

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE FRUTOS DE *Capsicum annuum*: CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA COM ÊNFASE NO MECANISMO DE AÇÃO
SOBRE O GÊNERO *Candida* E ANTIMICOBACTERIANA

RODRIGO DA SILVA GEBARA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ
FEVEREIRO - 2019

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE FRUTOS DE *Capsicum annuum*: CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA COM ÊNFASE NO MECANISMO DE AÇÃO
SOBRE O GÊNERO *Candida* E ANTIMICOBACTERIANA

RODRIGO DA SILVA GEBARA

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

Orientadora: Dr.^a Valdirene Moreira Gomes

Coorientador: Dr. Gabriel Bonan Taveira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ
FEVEREIRO - 2019

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE FRUTOS DE *Capsicum annuum*: CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA COM ÊNFASE NO MECANISMO DE AÇÃO
SOBRE O GÊNERO *Candida* E ANTIMICOBACTERIANA

RODRIGO DA SILVA GEBARA

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

Aprovada em 26 de fevereiro de 2019

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Anna Lvovna Okorokova Façanha
(Dr.^a em Química Biológica - CBB - LFBM - UENF)

Prof.^a Dr.^a Maura da Cunha
(Dr.^a em Ciências Biológicas - Biofísica - CBB - LBCT - UENF)

Dr.^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão
(Dr.^a em Biociências e Biotecnologia - UFRJ)

Dr. Gabriel Bonan Taveira
Coorientador
(Dr. em Biociências e Biotecnologia - CBB - LFBM - UENF)

Prof.^a Dr.^a Valdirene Gomes Moreira
Orientadora
(Dr.^a em Ciências Biológicas - Biologia Molecular - CBB - LFBM - UENF)

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

G293

Gebara, Rodrigo da Silva.

PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE FRUTOS DE *Capsicum annum* :
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA COM ÊNFASE NO
MECANISMO DE AÇÃO SOBRE O GÊNERO *Candida* E ANTIMICOBACTERIANA / Rodrigo
da Silva Gebara. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

80 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual
do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.

Orientadora: Valdirene Moreira Gomes.

Coorientador: Gabriel Bonan Taveira.

1. Peptídeos antimicrobianos. 2. Pimenta. 3. Defensina. 4. Mecanismo de ação. 5.
Defesa de plantas. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II.
Título.

CDD - 570

“Porque eu só preciso de pés livres, de mãos dadas, e de olhos bem abertos.”

(Guimarães Rosa)

Aos meus pais Artur e Auxiliadora, que sempre apoiaram minhas decisões, proporcionando-me ajuda emocional e recursos financeiros, durante toda jornada, por entenderem a minha constante ausência e sonharem junto comigo, nunca medindo esforços para concluir cada etapa da minha vida, dedico.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Deus e Pai Todo-Poderoso – a quem tributo toda honra e glória, sempre;
- À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Valdirene Moreira Gomes que confiou em mim, proporcionando uma oportunidade de crescimento profissional e de realização pessoal. A senhora será sempre meu referencial, obrigado por todo o carinho e incentivo de sempre e por nunca desistir de mim. Obrigado por tudo Val;
- À professora Dr.^a Anna Okorokova, Dr.^a Maura da Cunha e a Dr.^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão por terem aceitado o convite de participar da banca;
- Ao Prof. André de Oliveira Carvalho por ter aceitado revisar essa dissertação, pelos ensinamentos, por sempre surgir com novas ideias para melhorar meu trabalho e pela amizade construída no decorrer dos últimos anos. Sem dúvidas, você merece pelo seu desempenho, honestidade, humildade e perseverança cada conquista obtida;
- Ao meu coorientador Dr. Gabriel Bonan Taveira e sua esposa Dr.^a Érica de Oliveira Mello, por todo incentivo e suporte vitais às minhas atividades. Hoje entendo perfeitamente que vocês foram fundamentais para que esse sonho pudesse se tornar realidade. Obrigado por todo carinho, amizade, paciência e acima de tudo pela confiança em mim depositada. Desejo tudo que há de melhor na vida de vocês!
- Ao grupo de Pesquisa Valdirene/André dos quais não mencionarei nomes para não esquecer de ninguém. Obrigado por toda ajuda prestada, paciência, pelos choros, brigas e risadas;
- Aos professores, funcionários e discentes do LFBM por toda amizade construída, em especial minha amiga Laura Maciel, Antônio Cogo, Larinne Paiva, Kíssila Soares e Luana Pereira;
- Aos técnicos pela manutenção e auxílio científico do nosso Laboratório;

- À todos os meus amigos do LBR que sempre foram bem solícitos e receptivos para com a minha pessoa. Em especial: Sanderson Dias Calixto, Vinícius de Oliveira Mussi, Andreza Linhares, Elaine Gimenez, Paula Siqueira, Rebeka Souza, Letícia Nascimento e Yuri de Castro;
- À verdadeira amiga que a UENF me presenteou e que fez parte de toda essa história. Thaynã Amanda, escolhida para ser a madrinha de Morgana, muito obrigado por tudo! Amo você!
- Ao meu parceiro e amigo de todas as horas Sanderson Dias Calixto, por sempre ter uma palavra de encorajamento, ajudado em cada etapa do Mestrado, nos ensaios de citotoxicidade e por sempre “salvar” a minha vida quando eu precisava, por todo apoio, amizade, carinho. Você faz parte desta conquista;
- À minha amiga/irmã Renata Cherene por todo companherismo e carinho no decorrer de todos esses anos. Obrigado por sempre está ao meu lado em todos os momentos da minha vida e entender a minha ausência em algumas situações;
- Aos veterinários da minha filha Clight por todo zelo, serviços prestados e amizade construída no decorrer dos seus últimos dias. Muito obrigado por proporcionarem cuidados paliativos e qualidade de vida. Em especial: Adélia Sepúlveda, Lara Lages, Sérgio Galvão, Ana Carolina Lima, João Cardoso, Eliza Prates Camolezi e Giseli Cavalcanti;
- À toda a minha família, que mesmo sem entender minhas escolhas, as respeitaram e compreenderam minha ausência durante esses anos. Obrigado por tudo;
- À minha mãe Maria Auxiliadora da Silva Reis, que sempre respeitou, compreendeu todas as minhas decisões e que também foi meu suporte emocional em todas as fases da minha vida. Amo você!
- Ao meu irmão Bruno da Silva Gebara (Primogênito) que mesmo vivendo em sua dimensão paralela, fico feliz em poder acompanhar seu tratamento. Obrigado por me permitir entender e enxergar a vida com outros olhos;
- Ao meu pai, Artur Jorge Gebara Filho, que nesses últimos anos foi meu maior incentivador, nunca me deixando desistir de lutar por melhores condições financeiras e qualidade de vida. Pai eu te amo.
- À CAPES pela bolsa concedida durante o Mestrado;

SUMÁRIO

LISTA FIGURAS E QUADROS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Peptídeos antimicrobianos	16
1.2 Peptídeos antimicrobianos de plantas	18
1.3 Defensinas de plantas.....	23
1.4 O gênero <i>Capsicum</i>	25
1.5 Leveduras do gênero <i>Candida</i>	26
1.6 Fármacos antifúngicos	27
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Materiais Biológicos	33
3.1.1 Plantas de <i>Capsicum annuum</i>	33
3.1.2 Microrganismos.....	33
3.1.3 Células de mamíferos	34
3.2 Extração e purificação de proteínas dos frutos de <i>Capsicum annuum</i>	34
3.2.1 Extração proteica dos frutos	34
3.2.2 Cromatografia de Fase Reversa em HPLC para obtenção das Frações F2, F3 e F4	35
3.2.3 Quantificação de Proteínas.....	35
3.2.4 Eletroforese em Gel de Tricina na Presença de SDS	35
3.2.5 Preparo da amostra e condição de corrida eletroforética	35
3.2.6 Coloração com Coomassie Blue e descoloração do gel	36
3.2.7 Determinação da sequência de aminoácidos	36
3.3 Análise da atividade antifúngica	37
3.3.1 Ensaio de inibição do crescimento das células de leveduras	37
3.3.2 Análise da viabilidade celular em leveduras	38

3.3.3 Efeito das frações F2, F3 e F4 sobre a permeabilização de membranas de leveduras.....	38
3.3.4 Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio intracelular	38
3.4 Avaliação da atividade antimicobacteriana	39
3.5 Efeito das Frações na Viabilidade de Macrófagos e Monócitos.....	39
3.6 Análise estatísticas	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Perfil eletroforético do extrato bruto dos frutos <i>C. annuum</i>	41
4.2 Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético de frações obtidas...	41
4.3 Identificação de resíduos de aminoácidos das frações F2 e F3 por espectrometria de massas	43
4.4 Ensaio de inibição do crescimento das células de leveduras	5
4.5 Ensaio de viabilidade celular em leveduras de importância médica.....	7
4.6 Efeito das frações F2, F3 e F4 na permeabilização de membranas de leveduras	8
4.7 Efeito das frações F2, F3 e F4 sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio nas em células de leveduras	13
4.8 Avaliação das frações de interesse quanto à inibição do crescimento de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e M299	18
4.9 Efeito das frações F2, F3 e F4 na viabilidade celular utilizando o método MTT.....	20
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA FIGURAS E QUADROS

- Figura 1:** Representação esquemática adaptada das principais classes estruturais encontradas nos AMPs incluindo: α -hélices, folhas- β , mistura de α -hélices/folhas- β , cíclicos e lineares. As pontes dissulfeto, nos AMPs que as possuem, são representadas pelas bolas interligadas. Entre parênteses é apresentado o nome do AMP (Adaptado de: SILVA et al., 2011)..... 17
- Figura 2-** Mecanismos de interação e permeabilização de AMPs em membranas de microrganismos (A) modelo barril, (B) modelo tapete, (C) modelo poro toroidal, (D) modelo detergente (Adaptado de: KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018). 18
- Quadro 1** – Família de AMPs de plantas onde é mostrado classificação, características estruturais, banco de dados e número de pontes dissulfeto. 21
- Figura 3:** Representação esquemática da estrutura terciária da defensina *NaD1* de *Nicotiana glauca*. Estrutura em vermelho representa a α -hélice, em azul as folhas- β , em amarelo as pontes de dissulfeto onde os números indicam os resíduos de cisteínas que as formam e em cinzas as voltas (Adaptado de SHAFEE et al., 2016). 23
- Figura 4:** Representação esquemática das estruturas químicas dos fármacos antifúngicos utilizados no tratamento convencional da candidíase (Estruturas feitas no programa *ChemSketch* 2018 1.1)..... 28
- Figura 5:** Representação esquemática das estruturas químicas dos fármacos utilizados no esquema RIPE da tuberculose (Estruturas feitas no programa *ChemSketch* 2018 1.1)..... 30
- Figura 6:** Representação esquemática das estruturas químicas dos fármacos utilizados como segunda e terceira linha no tratamento da Tb (Estruturas feitas no programa *ChemSketch* 2018 1.1)..... 31
- Figura 7:** Visualização eletroforética da fração F/0-70 obtida de frutos maduros de *Capsicum annuum* em gel de tricina, na presença de SDS e β -mercaptoetanol, (M) marcador de massa molecular (Da), (F/0-70) fração obtida após fracionamento com sulfato de amônio (0-70% saturação) do extrato proteico de frutos de *C. annuum*. 41
- Figura 8:** (A) Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em coluna $C_{2}C_{18}$ da fração F/0-70. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida realizada com 0,1% de TFA (Solvente A) e a amostra eluída usando um gradiente de propanol. O fluxo utilizado foi de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. F1 a F6, picos retidos na coluna e eluídos em gradiente de propanol. (B): Visualização eletroforética por gel de tricina, na presença de SDS, das frações F1 a F6 tratadas com β -mercaptoetanol, obtida através do fracionamento da fração F/0-70, de *C. annuum* por cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna $C_{2}C_{18}$. (M) marcador de massa molecular (Da)..... 42
- Figura 9:** (A) Alinhamento dos dois fragmentos de sequência obtidos, sendo um de 17 e outro de 23 resíduos de aminoácidos, através do peptídeo de 5 kDa da fração F2 com as seguintes sequências de peptídeos similares às defensinas das seguintes espécies: *Capsicum frutescens* (gi:2224319006|ACM50880.1); *Capsicum chinense* (gi:159793522|ABW99097.1); *Capsicum annuum* (gi:1200228|CAA65045.1); *Medicago truncatula* (MtDef4.5) (gi:355523354|AET03808.1)..... 44

(B) Alinhamento dos 34 resíduos de aminoácidos obtidos dos peptídeos de 6 kDa da fração F2 e fração F3 com as seguintes sequências de peptídeos similares às defensinas das seguintes espécies: *Nicotiana alata* (NaD1) (ID: Q8GTM0); *Capsicum annum* (ID: XP016579688.1); *Capsicum chinense* (ID: PHU10972.1); *Capsicum baccatum* (ID: PHT42128.1). I% indica a porcentagem de resíduos e aminoácidos idênticos destacados em negrito (incluindo os resíduos de Cys). P% indica a porcentagem de resíduos de aminoácidos positivos (que apresentam as mesmas características físico-químicas) marcados em cinza. Espaços (-) foram introduzidos para um melhor alinhamento. Os números acima da sequência indicam o tamanho dos peptídeos em resíduos de aminoácidos. Os números que flanqueiam os peptídeos indicam a posição dos resíduos de aminoácidos em relação à sequência dos peptídeos maduros. As sequências mostradas foram obtidas do SWISS-PROT e alinhadas usando o Clustal Omega. 44

Figura 10: Visualização gráfica do efeito das frações F2, F3 e F4 no crescimento das leveduras *C. bunensis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*. As células de levedura foram tratadas na presença de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada fração ou ausência (controle). Os experimentos foram realizados em triplicata. (*) Indica significância pelo teste One-way ANOVA de Tukey ($P < 0,05$), calculado utilizando os valores de absorbância do experimento e seu respectivo controle. 6

Figura 11: (A) Imagens das placas de Petri mostrando a viabilidade celular das leveduras após 24 h de tratamento com as frações F2, F3 e F4 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). (B): Tabela mostra a porcentagem de perda de viabilidade celular em leveduras após 24 h de tratamento com F2, F3 e F4 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). CFU = unidade formadora de colônia (do inglês, colony forming unit). Os experimentos foram realizados em triplicata. 7

Figura 12: Imagens de microscopia de fluorescência das células da levedura *C. bunensis* incubadas com a sonda Sytox Green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm 9

Figura 13: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. tropicalis* incubadas com a sonda Sytox Green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm 10

Figura 14: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda Sytox Green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm 11

Figura 15: Imagens de microscopia de fluorescência das células da leveduras *C. parapsilosis* incubadas com a sonda Sytox Green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm 12

Figura 16: Imagens de microscopia de fluorescência das células da levedura *C. bunensis* incubadas com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm 14

- Figura 17:** Imagens de microscopia de fluorescência das células da levedura *C. tropicalis* incubadas com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 µg.mL⁻¹ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm. 15
- Figura 18:** Imagens de microscopia de fluorescência das células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 µg.mL⁻¹ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm. 16
- Figura 19:** Imagens de microscopia de fluorescência das células da levedura *C. parapsilosis* incubadas com a sonda 2',7'- diclorofluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 µg.mL⁻¹ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm. 17
- Figura 20:** Visualização gráfica do efeito das frações F2 e F3 obtidas, a partir de frutos *Capsicum annuum*, no crescimento da cepa *Mtb* H37Rv. A suspensão bacteriana (1x10⁶ CFU/poço) de *Mtb* H37Rv foi tratada e não tratada (C+) com as frações nessas concentrações. Após cinco dias, o método do MTT foi utilizado para estudo do efeito inibitório. As barras para cada amostra referem-se às concentrações em ordem crescente. Valores são reportados como média ± desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com p<0,001 (***). 18
- Figura 21:** Visualização gráfica do efeito das frações F2 e F3 obtidas, a partir de frutos *Capsicum annuum*, no crescimento do isolado clínico *Mtb* M299. A suspensão bacteriana (1x10⁶ CFU/poço) de *Mtb* M299 foi tratada ou não tratada (C+) nessas concentrações durante 5 dias. Após este período, o método do MTT foi utilizado para estudo do efeito inibitório. As barras para cada amostra referem-se às concentrações em ordem crescente. Valores são reportados como média ± desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com p<0,001 (***), p< 0,01 (**), p< 0,05 (*). 19
- Figura 22:** Avaliação da citotoxicidade das frações F2, F3 e F4 de frutos *Capsicum annuum* em culturas de macrófagos RAW 264.7 e monócito THP-1 pelo método de MTT. As linhagens celulares foram tratadas após 24 h com as frações F2, F3 e F4 nas concentrações testadas. Posteriormente, a solução de MTT foi adicionada às culturas celulares por 2 h e os cristais de formazan obtidos foram dissolvidos com isopropanol acético. Células não tratadas de cada linhagem celular foram usadas como um controle (citotoxicidade – 0%) e 1% do detergente Triton X-100 foram adicionados como tratamento no controle positivo (citotoxicidade – 100%). Meios aritméticos ± desvio padrão (n = 3). P<0,05 (*) comparadas com células não tratadas. 20

