa5 sobre a permeabilização de membranas fúngicas

A permeabilização das membranas dos fungos tratados com a fração Fa5 (fração que apresentou maior atividade antimicrobiana) isolada dos frutos de *C. annuum* L., foi avaliada através da utilização do corante fluorescente *SYTOX Green*, segundo metodologia descrita por Thevissen *et al.*, (1999). O *SYTOX Green* é um corante que possui alta afinidade por ácidos nucleicos, penetrando nas células cuja membrana se encontra comprometida e não atravessando membranas íntegras, e ao se ligar a ácidos nucleicos, se torna fluorescente. Após 24 h do ensaio de inibição do crescimento dos fungos filamentosos, as células fúngicas crescidas na ausência e na presença da fração Fa5 foram incubadas sob constante agitação por 15 min com o *SYTOX Green* a uma concentração de 0,2 µM, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Posteriormente, estas células foram transferidas para lâminas cobertas com lamínulas, e observada em

microscópio óptico (Axio Zeiss, Imager, A, 2) equipado com um conjunto de filtros fluorescentes (excitação com comprimento de onda entre 450 – 490 nm e emissão de 550 nm).

4.4.4 – Ensaio de determinação da indução de ROS intracelular

Para avaliar se o mecanismo de ação da fração Fa5 (fração que apresentou maior atividade antimicrobiana) envolve a indução do estresse oxidativo, o corante fluorescente 2',7'- diclorofluoresceína diacetato (H2DCFDA), na concentração final de 20 µM, foi utilizada para medir ROS intracelular, segundo a metodologia descrita por Mello *et al.*, (2011). Após 24 h do ensaio de inibição do crescimento com fungos filamentosos, 50 µL das células crescidas na ausência e na presença da fração Fa5 foram incubadas com o corante H2DCFDA, o qual é um composto estável, não fluorescente, lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células. As ROS produzidas oxidam este corante, emitindo fluorescência. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente com agitação constante, as células foram analisadas em microscópio óptico (Axio Zeiss, Imager, A, 2) equipado com um conjunto de filtros fluorescentes (excitação com comprimento de onda entre 450 – 490 nm e emissão de 550 nm).

4.5 – Avaliação da inibição da atividade amilásica

4.5.1 – Obtenção das amilases

As larvas de aproximadamente 16 dias do inseto *C. maculatus* foram dissecadas e seus intestinos, juntamente com o conteúdo luminal extraído. Os intestinos das larvas dos insetos foram macerados em salina e submetidos à centrifugação por 10 min a 12.000 x *g*. O sobrenadante foi dosado pelo método de Bradford (1976), e utilizado no ensaio de atividade amilásica.

As amostras de saliva humana (500 µL) foram coletadas e centrifugadas a 12.000 x *g* por 10 min a 4 °C. O sedimento contendo restos celulares e muco foi descartado e o sobrenadante coletado foi dosado pelo método de Bradford (1976), e armazenado a -20 ° C até a sua utilização.

4.5.2 – Ensaio de inibição da atividade da amilase salivar humana e do inseto *C. maculatus*

Este ensaio foi realizado com o intuito de identificarmos inibidores ativos e específicos contra as referidas amilases, seguindo a metodologia descrita por Bernfeld (1955). Inicialmente, as frações ($200 \mu\text{g. mL}^{-1}$) de *C. annuum*, obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, foram incubadas com 10 U de amilase (amilase salivar humana e larval do inseto *C. maculatus*). Posteriormente essa mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 15 min. Após este período foi adicionado $12,5 \mu\text{L}$ de amido 1 %, totalizando um volume final de $50 \mu\text{L}$, e a mistura retornou para o banho-maria a 37°C , amilase salivar humana por 15 min e amilase de *C. maculatus* por 30 min. Em seguida as amostras foram retiradas do banho e após o resfriamento foram adicionados $200 \mu\text{L}$ da solução de DNS (4 % hidróxido de sódio, 3,5- ácido dinitrosalicílico, 1 % tartarato duplo de sódio, 45 g de potássio e 2 g de fenol cristalino). As frações submetidas ao ensaio foram então fervidas por 5 min e posteriormente $200 \mu\text{L}$ de água foram adicionadas a cada amostra. A hidrólise do substrato pela enzima foi determinada após leitura da absorbância a 540 nm no espectrofotômetro (LGS53, BEL Photonics). Os experimentos foram realizados em triplicata. O controle serviu como parâmetro para o cálculo da porcentagem de inibição. Foi considerado que o controle possuía 100 % de atividade. Uma unidade de amilase foi definida como a variação de 0,1 de abs a 540 nm por 30 min de reação, como descrito por Franco *et al.*, (2000).

4.6 – Determinação da inibição da atividade da tripsina

A atividade inibitória da enzima tripsina pelas frações dos frutos de *C. annuum*, obtidas após cromatografia em HPLC, foi avaliada medindo-se a atividade hidrolítica residual da tripsina (1 mg/mL) através do uso do substrato BApNA ($0,0625 \text{ mM}$), após a pré-incubação com as frações. A atividade proteolítica foi determinada pela incubação de $10 \mu\text{L}$ das frações com $10 \mu\text{L}$ de tripsina e $25 \mu\text{L}$ de BApNA em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) a 37°C , num volume final de $200 \mu\text{L}$. A reação foi interrompida pela adição de $100 \mu\text{L}$ de ácido acético 30 % (v/v) e a hidrólise do substrato foi acompanhada fotometricamente

pela medida de absorvância liberada pelo *p*-nitroanilida a 405 nm (Macedo *et al.*, 2007).

4.7 – Análise estatística

Todos os dados foram avaliados pela *ANOVA* e as diferenças das médias de $p < 0,05$ foram consideradas significativas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* (versão 5.0 para Windows).

5. RESULTADOS

5.1 – Perfil eletroforético do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*

O perfil eletroforético do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* obtido após extração protéica é mostrado na figura 3. Na raia (A) foi possível observar a presença majoritária de uma banda proteica entre 14,2 e 17 kDa e outras três bandas entre 3,4 e 14,2 kDa.

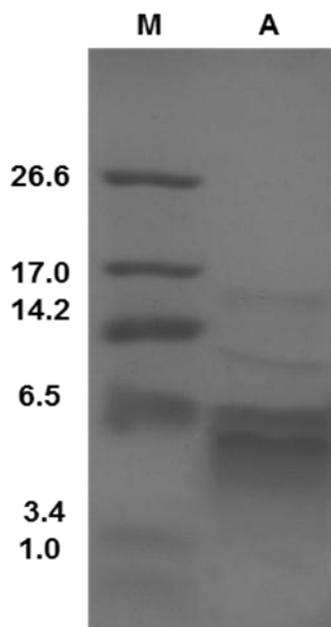


Figura 3: Visualização eletroforética do gel de tricina na presença de SDS do extrato bruto dos frutos de (A) *C. annuum* tratado com β -mercaptoetanol. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa).

5.2 – Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético das frações do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*

Após a extração proteica dos frutos de *C. annuum*, o extrato bruto destes frutos foi submetido à cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em sistema de HPLC, onde foram obtidas oito diferentes frações denominadas Fa1, Fa2, Fa3, Fa4, Fa5, Fa6, Fa7 e Fa8 (Figura 4A). O perfil eletroforético destas frações está representado na figura 4B, onde se observou que as frações Fa1, Fa4 e Fa7 apresentam uma única banda proteica em torno de 6,5 kDa. A fração Fa2 apresenta duas bandas proteicas, uma em torno de 6,5 kDa e outra entre 6,5 e 14,2 kDa. Já a fração Fa3, apresenta uma única banda com massa molecular entre 6,5 e 14,2 kDa. Na fração Fa5, verificou-se majoritariamente a presença de uma banda proteica próxima de 17 kDa, e outra banda em torno de 6,5 kDa. A fração Fa6 apresenta três bandas proteicas, uma com massa molecular em torno de 6,5 kDa, uma entre 6,5 e 14,2 kDa, e outra entre 14,2 e 17 kDa. Já a fração Fa8 apresenta três bandas proteicas, uma com aproximadamente 6,5 kDa e outras duas entre 6,5 e 14,2 kDa.

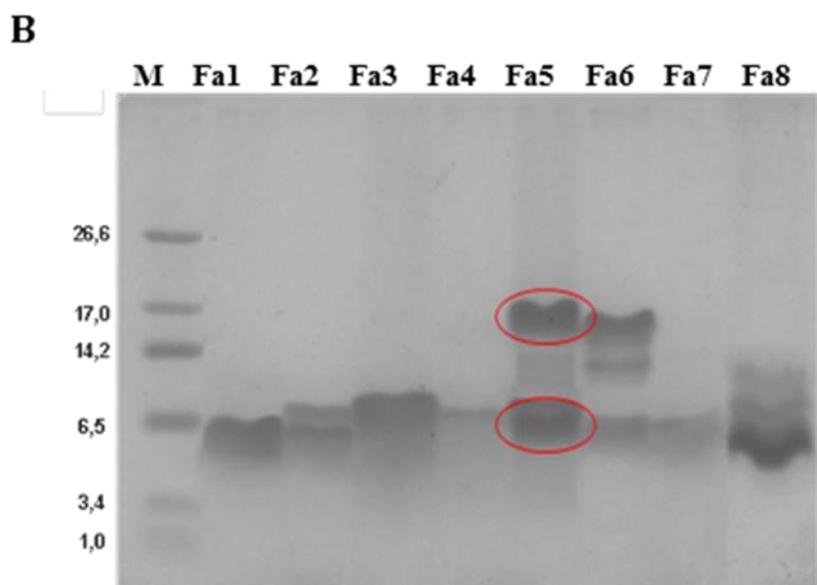
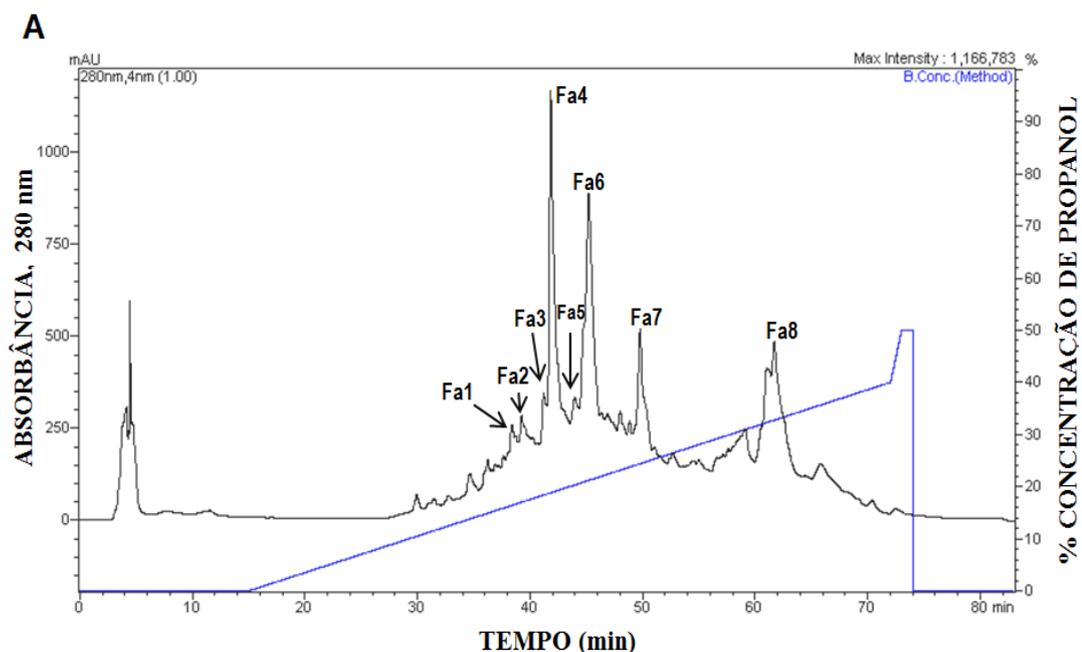


Figura 4: (A) Cromatograma do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* (acesso UENF 1381) em coluna de fase reversa C2/C18. Frações Fa1 – Fa8 obtidas após eluição da coluna com propanol. A cromatografia foi realizada utilizando-se um fluxo $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $38 \text{ }^\circ\text{C}$. **(B)** Visualização eletroforética em gel de tricina na presença de SDS das frações obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* (acesso UENF 1381) após cromatografia em sistema HPLC. Todas as frações foram tratadas com β -mercaptoetanol. M – Marcador de baixa massa molecular (kDa).

5.3 – Efeito das frações peptídicas obtidas dos frutos de *C. annuum* sobre a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos

Após a cromatografia de fase reversa em HPLC do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*, todas as frações obtidas foram selecionadas e testadas, numa concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, contra o crescimento dos fungos filamentosos *F. laterithium*, *F. solani*, *F. oxysporum*, e *C. gloeosporioides* (Figura 5 – 8), com exceção da fração Fa1 que é uma fração já caracterizada por Taveira *et al.*, (2014) e (2016). Os ensaios de crescimento foram avaliados até 54 ou 60 h, dependendo da espécie fúngica testada.

Nas figuras 5A e 5B, pode-se observar o efeito de todas as frações obtidas sobre o crescimento do fungo *F. laterithium*. Foi observado que as frações Fa3 e Fa4 foram capazes de reduzir significativamente ($p < 0,05$) em 26 e 20 %, respectivamente, o crescimento deste fungo. Já a fração Fa5 foi capaz de inibir 46 % ($p < 0,05$) do crescimento do mesmo. Já a fração Fa6 reduziu significativamente ($p < 0,05$) o crescimento do fungo em 28 % e a fração Fa7 inibiu aproximadamente 47 % ($p < 0,05$) do crescimento do fungo. As frações Fa2 e Fa8 não foram capazes de inibir o crescimento deste fungo significativamente.

Na figura 6A e 6B, pode-se observar a atividade das frações, obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* após cromatografia em HPLC, sobre o crescimento do fungo *F. solani*. Nota-se que apenas a fração Fa2 não foi capaz de inibir o crescimento deste fungo filamentoso. Observa-se ainda que, a fração Fa4 foi capaz de reduzir, significativamente, 25 % do crescimento deste fungo enquanto as frações Fa3 e Fa5 inibiram 41 e 65 % do seu crescimento ($p < 0,05$), respectivamente. Já as frações Fa6, Fa7 e Fa8 foram capazes de reduzir, significativamente, ($p < 0,05$) o crescimento do fungo em 23, 34 e 29 %, respectivamente.