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPs - do inglês, *antimicrobial peptides*;

CaDef 2.1- do inglês, *Capsicum annuum defensine-like peptide 1*;

CaDef 2.2- do inglês, *Capsicum annuum defensine-like peptide 2*;

CFU – do inglês, *colony forming unit*

DIC - do inglês, *differential interference contrast*;

DMEM - do inglês, *Dulbecco's modified medium*;

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético;

FBS - do inglês, *fetal bovine serum*;

F2 - fração F2 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C₂C₁₈, a partir da fração F/0-70, obtida dos frutos maduros de *C. annuum*;

F3 - fração F3 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C₂C₁₈, a partir da fração F/0-70, obtida dos frutos maduros de *C. annuum*;

F4 - fração F4 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C₂C₁₈, a partir da fração F/0-70, obtida dos frutos maduros de *C. annuum*;

F/0-70 - fração precipitada com 70% de sulfato de amônio;

HPLC - do inglês, *high performance liquid chromatography*;

H₂DCFDA - 2',7' diclorofluoresceína diacetato;

IC₅₀ - do inglês *inhibitory concentration that diminishes a specified response to 50%*;

kDa - quilodaltons;

LTPs - do inglês, *lipid transfer proteins*;

MDR - do inglês, *multiple drug resistance*;

MIC - do inglês, *minimal inhibitory concentration*;

Mtb - *Micobacterium tuberculosis*;

MTT - 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol;

OMS - Organização Mundial da Saúde;

PBS - Salina fosfatada tamponada;

RIPE - Rifampicina; Isoniazida; Pirazinamida; Etambutol;

ROS - do inglês, *reactive oxygen species*;

SDS - dodecil sulfato de sódio;

TB - Tuberculose;

TEMED - N, N', N'', N''', N'''' - tetrametiletilenodiamino;

TFA - do inglês, *trifluoroacetic acid*;

Tris - Tris (hidroximetil) amino etano;

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas que participam da primeira linha de defesa de diversos seres vivos, possuindo atividade antimicrobiana sobre uma ampla gama de patógenos. Este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar peptídeos presentes em frutos *Capsicum annuum*, avaliando sua atividade antifúngica e antimicobacteriana. Inicialmente foi realizada uma extração proteica em tampão fosfato pH 5,4, e deste extrato bruto a fração F/0-70 foi obtida utilizando uma metodologia baseada na precipitação de proteínas com sulfato de amônio 0-70% de saturação e aquecimento. Esta foi dialisada, liofilizada e submetida à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, utilizando coluna C₂C₁₈. Todo o processo foi monitorado por eletroforese em gel de tricina e as frações de interesse foram avaliadas quanto à capacidade de inibição do crescimento de leveduras e bactérias do gênero *Candida* e *Mycobacterium*, respectivamente. Devido a uma maior atividade inibitória das frações F2, F3 e F4, obtidas por cromatografia de fase reversa, estas foram selecionadas e avaliadas quanto ao potencial de inibição de crescimento, viabilidade celular em leveduras, permeabilização de membrana, aumento de ROS endógeno e citotoxicidade em macrófago murinho e monócito humano. Observamos que numa concentração de 100 µg.mL⁻¹ as frações F2, F3 e F4 apresentaram excelente atividade fungicida, exceto em *C. parapsilosis*, destas a fração F2 se mostrou mais promissora. Por espectrometria de massas, identificamos duas bandas de interesse correspondentes a aproximadamente 5 e 6 kDa das frações F2 e F3, mostrando similaridade com defensinas de plantas pertencentes à família Solanacea. Além disto, as leveduras *C. buinensis* e *C. tropicalis* quando tratadas principalmente com F2 apresentaram alterações morfológicas, permeabilização de membrana e aumento de ROS endógeno. A fração F2 também foi capaz de inibir duas cepas de *Mycobacteria* com diferentes níveis de virulências. Observou-se também que nas concentrações testadas, baixa citotoxicidade celular em macrófago RAW 264.7 e monócito humano THP-1 para nenhuma das frações testadas, apresentando IC₅₀ > 100 µg.mL⁻¹. Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que a fração F2 foi a mais promissora (*in vitro*) para estudos prospectivos que visam à geração de novos fármacos com potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, Pimenta, Defensina, Mecanismo de ação

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are molecules that participate in the first line of defense of several living beings, possessing antimicrobial activity against a wide range of pathogens. This work aimed to purify and characterize peptides present in *Capsicum annuum* fruits, evaluating their antifungal and antimycobacterial activity. Initially, a protein extraction was performed in phosphate buffer pH 5.4, and from this crude extract the F/0-70 fraction was obtained by using a methodology based on the precipitation of proteins with ammonium sulfate 0-70% saturation and heating. This was dialyzed, lyophilized and subjected to reversed-phase chromatography on HPLC system using C₂C₁₈ column. All the process was monitored by tricine gel electrophoresis and the fractions of interest were evaluated for the ability to inhibit the growth of yeasts and bacteria of the genus *Candida* and *Mycobacterium*, respectively. Due to a higher inhibitory activity of the fractions F2, F3 and F4 obtained by reversed phase chromatography, these were selected and evaluated for potential of growth inhibition, cell viability in yeast, membrane permeabilization, increase of endogenous ROS and cytotoxicity in murine macrophage and human monocyte. We observed that at a concentration of 100 µg.mL⁻¹ the F2, F3 and F4 fractions presented excellent fungicidal activity, except for *C. parapsilosis*, and from those, the fraction F2 was more promising. By mass spectrometry, we identified two interest bands corresponding to approximately 5 and 6 kDa in fractions F2 and F3, showing similarity with defensins of plants belonging to the Solanacea family. In addition, yeasts *C. buinensis* and *C. tropicalis* when treated mainly with F2 presented morphological alterations, membrane permeabilization and increase of endogenous ROS. The fraction F2 was also able to inhibit two different *Mycobacteria* strains. It was also observed that in the tested concentrations, there was no cellular cytotoxicity for RAW 264.7 macrophage and human monocyte THP-1 for none of the fractions tested, presenting IC₅₀> 100 µg.mL⁻¹. The data obtained in this work demonstrated that the fraction F2 was the most promising (*in vitro*) for prospective studies aimed at the generation of new drugs with antimicrobial potential.

Key- words: Antimicrobial peptides, Pepper, Defensin, Mecanism of action

1. INTRODUÇÃO

1.1 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são moléculas efetoras do sistema imunológico, presentes evolutivamente na maioria dos seres vivos, os quais abrangem uma ampla diversidade de atividade inibitória sobre vírus, bactérias, protozoários, leveduras, fungos filamentosos, e até mesmo sobre células cancerígenas, à medida que geralmente apresentam baixa toxicidade para células animais (ZASLOFF, 2002; FIGUEIRA et al., 2017). Os AMPs pertencem a um grupo heterogêneo e abundante de constituintes bioativos que são produzidos tanto em organismos procariotos quanto em eucariotos, atuam como componentes importantes da imunidade inata deste último (BROEKAERT et al., 1997; SILVA et al., 2011).

O método de infecção ocasionada pelo patógeno caracteriza como será o tipo de expressão desses peptídeos, podendo ser uma resposta constitutiva ou induzida (BOWDISH; DAVIDSON; HANCOCK, 2005; SELS et al., 2008). Todavia, apresentam funções e estruturas diversificadas tais como variedades do número de aminoácidos e estrutura tridimensional. Os AMPs compartilham algumas características importantes em comum, como o tamanho normalmente menor que 10 kDa e propriedades anfipáticas (BAUMANN et al., 2010). Em sua maioria os AMPs são moléculas catiônicas, cujas cargas positivas são conferidas pela presença de argininas e lisinas presentes na estrutura, apresentam aproximadamente de 12 a 100 resíduos de aminoácidos e sua estabilidade físico-química é dada pela presença de pontes dissulfeto (SHABIR et al., 2018).

Os AMPs podem ser agrupados em cinco grupos principais que se diferem em algumas características, baseando-se nas sequências primárias, estruturas tridimensionais e presença de pontes dissulfeto (Figura 1). O primeiro grupo é formado por peptídeos que adotam conformação de α -hélices em ambientes hidrofóbicos, tais como a cecropina (AMP de inseto) e a magainina (AMP de sapo). O segundo grupo envolve peptídeos que apresentam estruturas secundárias em folha- β , como por exemplo, a taquiplesia (AMP de caranguejo ferradura) e tanatina (AMP de inseto). Os que englobam o terceiro grupo são conhecidos como AMPs ricos em cisteínas que formam pontes dissulfetos, o que confere uma maior estabilidade à molécula. Estes são representados por várias famílias de AMPs de plantas, como as defensinas, tioninas, heveínas, kinotinas, proteínas transportadoras de lipídeos e snakinas (TAM et al., 2015). O quarto grupo envolve peptídeos ricos em aminoácidos histidinas e triptofanos como histatina (AMP da saliva humana rico em resíduos de histidinas)

e indolicidina (AMP de mamífero rico em resíduos de triptofano). No quinto grupo apresentam-se os AMPs abundantes em aminoácidos raros tais como as gramidicinas (AMP de bactérias) (BROEKAERT et al., 1997; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004). Um outro grupo de AMPs são os que apresentam um arcabouço peptídico cíclico, onde o N- e o C-terminal são ligados por uma ligação peptídica como exemplificado pela kalata (AMP de planta) (WHITE; CRAIK, 2016).

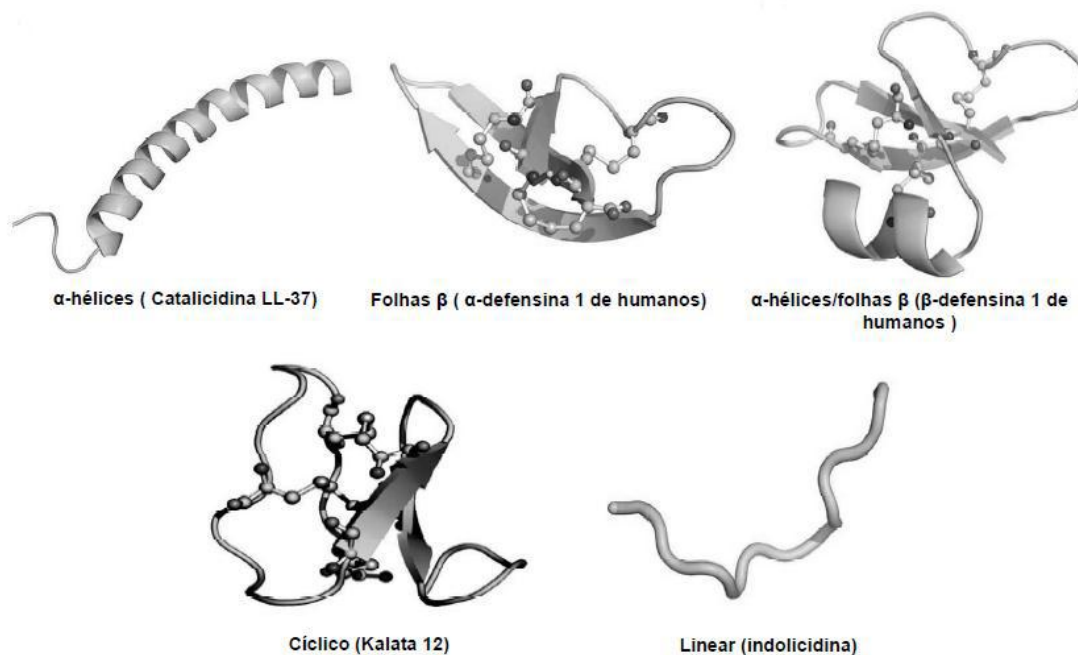


Figura 1: Representação esquemática das principais classes estruturais encontradas nos AMPs. As estruturas envolvem : α -hélices, folhas- β , mistura de α -hélices/folhas- β , cíclicos e lineares. As pontes dissulfeto, nos AMPs que as possuem, são representadas pelas bolas interligadas. Entre parênteses é apresentado o nome do AMP (Adaptado de SILVA et al., 2011).

A atividade dos AMPs, bem como seu mecanismo de ação, ainda não foi completamente elucidada. Algumas evidências apontam que estes atuam permeabilizando a membrana do microrganismo, devido à grande capacidade destes em interagir com diversas membranas biológicas (HUANG; XIE; GONG, 2000; NAWROT et al., 2014). Esta característica tem despertado o interesse em aprofundar os estudos desses AMPs, com o intuito de desenvolver produtos bioativos com propriedades terapêuticas.

Alguns modelos de interação com a membrana plasmática foram propostos (Figura 2), como: (A) modelo barril, (B) modelo tapete, (C) modelo poro toroidal e o (D) modelo detergente (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018).

No modelo barril os AMPs são depositados perpendicularmente ao plano da bicamada da membrana após a interação dos domínios hidrofóbicos destes com os grupos acil dos fosfolípídeos de membrana (Figura 2A); o modelo tapete possui uma ação tipo “detergente”, onde primeiro a micela do AMP toca a membrana e então depois o AMP penetra a bicamada lipídica formando poros (Figura 2B); no modelo poro toroidal (Figura 2C) as regiões hidrofóbicas dos AMPs se alinham verticalmente na estrutura da bicamada, enquanto as regiões hidrofílicas ajudam na formação do poro associado a parte central da bicamada lipídica; no modelo detergente os AMPs se ligam paralelamente à membrana e desestabilizam sua estrutura fluída sem atravessar a bicamada, provocando ruptura e formação de micelas (Figura 2D).

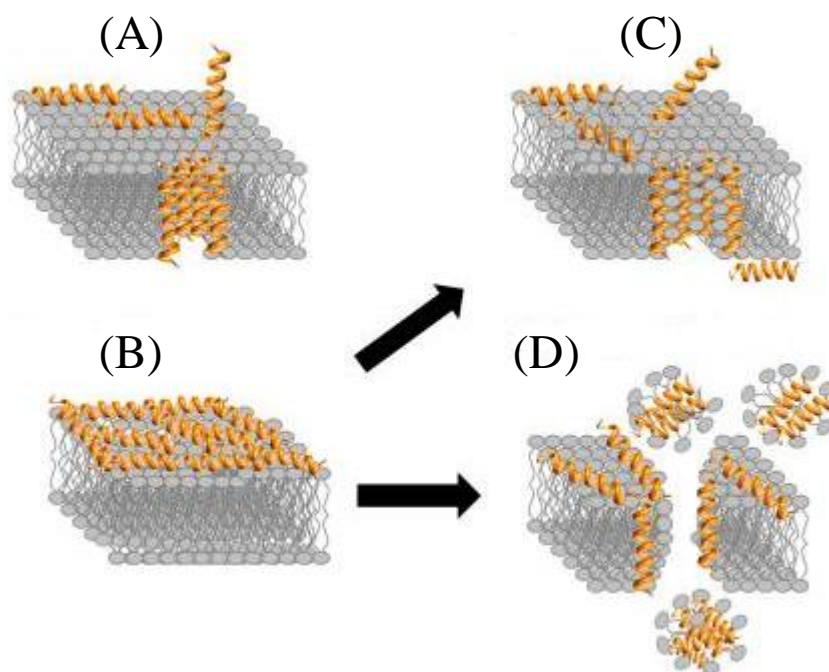


Figura 2- Mecanismos de interação e permeabilização de AMPs em membranas de microrganismos (A) modelo barril, (B) modelo tapete, (C) modelo poro toroidal, (D) modelo detergente (Adaptado de: KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018).