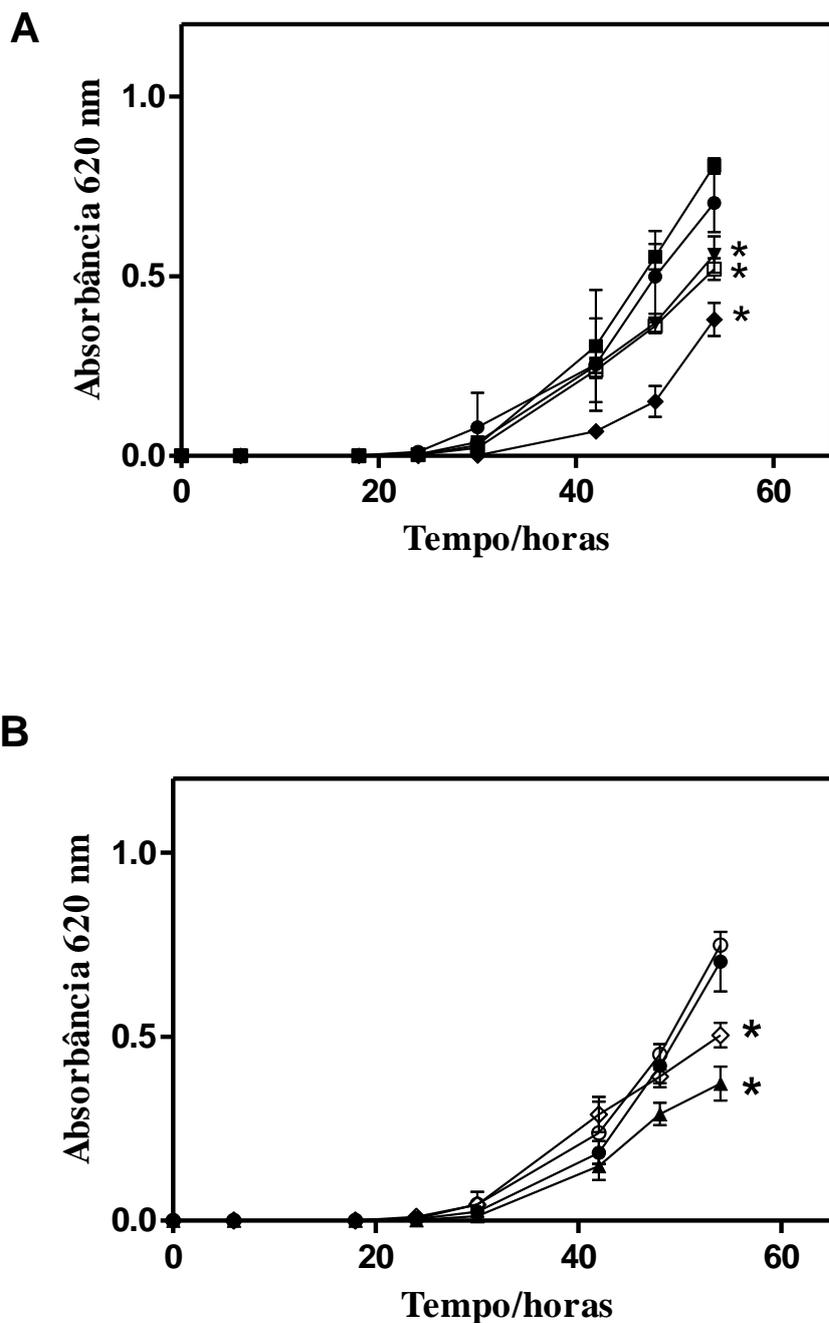


Figura 5: Visualização gráfica do crescimento do fungo filamentosso *F. laterithium* na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações ricas em peptídeos, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*. O crescimento deste fungo foi observado até 54 h. **(A)** (-●-) Controle; (-■-) Fração Fa2; (-□-) Fração Fa3; (-▼-) Fração Fa4; (-◆-) Fração Fa5. **(B)** (-●-) Controle; (-◇-) Fração Fa6; (-▲-) Fração Fa7; (-○-) Fração Fa8. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle.

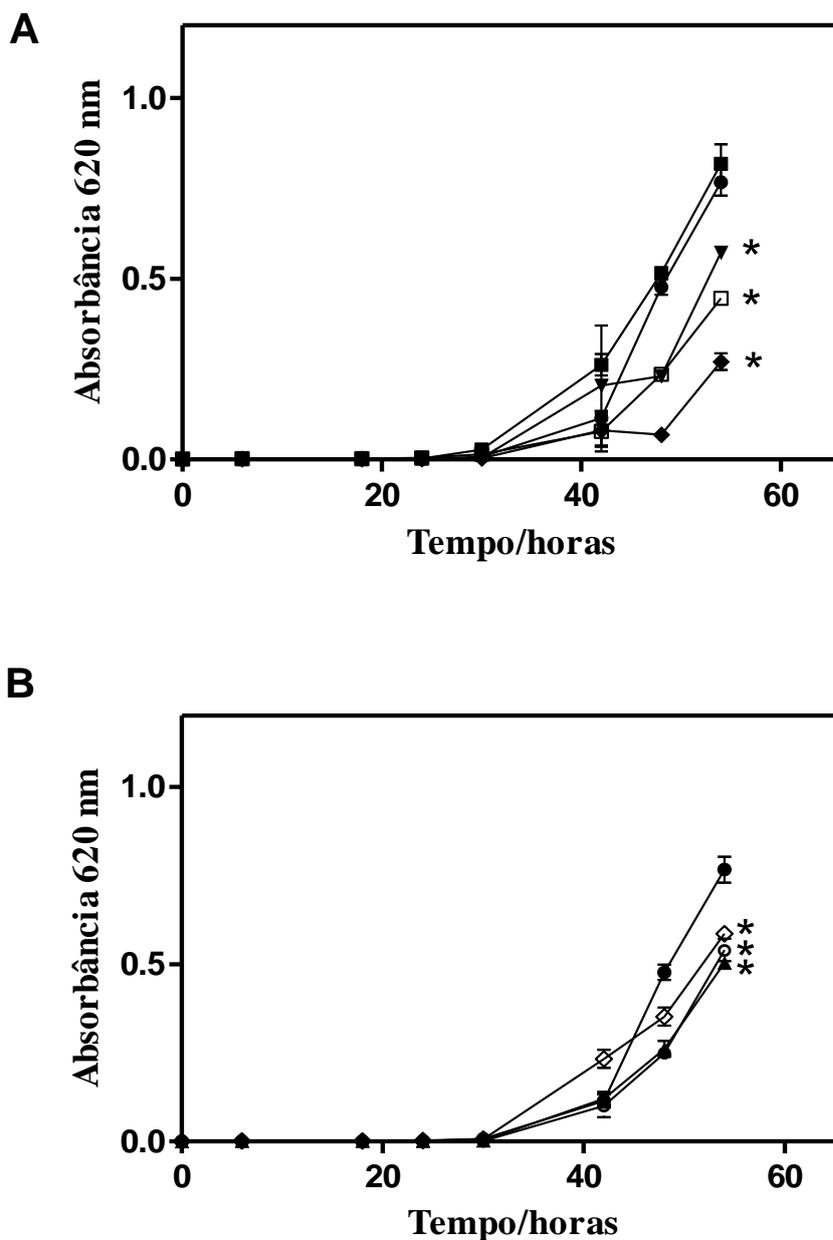


Figura 6: Visualização gráfica do crescimento do fungo filamentosso *F. solani* na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações ricas em peptídeos, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*. O crescimento deste fungo foi observado até 54 h. **(A)** (-●-) Controle; (-■-) Fração Fa2; (-□-) Fração Fa3; (-▼-) Fração Fa4; (-◆-) Fração Fa5. **(B)** (-●-) Controle; (-◇-) Fração Fa6; (-▲-) Fração Fa7; (-○-) Fração Fa8. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle.

A figura 7A e 7B mostra a atividade inibitória das frações, obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* após cromatografia em HPLC, contra o fungo *F. oxysporum*. Foi observado que, assim como para os demais fungos do gênero *Fusarium* testados, a fração Fa2 também não foi capaz de inibir o crescimento deste fungo filamentososo. Observa-se ainda que, a fração Fa4 reduziu, significativamente, 31 % do seu crescimento ($p < 0,05$), enquanto as frações Fa3 e Fa5 foram capazes de inibir cerca de 43 e 85 % do crescimento do fungo, respectivamente. Já a fração Fa6 reduziu, significativamente ($p < 0,05$), 20 % do crescimento do fungo, quando comparada ao controle. Enquanto as frações Fa7 e Fa8 causaram uma inibição de aproximadamente 42 e 69 %, respectivamente.

Na figura 8A e 8B, foi possível verificar o efeito das frações, obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* após cromatografia em HPLC, sobre o crescimento do fungo *C. gloeosporioides*. Neste resultado nota-se que todas as frações, quando comparada com o controle, não foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,05$) o crescimento deste fungo na concentração utilizada ($200 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

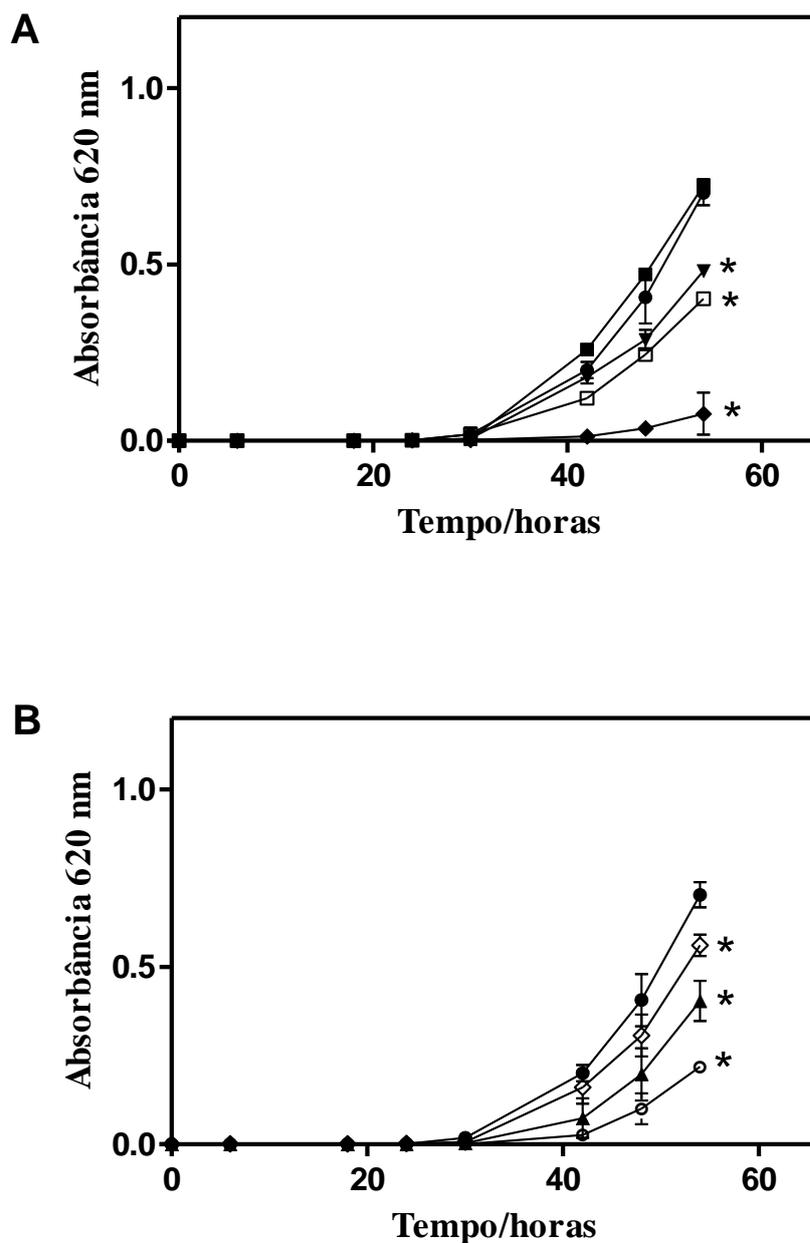


Figura 7: Visualização gráfica do crescimento do fungo filamentosso *F. oxysporum* na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações ricas em peptídeos, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*. O crescimento deste fungo foi observado até 54 h. **(A)** (-●-) Controle; (-■-) Fração Fa2; (-□-) Fração Fa3; (-▼-) Fração Fa4; (-◆-) Fração Fa5. **(B)** (-●-) Controle; (-◇-) Fração Fa6; (-▲-) Fração Fa7; (-○-) Fração Fa8. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle.

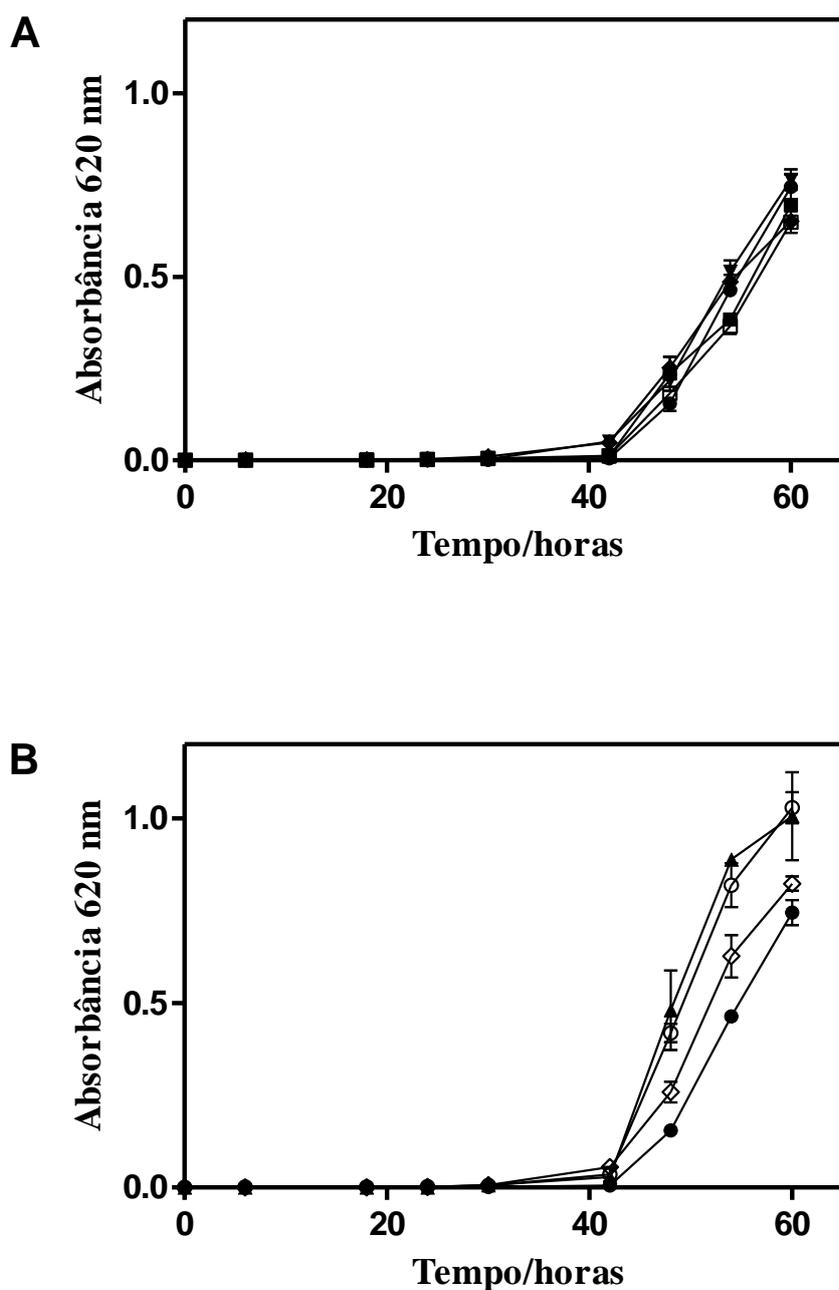


Figura 8: Visualização gráfica do crescimento do fungo filamentoso *C. gloeosporioides* na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g. mL}^{-1}$ das frações ricas em peptídeos, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*. O crescimento deste fungo foi observado até 60 h. **(A)** (-●-) Controle; (-■-) Fração Fa2; (-□-) Fração Fa3; (-▼-) Fração Fa4; (-◆-) Fração Fa5. **(B)** (-●-) Controle; (-◇-) Fração Fa6; (-▲-) Fração Fa7; (-○-) Fração Fa8. Os valores são médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle.

5.4 – Identificação da sequência de aminoácidos da fração Fa5 por espectrometria de massas

Devido à alta atividade antimicrobiana apresentada pela fração Fa5, os peptídeos majoritários contidos nesta fração (banda próxima de 6,5 kDa e a banda próxima de 17 kDa, marcados em círculo vermelho na figura 4B) foram submetidas ao sequenciamento. Na figura 9, pode-se perceber que, para a banda de maior massa molecular nenhum resultado foi obtido até o momento e essa está sendo submetida novamente a sequenciamento. Já para a banda próxima de 6,5 kDa foi obtida duas sequências denominadas de peptídeo 1 (LRDSSNSKSPASDAAPQHVTLSNR) e peptídeo 2 (LNEHFQELGNALDPDRPK). O alinhamento dos aminoácidos do peptídeo 1 mostrou similaridade à defensina de *Arabidopsis thaliana* (gi 122209378). O alinhamento dos aminoácidos do peptídeo 2 mostrou similaridade com microplusina de *Argas monolakensis* (gi 121952248), um AMP de carrapato.

A	
peptídeo 1	LRDSSNSKSPAS-DAAPQHVTLSNR
peptídeo 211 similar à defensina <i>Arabidopsis thaliana</i>	20-VMKSSNSKERTYPVTPALNPLTGQH-45
	: .***** : .:* **::
B	
peptídeo 2	LNEHFQELGNALDPDRPK
microplusina <i>Argas monolakensis</i>	87-EINELHELANQCDPAHH-105
	:::*. * ** :

Figura 9: Identificação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas dos peptídeos 1 e 2 obtidos do peptídeo de massa molecular de aproximadamente 6,5 kDa, obtida da fração Fa5 do extrato bruto de frutos de *C. annuum* (acesso UENF 1381) após cromatografia em sistema HPLC. **(A)** Alinhamento dos aminoácidos do peptídeo 1. **(B)** Alinhamento dos aminoácidos do peptídeo 2. (*) aminoácidos idênticos; (:) aminoácidos com fortes propriedades similares; (.) aminoácidos com fracas propriedades similares; (-) espaço foi introduzido para melhorar o alinhamento. Os números que flanqueiam as sequências indicam a posição dos resíduos em relação à sequência inteira.

5.5 – Análise morfológica dos fungos filamentosos tratados com a fração Fa5

Na figura 10, pode-se visualizar as imagens feitas através de microscopia óptica dos fungos *F. lateritium*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides* crescidos em meio sem adição da fração Fa5 (controle) e na presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração Fa5, após 24 h de incubação, a 30 °C.

Nas figuras 10B e 10D, foi possível observar que os fungos *F. lateritium* e *F. solani* apresentam alterações morfológicas, quando crescidos na presença da fração Fa5, apresentando aglomeração celular (asterisco), hifas mais ramificadas, curtas e com dificuldade de alongamento (seta aberta), fatos que não foram observados nos controles (Figura 10A e 10C).

Para o fungo *F. oxysporum* também houve alterações, como hifas menos ramificadas e mais estreitas (seta pontilhada) quando crescidas na presença da fração Fa5 (Figura 10F), diferentes das hifas observadas no controle (Figura 10E).

Na figura 10H, observou-se o fungo *C. gloeosporioides* crescido na presença da fração Fa5, também apresentou alterações morfológicas. Notaram-se hifas menos desenvolvidas, com dificuldade de alongamento (seta aberta). Verificou-se ainda a presença de hifas deformadas com “inchaço” (seta preenchida), diferentemente do que foi observado nas hifas do controle, onde o fungo cresceu na ausência da fração (Figura 10G).

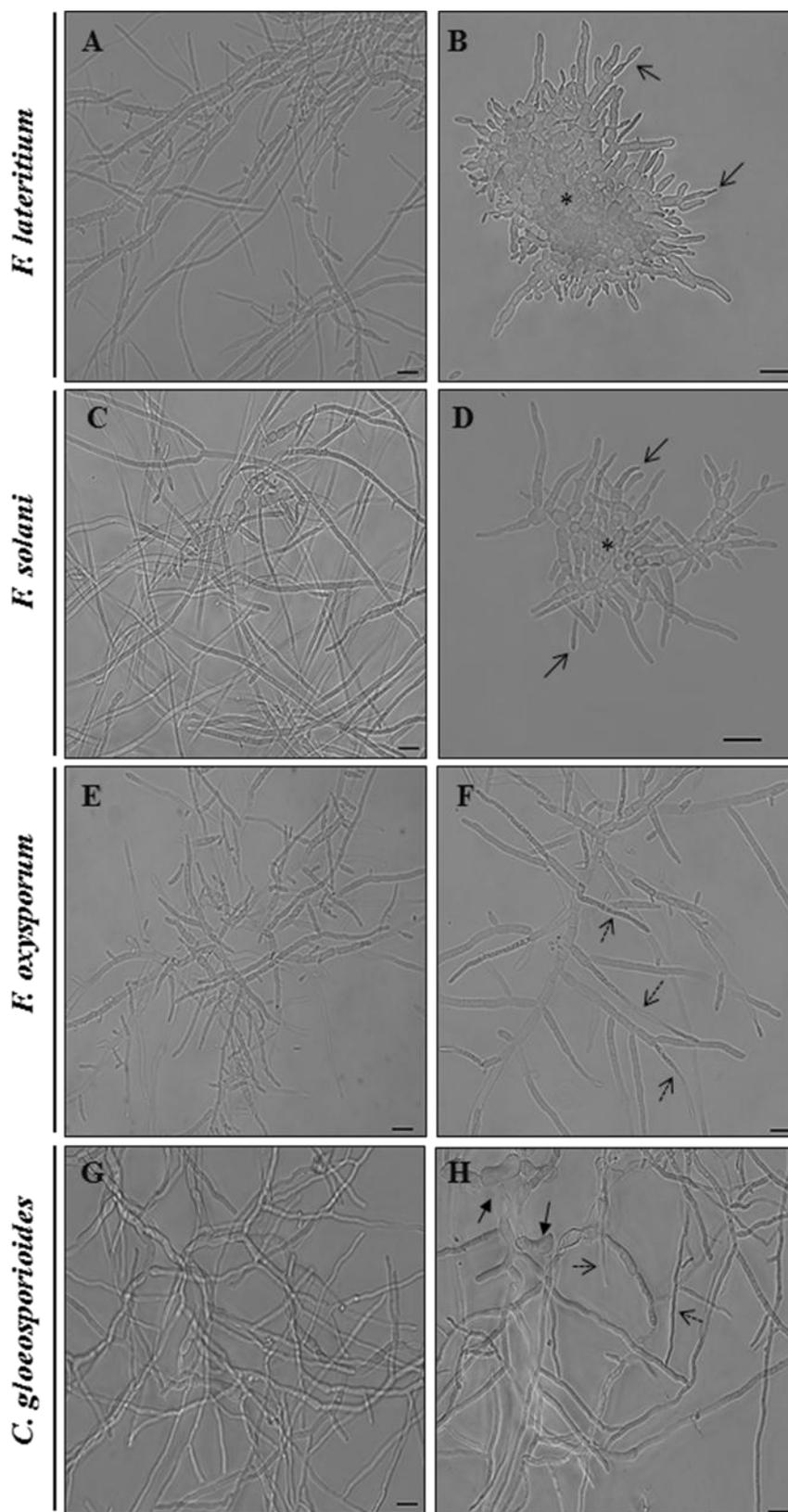


Figura 10 – Microscopia óptica da estrutura das diferentes espécies de fungos fitopatogênicos. (A, C, E, G) Células controle (crescidas na ausência da fração Fa5); (B, D, F e H) Células crescidas na presença 200 µg.mL⁻¹ da fração Fa5. Aglomeração Celular (*); Dificuldade de alongamento da hifa (seta aberta); Estreitamento da hifa (seta pontilhada); Inchaço da hifa (seta preenchida). Barras= 20 µm.

5.6 – Efeito da fração Fa5 sobre a permeabilização de membranas

A fração Fa5, obtida após a cromatografia de fase reversa em HPLC do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*, foi selecionada por apresentar alta atividade antimicrobiana para os fungos do gênero *Fusarium*. Desta forma, após 24 h de ensaio de inibição do crescimento, as células dos fungos *F. laterithium*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides*, foram submetidas ao tratamento com a sonda *Sytox Green* (Figura 11 – 12).

Foi possível perceber na figura 11, que tanto para o fungo *F. laterithium* quanto para *F. solani*, as hifas fúngicas que foram incubadas com a fração Fa5 apresentaram maior fluorescência da sonda, indicando, assim, que a fração Fa5 foi capaz de comprometer estruturalmente a membrana plasmática destas células, possibilitando a entrada e marcação do corante, esses dados podem ser ratificados se compararmos às imagens das hifas crescidas na ausência desta fração, onde nenhuma marcação foi observada.

Na figura 12, verifica-se que o fungo *F. oxysporum* crescido na presença da fração Fa5, apresenta intensa marcação do corante *Sytox Green* indicando que esta fração foi capaz de permeabilizar à membrana deste fungo permitindo a entrada e marcação do corante. O mesmo não pôde ser observado nas hifas crescidas na ausência desta fração onde nenhuma fluorescência foi observada, indicando que a membrana do fungo encontra-se íntegra. Na figura 12 também foi verificado a marcação do fungo *C. gloeosporioides*, após crescimento na ausência e presença da fração Fa5, porém notou-se uma marcação bem mais acentuada nas hifas crescidas na presença desta fração do que naquelas que cresceram na sua ausência, o que nos permite afirmar que esta fração também foi capaz de agir sobre a membrana deste fungo, permitindo a entrada e marcação do corante.

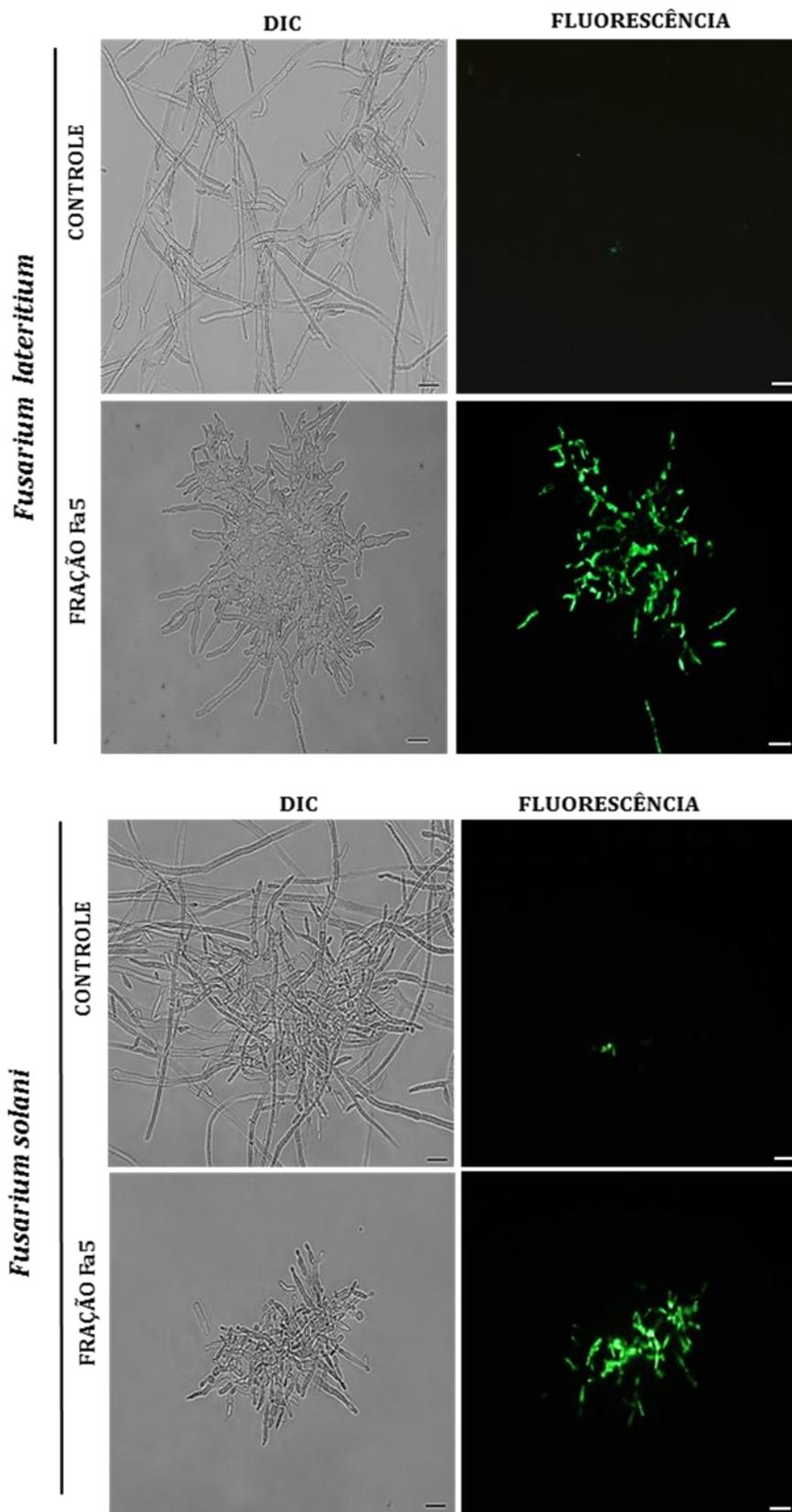


Figura 11: Imagem de microscopia de fluorescência dos fungos *F. lateritium* e *F. solani* incubadas com o corante *Sytox Green*, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração Fa5. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $20 \mu\text{m}$