1.2 Peptídeos antimicrobianos de plantas

As plantas são fontes promissoras de compostos antimicrobianos que podem ser potencialmente utilizados no tratamento de infecções causadas por microrganismos. Além do caule, flores e folhas, os frutos possuem propriedades nutricionais, funcionais e um eficiente mecanismo de defesa contra pragas e patógenos, visto que estão constantemente expostas a fatores ambientais (MARÓTI et al., 2011). Em resposta a essa ameaça contra vírus, fungos, bactérias e protozoários, diversas moléculas estão envolvidas na defesa da planta, como por

exemplo, os compostos fenólicos, alcaloides, aminoácidos não proteicos, peptídeos com atividade antimicrobiana, entre outros (CASTRO; FONTES, 2005; TAM et al., 2015; AL AKEEL et al., 2017).

AMPs de plantas podem ser encontrados em órgãos vegetais, como caules, flores, folhas, frutos, raízes e especialmente em sementes, local onde há um elevado nível, comparado aos outros órgãos da planta (BROEKAERT et al., 1997; DANG; VAN DAMME, 2015; AL AKEEL et al., 2017).

Os AMPs de plantas compartilham das características gerais dos demais AMPs, tais como: baixa massa molecular (inferior a 10 kDa), propriedades anfipáticas, possuindo tanto uma região hidrofóbica que interage com lipídeos quanto uma região hidrofílica carregada positivamente (com alto conteúdo de lisina, arginina e/ou histidina) capaz de interagir com estruturas aniônicas. Muitos AMPs são ricos em resíduos de cisteína, os quais se conectam aos pares (2, 3 ou 4), formando pontes dissulfeto, conferindo alta estabilidade e tornando-as bastante resistentes às proteases presentes no soro/plasma (BROEKAERT et al., 1997; GENNARO; ZANETTI, 2000; HANCOCK; SCOTT, 2000; BOMAN, 2003; MARSHALL; ARENAS, 2003; PESCHEL; SAHL, 2006; BENKO-ISEPPON et al., 2010).

Baseando-se nas homologias, eles são classificados conforme suas características estruturais, sequência primária, resíduos de cisteína e pontes dissulfeto (Quadro 1). Os AMPs de plantas foram divididos em sete subgrupos, como: heveínas; knotinas; as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs, do inglês *lipid transfer proteins*); as snakinas, inicialmente isoladas de batata (*Solanum tuberosum*); as defensinas, inicialmente isoladas de sementes de cevada (*Hordeum vulgare*); as tioninas, sendo a purotionina, isolada de trigo (*Triticum aestivum*), o primeiro peptídeo cuja atividade contra patógenos de plantas foi detectada *in vitro*; os peptídeos circulares, conhecidos como ciclotídeos encontrados nas famílias das Rubiaceae e Violaceae e os inibidores de proteinases, isolados de sementes de pimenta, do gênero *Capsicum* (BENKO-ISEPPON et al., 2010; TAM et al., 2015; RIBEIRO et al., 2007).

Apesar de uma ampla variedade de AMPs de plantas, quatro famílias foram melhores caracterizadas: as defensinas de plantas, as LTPs, as tioninas (BROEKAERT et al., 1997); (EGOROV et al., 2005); e os ciclotídeos (WEIDMANN; CRAIK, 2016).

As tioninas foram os primeiros peptídeos de planta caracterizados (GARCIA-OLMEDO et al., 1989). Constituem uma família de peptídeos básicos, com baixa massa molecular, em torno de 5 kDa, ricos em arginina, lisina e cisteína. Localizam-se predominantemente no meio intracelular, entretanto, são encontradas também no meio extracelular e em vários tecidos vegetais. A principal característica das tioninas é a sua ampla







atividade antifúngica e antibacteriana. Tais efeitos são baseados na permeabilização de membrana celular (CAMMUE et al., 1992; BOHLMANN et al., 1998; STEC, 2006; TAVEIRA et al., 2016).

As LTPs são peptídeos catiônicos encontradas em muitas espécies de monocotiledônea e dicotiledônea. Sua classificação ocorreu devido à sua capacidade de facilitar a transferência de fosfolípídeos entre as membranas celulares *in vitro*. As LTPs podem ser divididas em duas famílias LTP1 e LTP2, que apresentam massa molecular de aproximadamente 9 a 7 kDa, respectivamente. O peptídeo sinal da família LTP1 apresenta em torno de 21 a 27 resíduos de aminoácidos e a família LTP2 de 27 a 35 resíduos de aminoácidos. Peptídeos de ambas as famílias, apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e leveduras (THEVISSSEN et al., 1996).



Os ciclotídeos são peptídeos cíclicos, devida a presença de uma ligação peptídica formada entre o N- e o C-terminal, derivados de plantas contendo três pontes de dissulfeto, formados a partir de seis resíduos de cisteínas (CRAIK et al., 1999). A combinação destas características estruturais torna os ciclotídeos estáveis, atraindo grande interesse tanto da indústria farmacêutica como na pesquisa para aplicações de *design* de fármacos ou engenharia de estruturas de proteínas. Pouco é conhecido sobre o papel natural dos ciclotídeos em plantas, embora esteja relacionado à defesa contra insetos (WEIDMANN; CRAIK, 2016).

Nosso grupo vem há alguns anos isolando e caracterizando diferentes peptídeos antimicrobianos pertencentes a diversas espécies de plantas como *Vigna unguiculata*, *Passiflora edulis f. flavicarpa*, *Phaseolus vulgaris*, *Coffea canefora*, *Adenantha pavonina*, *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense* e *Capsicum baccatum* os quais têm se mostrado eficientes na inibição do crescimento de leveduras, fungos filamentosos e bactérias sendo estes microrganismos patogênicos ou não, tanto para as plantas, quanto para a saúde humana (CARVALHO et al., 2001; CARVALHO et al., 2004; AGIZZIO et al., 2003; AGIZZIO et al., 2006; MELLO et al., 2014; ZOTTICH et al., 2013; BARD et al., 2016; SOARES et al., 2012; TAVEIRA et al., 2014; DIAS et al., 2013; BARD et al., 2014).

Quadro 1 – Família de AMPs de plantas onde é mostrado classificação, características estruturais, banco de dados e número de pontes dissulfeto.

FAMÍLIA	NOME	ESTRUTURA PROTÉICA	PDB ¹	DB ²	REFERÊNCIA
Defensina de planta	Rs-AFP2		1AYJ	4	- Terras <i>et al.</i> , 1992 - Aerts <i>et al.</i> , 2007 - Tavares <i>et al.</i> , 2008
α - e β -tioninas	Alpha-1 purotionina		1BHP	4	- Ohtani <i>et al.</i> , 1977
Tioninas	Crambina		1AB1	3	- Schrader-Fischer e Apel, 1994
Proteína transportadora de lipídeos	Ace-AMP1		1T12	4	-Cammue <i>et al.</i> , 1995 - Carvalho <i>et al.</i> , 2001 - Diz <i>et al.</i> , 2006 - Zottich <i>et al.</i> , 2011
Proteína do tipo heveína	Ace-AMP2		1HEV	4	-Broekaert <i>et al.</i> , 1992 - Lipkin <i>et al.</i> , 2005
Knotina	Mj-AMP1		1DKC	3	-Cammue <i>et al.</i> , 1992 - García-Olmedo <i>et al.</i> , 2001

Continuação ...

Macadamia	MiAMP1		1C01	3	- Marcus <i>et al.</i> , 1997 -McManus <i>et al.</i> , 1999 - Stephens <i>et al.</i> , 2005
Impatiens	ib-AMP1	-	-	-	- Tailor <i>et al.</i> , 1997 - Patel <i>et al.</i> , 1998 -Thevissen <i>et al.</i> 2005 - Wang <i>et al.</i> , 2009
Milho-AMP	MBP-1	-	-	-	- Duvick <i>et al.</i> , 1992
Puroindolinas	Puroindolina A	-	-	-	- Blochet <i>et al.</i> , 1993 -Gautier <i>et al.</i> , 1994 - Dhatwalia <i>et al.</i> , 2009
Snakinas	SN1	-	-	-	- Segura <i>et al.</i> , 1999 -Berrocal-Lobo <i>et al.</i> , 2002
Ciclotídeos	Kalata B1		1JJZ	3	- Jennings <i>et al.</i> , 2001 -Kamimori <i>et al.</i> , 2005
Inibidores de proteínase	CaTI	-	-	-	- Ribeiro <i>et al.</i> , 2007b

¹PDB refere-se ao *Protein Database* e, ²DB ao número de pontes dissulfeto. Adaptado de: BENKO-ISEPON *et al.* (2010).

1.3 Defensinas de plantas

As defensinas representam uma subfamília de peptídeos de plantas com 45 a 54 resíduos de aminoácidos, tendo sido primeiramente caracterizadas por Terras *et al.* (1995). Estes peptídeos foram obtidos inicialmente a partir de grãos de trigo e cevada, na qual foram inicialmente denominadas como γ -tionina, um subgrupo das tioninas, por apresentarem tamanho de 5 kDa e quatro ligações dissulfeto (BROEKAERT *et al.*, 1995; COOLS *et al.*, 2017). Embora tamanha semelhança, as mesmas não apresentavam o mesmo padrão de formação de pontes dissulfeto. As defensinas apresentam oito cisteínas que formam uma estrutura estável, com quatro pontes de dissulfeto, que são enoveladas em forma globular, contendo três folhas- β antiparalelas e uma α -hélice (Figura 3) (CARVALHO; GOMES, 2009).

Duas dessas pontes formam um elemento estrutural típico, denominado α -hélice/folha- β estabilizado por cisteína. Este consiste em duas pontes dissulfeto formadas entre duas cisteínas da α -hélice e duas cisteínas da folha- β C-terminal, e é característico de peptídeos com atividade antimicrobiana (KOBAYASHI *et al.*, 1991; ZHU; GAO; TYTGAT, 2005).

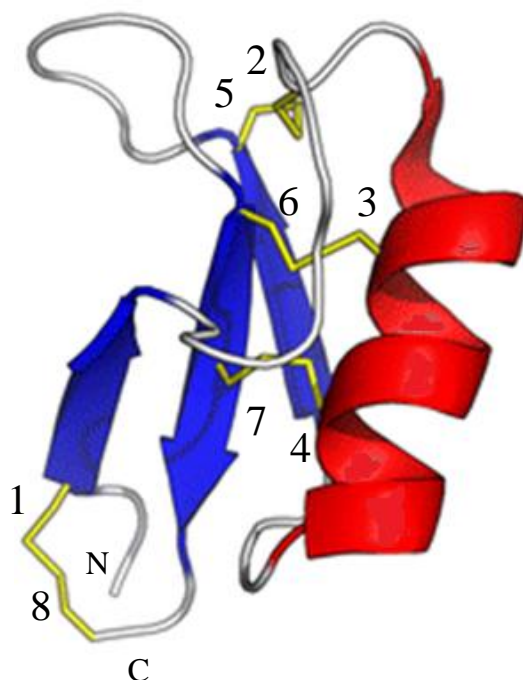


Figura 3: Representação esquemática da estrutura terciária da defensina *NaD1* de *Nicotiana alata*. Estrutura em vermelho representa a α -hélice, em azul as folhas- β , em amarelo as pontes de dissulfeto onde os números indicam os resíduos de cisteínas que as formam e em cinzas as voltas (Adaptado de SHAFEE *et al.*, 2016).

Apesar das estruturas terciárias serem bem conservadas, quando um alinhamento das estruturas primárias de diversas defensinas de plantas é realizado, é possível observar que entre os resíduos de cisteínas existe uma grande variação na sequência de aminoácidos dando origem a várias atividades biológicas e mecanismos de ação para os diferentes membros da família das defensinas (PARISI et al., 2018). Entre as atividades biológicas já descritas estão: a atividade antibacteriana, antifúngica, inibidora de proteinase e α -amilase, tolerância de zinco e bloqueadora de canais de íons. Além de estarem envolvidas na resposta aos estresses biótico e abiótico, bem como no crescimento e desenvolvimento da planta (BLOCH; RICHARDSON, 1991; FANT; VRANKEN; BORREMANS, 1999; GAO et al., 2000; FUJIMURA et al., 2004; SITARAM, 2006; SAGARAM et al., 2011; NAWROT et al., 2014; HAYES et al., 2018). Além das atividades acima descritas, as defensinas de plantas demonstraram ter ação inibitória sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (SOUZA et al., 2018) e inibição *in vitro* da transcriptase reversa do vírus HIV-1 (YE; NG, 2001; WONG; NG, 2005a), apresentando também, atividade inibitória sobre células cancerígenas (WONG; NG, 2005b; WANG et al., 2009; HEGEDŰS; MARX, 2013; FIGUEIRA et al., 2017).

Devido a suas propriedades biológicas, baixa citotoxicidade e menores chances de resistência, ao longo das últimas décadas, intensificou-se o número de pesquisas sobre defensinas de planta, acarretando na identificação de novas moléculas desta família de AMPs, bem como o aprofundamento do entendimento de seus mecanismos de ação. Além disso, suas atividades biológicas podem ser potencializadas, quando há modificações na sequência de aminoácidos, podendo até ser obtidas por meio de síntese química (COOLS et al., 2017).

1.4 O gênero *Capsicum*

O gênero *Capsicum* compreende pimentas e pimentões com uma grande variabilidade nos tipos de frutos, diferindo-se em tamanhos, cores e formas. Elas pertencem à família Solanaceae que apresenta grande relevância econômica (LUNING et al., 1995; MENICHINI et al., 2009).

Cinco espécies de *Capsicum* são consideradas cultivadas em todo o mundo: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. pubescens*, os quais apresentam variabilidade genética de forma natural (NASCIMENTO FILHO; BARBOSA; LUZ, 2007), sendo a espécie *C. annuum* a mais cultivada do gênero (SIGNORINI et al., 2013).

A pimenta e os pimentões têm valor não apenas econômico para agricultura, mas cultural, por também ser uma especiaria de culinária popular, valorizada por seus atributos sensoriais de cor, sabor, pungência, aroma e valor nutricional do seu fruto que podem ser consumidos desde verde até totalmente maduro (KOUASSI; KOFFI-NEVRY, 2012).

As civilizações medievais sempre utilizaram as pimentas com a finalidade de tornar os alimentos mais agradáveis ao paladar e pela sua capacidade de conservação natural. As pimentas apresentam propriedades antioxidantes e têm sido alvos de estudos na prevenção de alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e no processo de senescência (DEEPA et al., 2006; ARROYO; IRUELA-ARISPE, 2010; GUZMAN et al., 2010). Como fins medicinais, são utilizadas como estimulante digestivo, afrodisíaco, combate a disenteria e infecções intestinais, além de ação antiparasitária e cicatrizante, dentre outros (MARIA; PINTO, 2013).

Os frutos de *Capsicum* apresentam antioxidantes naturais, como a vitamina C, carotenoides e vitamina E. Também são fontes de vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina e ácido fólico), além da vitamina A. O acúmulo de radicais livres está implicado com a etiologia de várias doenças e lesão tecidual por estresse oxidativo, justificando a utilização dos frutos de *Capsicum* na prevenção de doenças degenerativas, cardiovasculares, catarata, Parkinson e Alzheimer, pois os antioxidantes são capazes de sequestrar radicais livres (PAULA et al., 2010).

A pungência ou ardência das pimentas deve-se a presença de alcaloides: capsaicina e a dihidrocapsaicina. Estas são encontradas principalmente nas sementes e, em menor quantidade, no pericarpo sendo que as variedades de pimentas apresentam diversos teores de capsaicinoides (ADASZEK et al., 2019). Os capsaicinoides são amplamente utilizados na indústria de alimentos e na medicina como anti-inflamatório, anticarcinogênico e no controle da dor, devido sua interação com o receptor de dor TRPV1 (REILLY et al., 2001; SINGH et

al., 2001). Estudos recentes realizados por DOSENOVIC et al. (2017) revelaram o potencial efeito anestésico tópico da capsaicina no tratamento da neuropatia diabética dolorosa, assim como foi observado para pregabalina, gabapentina, antidepressivos tricíclicos, opioides e anticonvulsivantes. Além disso, estes alcaloides apresentam potencial antimicrobiano (ZIGLIO, 2010).