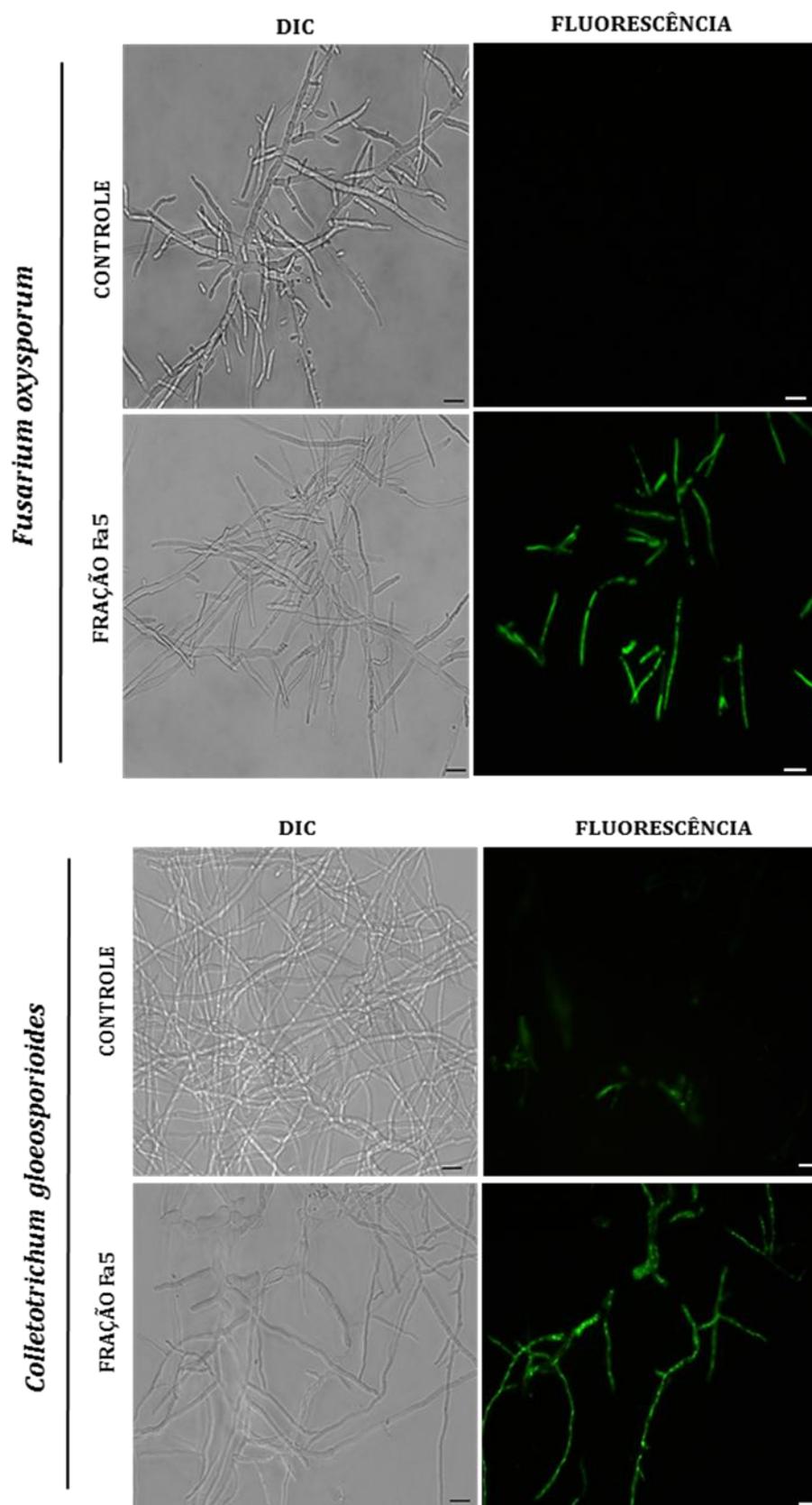


Figura 12: Imagem de microscopia de fluorescência dos fungos *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides* incubadas com o corante *Sytox Green*, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da fração Fa5. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $20 \mu\text{m}$.

5.7 – Efeito da fração Fa5 sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células fúngicas

Após 24 h do ensaio de inibição do crescimento, as células dos fungos *F. laterithium*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides*, crescidas na presença e na ausência de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração Fa5, foram retiradas e incubadas com o corante H_2DCFDA para verificar se houve indução da produção endógena de ROS (Figura 13 – 14).

Na figura 13, foi possível observar que as células dos fungos *F. laterithium* e *F. solani*, crescidas na presença da fração Fa5, apresentaram-se marcadas, indicando que esta fração foi capaz de induzir um aumento da produção de ROS nestes fungos. Ao analisar o controle nota-se uma marcação bem menos intensa, confirmando a relação da fração Fa5 com a indução de ROS observada nas células que cresceram na presença da mesma.

Na figura 14, observou-se que as células dos fungos *F. oxysporum* incubadas com a fração Fa5, apresentaram uma marcação mais acentuada para ROS do que as células do controle, também confirmando a propriedade da fração Fa5 em induzir o aumento de ROS nas células deste fungo. Nesta figura também visualizamos este ensaio para o fungo *C. gloeosporioides*, onde nenhuma indução significativa de ROS pode ser visualizada.

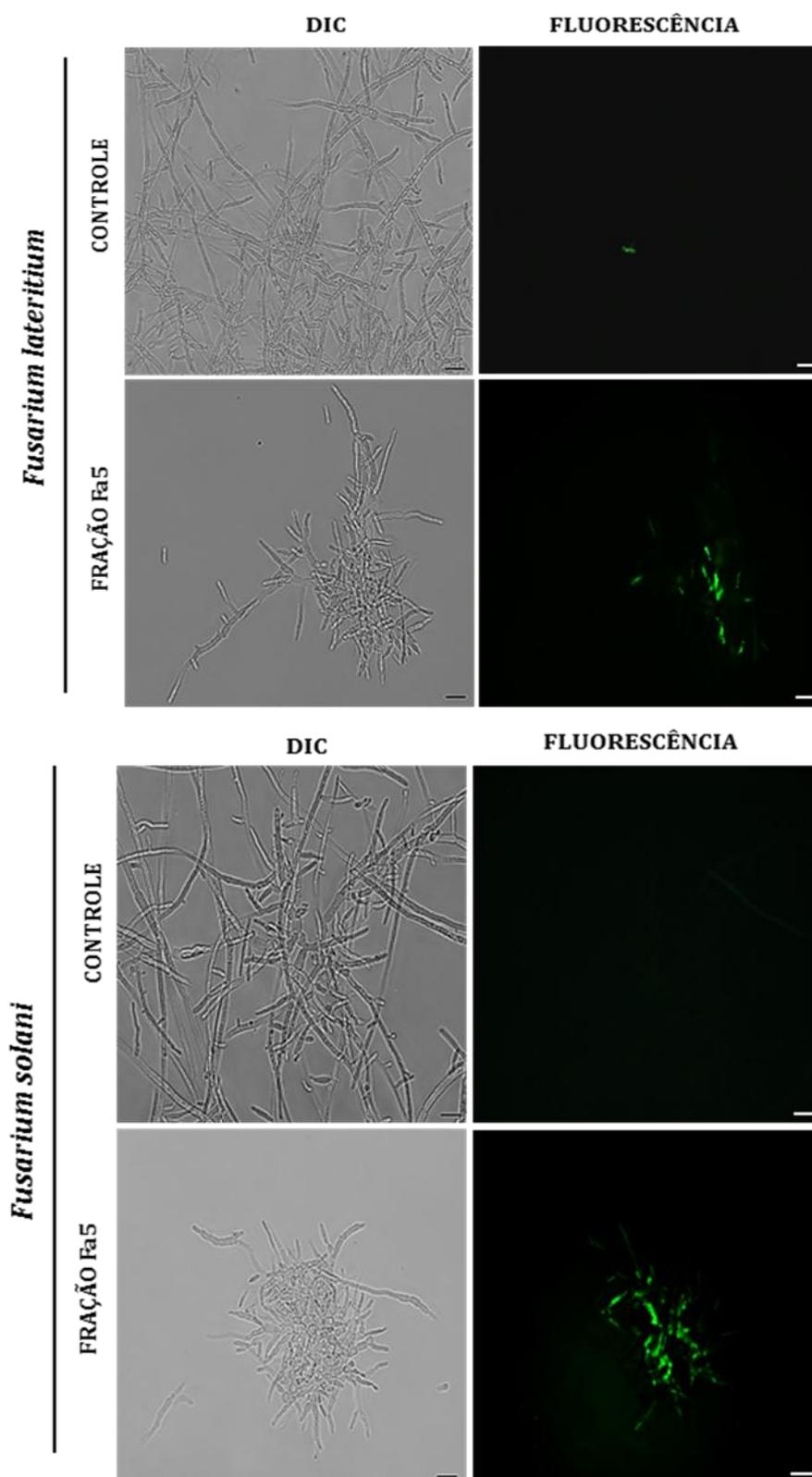


Figura 13: Imagem de microscopia de fluorescência dos fungos *F. lateritium* e *F. solani* após serem incubadas com o corante para verificação de indução de ROS (2', 7' - diclorofluoresceína diacetato), após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da fração Fa5, por 24 h. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm .

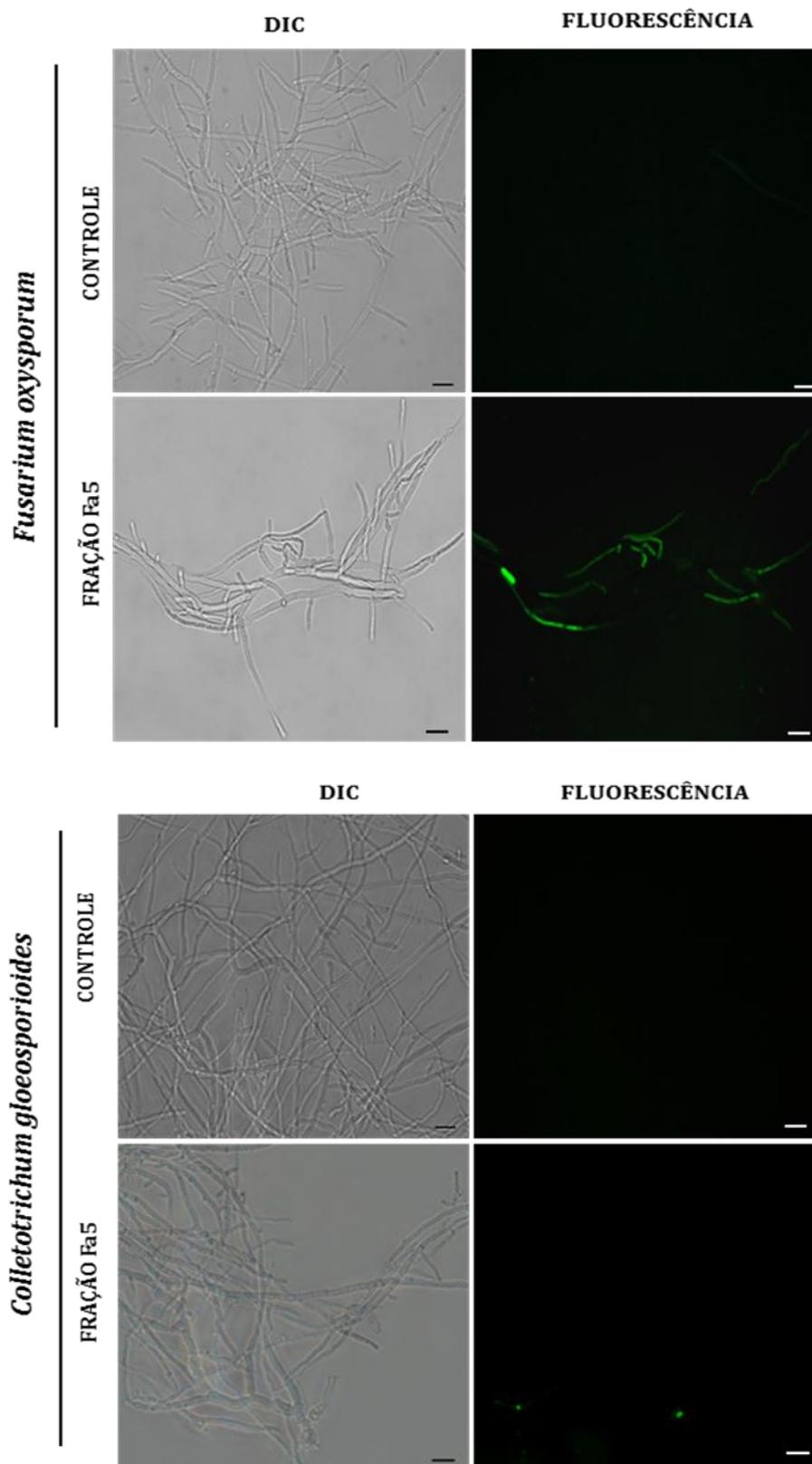


Figura 14: Imagem de microscopia de fluorescência dos fungos *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides* após serem incubadas com o corante para verificação da indução de ROS (2', 7' – diclorofluoresceína diacetato), após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da fração Fa5, por 24 h. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras= 20 μm .

5.8 – Efeito das frações sobre a inibição da atividade da amilase salivar humana e larval do inseto *Callosobruchus maculatus*

Todas as frações de *C. annuum*, obtidas após a cromatografia de fase reversa em HPLC, foram submetidas ao ensaio de inibição da atividade da enzima amilase salivar humana e larval do inseto *C. maculatus*, numa concentração de 200 µg. mL⁻¹.

Como foram observadas na figura 15A todas as frações foram capazes de inibir significativamente a atividade amilásica da saliva humana, onde as frações Fa2, Fa3, Fa4, Fa5, Fa6, Fa7 e Fa8 causaram uma inibição de 66, 75, 66, 69, 73, 76 e 83 %, respectivamente.

Na figura 15B, pode-se notar que a fração Fa4 não apresentou especificidade para amilase larval inseto *C. maculatus*. O que não ocorreu com as demais frações, que inibiram significativamente ($p < 0,05$) a atividade desta enzima, quando comparadas com o controle. Observou-se que as frações Fa2, Fa3, Fa5, Fa6, Fa7 e Fa8 inibiram, respectivamente, 40, 50, 80, 53, 68 e 95 % da atividade da amilase larval deste inseto.

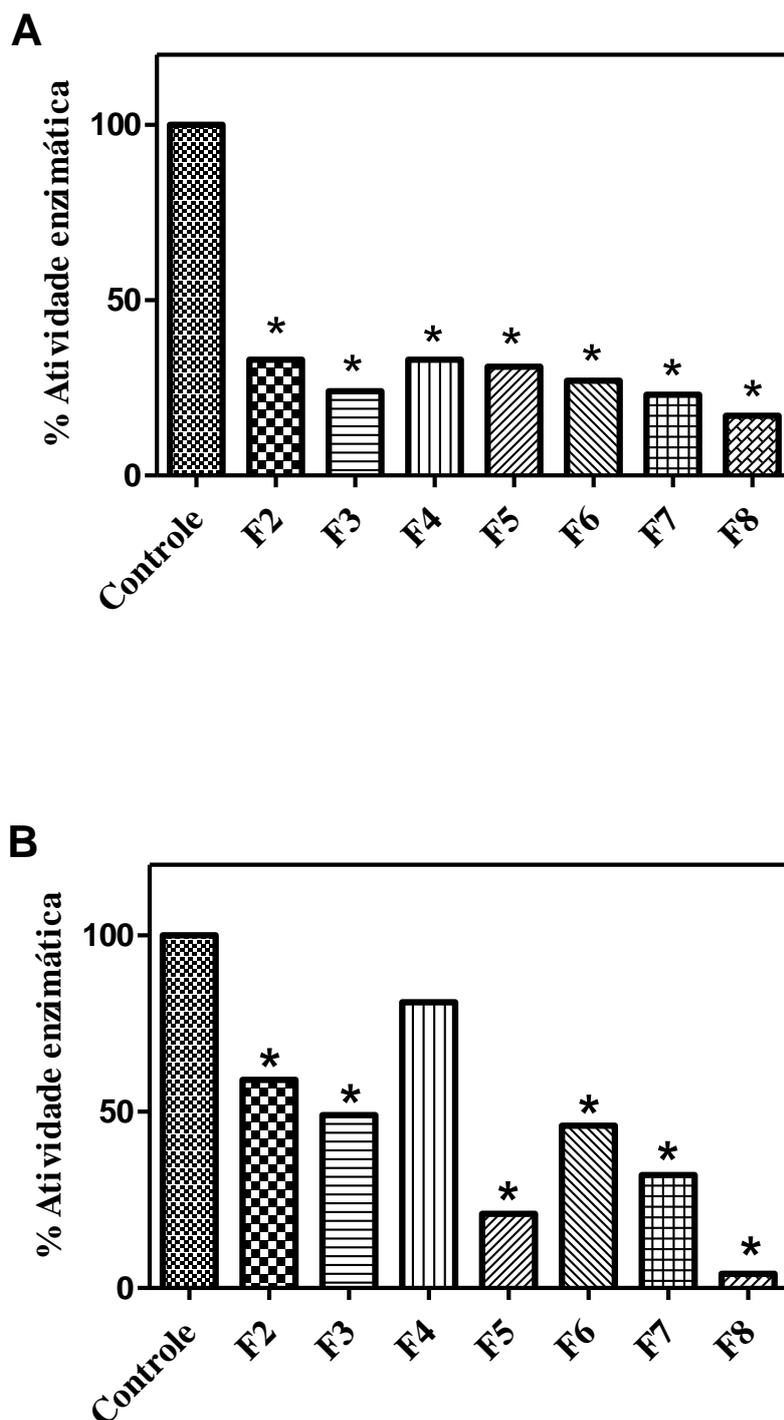


Figura 15: Visualização gráfica do efeito das frações, obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* após cromatografia em HPLC, sobre a atividade enzimática da amilase salivar humana **(A)** e da amilase larval do inseto *C. maculatus* **(B)**. O ensaio foi realizado em uma concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores representam médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle.