1.5 Leveduras do gênero *Candida*

As leveduras são microrganismos unicelulares e eucariotos, que apresentam forma esférica ou oval, medindo 2 a 5 μm de diâmetro, por 5 a 30 μm de comprimento. Podem formar cadeias pela união de células individuais, denominadas pseudomicélio. Dividem-se por brotamento ou cissiparidade e desenvolvem colônias circulares, consistentes, opacas ou brilhantes em meio sólido (DUBOC, 1996). Algumas espécies ocorrem em superfícies de frutos frescos ou apodrecidos, enquanto outras podem aparecer em superfícies expostas da planta, e são também encontradas no solo, água, esgoto e até no trato digestivo de mamíferos (ALINE et al., 2015; LEVY, 2004).

As leveduras possuem uma parede celular bem estruturada capaz de proporcionar integridade osmótica a célula, além de determinar a morfologia celular durante os diferentes estágios do seu ciclo de vida. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a parede celular é constituída de proteínas e três diferentes cadeias polissacarídicas: uma cadeia predominante e linear de β -1,3-glucano, uma menor e altamente ramificada β -1,6-glucanos e quitina (BALADRÓN et al., 2002). Entretanto, em células de *Candida*, o glucano é o polissacarídeo mais abundante da parede (compondo de 60-65% do total de polissacarídeos) e os mananos compõem aproximadamente de 20-25%. O componente de menor quantidade é a quitina, correspondendo a 5% do total de sacarídeos presentes na parede celular (RUIZ-HERRERA et al., 1994).

A membrana das leveduras é composta por lipídeos (fosfolipídeos e lipídeos neutros) e também de proteínas, sendo o ergosterol, o principal componente lipídico da membrana celular, exercendo funções semelhantes às do colesterol em células animais e também é alvo de ação de fármacos antifúngicos (BOSSCHE; KOYMANS, 1998).

As espécies de *Candida* podem ou não apresentar patogenicidade aos humanos. Espécies pertencentes a este gênero podem produzir infecções localizadas ou sistêmicas como a candidíase, a meningite e septicemias, causadas pelo patógeno humano *C. albicans*. Existem ainda outras espécies do mesmo gênero que são consideradas facultativas como, por exemplo,

a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e a *C. glabrata* sendo essas leveduras isoladas de habitats naturais como o solo, água e de frutos (LEVY, 2004).

As espécies desse gênero correspondem ao agente etiológico mais comum de infecções fúngicas que ameaçam a vida de pacientes, os quais estão imunocomprometidos, que sofreram procedimentos clínicos invasivos ou pacientes politraumatizados que requerem estadias prolongadas em unidades de terapia intensiva. Além disso, leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela quarta causa mais comum de septicemias hospitalares e estão relacionadas com procedimentos de alta complexidade, como uso de cateteres, cuidados intensivos neonatais, cirurgia do trato gastrointestinal e transplante de fígado (ODDS et al., 2007; BROWN et al., 2012).

A ocorrência de Candidemia é pesquisado com frequência nos Estados Unidos, onde foram relatados 29 casos em 100.000 habitantes. A taxa de mortalidade é elevada e corresponde cerca de 27% a 42%, quando comparada com septicemias provocadas por vírus e bactérias. As manifestações clínicas são inespecíficas, sendo a febre o sinal mais comum. O diagnóstico é específico, realizada por meio de hemocultura, sendo positivo em aproximadamente 50% dos casos (MORGAN, 2005).

A candidemia no Brasil ocasiona aumento no tempo de internação e está relacionada com uma taxa de mortalidade de até 50% em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Estudos realizados por Bizerra et al. (2014) demonstraram que no país há uma ocorrência de resistência à classe dos medicamentos azólicos, principalmente em *C. glabrata* e *C. krusei*, enquanto que à anfotericina B é rara em toda a América Latina.

É importante ressaltar que a taxa de mortalidade provocada por leveduras do gênero *Candida* é elevada, enfatizando a importância de um diagnóstico precoce, controle adequado da infecção hospitalar e escolha da terapia antifúngica apropriada (DOI et al., 2016).

1.6 Fármacos antifúngicos

Desde a sua descoberta na década de 1950, os polienos têm sido empregados como fungicidas contra várias espécies de *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus*. São moléculas provenientes de produtos naturais, de caráter anfipático e que promovem efeitos tóxicos em membranas contendo ergosterol, formando canais de membrana que desencadeiam em vazamento de componentes citoplasmáticos, resultando em morte celular (ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017).

Apesar da sua potente atividade fungicida, a administração dos polienos representados pela anfotericina B, na parte clínica é limitada pelo hospedeiro, devido ao seu perfil de toxicidade e à estreita relação estrutural entre o ergosterol e membrana dos mamíferos, sendo a nefrotoxicidade um efeito colateral comum do tratamento da anfotericina B (HAMILL, 2013; ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2016).

Todavia, os medicamentos da classe dos azóis têm sido amplamente utilizadas como antifúngicos devido ao seu amplo espectro de atividade, perfil favorável de segurança e biodisponibilidade (ROEMER; KRYSAN, 2014). Portanto, estes bloqueiam a biossíntese do ergosterol através da inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase codificado por ERG11 em *C. albicans*. Isto resulta na depleção do ergosterol e no acúmulo de um esterol na membrana produzida por Erg3, que exerce uma tensão de membrana quando incorporada na membrana fúngica. Os medicamentos azólicos incluem cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol que se destacam principalmente pela atividade fungistática contra leveduras. Esse perfil associado ao uso extensivo na clínica como profilaxia, permite a sobrevivência de populações fúngicas resultando em resistência generalizada à classe (PAPPAS et al., 2015; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017).

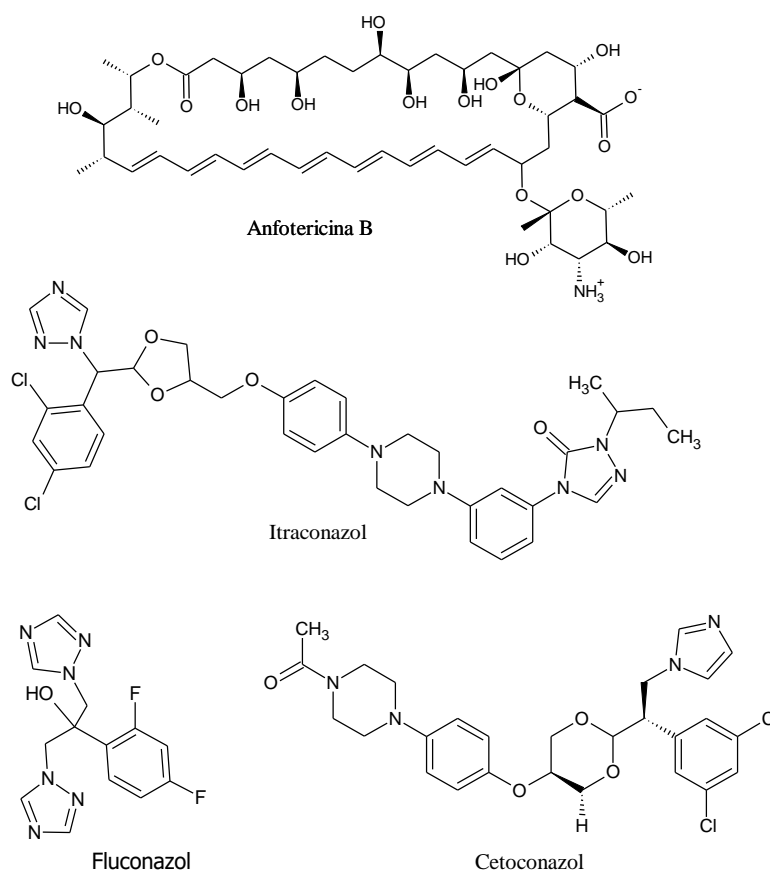


Figura 4: Representação esquemática das estruturas químicas dos fármacos antifúngicos utilizados no tratamento convencional da candidíase (Estruturas feitas no programa *ChemSketch* 2018 1.1).

1.7 Tuberculose

A tuberculose (TB) é umas das doenças mais remotas na história da Antiguidade. Estudos revelam, através de registros arqueológicos, a presença da doença entre diversos povos que através de sinais clínicos, caracterizados como a presença de deformidades tuberculosas, foi primariamente identificada em múmias egípcias (CAMPOS; PIANTA, 2001).

Atualmente a TB é a doença infecciosa com maior taxa de mortalidade mundial, estimando-se que um quarto da população mundial esteja infectada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) latente. Entretanto, apenas 10% destes indivíduos desenvolvem a patologia, sendo alguns fatores responsáveis por influenciar no aumento do número de casos de TB, destacando-se o aparecimento de cepas resistentes aos fármacos de primeira linha disponíveis, infecção ocasionada pelo vírus da imunodeficiência humana, fatores ambientais e baixa condição socioeconômica que podem induzir a imunossupressão (LYON; ROSSMAN, 2017; POETA et al., 2019).

Mtb é transmitido através da liberação de aerossol contendo partículas infecciosas, proveniente da tosse de indivíduos acometidos pela doença pulmonar ativa e posterior inalação de gotículas de aerossol contendo o bacilo por indivíduos saudáveis (SIQUEIRA, 2012).

O tratamento da Tb foi estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e baseia-se na utilização dos fármacos RIPE (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) (Figura 5) por 2 meses, seguidos por mais 4 meses de tratamento com isoniazida e rifampicina, tendo uma taxa de cura de 83% dos pacientes. Entretanto, nos casos de MDR-Tb (do inglês, *multidrug resistant-TB*), apresentando resistência a isoniazida e rifampicina descritos anteriormente e resistência adicional a qualquer medicamento de segunda linha (Figura 6), como as fluoroquinolonas por via endovenosa, a taxa de cura é muito baixa, exigindo a utilização de antimicrobianos injetáveis, de elevado custo e de uso restrito hospitalar (MOODLEY; GODEC, 2016; GUPTA; JORWAL, 2018).

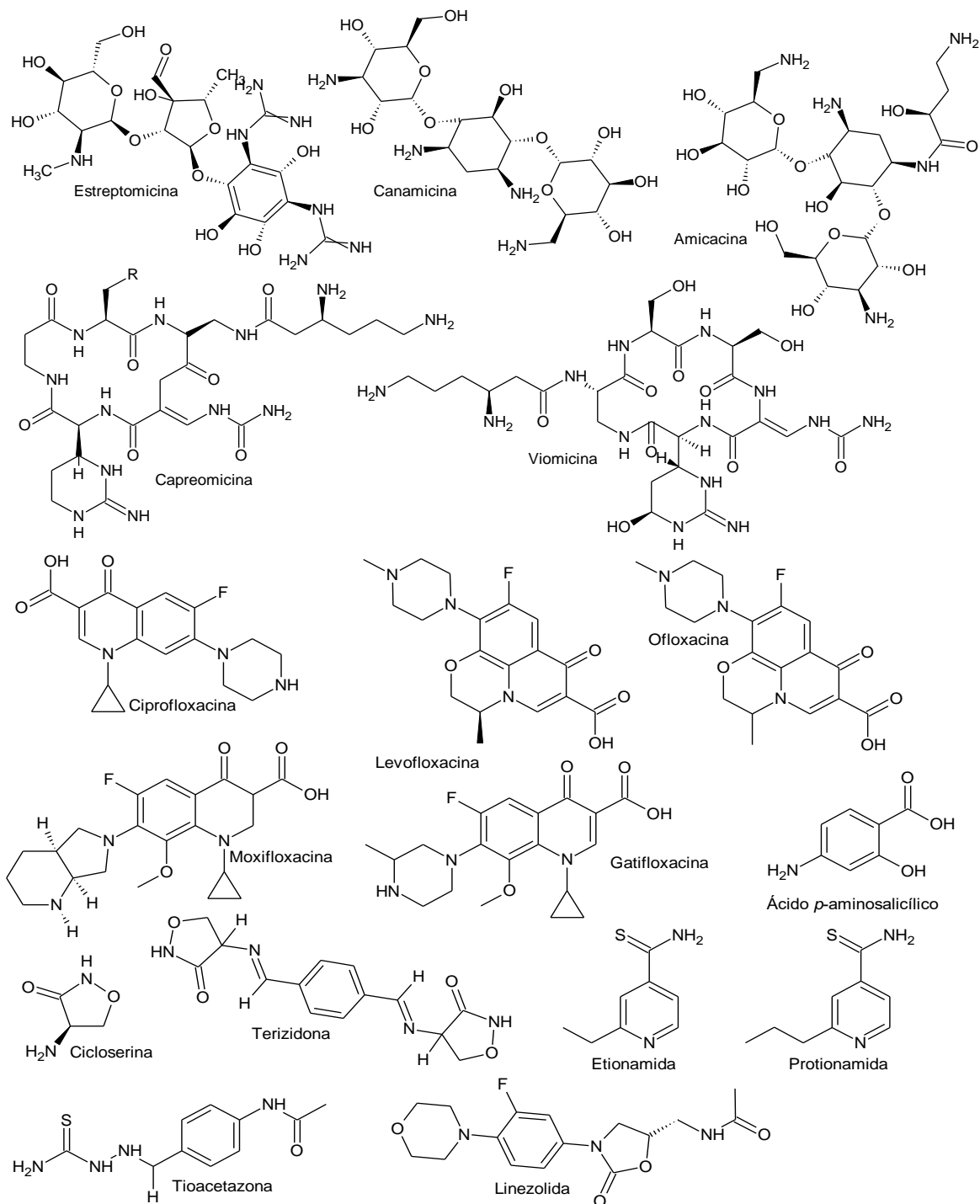


Figura 6: Representação esquemática das estruturas químicas dos fármacos utilizados como segunda e terceira linha no tratamento da Tb (Estruturas feitas no programa *ChemSketch* 2018 1.1).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar peptídeos antimicrobianos (AMPs) presentes em diferentes frações, obtidas a partir de frutos *Capsicum annuum* L., bem como sua atividade biológica e mecanismo de ação sobre leveduras do gênero *Candida*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e purificar peptídeos de frutos de plantas de *C. annuum*;
- Caracterizar bioquimicamente os peptídeos das frações obtidas de frutos *C. annuum*;
- Avaliar o perfil antifúngico das frações F2, F3 e F4 sobre *Candida albicans*, *C. tropicallis*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis*;
- Avaliar a viabilidade das células de leveduras citadas na presença das frações F2, F3 e F4;
- Avaliar o mecanismo de ação das frações F2, F3 e F4 em permeabilizar membranas e induzir estresse oxidativo em leveduras citadas;
- Verificar a toxicidade das frações F2, F3 e F4 sobre células de macrófago murino RAW 264.7 e monócito humano THP-1;
- Avaliar o perfil antimicobacteriano das frações F2 e F3 sobre cepas *Mtb* H37Rv e M229.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais Biológicos

3.1.1 Plantas de *Capsicum annuum*

As sementes de *Capsicum annuum* (pimenta) (acesso UENF 1381) foram fornecidas pela Prof^a. Dr^a. Rosana Rodrigues do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Inicialmente as sementes foram cultivadas em câmara de crescimento a 28 °C e 80% de umidade relativa com fotoperíodo de 16 h para o dia e 8 h para a noite. Os plantios das sementes foram realizados em bandejas de isopor de 72 células com substrato comercial Vivatto adubado com formulação nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), que fornece 4% de nitrogênio, 14% de fósforo e 8% de potássio, sendo irrigadas uma vez ao dia. Posteriormente foram transplantadas para casa de vegetação e cultivadas sob a mesma forma de fonte de nutrientes à temperatura ambiente.

3.1.2 Microrganismos

As espécies de leveduras, isoladas do ambiente, como *Candida albicans* (CE022), *Candida tropicalis* (CE017) e *Candida parapsilosis* (CE002), foram cultivadas e conservadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. As leveduras de *Candida buinensis* (3982) foram obtidas da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. As leveduras do gênero *Candida* foram mantidas em ágar Sabouraud (Merck) e conservadas no LFBM.

A cepa laboratorial de referência *M. tuberculosis* (*Mtb*) H37Rv foi obtida comercialmente da *American Type Culture Collection* (27294), enquanto a cepa da família Beijing, *Mtb* M299, proveniente de um isolado clínico de pacientes com TB em Moçambique foi cedida pelo Dr. Philip Suffys (Instituto Oswaldo Cruz/RJ). Ambas as cepas foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9 (DIFCO, Detroit, MI), suplementado com 0,05% Tween 80 e 10% de ADC (albumina, dextrose, catalase, Difco Laboratories) durante 7 dias até metade da fase logarítmica, em estufa bacteriológica à 37 °C e 5% de CO₂. O

monitoramento do crescimento micobacteriano foi efetuado através da medida de densidade óptica (D.O. 600 nm), por espectrofotometria (Biochrom, modelo Libra S6). As alíquotas de 1 mL (10^7 a 10^8 bactérias) foram retiradas para estoque e mantidas em acondicionamento à -70°C , no Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR), do CBB da UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Toda a manipulação e cultivo das cepas de *Mtb* obedeceram às normas de laboratório de biossegurança de nível III.

3.1.3 Células de mamíferos

Macrófago murino RAW 264.7 (ATCC, Manassas, VA, EUA) e monócito humano THP-1 (ATCC, Manassas, VA, EUA) foram cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-F12) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) em 5% de CO_2 à 37°C .

3.2 Extração e purificação de proteínas dos frutos de *Capsicum annuum*

3.2.1 Extração proteica dos frutos

A extração proteica dos frutos foi realizada, de acordo com a metodologia descrita por TAVEIRA et al. (2014). O pericarpo maduro, após 21 dias de maturação, correspondendo a 40 g do peso fresco foram triturados em um multiprocessador de alimentos (Mix 3x1, Philips) combinado a 200 mL de tampão fosfato (10 mM Na_2HPO_4 ; 15 mM NaH_2PO_4 ; 0,1 M KCl; 1,5% EDTA e pH 5,4) até a completa homogeneização. Em seguida, essa homogeneização foi submetida à agitação constante por 2 h a 4°C . O homogenato obtido foi submetido a uma centrifugação ($15.400 \times g$ por 45 min a 4°C), o precipitado insolúvel foi descartado e, ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 0-70 % de saturação. O material obtido foi mantido por 16 h a 4°C . Posteriormente, foi centrifugado a $15.400 \times g$ por 45 min a 4°C , sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em água destilada e aquecido a 80°C por 15 min. Após esta última etapa, foi novamente submetido a uma centrifugação a $10.000 \times g$ por 10 min a 4°C , na qual o precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido, dialisado contra água destilada (tubo de diálise benzoilado, Sigma) por 3 dias com 3 trocas diárias e liofilizado (K105, Liotop). Este extrato fracionado foi chamado de F/0-70 e submetido à cromatografia de fase reversa em HPLC (coluna C_2C_{18}).

3.2.2 Cromatografia de Fase Reversa em HPLC para obtenção das Frações F2, F3 e F4

Os peptídeos extraídos de frutos de *C. annuum* foram purificados através de cromatografia de fase reversa em HPLC (Promenence, Shimadzu) utilizando uma coluna C₂C₁₈ (μRPC C₂C₁₈, GE-Healthcare) acoplada a uma coluna guarda C₈ (Pelliguard, 20 x 4,6 mm, Sigma), equilibrada com a Solução A (0,1% de TFA, do inglês *trifluoroacetic acid*), na qual foram aplicados 400 μg da fração F/0-70 solubilizada em 400 μL da solução A, após ter sido filtrado em filtro de 0,2 μm (Millex-GV, Millipore) segundo metodologia descrita por Taveira et al. (2014) com modificações.

A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, numa temperatura de 38 °C, na qual a eluição das amostras foi efetuada em gradiente de propanol 100 % em 0,1 % de TFA (Solução B) do seguinte modo: 0% da solução B por 15 min, de 0 a 40% da solução B por 57 min, de 40 a 50% da solução B por 1 min, 50% da da solução B por 1 min, 0% da solução B por 10 min.

A coluna foi lavada com TFA 0,1 % e água ultrapura (solução A) e em seguida um gradiente linear foi formado pela adição da solução B. A eluição das proteínas na coluna foi acompanhada por absorbâncias lidas a 220 nm em um detector de arranjo de diodo.

3.2.3 Quantificação de Proteínas

As proteínas foram determinadas quantitativamente pelo método do ácido bicinonínico, segundo SMITH et al. (1985), sendo a ovalbumina (Sigma) utilizada como padrão.

3.2.4 Eletroforese em Gel de Tricina na Presença de SDS

O processo de purificação foi monitorado por eletroforese em gel de tricina-SDS, usando placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 mm, segundo o método descrito por SCHAGGER; VON JAGOW (1987).

O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4 % de acrilamida/bis-acrilamida e o gel de concentração numa concentração de 3,9 %. Estes foram montados no Mini Protean Tetra System (Biorad).

3.2.5 Preparo da amostra e condição de corrida eletroforética

As amostras contendo as proteínas de interesse após cromatografia de fase reversa em HPLC C₂C₁₈ foram concentradas por liofilização, ressuspensas em tampão de amostra (0,125

M de Tris, 2,5 % de SDS, 0,25 % de azul de bromofenol; 5 % de β - mercaptoetanol e 15 % de sacarose), aquecidos por 5 min a 100 °C e posteriormente centrifugados a 16,000 x g por 2 min, a temperatura ambiente. Em seguida, 20 μ L de cada amostra foram aplicados ao gel de concentração. A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 24 V por um período de aproximadamente de 16 horas, utilizando na corrida o tampão catodo (Tricina 0,1M; Tris-HCl 0,1M pH 8,31; SDS 0,1 %) e tampão anodo (Tris-HCl 0,2M pH 8,9; SDS 0,2 %).

Para estimar a massa molecular dos peptídeos foram usados os marcadores de baixa massa molecular composto das seguintes massas moleculares de proteínas em Da (16.950, 14.440, 10.600, 8.160, 6.210, 3.480, 2.510) (MW-SDS-17S, Sigma) e (26.600, 17.000, 14.200, 6.500, 3.496, 1.060) (*Ultra low Ranger Molecular Weight Marker*, Sigma).

3.2.6 Coloração com Coomassie Blue e descoloração do gel

Após a finalização da corrida eletroforética, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado numa solução corante (0,025 % de Coomassie Blue G, 10 % de ácido acético em água destilada) em agitação constante por aproximadamente 1 h. Depois de corado, o gel foi transferido para uma solução descorante (10 % de ácido acético em água destilada). O mesmo foi mantido nesta última solução até a visualização das bandas proteicas e em seguida armazenado em água destilada.

As imagens dos géis foram digitalizadas em um fotodocumentador LAS 500 (GE Healthcare).

3.2.7 Determinação da sequência de aminoácidos

Para o sequenciamento dos peptídeos presentes em frutos de *Capsicum annuum*, as bandas de interesse foram extraídas e digeridas do gel, sendo submetidas à metodologia de espectrometria de massas. Os peptídeos digeridos foram primeiramente co-cristalizados em solução superconcentrada de uma matriz molar contendo ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e subsequentemente analisados por espectrômetro, modelo (AB SCIEX TOF/ TOFTM 5800 System), utilizando analisadores de massa de tempo de voo com *reflectron*.

A calibração externa no modo MS foi realizada usando uma mistura de quatro peptídeos: des-Arg1-Bradicinina ($m/z= 904,47$), angiotensina I ($m/z= 1296,69$), Glu1-fibrinopeptídeo B ($m/z= 1570,68$) e ACTH (18-39) ($m/z= 2465,20$). Os espectros MS/MS foram calibrados externamente utilizando íons de fragmentos conhecidos observados no espectro MS/MS de Glu1-fibrinopéptido B. A pesquisa de bases de dados MS/MS foi realizada contra as bases de dados NCBIprot utilizando o *software* Mascot

(www.matrixscience.com). A pesquisa de parâmetros incluiu duas clivagens tríplicas perdidas permitidas e modificações não fixas de metionina (oxidação) e cisteína fixa (carbamidometilação). Os peptídeos MS/MS com base nas identificações de proteínas foram validados no *software Scaffold 4* (Proteome Software Inc., Portland, OR), sendo as identificações aceitas se pudessem ser estabelecidas com uma probabilidade superior a 95%, conforme especificado pelo algoritmo *Peptide Prophet*. As probabilidades de proteína foram atribuídas pelo algoritmo *Protein Prophet*, de acordo com NESVIZHSHKII et al. (2003). As pesquisas por sequência similares foram realizadas usando o programa BLAST. Os fragmentos obtidos tiveram a sequência obtida do banco de dados *Swiss-Prot* e foram alinhadas usando o programa *Clustal Omega* (SIEVERS et al., 2014).

3.3 Análise da atividade antifúngica

3.3.1 Ensaio de inibição do crescimento das células de leveduras

Alíquotas das espécies de leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis* foram retiradas de uma placa de Petri (possuindo colônias crescidas) e semeadas em novas placas, contendo ágar Sabouraud (1% peptona, 2% glicose, 2% ágar) (Merck), realizando-se estriações sobre o meio para a obtenção de um crescimento celular homogêneo. A nova placa foi incubada na estufa a 30°C por 24 h e posteriormente foi utilizada para obtenção das células utilizadas no ensaio.

Com o auxílio de uma alça de semeadura, uma alíquota celular foi retirada da placa de Petri e adicionada a 10 mL de meio líquido caldo Sabouraud (1% peptona, 2% glicose) (Merck) para que se pudesse realizar a quantificação das mesmas numa câmara de Neubauer (LaborOptik), à partir de uma alíquota de 10 µL, com auxílio de um microscópio óptico (Axioplan ImageA2).

As células das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. buinensis* e *C. parapsilosis* (1×10^4 cel.mL⁻¹) foram incubadas em caldo Sabouraud contendo 100 µg.mL⁻¹ das frações F2, F3 e F4, sendo o volume final ajustado para 200 µL. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços) (Nunc) a 30 °C, totalizando um período de 24 h.

O acompanhamento de crescimento celular foi determinado pela densidade óptica em 24 h, em um leitor de microplacas (EZ Read 400 Research/Biochrom), num comprimento de onda de 620 nm. Todo ensaio foi realizado em triplicata e sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada descrita por BROEKAERT et al. (1990).

3.3.2 Análise da viabilidade celular em leveduras

Para analisar o efeito das frações F2, F3 e F4 sobre a viabilidade celular de leveduras do gênero *Candida*, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 3.3.1. As células controle (na ausência do tratamento com as frações isoladas) foram lavadas e diluídas 1.000 vezes em meio Sabouraud (1% peptona, 2% glicose) (Merck). Uma alíquota de 100 μL da diluição foi espalhada com uma alça de Drigalski sobre a superfície de uma placa de Petri, contendo agar Sabouraud (1% peptona, 2% glicose, 2% ágar) (Merck) e cultivadas a 30 °C, durante 48 h. No final deste período, as unidades formadoras de colônia (CFU, do inglês *colony forming unit*) foram determinadas para cada espécie, e as placas de Petri foram fotografadas, de acordo com a metodologia de (VERMELHO et al., 2006). Esse procedimento foi repetido com leveduras tratadas com as frações isoladas contendo 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e realizado em triplicata.

3.3.3 Efeito das frações F2, F3 e F4 sobre a permeabilização de membranas de leveduras

A análise da capacidade de permeabilização da membrana das células de leveduras tratadas com as frações isoladas foi avaliada através da utilização do corante fluorescente Sytox green, de acordo com a metodologia proposta por (THEVISSSEN; TERRAS; BROEKAERT, 1999). Este ensaio foi repetido conforme descrito no item 3.3.1. Após as 24 h de incubação com as frações separadamente, alíquotas de 96 μL foram incubadas, ao abrigo da luz e sob agitação constante de 500 rpm por 15 min, com o corante fluorescente Sytox green a uma concentração final de 0,2 μM , de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. As células do controle foram somente incubadas com o corante Sytox green, nas mesmas condições. Posteriormente, as células foram analisadas em microscópio óptico (Axioplan A2, Zeiss), acoplado a uma câmera AxioCAM MRc5 (Zeiss) e as imagens analisadas pelo software Axiovision, versão 4.0 (Zeiss). O microscópio é equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450- 490 nm e emissão de 500 nm).

3.3.4 Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio intracelular

Para avaliar se o mecanismo de ação das frações isoladas envolveu a indução de estresse oxidativo, o experimento foi realizado como descrito no item 3.3.1., com algumas modificações: a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H_2DFCDA) foi utilizada para medir espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) intracelular, segundo metodologia descrita por MELLO et al. (2011). Esta sonda foi utilizada

à 20 μM , incubada com as células das leveduras ao abrigo da luz, por 2 h à temperatura ambiente e com agitação constante de 500 rpm. Em seguida, as células foram analisadas no microscópio óptico equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450-490 nm e emissão de 500 nm). Este corante entra passivamente nas células, sendo desacetilado por esterases intracelulares e quando for oxidado por ROS, tornar-se-á fluorescente.

3.4 Avaliação da atividade antimicobacteriana

Durante a fase logarítmica de crescimento das cepas de *Mtb* H37Rv e M299, 50 μL da suspensão de cada cepa foram separadamente plaqueados em placa de 96 poços (1×10^7 CFU/mL) e acrescidos das frações F2, F3 e F4 nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as cepas de *Mtb*. A placa foi então incubada a 37 °C por 5 dias. Após este período, foram adicionados 10 μL /poço de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT, do inglês *methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*) e 3 h depois, 100 μL de tampão de lise (20% (p/v) de SDS, 50% (v/v) de dimetilformamida (DMF, do inglês *dimethylformamide*, Sigma-Aldrich) (MOODLEY et al., 2014). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm (CAVIDES et al., 2002). Como controle positivo de crescimento foi utilizado meio de cultura 7H9 suplementado e acrescido de bactérias e não tratado e como controle negativo, somente meio de cultura suplementado. A capacidade das células em reduzir o sal MTT em cristal de formazan pela atividade da desidrogenase é utilizada como um indicador da viabilidade celular.

3.5 Efeito das Frações na Viabilidade de Macrófagos e Monócitos

Para os ensaios, as células RAW 264.7 e THP-1 foram semeadas em placas de 96 poços (1×10^5 células. mL^{-1}) e incubadas durante 24 h à 37 °C em meio DMEM-F12. Após este procedimento, as culturas de células foram incubadas na presença ou ausência das frações F2, F3 e F4 (12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 24 h à 37 °C.

Os efeitos das frações nos macrófagos RAW 264.7 e na viabilidade dos monócitos THP-1 foram determinados utilizando o ensaio MTT como descrito no item 3.4, sem a necessidade da etapa da lise (tampão de lise). Após 24 h de incubação com frações, ambas as culturas celulares foram adicionadas com solução a 10% v/v de MTT (5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 2 h a 37 °C.

Posteriormente, o sobrenadante de células tratadas com RAW 264.7 foi removido e os cristais de formazan gerados foram dissolvidos com 100 μL de isopropanol acidificado. Para a

dissolução do cristal de formazan das células THP-1 (não aderente) tratadas, a placa de 96 poços foi submetida a centrifugação a 400 g durante 5 min à 18°C para remoção do sobrenadante e posterior diluição dos cristais como descrito acima. A absorbância foi lida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas (MOSMANN, 1983). A citotoxicidade foi calculada subtraindo a razão do valor médio de absorbância para células tratadas, do valor médio de absorbância para células não tratadas. Utilizaram-se células tratadas com detergente Triton X-100 como 100% de citotoxicidade (controle positivo).