5.9 – Efeito das frações peptídicas obtidas dos frutos de *C. annuum* sobre a inibição da atividade da enzima tripsina

Todas as frações de *C. annuum*, obtidas após a cromatografia de fase reversa em HPLC, foram avaliadas quanto ao seu efeito sobre a atividade da enzima tripsina.

Na figura 16, foi possível observar que apenas a fração Fa2 foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$) a atividade desta enzima, apresentando 95% de inibição da atividade da tripsina.

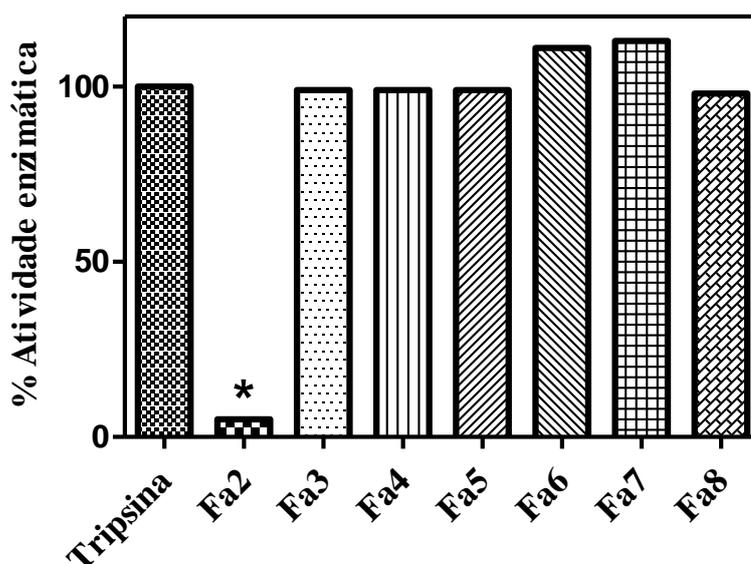


Figura 16: Visualização gráfica do efeito das frações, obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* após cromatografia em HPLC, sobre a atividade enzimática da tripsina. Os valores representam as médias (\pm SD) de triplicatas. Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle.

5.10 – Perfil eletroforético do extrato bruto dos frutos de *Capsicum*

Neste trabalho também foi selecionado os frutos das espécies de *C. chinense* e *C. baccatum* para identificar, purificar e caracterizar eletroforeticamente os peptídeos presentes nestes frutos.

A figura 17 mostra o perfil eletroforético do extrato bruto dos frutos de *C. chinense* e *C. baccatum* obtidos após extração proteica. Na raia (C), verificou-se o perfil proteico do extrato bruto dos frutos de *C. chinense*, onde se observa bandas com massas moleculares acima de 14,2 kDa e outras bandas de menor massa molecular variando entre 3,4 e 14,2 kDa. Na raia (B) foi observado o perfil eletroforético do extrato bruto dos frutos de *C. baccatum*, onde pode-se observar a presença de cinco bandas proteicas majoritárias, três destas apresentam massa molecular acima de 14,2 kDa e duas variando entre 6,5 e 14,2 kDa.

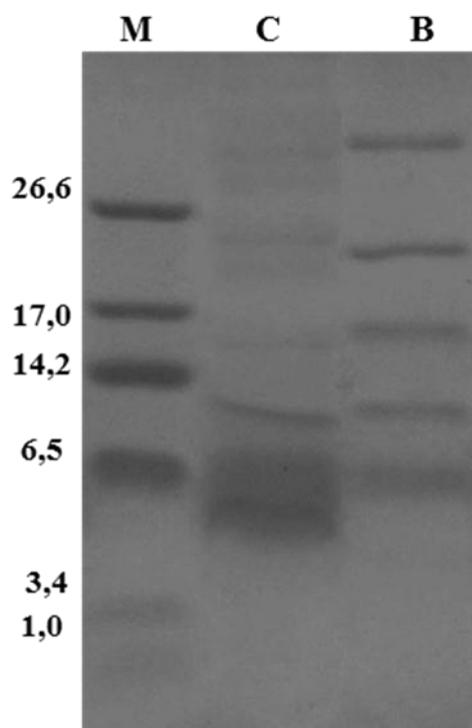
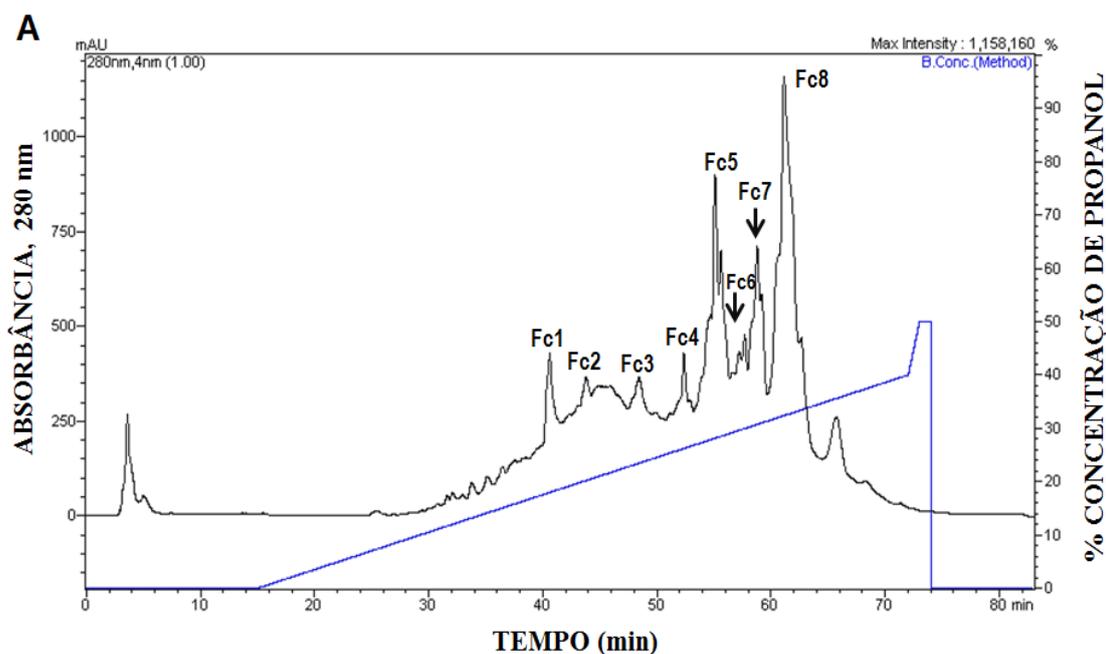


Figura 17: Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS do extrato bruto dos frutos de (C) *C. chinense*, (B) *C. baccatum* tratados com β -mercaptoetanol. (M) marcador de baixa massa molecular (kDa).

5.11 – Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético das frações dos extratos bruto dos frutos de *Capsicum*

Após a extração proteica dos frutos de *C. chinense* e *C. baccatum*, os extratos brutos destes frutos foram submetidos à cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em sistema de HPLC e posteriormente as frações resultantes foram submetidas à eletroforese em gel de tricina na presença de SDS (Figura 18 a 19).

Na figura 18A, foi possível observar o cromatograma do extrato bruto dos frutos de *C. chinense* após cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em sistema de HPLC, onde foram obtidas oito diferentes frações, as quais foram denominadas Fc1, Fc2, Fc3, Fc4, Fc5, Fc6, Fc7 e Fc8. O perfil eletroforético destas frações está apresentado na figura 18B, onde pode-se perceber que, as frações Fc1 e Fc2 apresentaram uma banda proteica em torno de 14,2 kDa e um *pool* proteico entre 3,4 e 14,2 kDa. A fração Fc3 apresenta duas bandas, uma de massa molecular de 6,5 kDa e outra banda de 14,2 kDa. A fração Fc4 apresenta duas bandas majoritárias entre 14,2 e 17 kDa. Já a fração Fc5 apresenta uma banda levemente marcada entre 3,4 e 6,5 kDa, e outras três bandas entre 6,5 e 14,2 kDa. Para a fração Fc6, duas bandas proteicas superiores a 14,2 kDa e um *pool* proteico entre 6,5 e 14,2 kDa são observados. A fração Fc7 apresenta três bandas entre 14,2 e 26,6 kDa e outras duas bandas entre 6,5 e 14,2 kDa. Na fração Fc8, um *pool* proteico entre 6,5 e 17 kDa é observado, bem como uma banda em torno de 26,6 kDa pode ser visualizada.



B M Fc1 Fc2 Fc3 Fc4 Fc5 Fc6 Fc7 Fc8

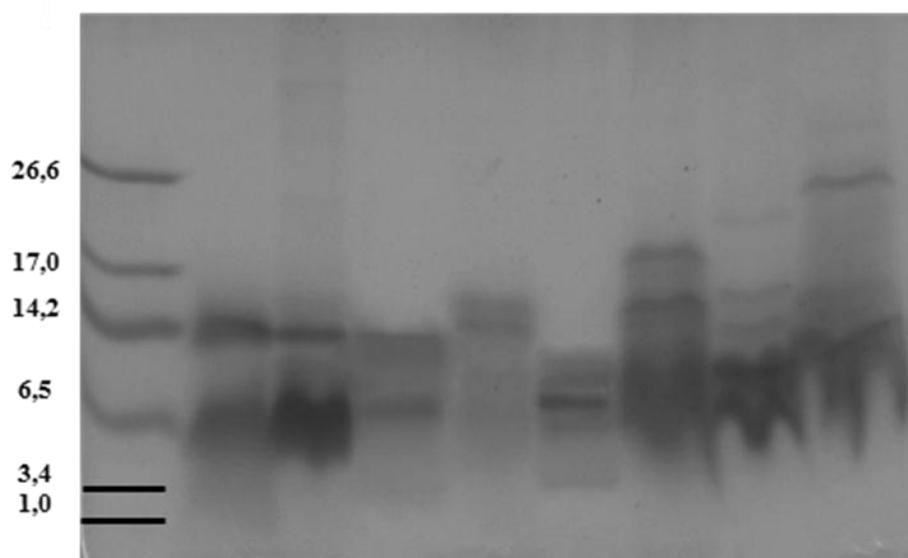


Figura 18: (A) Cromatograma do extrato bruto dos frutos de *C. chinense* (UENF 1755) em coluna de fase reversa C2/C18. Frações Fc1 – Fc8 obtidas após eluição da coluna com propanol. A cromatografia foi realizada utilizando-se um fluxo de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $38 \text{ }^\circ\text{C}$. **(B)** Visualização eletroforética em gel de tricina na presença de SDS das frações obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. chinense* (acesso UENF 1755) após cromatografia em sistema HPLC. Todas as frações foram tratadas com β -mercaptoetanol. M – Marcador de baixa massa molecular (kDa).

O extrato bruto dos frutos de *C. baccatum* foi submetido à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, utilizando uma coluna C2/C18, através da qual foram obtidas oito frações denominadas: Fb1, Fb2, Fb3, Fb4, Fb5, Fb6, Fb7 e Fb8 (Figura 19A). Na figura 19B, é mostrado o perfil eletroforético destas frações obtidas após esta cromatografia, onde pode-se observar que a fração Fb1 apresenta apenas uma banda, fracamente corada, com massa molecular em torno de 6,5 kDa. A fração Fb2 apresenta três bandas proteicas, uma banda com aproximadamente 6,5 kDa, outra entre 6 e 14 kDa, e uma outra entre 14 e 17 kDa. A fração Fb3 apresenta apenas uma banda proteica com massa molecular em torno de 6,5 kDa. Para a fração Fb4, observou-se a presença de duas bandas, uma com aproximadamente 6,5 kDa e uma outra banda em torno de 17 kDa. Já as frações Fb5, Fb6 e Fb7 apresentam uma única banda com massa molecular entre 6,5 e 14,2 kDa. E, a fração Fb8, não apresentou nenhuma banda proteica.