3.6 Análise estatísticas

Os dados foram mostrados como média \pm erro padrão e foram relatados e avaliados por análise de variância e pela One-Way ANOVA seguida por Teste de Tukey, sendo considerado significativo $p < 0,05$. Para calcular o IC₅₀ e MIC₅₀ das amostras testadas foram utilizados os resultados das curvas de concentração-resposta para cada atividade por regressão não-linear e as estatísticas calculadas para estes valores foram avaliadas por análise de variância One-Way ANOVA seguido por Teste de Tukey, sendo considerado significativo $p < 0,05$. Softwares utilizados: Microsoft Office Excel 365 e *GraphPad Prism* (versão 5.0 para Windows).

4. RESULTADOS

4.1 Perfil eletroforético do extrato bruto dos frutos *C. annuum*

O perfil eletroforético da fração proteica obtida dos frutos de *C. annuum* após saturação com sulfato de amônio é mostrado na figura 7, denominando-se de F/0-70. Na raia F/0-70 foi possível observar a presença de uma banda proteica majoritária entre 6 e 8 kDa e outras três bandas com menos intensidade entre 8,1 e 14,2 kDa.

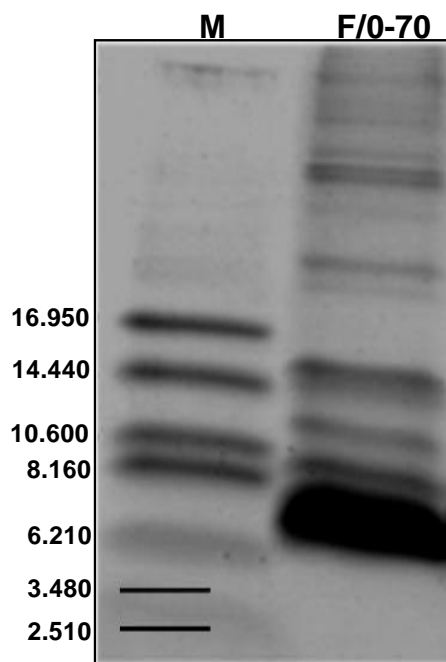


Figura 7: Visualização eletroforética da fração F/0-70 obtida de frutos maduros de *Capsicum annuum* em gel de tricina, na presença de SDS e β -mercaptoetanol, (M) marcador de massa molecular (Da), (F/0-70) fração obtida após fracionamento com sulfato de amônio (0-70% saturação) do extrato proteico de frutos de *C. annuum*.

4.2 Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético de frações obtidas

Após a obtenção da fração F/0-70 enriquecida em peptídeos, esta foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna $C_{2}C_{18}$ em sistema de HPLC, onde foram separadas em seis frações denominadas F1, F2, F3, F4, F5, F6 (Figura 8) e duas frações contendo dois picos não retidos. O perfil eletroforético destas frações está representado na figura 8B, onde se observou que F1 apresentou uma única banda de aproximadamente 5 kDa, F2 duas bandas proteicas de aproximadamente 5 e 6 kDa, F3 três bandas, sendo duas destas em torno de 5 kDa e uma de 6 kDa. A fração F4 apresentou aproximadamente três bandas, contendo 5 kDa,

6 kDa e 14 kDa respectivamente. Já a fração F5 observou-se a presença de bandas aproximadas entre 5 kDa a 14 kDa. A fração F6 apresentou três bandas proteicas, uma com aproximadamente 5 kDa e outras duas com 6 kDa e 26 kDa respectivamente.

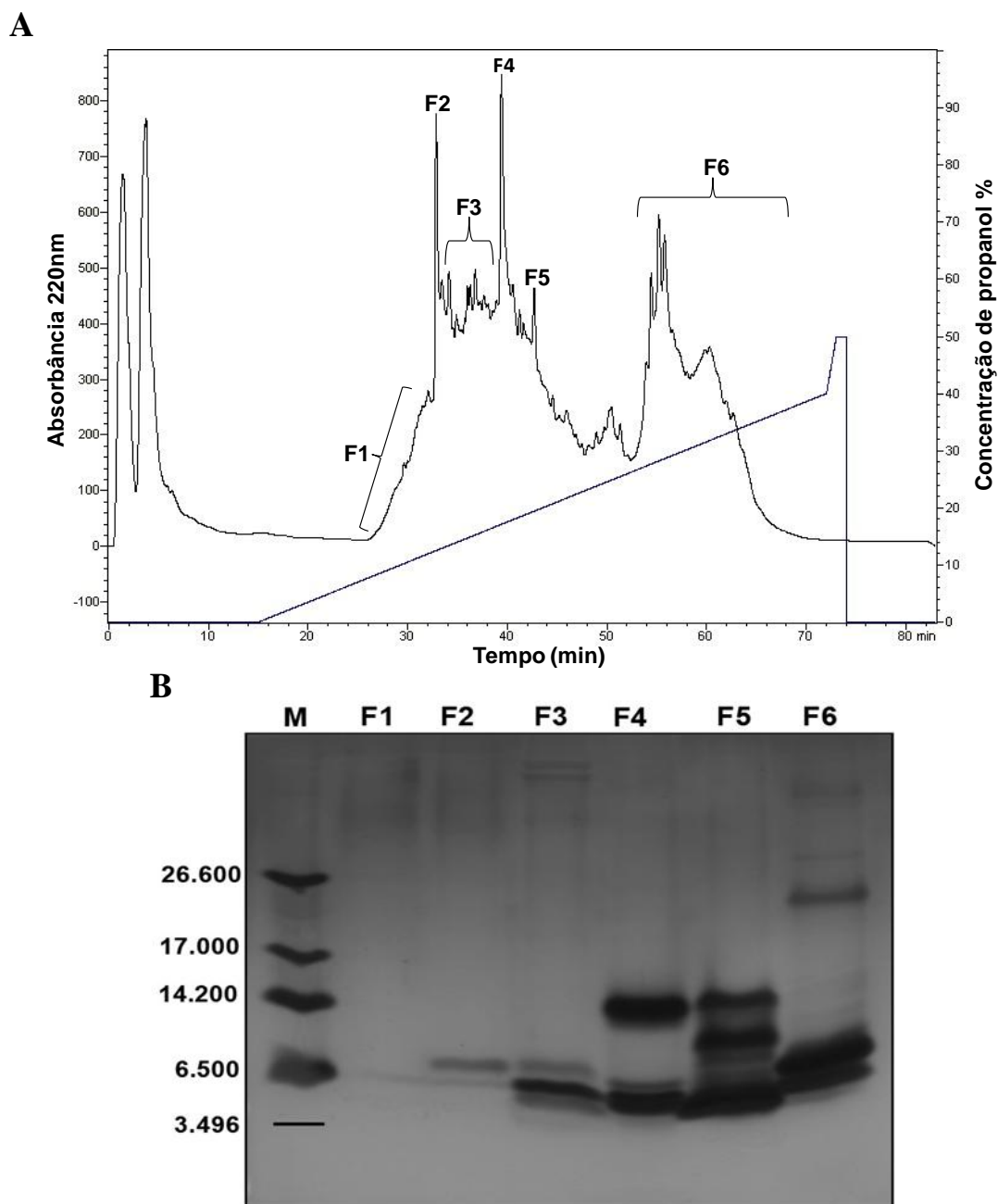


Figura 8: (A) Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em coluna C_2C_{18} da fração F/0-70. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida realizada com 0,1% de TFA (Solvente A) e a amostra eluída usando um gradiente de propanol. O fluxo utilizado foi de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. F1 a F6 são referentes a picos retidos na coluna e eluídos em gradiente de propanol. (B): Visualização eletroforética por gel de tricina, na presença de SDS, das frações F1 a F6 tratadas com β -mercaptoetanol, obtida através do fracionamento da fração F/0-70, de *C. annuum* por cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna C_2C_{18} . (M) marcador de massa molecular (Da).

4.3 Identificação de resíduos de aminoácidos das frações F2 e F3 por espectrometria de massas

Devido à elevada atividade antimicrobiana apresentada pelas frações F2 e F3 (Figura 10), os peptídeos majoritários contidos nessas frações, como as bandas de 5 kDa e 6 kDa, foram submetidos à espectrometria de massas.

A banda correspondente a aproximadamente 5 kDa da fração F2 teve dois fragmentos de sequência obtidos, um de 17 e outro de 23 resíduos de aminoácidos, identificados (Figura 9A). Através da análise em bancos de dados esses resíduos mostraram similaridade com peptídeos pertencentes a família das defensinas de plantas, sendo então denominado *Capsicum annuum defensin 2.1* (CaDef 2.1), a análise revelou uma similaridade 85%, 72%, 70% e 56% com defensinas de *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum annuum* e *Medicago truncatula* (MtDef4.5), respectivamente.

Os 34 resíduos de aminoácidos deduzidos das bandas de aproximadamente 6 kDa das frações F2 e F3 (Figura 9B) foram comparadas com o banco de dados Protein, mostrando similaridade com a estrutura primária de AMPs de plantas pertencentes às defensina e, por isso, foram denominadas de CaDef 2.2. A análise revelou 69%, 67%, 67% e 45% de similaridade com defensinas de *Capsicum baccatum*; *Capsicum chinense*; *Capsicum annuum* e *Nicotiana glauca* (NaD1), respectivamente.

	1	10	20	30	40	I%	P%
CaDef 2.1	ICEALSGNFKGLCLSSR-----REGFTDGSCIGFRLQCFCTKPCA					-	-
<i>Capsicum frutescens</i>	ICEALSGNFKGLCLSSR NCGKVCR REGFTDGSCIGFRLQCFCTKPCA					85	85
<i>Capsicum chinense</i>	ICEALSGNFKGLCLSSR DGCVCR REGFTSGVCRGFPLKCFCKPCA					72	74
<i>Capsicum annuum</i>	ICEALSGNFKGLCLSSR DGCVCR REGFTSGVCRGFPLKCFCKPGA					70	72
<i>Medicago truncatula</i>	-CLSQSH FKGLCLSD QNCATVCL TEGFTDGR CR GFRQRCFC SKPC-					56	66
	1	10	20	30	40	I%	P%
CaDef 2.2	-----SKYFTGLCWTDSSCRKVCIEKDKFQDGHCSKIQR-----					-	-
<i>Capsicum baccatum</i>	QNICKTK SKYFTGLCWTDSSCRKVCIEKDKFQDGHCSKIQR NCLCTKIC					69	69
<i>Capsicum chinense</i>	QNICKTK SKYFTGLCWTDSSCRKVCIEKDKFQDGHCSK LQRNCLCTKIC					67	65
<i>Capsicum annuum</i>	QNICKTK SKYFTGLCWADSSCRKVCIEKDKFQDGHCSK LQRNCLCTKIC					67	65
<i>Nicotiana glauca</i>	-RECKTESNT FPGICITKPPCRKACIS - EKF TDGHCSKILRRCLCTKPC					45	42

Figura 9: (A) Alinhamento dos dois fragmentos de sequência obtidos, sendo um de 17 e outro de 23 resíduos de aminoácidos, através do peptídeo de 5 kDa da fração F2 com as seguintes sequências de peptídeos similares às defensinas das seguintes espécies: *Capsicum frutescens* (gi:2224319006|ACM50880.1); *Capsicum chinense* (gi:159793522|ABW99097.1); *Capsicum annuum* (gi:1200228|CAA65045.1); *Medicago truncatula* (MtDef4.5) (gi:355523354|AET03808.1). (B) Alinhamento dos 34 resíduos de aminoácidos obtidos dos peptídeos de 6 kDa da fração F2 e fração F3 com as seguintes sequências de peptídeos similares às defensinas das seguintes espécies: *Nicotiana glauca* (NaD1) (ID: Q8GTM0); *Capsicum annuum* (ID: XP016579688.1); *Capsicum chinense* (ID: PHU10972.1); *Capsicum baccatum* (ID: PHT42128.1). I% indica a porcentagem de resíduos e aminoácidos idênticos destacados em negrito (incluindo os resíduos de Cys). P% indica a porcentagem de resíduos de aminoácidos positivos (que apresentam as mesmas características físico-químicas) marcados em cinza. Espaços (-) foram introduzidos para um melhor alinhamento. Os números acima da sequência indicam o tamanho dos peptídeos em resíduos de aminoácidos. Os números que flanqueiam os peptídeos indicam a posição dos resíduos de aminoácidos em relação à sequência dos peptídeos maduros. As sequências mostradas foram obtidas do SWISS-PROT e alinhadas usando o Clustal Omega.

4.4 Ensaio de inibição do crescimento das células de leveduras

Após a cromatografia de fase reversa em HPLC da F/0-70, obtida a partir de frutos *C. annuum*, apenas as frações de interesse (F2, F3 e F4) foram selecionadas e utilizadas para a realização dos ensaios biológicos.

Os resultados apresentados na Figura 10 mostraram uma maior atividade inibitória das frações F2, F3 e F4 contra o crescimento da levedura *C. buinensis*, exibindo 87,5%, 99,6% e 88,4% de inibição de crescimento, respectivamente.

Quando avaliadas contra as células de *C. albicans* as frações F2 e F3, foram capazes de causar uma redução no crescimento desta levedura, inibindo 75,8% e 89,5% respectivamente. No entanto, a fração F4 não foi capaz de inibir significativamente *C. albicans*.

As frações F2, F3 e F4 reduziram o crescimento das células de *C. tropicalis* em 94,5%, 90,3% e 58,4%, respectivamente. Observamos ainda que apenas a fração F2 foi capaz de inibir 51,7% do crescimento da levedura *C. parapsilosis*, enquanto as frações F3 e F4 não inibiram significativamente o crescimento dessa levedura na concentração utilizada. Com este resultado, observamos que a fração F2, quando comparada ao controle e com as outras frações testadas, foi a mais promissora na capacidade de inibir significativamente ($p < 0,05$) o crescimento de todas as leveduras na concentração utilizada.

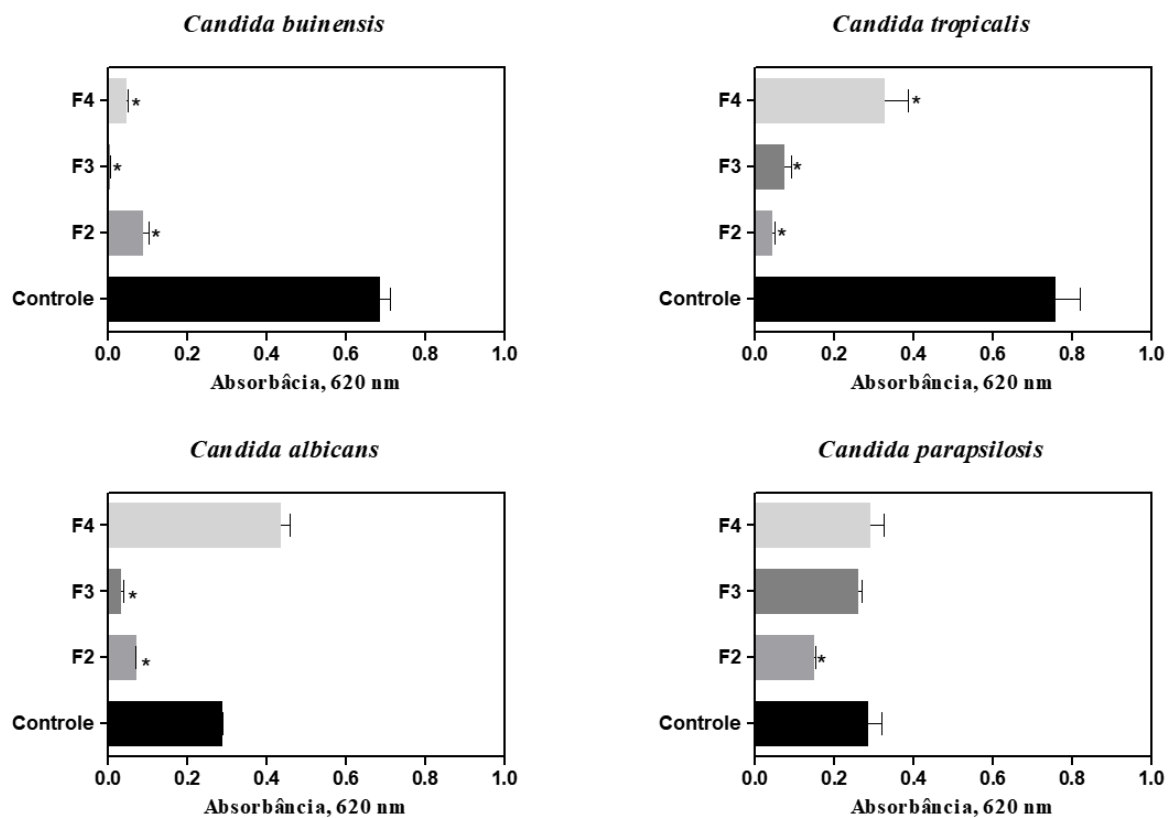


Figura 10: Visualização gráfica do efeito das frações F2, F3 e F4 no crescimento das leveduras *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*. As células de levedura foram tratadas na presença de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada fração ou ausência (controle). Os experimentos foram realizados em triplicata. (*) Indica significância pelo teste One-way ANOVA de Tukey ($P < 0,05$), calculado utilizando os valores de absorbância do experimento e seu respectivo controle.

4.5 Ensaio de viabilidade celular em leveduras de importância médica

Os resultados obtidos pelo ensaio de viabilidade demonstraram que as frações F2, F3 e F4 induziram perda de viabilidade em todas as células de levedura testadas (Figura 11). As espécies do gênero *Candida* mais suscetíveis a estas frações foram *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis*. A fração F2 induziu perda de viabilidade de 73,6%, 96,1% e 95,55%, respectivamente, enquanto que a fração F3 diminuiu o número de células viáveis em 100%, 100% e 97%, respectivamente. A fração F4 também foi capaz de induzir a perda de viabilidade celular em 99,3%, 29,8% e 91,5%, respectivamente. Esses resultados indicaram que o efeito inibitório dessas frações foi fungicida.

A	Controle	Fração F2	Fração F3	Fração F4	B		
					Amostras	CFU	Perda de Viabilidade Celular (%)
<i>C. buinensis</i>					Controle	1079.66±14.15	0%
					F2	26.33±9.23	73.67%
					F3	0	100%
					F4	0.66±1.15	99.34%
<i>C. tropicalis</i>					Controle	146.30±17.09	0%
					F2	0.66±1.15	95,55%
					F3	4.33±2.88	97,04%
					F4	12.33±4.5	91,57%
<i>C. albicans</i>					Controle	367.66±26.08	0%
					F2	14±2.64	96.19%
					F3	0	100%
					F4	258±33.60	29.70%
<i>C. parapsilosis</i>					Controle	322.66±4.62	0%
					F2	149.66±17.62	53,62%
					F3	198± 6.08	38,64%
					F4	241±6.11	25,30%

Figura 11: (A) Imagens das placas de Petri mostrando a viabilidade celular das leveduras após 24 h de tratamento com as frações F2, F3 e F4 (100 µg.mL⁻¹). (B): Tabela mostrando a porcentagem de perda de viabilidade celular em leveduras após 24 h de tratamento com F2, F3 e F4 (100 µg.mL⁻¹). CFU = unidade formadora de colônia (do inglês, *colony forming unit*). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 Efeito das frações F2, F3 e F4 na permeabilização de membranas de leveduras

O efeito antifúngico das frações foi caracterizado em relação ao seu mecanismo de ação, após 24 h de ensaio de inibição do crescimento. As células da levedura *C. buinensis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Figuras 12-15) foram utilizadas para avaliar a capacidade de permeabilização da membrana, através da incubação com a sonda Sytox Green, (das frações F2, F3 e F4 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Foi possível detectar que a grande maioria das células de *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis* apresentou maior emissão de sinal fluorescente quando tratadas com as frações F2, F3 e F4, sugerindo que estas foram capazes de permeabilizar a membrana dessas espécies de *Candida*, quando comparadas com as imagens de leveduras na ausência destas frações, onde nenhuma marcação foi observada.

Este ensaio mostrou que os peptídeos presentes nestas frações, poderiam atuar comprometendo a estrutura da membrana plasmática, possibilitando que a mesma seja permeável o suficiente para a entrada da sonda no citoplasma das células ligando-se aos ácidos nucleicos e assim emitir um sinal fluorescente, com exceção de *C. parapsilosis*, onde nenhuma fluorescência foi observada, sugerindo que a membrana desta cepa se encontrava íntegra. Observamos também que, após o tratamento com as frações F2, F3 e F4, o crescimento das leveduras também apresentou alterações morfológicas (células menos desenvolvidas, citoplasma condensado e com dificuldades de liberação do brotamento), as quais não foram observadas nos controles na microscopia de campo claro.

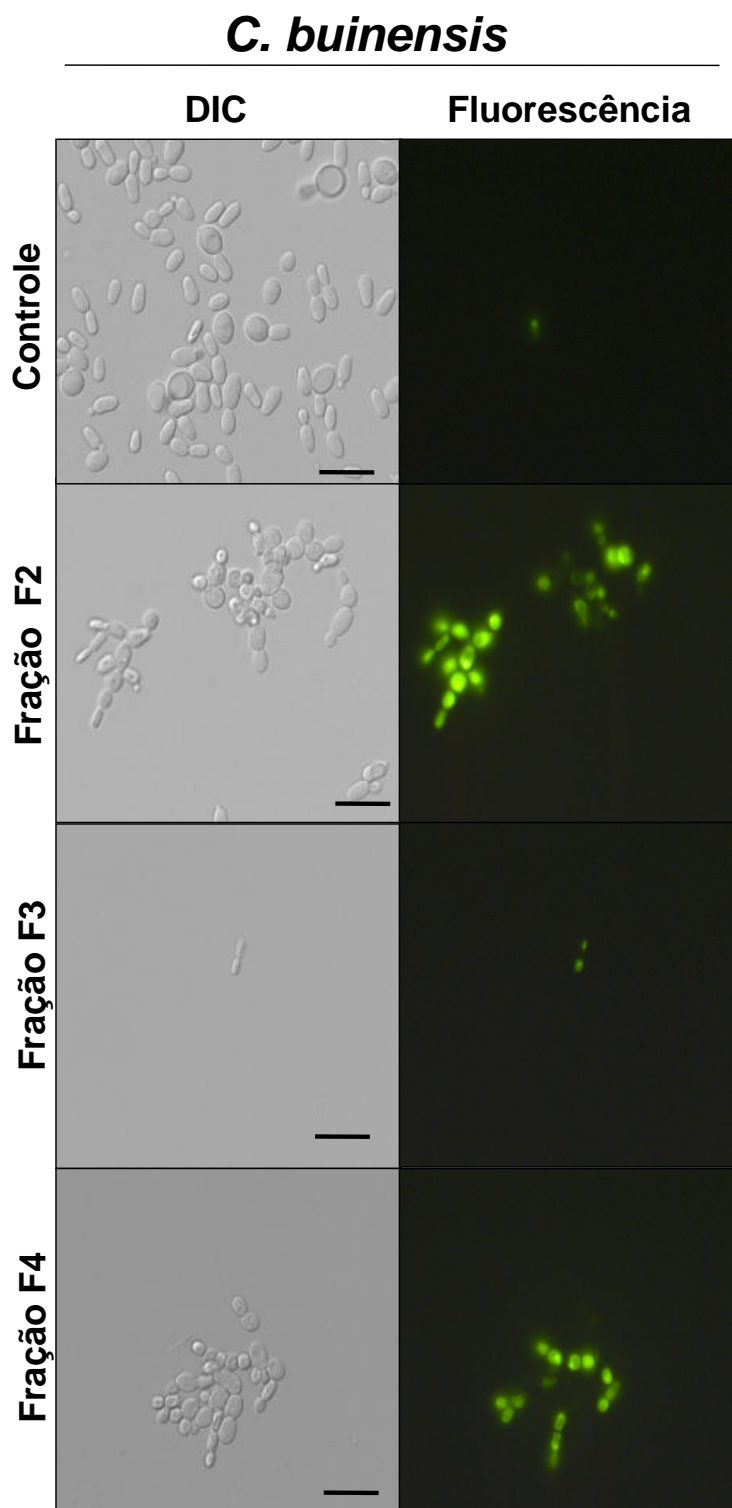


Figura 12: Imagens de microscopia de fluorescência das células de *C. buinensis* incubadas com a sonda Sytox Green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $20 \mu\text{m}$.

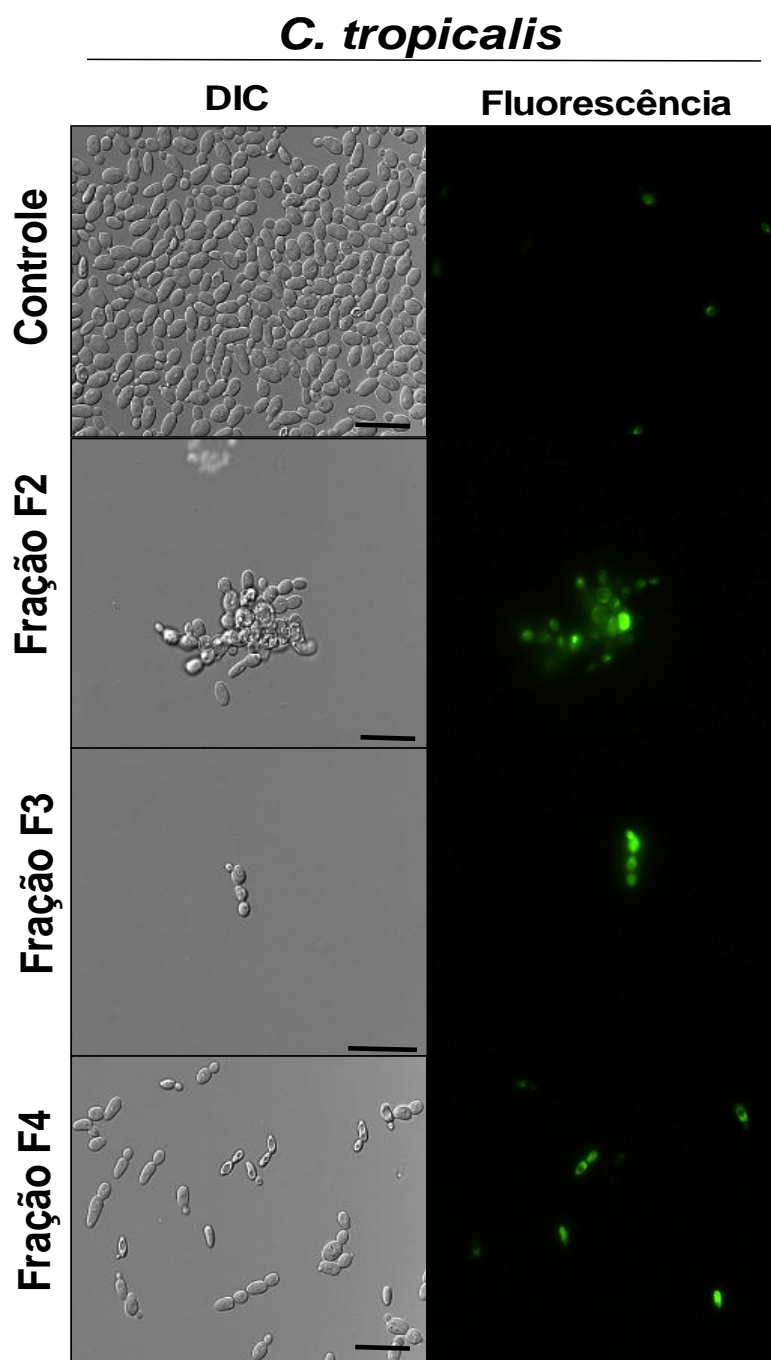


Figura 13: Imagens de microscopia de fluorescência de células de *C. tropicalis* incubadas com a sonda Sytox Green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $20 \mu\text{m}$.

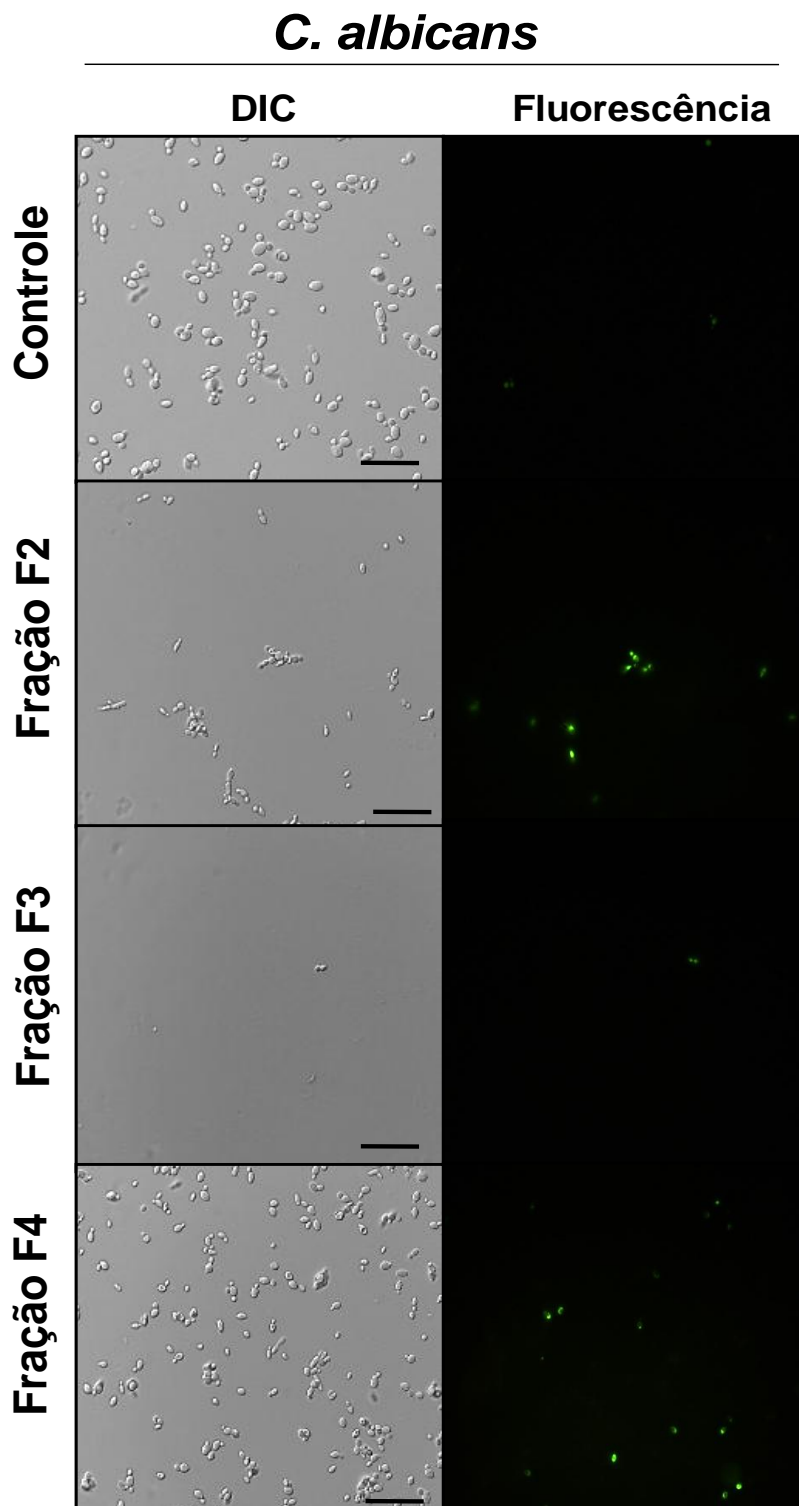


Figura 14: Imagens de microscopia de fluorescência de células de *C. albicans* incubadas com a sonda Sytox Green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $20 \mu\text{m}$.