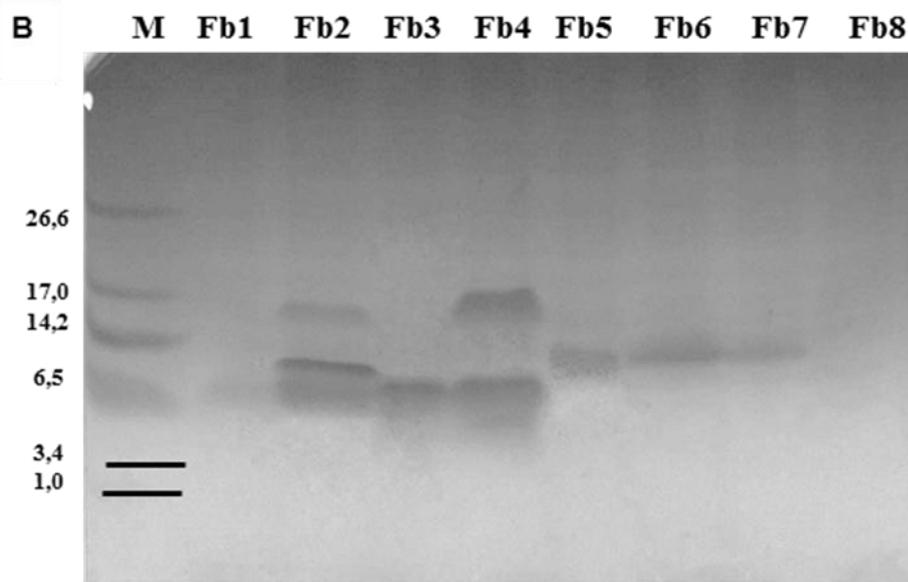
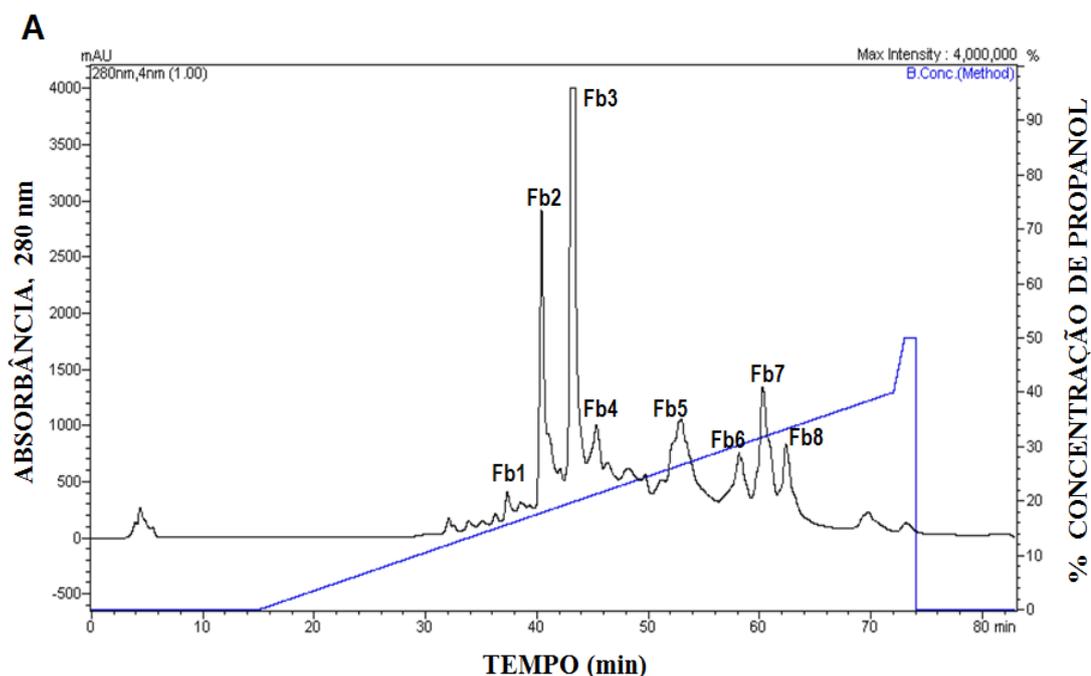


Figura 19: (A) Cromatograma do extrato bruto dos frutos de *C. baccatum* (acesso UENF 1496) em coluna de fase reversa C2/C18. Frações Fb1 – Fb8 obtidas após eluição da coluna com propanol. A cromatografia foi realizada utilizando-se um fluxo de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ a $38 \text{ }^\circ\text{C}$. **(B)** Visualização eletroforética em gel de tricina na presença de SDS das frações obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. baccatum* (acesso UENF 1496) após cromatografia em sistema HPLC. Todas as frações foram tratadas com β -mercaptoetanol. M – Marcador de baixa massa molecular (kDa).

6. DISCUSSÃO

Os frutos do gênero *Capsicum* são de grande importância econômica para o mercado mundial. Os aspectos nutricionais e a ampla versatilidade de utilização que apresentam, fazem desta cultura uma das mais difundidas do mundo (Rufino e Penteado, 2006; FAO, 2011), no entanto, sua produção mundial é dificultada por limites impostos por agentes fitopatogênicos (Kurozawa e Pavan, 1997). Estudos como este, que buscam revelar características bioquímicas de frutos do gênero *Capsicum*, são de grande importância para a melhora no manejo dessas culturas. Investigações sobre AMPs podem também contribuir de forma significativa para o desenvolvimento de controle de fitopatógenos, sendo estes importantes elementos para os programas de melhoramento genético de plantas que visam resistência às doenças (Lopes e Ávila, 2003; Babu *et al.*, 2011).

Este trabalho iniciou-se com a extração proteica de três espécies de frutos do gênero *Capsicum*: *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. annum*, segundo a metodologia descrita por Taveira *et al.*, (2014). Os respectivos extratos foram purificados por cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em HPLC, através da qual foram obtidas oito diferentes frações para cada espécie. O perfil eletroforético em gel de tricina dessas respectivas frações mostrou a presença de variadas bandas proteicas, entre elas, peptídeos de baixa massa molecular (Figura 4, 18 e 19). Outros trabalhos também já demonstraram a presença de diferentes peptídeos com atividade antimicrobiana em frutos de *Capsicum* (Liu *et al.*, 2006; Taveira *et al.*, 2014; Henriques, 2015), assim como em diferentes partes

da planta deste gênero, por exemplo, sementes (Vieira Bard *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013), folhas (Pereira, 2013; Diz, 2007) e raiz (Pereira, 2015).

Diante do trabalho exposto por Taveira *et al.*, (2014), no qual foi visto a potente atividade de um peptídeo similar à tionina (CaThi) isolada de frutos de *C. annuum* sobre diferentes leveduras e bactérias patogênicas ao homem, assim este estudo direcionou-se a selecionar as frações dos frutos de *C. annuum* (na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para analisar o efeito antimicrobiano destas sobre o crescimento dos fungos fitopatogênicos *F. laterithium*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides*. Desta forma, observou-se que as frações foram capazes de apresentar um efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) sobre o crescimento do fungo filamentosos *F. laterithium*, com exceção apenas das frações Fa2 e Fa8 que não foram capazes de inibir o crescimento deste fungo (Figura 5). Já quando essas frações, dos frutos de *C. annuum*, foram analisadas sobre o crescimento de *F. solani* e *F. oxysporum* foi visto que as frações apresentaram um efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) no crescimento destes fitopatógenos, com a exceção apenas da fração Fa2 que não foi capaz de inibir o crescimento (Figura 6 e 7). Porém, ao analisar o crescimento do fungo *C. gloeosporioides*, percebeu-se que estas frações não foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,05$) o crescimento do fungo ($p < 0,05$) (Figura 8). Diversos trabalhos vêm sendo realizados apresentando a capacidade dos peptídeos de plantas inibirem o crescimento de diversos fitopatógenos (Wang *et al.*, 2004; Gonorazky *et al.*, 2005; Regente *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2010, Asano *et al.*, 2013, Wu *et al.*, 2013). Van der Weerden *et al.*, (2008) mostraram que uma defensina (NaD1), isolada de *Nicotiana glauca*, na concentração de $1 \mu\text{M}$ inibiu 50 % do crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *Leptosphaeria maculans* e 65 % dos fungos *Thielaviopsis basicola*, *Verticillium dahliae* e *Aspergillus nidulans*. Entretanto na concentração de $5 \mu\text{M}$ da defensina, o crescimento dos fungos filamentosos testados foi reduzido em mais que 90 %. Já em outro trabalho, Yang *et al.*, (2006) revelaram que uma LTP isolada de sementes de *Leonurus japonicus* Houtt (LjAMP2), apresentou atividade contra vários fungos e bactérias, mas quando esta foi testada contra patógenos como *Agrobacterium radiobacter* não houve qualquer inibição. Resultados obtidos neste trabalho em conjunto com outros trabalhos já publicados nos mostram que os AMPs possuem ação contra diferentes microrganismos, no entanto esta atividade

antimicrobiana varia de acordo com a concentração, com o peptídeo e com o microrganismo testado.

Os resultados obtidos nos ensaios de inibição ainda podem ser explicados por uma possível interação sinérgica dos peptídeos contidos nas diferentes frações. Molina *et al.*, (1993) mostraram que a interação sinérgica entre tioninas de trigo e um peptídeo similar a LTP de cevada, apresentaram uma inibição de quase 100 % no crescimento do fungo *F. solani*, enquanto que a LTP testada sozinha contra o mesmo fungo, teve um efeito inibitório menor que 10 %. Carvalho *et al.*, (2001) também revelaram que uma LTP em combinação com uma defensina, ambas isoladas de sementes de feijão-de-corda (cultivar Epace-10), atuavam em sinergia causando alta atividade inibitória sobre o crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *F. solani*.

Devido a potente atividade antifúngica apresentada pela fração Fa5, a banda de 6,5 kDa e a banda proteica entre 14,2 e 17 kDa presentes nesta fração, foram submetidas Identificação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas mostrando que para a banda de aproximadamente 6,5 kDa foram obtidas duas sequências denominadas de peptídeo 1 e peptídeo 2. Após o alinhamento de aminoácidos, foi visto que o peptídeo 1 apresentou similaridade com defensina de *Arabidopsis thaliana* e o peptídeo 2 apresentou similaridade com microplusina de *Argas monolakensis* (Figura 9), um AMP aniônico, com massa molecular de 10,2 kDa, encontrado numa espécie de carrapato. Nenhum resultado foi obtido até o momento para a banda entre 14 e 17 kDa. Outros trabalhos já caracterizaram peptídeos com massa molecular próxima de 6 kDa, como, os pertencentes a família das defensinas (Carvalho *et al.*, 2001; Games *et al.*, 2008), inibidores de proteinases (Ribeiro *et al.*, 2007a; Dias *et al.*, 2013), tioninas (Taveira *et al.*, 2014) e peptídeos similares à vicilina (Ribeiro *et al.*, 2007b; Vieira Bard *et al.*, 2014).

Análises feitas através de microscopia óptica revelaram alterações morfológicas nas células de todos os fungos testados, crescidas na presença da fração Fa5 (Figura 10). Vale ressaltar que apesar da fração Fa5 não ter causado uma inibição significativamente no crescimento do fungo *C. gloeosporioides*, foi observado que esta fração causou danos morfológicos nas células deste fungo, onde se observou hifas menos desenvolvidas, com dificuldade de alongamento, e ainda a presença de algumas hifas deformadas com “inchaço” (Figura 10H).

Desta forma, acredita-se que este crescimento anormal pode ter resultado em um aumento da densidade ótica, pois ao observar o gráfico de inibição do crescimento a absorvância deste fungo, na presença da fração Fa5, é tão alta quanto o controle (Figura 8A). Já foi citado que várias defensinas de plantas são capazes de induzir alterações morfológicas em células fúngicas (Thevissen *et al.*, 2004; de Beer e Vivier, 2011). E tais alterações, estão incluídas aglomeração celular, alongamento celular, hiper-ramificação das hifas e principalmente, a redução do número de células. Alguns autores também relataram que estes efeitos variam de acordo com os fungos e os AMPs que estão sendo testados (Osborn *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2011)

Na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos de ação dos peptídeos da fração Fa5, realizou-se um ensaio de permeabilização de membranas, de acordo com a metodologia descrita por Thevissen *et al.*, (1999). Foi analisado o efeito desta fração (na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre a membrana dos fungos fitopatogênicos. Observou-se que a fração Fa5 foi capaz de comprometer estruturalmente a membrana plasmática de todos os fungos testados, através da marcação das células pelo corante fluorescente *Sytox Green*, o qual só consegue atravessar membranas estruturalmente comprometidas, ligando-se a ácidos nucleicos (Figura 11 – 12). Outros trabalhos também evidenciaram a capacidade de AMPs de plantas em permeabilizar membranas (Thevissen *et al.*, 1999; Giudici *et al.*, 2004; Mello *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012). Giudici *et al.*, (2006) mostraram que uma viscotoxina A3 (VtA3), foi capaz de alterar a permeabilidade da membrana plasmática e de se internalizar nas células do fungo *F. solani*. Diz *et al.*, (2011) também revelaram que uma LTP (Ca-LTP1) isolada de sementes de *C. annuum* foi capaz de permeabilizar a membrana da levedura *C. tropicalis*. Destaca-se ainda o fato de que a permeabilização de membranas e a inibição do crescimento são eventos que não estão necessariamente relacionados, por mais que isso ocorra em muitos casos, pode haver a permeabilização sem ocorrer à inibição do crescimento e vice-versa (Steffen *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2012).

A permeabilização de membranas pode resultar no colapso do potencial de membrana. Entretanto, as células dependem desse potencial de membrana para cumprir as suas funções fisiológicas vitais e sua restauração é obrigatória exigindo uma maior demanda de energia celular (Addabbo *et al.*, 2009). Uma possível consequência deste processo é a geração de espécies reativas de

oxigênio (ROS) por mitocôndrias ativadas. Portanto, foi analisado a capacidade da fração Fa5 em induzir o aumento na produção endógena de ROS nas células dos fungos *F. laterithium*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *C. gloesporioides*, crescidas na presença de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ desta fração. Foi possível observar que em todos os fungos do gênero *Fusarium* testados, a fração Fa5 causou aumento na indução de ROS, todavia contra as células do fungo *C. gloesporioides* a fração Fa5 não induziu o aumento de ROS intracelular, indicando que o mecanismo pelo qual estes peptídeos da fração Fa5 atuam neste fungo, não está relacionado com o aumento de ROS (Figura 13 – 14). Outros pesquisadores também demonstraram a capacidade de AMPs de plantas em causar aumento na produção ROS, os quais têm sido considerados como reguladores primários de morte celular (Aerts *et al.*, 2007; 2008; Hwang *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012, Taveira *et al.*, 2016). Aerts *et al.*, (2011) constataram que uma defensina, denominada HsAFP1, foi capaz de causar o acúmulo de ROS e induzir a apoptose em células de *C. albicans*. Mello *et al.*, (2011) também ratificaram a capacidade de uma defensina (*PvD*₁), isolada de sementes de *P. vulgaris*, de induzir a produção endógena de ROS e óxido nítrico em células da levedura *C. albicans*. Quanto a baixa fluorescência observada nas células controle (Figura 10A, 10C, 10E e 10G), podem ser justificadas pelo fato de que as moléculas de ROS são produzidas em níveis basais nas células, mesmo quando crescidas sob condições normais (Maiese *et al.*, 2010).

Assim como os fungos, os insetos são responsáveis por grandes prejuízos anuais na agricultura. Dessa forma, muitos trabalhos vêm sendo realizados com o intuito de isolar proteínas para atuarem na defesa contra insetos. Os insetos, sobretudo os amidolíticos, dependem diretamente da atividade das α -amilases existentes em seu intestino para a sua sobrevivência. Isto ocorre pelo fato dos insetos amidolíticos utilizarem o amido como principal fonte de carboidrato, o qual tem que ser quebrado para que a energia possa ser assimilada e, isto é feito pelas suas α -amilases intestinais (Kalve *et al.*, 2012). Neste trabalho mostrou-se que na concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, todas as frações do extrato bruto dos frutos de *C. annuum* inibiram significativamente ($p < 0,05$) a atividade das enzimas amilase salivar humana e larval do inseto *C. maculatus*, com exceção apenas da fração Fa4 que não apresentou especificidade para amilase larval do inseto testado (Figura 15). Outros trabalhos também comprovam a capacidade dos

AMPs, de diferentes famílias, em inibir α -amilases tanto de insetos quanto de mamíferos (Santos *et al.*, 2010; Vijayan *et al.*, 2012, Mehrabadi *et al.*, 2012, Kalve *et al.*, 2012; Diz *et al.*, 2011). As defensinas, por exemplo, já são bem caracterizadas por esta propriedade (Carvalho e Gomes, 2011). Zottch *et al.*, (2011) mostraram pela primeira vez que duas LTPs, isoladas de sementes de café (*Coffea canephora*), foram capazes de inibir a atividade de α -amilase de mamíferos. Em outro trabalho Vieira Bard *et al.*, (2014) revelaram que um peptídeo similar à vicilina, isolada de sementes de *Capsicum baccatum* L., na concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi capaz de inibir α -amilases salivar humana e larval dos insetos *C. maculatus* e *Tribolium castaneum*.

Neste trabalho, também foi avaliada a capacidade de todas as frações, obtidas do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*, em inibir a atividade da tripsina, uma enzima da classe serino protease que pode ser encontrada em organismos patogênicos que colonizam tecidos vegetais. De acordo com os resultados obtidos, ficou claro que das frações testadas, apenas a fração Fa2 foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$) a atividade da enzima tripsina (Figura 16). Outros estudos já identificaram inibidores de proteinases em diferentes espécies de plantas. Ribeiro *et al.*, (2007a) isolaram um peptídeo, de sementes de *C. annuum*, com alta atividade inibitória contra tripsina. Moulin *et al.*, (2014), identificaram inibidores de tripsina em folhas de *C. baccatum* var. pendulum. Vários trabalhos descrevem proteínas bifuncionais com atividade para tripsina e α -amilase (Strobl *et al.*, 1998), por exemplo, Gómez-Leyva e Blanco-Labra, que em 2001 relataram uma protease de milho com atividade para tripsina e α -amilase. Saxena *et al.*, (2010) também purificaram uma proteína de *Eleusine coracana*, com atividade para tripsina e α -amilase.

Os AMPs possuem um amplo espectro de atividade contra diferentes microrganismos, e por isso acredita-se que estes podem ser uma alternativa viável para a produção de futuros medicamentos e defensivos agrícolas. Contudo o real modo de ação dos AMPs ainda não foi completamente esclarecido, e os resultados obtidos, neste trabalho são interessantes, podendo abrir novas possibilidades para o possível desenvolvimento de métodos adequados para o controle de pragas e patógenos, visando o controle de diversas doenças de plantas.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- O extrato bruto dos frutos de *C. annuum*, caracterizaram-se por apresentar oito diferentes frações ricas, compostas majoritariamente por proteínas de baixa massa molecular;
- As frações testadas dos frutos de *C. annuum* inibiu significativamente ($p < 0,05$) o crescimento dos fungos das espécies do gênero *Fusarium*, em destaque a fração Fa5;
- Nenhuma das frações testadas dos frutos de *C. annuum* inibiu significativamente ($p < 0,05$) o crescimento do fungo *C. gloeosporioides*;
- A partir da análise de sequenciamento da banda de 6,5 kDa da fração Fa5 foram obtidos dois peptídeos cujo alinhamento mostra similaridade com famílias de peptídeos antimicrobianos;
- A fração Fa5 induziu alterações morfológicas nas células dos fungos *F. laterithium*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides*;

- A fração Fa5 foi capaz comprometer estruturalmente a membrana plasmática das células dos fungos *F. laterithium*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *C. gloeosporioides*;
- A fração Fa5 foi capaz de induzir o aumento da produção de ROS nas células das espécies do gênero *Fusarium*;
- Todas as frações testadas, do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*, inibiram significativamente ($p < 0,05$) a atividade da enzima α -amilase salivar humana;
- Todas as frações do extrato bruto dos frutos de *C. annuum*, inibiram significativamente ($p < 0,05$) a atividade da amilase larval do inseto *C. maculatus*, com exceção apenas da fração Fa4;
- A fração Fa2 foi à única fração capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$) a atividade da enzima tripsina;
- O extrato bruto dos frutos de *C. chinense* e *C. baccatum*, caracterizaram-se por apresentar oito diferentes frações ricas em peptídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addabbo, F., Montagnani, M., Goligorsky, M. S. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension*, 53:885-892.
- 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.
- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Cammue, B. P. A., Thevissen, K. (2008) The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65:2069-2079.
- Aerts, A. M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B. P., Thevissen, K. (2011) The antifungal plant defensin *HsAFP1* from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. *Front Microbiol*, 47:188-195.
- Albrecht, E., Zhang, D., Saftner, R. A, Stommel, R.J. (2012) Genetic diversity and population structure of *Capsicum baccatum* genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59:517-538.

- Andrews, J. (1995) Peppers: the domesticated *Capsicums*. 4 ed.. Austin: University of Texas Press. New Edition, 170p.
- Asano, T., Miwa, A., Maeda, K., Kimura, M., Nishiuchi, T. (2013) The secreted antifungal protein thionin 2.4 in *Arabidopsis thaliana* suppresses the toxicity of a fungal fruit body lectin from *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog*, 9: e1003581.
- Astafieva, A. A., Rogozhin, E. A., Andreev, Y. A., Odintsova, T. I., Kozlov, S. A., Grishin, E. V. Egorov T. A., (2013) A novel cysteine-rich antifungal peptide ToAMP4 from *Taraxacum officinale* Wigg. flowers. *Plant physiology and biochemistry*, 70:93-99.
- Babu, B. S., Pandravada, S. R., Rao, R. P., Anitha, K., Chakrabarty, S. K., Varaprasad, K. S. (2011) Global sources of pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. *Crop Protection*, 30:389-400.
- Bahar, A. A., Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6:1543-1575.
- Balls, A. K., Hale, W. S., Harris, T. H. (1942) Further observations on a crystalline wheat protein. *Cereal Chem*, 19:840-844.
- Barreto, M., Scaloppi, E. A. G. (2007) Sistema de previsão de doenças de hortaliças. In: zambolim, L. *Manejo Integrado – doenças, pragas e plantas daninhas*. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia, p.169-189.
- Benko-Iseppon, A. M., Galdino, S. L., Calsa, T. J., Kido, E. A., Tossi, A., Belarmino, L. C., Corvella, S. (2010) Overview on plant antimicrobial peptides. *Current Protein and Peptide Science*, 11:181-188.
- Bento, C. S., Sudré, C. P., Rodrigues, R., Riva, E. M., Pereira, M. G. (2007) Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. *Scientia Agraria*, 8:149-156.
- Bernfeld, P. (1955). Amylase α and β . *Methods in enzymology*, 1:149-158.

- Blat, S. F., Costa, C. P. D., Vencovsky, R., Sala, F. C. (2005) Reação de acessos de pimentão e pimentas ao oídio (*Oidiopsis taurica*). *Horticultura Brasileira*, 23:72-75.
- Bloch, Jr. C., Richardson, M. (1991) A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α -amilase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat γ -purothionins. *FEBS letters*, 279:101-104.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72:248-254.
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx, G., Osborn, R. W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16:297-323.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A., Vanderleyden, J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters*, 69:55-59.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P., Osborn, R. W. (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant physiology*, 108:1353.
- Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3:238-250.
- Buarque, D. (2011) População mundial chega a 7 bilhões, diz ONU. Disponível em: <http://g1.globo.com/mundo/noticia/2011/10/populacao-mundial-chega-7-bilhoes-de-pessoas-diz-onu.html>. Atualizado em 26/10/2011.
- Büttow, M. V., Barbieri, R. L., Neitzke, R. S., Heiden, G., Carvalho, F. I. F. (2010) Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. *Ciencia Rural* [online], 40:1264-1269.

- Caaveiro, J. M. M., Molina, A., González-Mañas, J. M., Rodríguez-Palenzuela, P., García-Olmedo, F., Goñi, F. M. (1997) Differential effects of five types of antipathogenic plant peptides on model membranes. *FEBS letters*, 410: 338-342.
- Carlini, C. R. Grossi-de-Sá, M. F. (2002) Plant toxic protein with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40:1515-1539.
- 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*, 39:137-146.
- Carvalho, S. D. (2003) Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) da Embrapa Hortaliças. 49 ed. Brasília. *Embrapa Hortaliças*, 49p.
- Carvalho, S. I. C., Bianchetti, L. B. (2004) Sistema de produção de pimentas (*Capsicum* spp.): botânica. *Embrapa Hortaliças*, Disponível em: [http:// www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botânica](http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botânica). Acesso em 29 de novembro de 2015.
- Carvalho, A. O., Gomes, V. M. (2007) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology – A concise review. *Peptides*, 28:1144-1153.
- Carvalho, A. O., Gomes, V. M. (2009) Plant defensin – Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30:1007-1020.
- Carvalho, A. O., Gomes, V. M. (2011) Plant defensins and defensin-like peptides- biological activities and biotechnological applications. *Current pharmaceutical design*, 17:4270-4293.
- Castro, M. S., Fontes, W. (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and peptide letters*, 12:11-16.

- Chan, D. I., Prenner, E. J., Vogel, H. J. (2006) Tryptophan-and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758:1184-1202.
- Chen, K. C., Lin, C. Y., Chung, M. C., Kuan, C. C., Sung, H. Y., Tsou, S. C. S., Kuo, C. G., Chen, C. S. (2002) Cloning and characterization of a cDNA encoding an antimicrobial protein from mung bean seeds. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43:251-259.
- Chen, J. Jr., Chen, G. H., Hsu, H. C., Li, S. S., Chen, C. S. (2004) Cloning and functional expression of a mung bean defensin VrD1 in *Pichia pastoris*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52:2256-2261.
- Chen, G. H., Hsu, M. P., Tan, C. H., Sung, H. Y., Kuo, C. G., Fan, M. J., Chen, H. E., Chen, S., Chen, C. S. (2005) Cloning and characterization of a plant defensin VaD1 from azuki bean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53: 982-988.
- 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 – Plant*, 42:100-108.
- Coelho Netto, R. A., Pereira, B. G, Noda H., Boher, B. (2004) Murcha bacteriana no estado do amazonas, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* [online], 29:17-23.
- Cohn, J., Sessa, G., Martin, G. B. (2001) Innate immunity in plants. *Current opinion in immunology*, 13:55-62.
- Colilla, F. J., Rocher, A., Mendez, E. (1990). Gamma-Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS letters*, 270:191-194.
- Cruz, L. P., Ribeiro, S. F., Carvalho, A. O., Vasconcelos, I. M., Rodrigues, R., Cunha, M. D., 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.

De Beer, A., Vivier, M. A. (2011) Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC research notes*, 4:459.

Derera, F. N., Nagy, N. Hoxha, A. (2005) Condiment paprika research in Australia. *Journal of Business Chemistry*, 2:4-18.

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

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

Diz, M. S. S. (2007). Isolamento e Caracterização de uma Proteína Transportadora de Lipídeo (LTP) de Pimenta. Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 67p.

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

- Dubreil, L., Gaborit, T., Bouchet, B., Gallant, D. J., Broekaert, W. F., Quillien, L., Marion, D. (1998) Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline- α and puroindoline- β) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1) of *triticum aestivum* seeds. Relationships with their *in vitro* antifungal properties. *Plant Science*, 138:121-135.
- Egorov, T. A., Odintsova, T. I., Pukhalsky, V. A., Grishin, E. V. (2005) Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, 26:2064-2073.
- Embrapa (2007) Pimenta (*Capsicum* spp.). Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/doencas.html>. Acessado em 14 de setembro de 2014.
- FAO (2011) Agricultural production data. *FAOSTAT*. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acessado em 04 de novembro de 2015.
- Flood, J. (2010) The importance of plant health to food security. *Food Security*, 2:215-231
- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Bloch, C., Silva, C. P., Grossi de Sá, M. F. (2000) Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry*, 267:2166-2173.
- Games, P. D., Santos, I. S., Mello, E. O., Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., Souza-Filho, G. A., Da Cunha, M., Vasconcelos, I. M., Ferreira, B. S., Gomes, V. M. (2008) Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides*, 29:2090-2100.
- Garcia-Olmedo, F., Lopez-Fando, J. J., Castagnaro, A., Molina, A., Carmona, M. J., Fernandez, J. A., Hernández-Lucas, C., Carbonero, P. (1992) Characterization and analysis of thionin genes. In: Boller, T. *Genes involved in plant defense*. Vienna: Springer-Verlag Pod, p. 283-302.

- George C. C., Tudzynski, P. (1997) Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal parasites. *In: Heath, M. C. Plant Relationships Part B.* Springer Berlin Heidelberg, p. 257-276.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., Mische, S. M. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, 20:601-605.
- Giudici, A. M., Regente, M. C., Villalaín, J., Pfüller, K., Pfüller, U., De la Canal, L. (2004) Mistletoe viscotoxins induce membrane permeabilization and spore death in phytopathogenic fungi. *Physiologia plantarum*, 121:2-7.
- Giudici, M., Poveda, J. A., Molina, M. L., De la Canal, L., González-Ros, J. M., Pfüller, K., Villalaín, J. (2006) Antifungal effects and mechanism of action of viscotxin A3. *FEBS Journal*, 273:72-83.
- Giuliani, A., Pirri, G., Nicoletto, S. F. (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2:1-33.
- Gómez-Leyva, F. J., Blanco-Labra, A. (2001) Bifunctional α -amylase/trypsin inhibitor activity previously ascribed to the 22 kDa TL protein, resided in a contaminant protein of 14 kDa. *Journal of plant physiology*, 158:177-183.
- Gonorazky, A. G., Regente, M. C., De La Canal, L. (2005). Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *Journal of plant physiology*, 162:618-624.
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O., Terán, L. M. (2010). Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology*, 135:1-11.
- Heil, M. (2010). Plastic defence expression in plants. *Evolutionary Ecology*, 24:555-569.

- Hématy, K., Cherk, C., Somerville, S. (2009). Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Current opinion in plant biology*, 12:406-413.
- Henriques, L. N. F. (2015) Purificação parcial, caracterização eletroforética e atividade inibitória de peptídeos antimicrobianos de frutos de *Capsicum baccatum*. Monografia (Biologia Celular) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 54p.
- Holaskova, E., Galuszka, P., Frebort, I., Oz, M. T. (2015) Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology Advances*, 33:1005-1023.
- Hoskin, D. W., Ramamoorthy, A. (2008) Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778:357-375.
- Hunziker, A. T. (2001). The genera of Solanaceae. 2 ed. Germany: *Koeltz Scientific Books*, 500p
- Hwang, B., Hwang, J. S.; Lee, J., Lee, D. G. (2011) The antimicrobial peptide, psacothasin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochemical and biophysical research communications*, 405:267-271.
- Jung, H. W., Kim, W., Hwang, B. K. (2003) Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant, cell e environment*, 26:915-928.
- Kader, J. C. (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annual review of plant biology*, 47:627-654.
- Kalve, N. D., Lomate, P. R., Hivrle, V. K. (2012) A proteinaceous thermo labile α -amylase inhibitor from *Albizia lebbeck* with inhibitory potential toward insect amylases. *Arthropod-Plant Interactions*, 6:213-220.

- Kido, E. A., Pandolfi, V., Houllou-Kido, L. M., Andrade, P. P., Marcelino, F. C., Nepomuceno, A. L., Abdelnoor, R. V., Burnquist, W. L., Benko-Iseppon, A. M. (2010) Plant antimicrobial peptides: an overview of SuperSAGE transcriptional profile and a functional review. *Current Protein and Peptide Science*, 11:220-230.
- Komárek, M., Čadková, E., Chrastný, V., Bordas, F., Bollinger, J. C. (2010) Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environment international*, 36:138-151.
- Kristensen, A. K., Brunstedt, J., Nielsen, K. K., Roepstorff, P., Mikkelsen, J. D. (2000) Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. *Plant Science*, 155:31-40.
- Kümmerer, K. (2004) Resistance in the environment. *Journal Antimicrob.Chemother*, 54:311–320.
- Kurozawa, C., Pavan, M. A. (1997) Doenças das Solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta). Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. 3 ed. São Paulo: *Agronômica Ceres*, 2:665-675.
- Lannes, S. D., Finger, F. L., Schuelter, A. R., Casali, V. W. (2007) Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. *Scientia Horticulturae*, 112:266-270.
- Lee, S. C., Hong, J. K., Kim, Y. J., Hwang, B. K. (2000) Pepper gene encoding thionin is differentially induced by pathogens, ethylene and methyl jasmonate. *Physiological and molecular plant pathology*, 56:207-216.
- Lim, T. K. (2012). *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. In: Lim, T. K. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. 2 ed. Canada: Springer, 23:202.
- Liu, K., Jiang, H., Moore, S. L., Watkins, C. B., Jahn, M. M. (2006) Isolation and characterization of a lipid transfer protein expressed in ripening fruit of *Capsicum chinense*. *Planta*, 223:672-683.

- Lobo Junior, M., Silva-Lobo, V. L., Lopes, C. A. (2001) Reação de genótipos de *Capsicum spp.* (pimentas e pimentão) à antracnose (*Colletotricum gloeosporioides*). *Fitopatologia Brasileira*, 26:373.
- Lopes, C. A., Ávila, A. C. (2003) Doenças do pimentão. *Embrapa Hortaliças*, Brasília. 96 p.
- Macedo, M. L. R., Garcia, V. A., Maria das Graças, M. F., 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.
- Maiese, K., Chong, Z. Z., Hou, J., Shang, Y. C. (2010) Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Experimental gerontology*, 45:217-234.
- Maor, R., Shirasu, K. (2005) The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. *Current opinion in microbiology*, 8:399-404.
- 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.
- Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, E., Mergaert, P. (2011) Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in microbiology*, 162:363-374.
- 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.
- Matsuzaki, K. (1999) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesin as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462:1-10.

- Mehrabadi, M., Bandani, A. R., Mehrabadi, R., Alizadeh, H. (2012) Inhibitory activity of proteinaceous α -amylase inhibitors from Triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary α -amylases: interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. *Pesticide biochemistry and physiology*, 102:220-228.
- Mello, E. O., Ribeiro, S. F., Carvalho, A. O., Santos, I. S., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., Gomes, V. M. (2011) Antifungal activity of *PvD1* defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. *Current microbiology*, 62:1209-1217.
- Melo, F. R., Rigden, D. J., Franco, O. L., Mello, L. V., Ary, M. B., Grossi-de-Sa, M. F., Bloch, Jr. C. (2002) Inhibition of trypsin by cowpea thionin: Characterization, molecular modeling, and docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 48:311-319.
- Molina, A., García-Olmedo, F. (1997) Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *The Plant Journal*, 12:669-675.
- Molina, A., Segura, A., García-Olmedo, F. (1993) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *Febs Letters*, 316:119-122.
- Montesinos, E. (2007) Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters*, 270:1-11.
- Moscone, E. A., Escaladaferro, M. A., Gabrielle, M., Cecchini N. M., García, Y. S., Jarret, R., Daviña, 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.
- Moulin, 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 geléia 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.

Odintsova, T., Egorov, T.A. (2012) Plant antimicrobial peptides. In: Irving, H. R., Gehring, C. *Plant signaling peptides*. New York: Springer Heidelberg, 16:107-133.

ONU (2015) População mundial chegará aos 10 bilhões em 2050, segundo estudo. Disponível em: <http://g1.globo.com/mundo/noticia/2015/09/populacao-mundial-chegara-aos-10-bilhoes-em-2050-segundo-estudo.html>. Atualizado em 08/09/15.

Osborn, R. W., De Samblanx, G. W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F. V. (1995) Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS letters*, 368:257-262.

Padovan, L., Segat, L., Tossi, A., Calsa, J., Ederson, A. K., Brandão, L., Guimaraes, R. L., Pandolfi, V., Pestana-Calsa, M. C., Belarmino, L. C.; Benko-Iseppon, A. M.; Crovella, S. (2010) Characterization of a new defensin from cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Protein and peptide letters*, 17:297-304.

Pelegriani, P. B., Lay, F. T., Murad, A. M., Anderson, M. A. Franco, O. L., (2008) Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin Family. *Proteins*, 73:719-29.

- Pereira, L. S. (2013) Peptídeos de folhas de *Capsicum baccatum* com atividade inibitória contra *Leishmania amazonensis*. Monografia (Biologia Celular) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 67p.
- Pereira, L. S. (2015) Peptídeos antimicrobianos de folhas e raízes de *Capsicum annuum* L.: Caracterização e atividade inibitória sobre microrganismos fitopatogênicos. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 96p.
- Pichersgill, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Gupta, P. K., Tsuchiya, T. *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. Amsterdam: Elsevier, 2:139-630.
- Powers, J. P. S., Hancock, R. E. (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24:1681-1691.
- Pozzobon, M. T., Schifino-Wittmann, M. T., De Bem Bianchetti, L. (2006) Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do $x=12$ and $x=13$ represent two evolutionary lines? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151:259-269.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., Aranha, C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *International journal of antimicrobial agents*, 24:536-547.
- Regente, M. C., De La Canal, L. (2000) Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiologia Plantarum*, 110:158-163.
- Regente, M. C., Giudici, A. M., Villalain, 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., Rêgo, M. M., Finger, F. L., Cruz, C. D. (2009) A diallel study of yield components and fruit quality in chilli pepper (*Capsicum baccatum*). *Euphytica* 168:275-287.
- Rêgo, E. R., Rêgo, M. M., Cruz, C. D., Finger, F. L., Casali, V. W. D. (2011) Phenotypic diversity, correlation and importance of variables for fruit quality and yield traits in Brazilian peppers (*Capsicum baccatum*). *Genetics Resources and Crop Evolution*, 58:909-918.
- 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 animals. *In: Salazar, M. A., Ortega, J. M. Pepper: nutrition, consumption and Health*. New York. Nova Science, 1:159-170.
- Reifschneider, F. J. B. (2000) *Capsicum: Pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília, D. F.: *Embrapa*. 113p.
- Reignault, P., Sancholle, M. (2005) Plant–pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? *Comptes rendus biologiques*, 328:821-833.
- Ribeiro, S. F. F., Carvalho, A. O., Da Cunha, M., Rodrigues, R., Cruz, L. P., Melo, V. M. M., Vasconcelos, I. M., Melo, E. J. T., Gomes, V. M. (2007a) Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon*, 50:600-611.
- Ribeiro, S. F. F., Agizzio, A. P., Machado, O. L. T., Neves-Ferreira, A. G. C., Oliveira, M. A., Fernandes, K. V. S., Carvalho, A. O., Perales, J., Gomes, V. M. (2007b) A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: partial characterization and antifungal activity. *Scientia horticulturae*, 111:399-405.
- Ribeiro, C. S., Lopes, C. A., Carvalho, S. I. C., Henz, G. P., Reifschneider, F. J. B. (2008) Pimentas *Capsicum*. *Embrapa Hortaliças*, p. 11-14.

- Ribeiro, S. F., Silva, M. S., Cunha, M., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Rabelo, G., Mello, E. O., Santa-Catarina, C., Rodrigues, R., Gomes, V. M. (2012) *Capsicum annum* L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101:657-670.
- Ribeiro, S. F. F., Fernandes, K. V. S., Santos, I. S., Taveira, G. B., Carvalho, A. O., Lopes, J. L. S., Beltramini, L. M., Rodrigues, R., Vasconcelos, I. M., Cunha, M. D., Souza-Filho, G. A., Gomes, V. M. (2013) New small proteinase inhibitors from *Capsicum annum* seeds: characterization, stability, spectroscopic analysis and a cDNA cloning. *Peptide Science*, 100:132-140.
- Ristori, C. A., Pereira, M. A. S., Gelli, D. S. (2002) O efeito da pimenta do reino preta moída frente à contaminação *in vitro* com *salmonella rubislaw*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 61:131-133.
- Rivelli, V. C. (1989) A wilt of pepper incited by *Fusarium oxysporum f. spp. capsici f. spp. nov* (Doctoral dissertation, MS Thesis). Louisiana State University, Baton Rouge.
- Rodrigues, R. S. J., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., Sánchez-Mata, M. C. (2014) Simultaneous determination of vitamin B1 and B2 in complex cereal foods, by reverse phase isocratic HPLC-UV. *Journal of Cereal Science*. 55:293- 299.
- Romo-Hualde, A., Yetano-Cunchillos, A. I., González-Ferrero, C., Sáiz-Abajo, M. J., González-Navarro, C. J. (2012) Supercritical fluid extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red pepper (*Capsicum annum* L.) by-products. *Food Chemistry*, 133:1045-1049.
- Rosegrant, M. W., Paisner, M. S., Meijer, S., Witcover, J. (2001) Projections of global food supply and demand and child malnutrition. *In Global food Projections to 2020. Emerging Trends and Alternative Futures*. Washington, 58-81p.
- Rufino, J. L. S., Penteadó, D. C. S. (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. *Informe Agropecuário*, 27:7-15.

- Samuel, D., Liu, Y. J., Cheng, C. S., Lyu, P. C. (2002) Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Journal of Biological Chemistry*, 277:35267-35273.
- Santos, H. S., Goto, R. (2004) Enxertia em plantas de pimentão no controle da murcha de fitóftora em ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, 22:45-49.
- Santos, I. S. D., Carvalho, A. D. O., Souza-Filho, G. A. D., Nascimento, V. V. D., Machado, O. L., Gomes, V. M. (2010) Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect α -amylase inhibitory activity. *Protein expression and purification*, 71:8-15.
- Saxena, L., Iyer, B. K., Ananthanarayan, L. (2010) Purification of a bifunctional amylase/protease inhibitor from ragi (*Eleusine coracana*) by chromatography and its use as an affinity ligand. *Journal of Chromatography*, 19:1549-1554.
- Schägger, H. e 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.
- Segura, A., Moreno, M., García-Olmedo, F. (1993) Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS letters*, 332:243-246.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7:1.
- Silva, O. N., Mulder, K. C., Barbosa, A. A., Otero-Gonzales, A. J., López-Abarrategui, C., Dias, S. C., Rezende, T. M., Franco, O. L. (2011) Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Frontiers in microbiology*, 2:232.

- Skaggs, R., Decker, M. F., VanLeeuwen, D. (2000) A Survey of Southern New Mexico Chile Producers: Production, Practices and Problems (Bulletin 782). *Las Cruces, NM: New Mexico State University Agricultural Experiment Station.*
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Maallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Osion, B. J., Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150:76-85.
- 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.
- Strobl, S., Maskos, K., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Rüth, X. F., Glockshuber, R. (1998) Crystal structure of yellow meal worm α -amylase at 1.64 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 278:617-628.
- Sudré, C. P., Gonçalves, L. S. A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A. T., Riva-Souza, E. M. Bento., C, D. S. (2010) Genetic variability in domesticated *Capsicum spp.* as assessed by morphological and agronomic data in mixer statistical analysis. *Genetics and Molecular Research*, 9:283-294.
- Taveira, G. B., Mathais, L. S., Vieira-da-Motta, O., Machado, O. L. T., Rodrigues, R., Carvalho, A. O., Teixeira-Ferreira, A., Parales, J., Vasconcelos, I. M., Gomes, V. M., (2014) Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Biopolymers*, 102:30-39
- Taveira, G. B., 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*, 16:1.

- Teixeira, V., Feio, M. J., Bastos, M. (2012) Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in lipid research*, 51:149-177.
- Terras, F. R. G., Schoofs, H. M. E., De Bolle, M. F. C., Van Leuven, F., Ress, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. e Broekaert, W. F. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 267:15301-15309.
- Thevissen, K., Terras, F. R. G., Broekaert, W. F. (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:5451-5458.
- Thevissen, K., Ferket, K. K. A., François, I. E. J. A., Cammue, B. P. A., (2003) Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides*, 24:1705-1712.
- Thevissen, K., Warnecke, D. C., Francois, I. E. J. A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zahringer, U., Thomma, B. P. H. J., Ferket, K. K. A., Cammue, B. P. A. (2004). Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 279:3900-3905.
- Torrent, M., Pulido, D., Rivas, L., Andreu, D. (2012) Antimicrobial peptide action on parasites. *Current drug targets*, 13:1138-1147.
- Van der Weerden, N. L., Lay, F. T., Anderson, M. A. (2008) The plant defensin, *NaD1*, enter the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *Journal of Biological Chemistry*, 283:14445-14452.
- Van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. J. (2006) Significance of inducible defense- related proteins in infected plants. *Annual Rev. Phytopathology*, 44:135-162.
- Velazhahan, R., Radhajeyalakshmi, R., Thangavelu, R., Muthukrishnan, S. (2001) An antifungal protein purified from pearl millet seeds shows sequence homology to

lipid transfer proteins. *Biologia plantarum*, 44:417-421.

- Vieira Bard, G. C., Nascimento, V. V., Oliveira, A. E., Rodrigues, R., Da Cunha, M., Vasconcelos, I. M., Carvalho, A. O., Gomes, V. M. (2014). Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are α -amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology. *Peptide Science*, 102:335-343.
- Vieira Bard, G. C., Nascimento, V. V., Ribeiro, S. F., Rodrigues, R., Pereles, J. F., I M., Carvalho, A. O., Fernandes, K. V. S., Gomes, V. M. (2015) Characterization of peptides from *Capsicum annum* hybrid seeds with inhibitory activity α -amylase, serine proteinase and fungi. *The protein journal*, 34:122-129.
- Vijayan, S., Imani, J., Tanneeru, K., Guruprasad, L., Kogel, K. H., Kirti, P. B. (2012) Enhanced antifungal and insect α -amylase inhibitory activities of Alpha-TvD1, a peptide variant of Tephrosia villosa defensin (TvD1) generated through in vitro mutagenesis. *Peptides*, 33:220-229.
- Viñals, F. N.; Ortega, R. G.; Garcia, J. C. (1996) El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Madrid: *Mundi-Prensa*, p. 607.
- Wang, S. Y., Wu, J. H., Ng, T. B., Ye, X. Y., Rao, P. F. (2004) A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides*, 8:1235- 42.
- Wong, J. H., Zhang, X. Q., Wang, H. X., Ng, T. B. (2006). A mitogenic defensin from white cloud beans (*Phaseolus vulgaris*). *Peptides*, 27:2075-81.
- Wu, X., Sun, J., Zhang, G., Wang, H., Ng, T. B. (2011) An antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* cv. 'Cloud Bean'. *Phytomedicine*, 18:104-109.
- Wu, T., Tang, D., Chen, W., Huang, H., Wang, R., Chen, Y. (2013) Expression of antimicrobial peptides thanatin (S) in transgenic *Arabidopsis* enhanced resistance to phytopathogenic fungi and bacteria. *Gene*, 527:235-242.

- Yang, X., Li, J., Li, X., She, R., Pei, Y. (2006) Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. *Peptides*, 27:3122-3128.
- Yeats, T. H., Rose, J. K. (2008) The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science*, 17:191-198.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415:389-95.
- Zottich, U., Da Cunha, M., Carvalho, A, Dias, G. B., Silva, N., Santos, I. S., do Nascimento, V., Miguel, E. C., Machado, O., Gomes, V M. (2011) Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810:375-383.