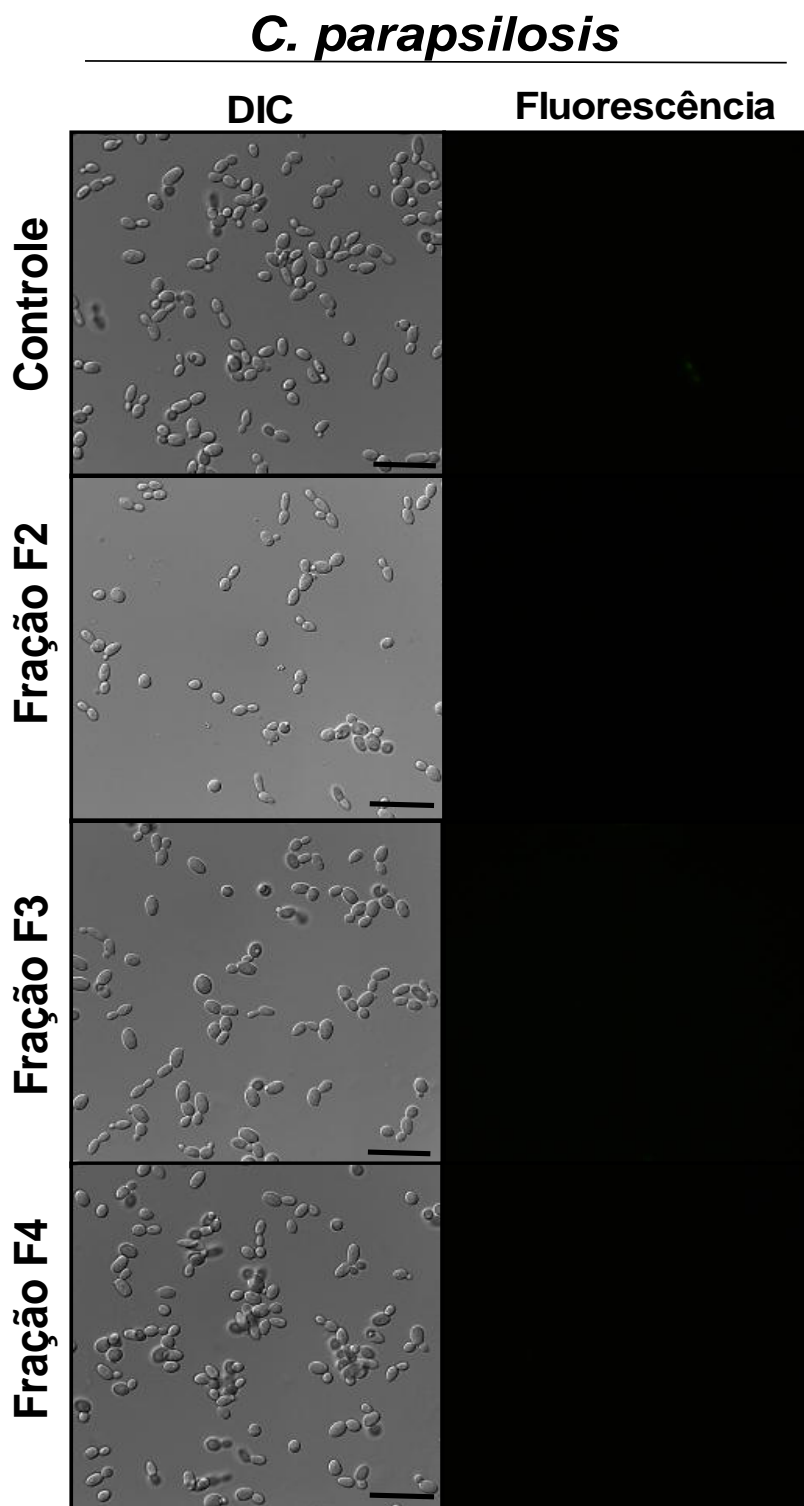


Figura 15: Imagens de microscopia de fluorescência das células de *C. parapsilosis* incubadas com a sonda Sytox Green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $20\mu\text{m}$.

4.7 Efeito das frações F2, F3 e F4 sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio nas em células de leveduras

Após 24 h do ensaio de inibição do crescimento, as células de leveduras *C. buinensis*; *C. tropicalis*; *C. albicans* e *C. parapsilosis*, crescidas na presença e na ausência de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4, foram retiradas e incubadas com o corante H₂DCFDA para verificar se estas frações seriam capazes de causar a indução da produção endógena de ROS (Figuras 16-19). Este ensaio resultou na observação de intensa marcação com o corante em células de *C. buinensis* e *C. tropicalis* cultivadas apenas na presença da fração F2, indicando a indução da produção de ROS nestas leveduras, quando comparadas com o grupo controle, cuja marcação foi bem menos intensa. O mesmo efeito não pôde ser observado nas frações F3 e F4 para estas espécies. No entanto, a propriedade de induzir o estresse oxidativo também não foi detectado em *C. albicans* e *C. parapsilosis*, quando tratadas com F2, F3 e F4 na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, visto que não foi observado nenhuma marcação fluorescente.

C. buinensis

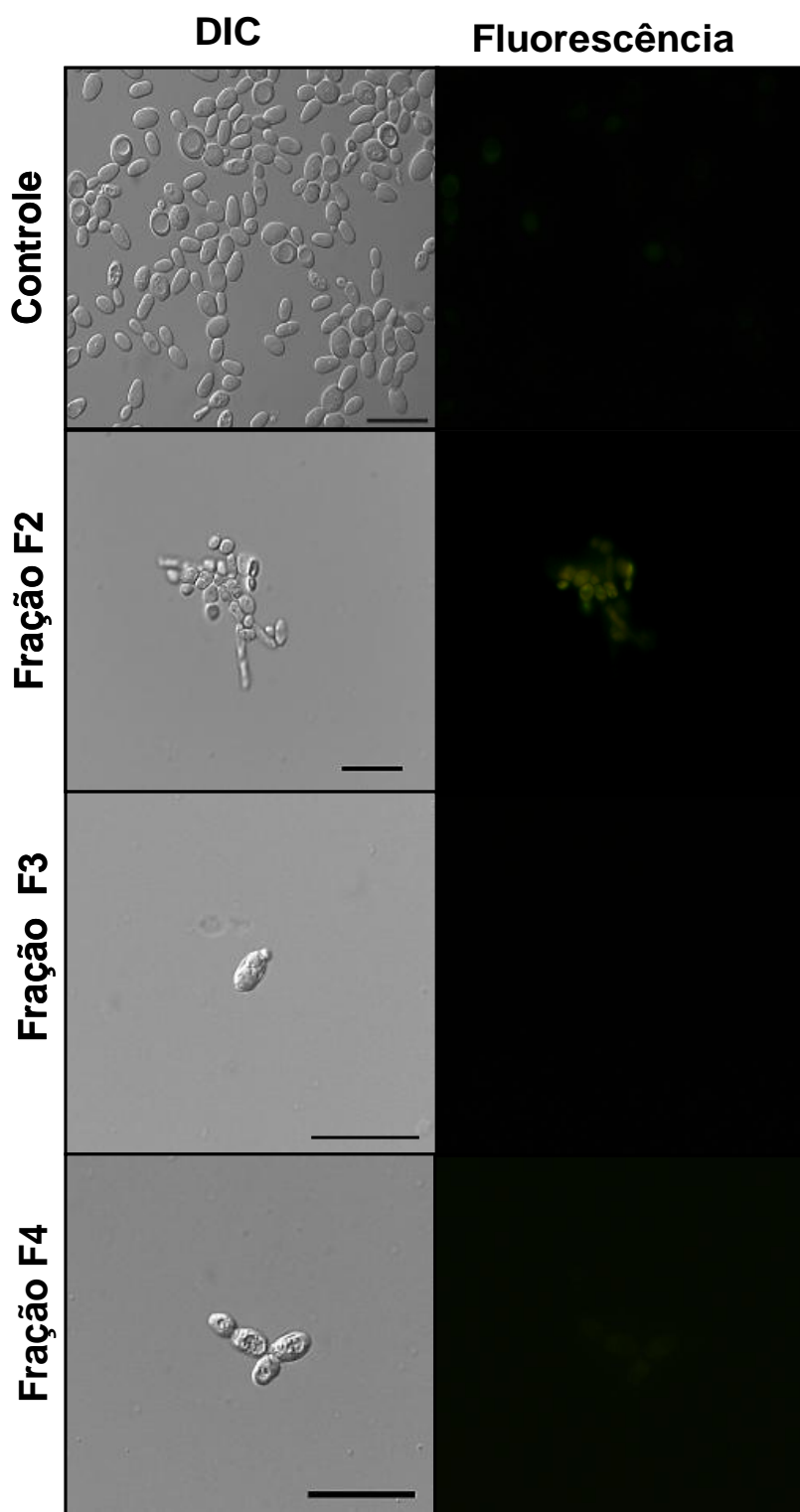


Figura 16: Imagens de microscopia de fluorescência das células da levedura *C. buinensis* incubadas com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $20 \mu\text{m}$.

C. tropicalis

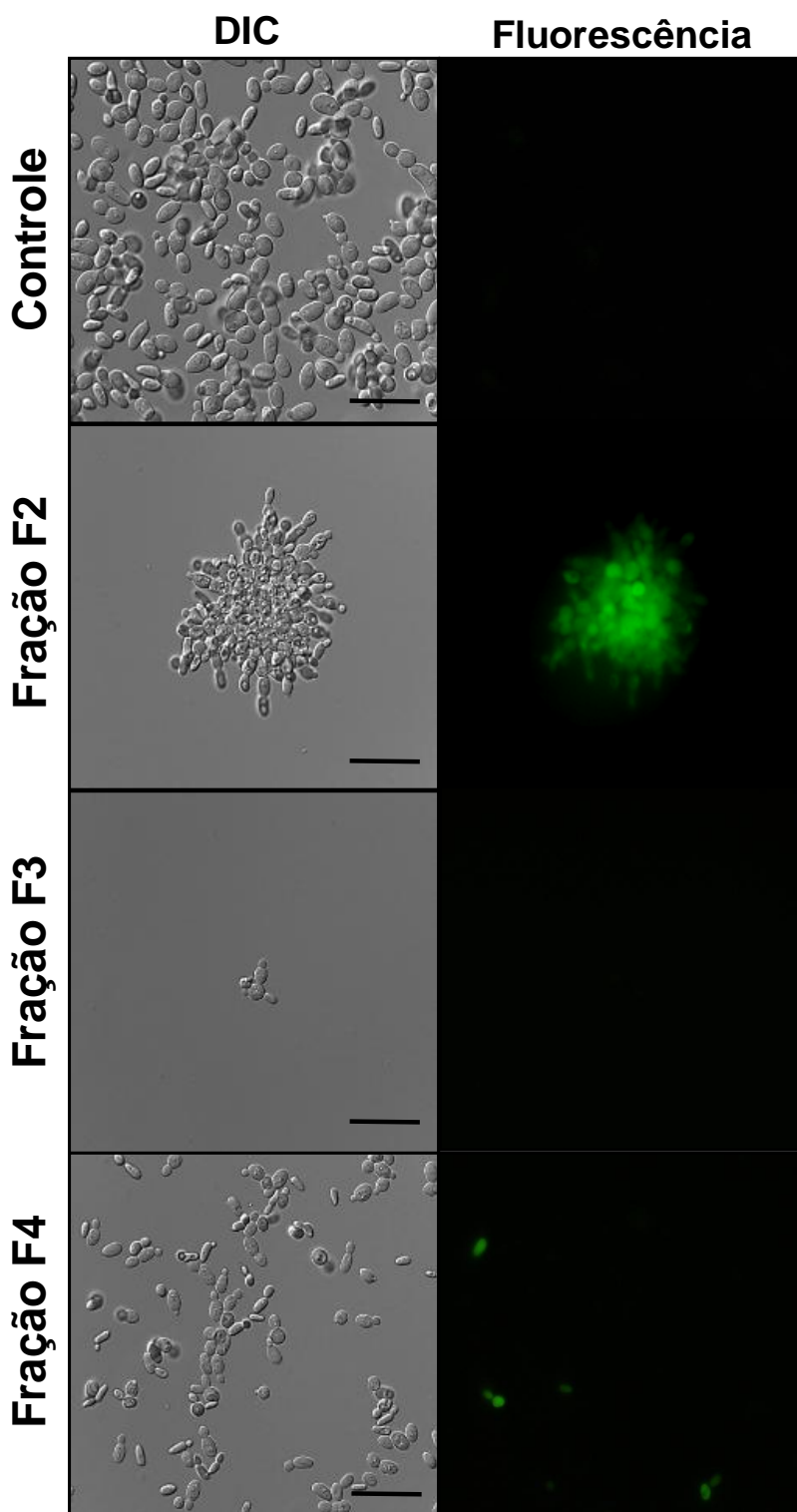


Figura 17: Imagens de microscopia de fluorescência das células da levedura *C. tropicalis* incubadas com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $20 \mu\text{m}$.

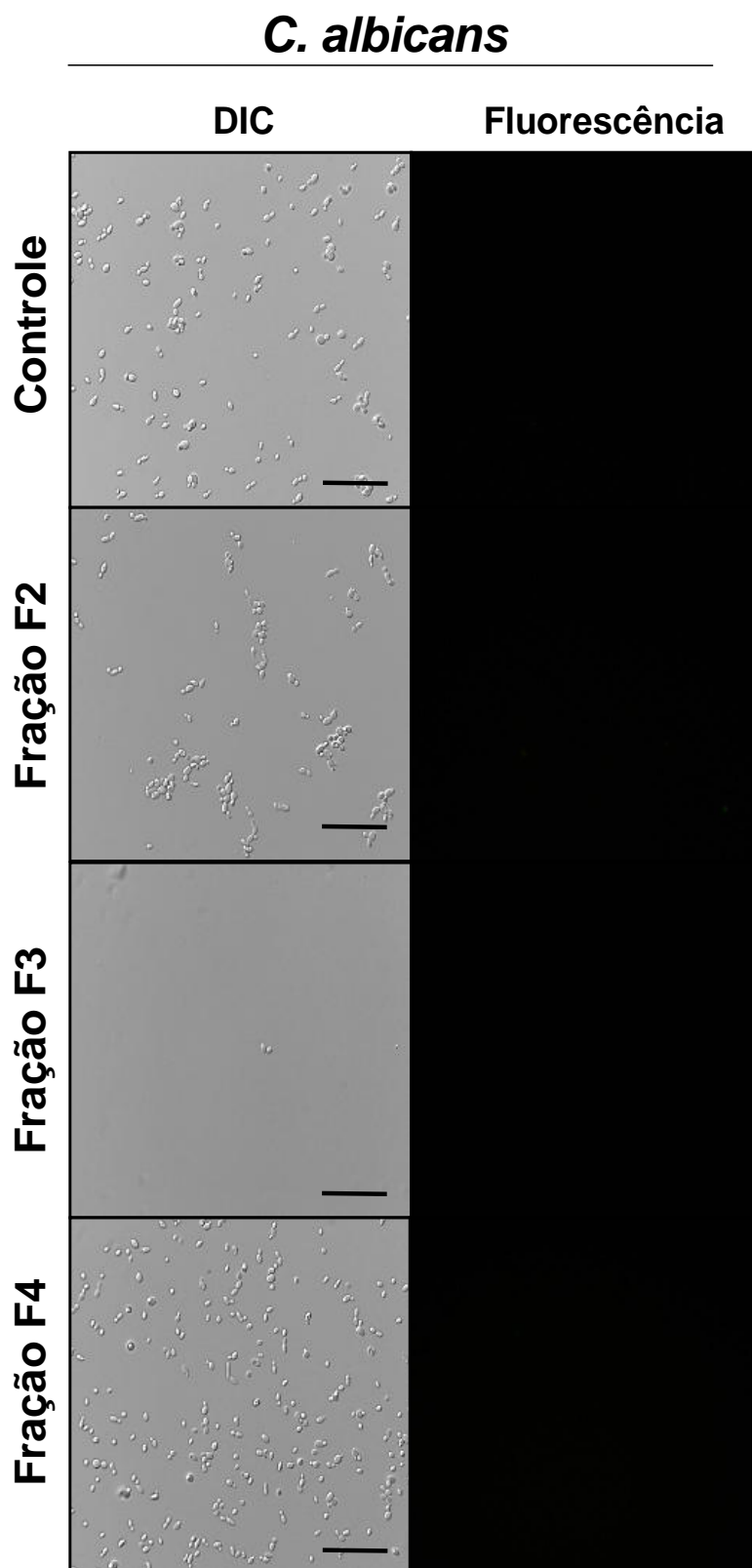


Figura 18: Imagens de microscopia de fluorescência das células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm .

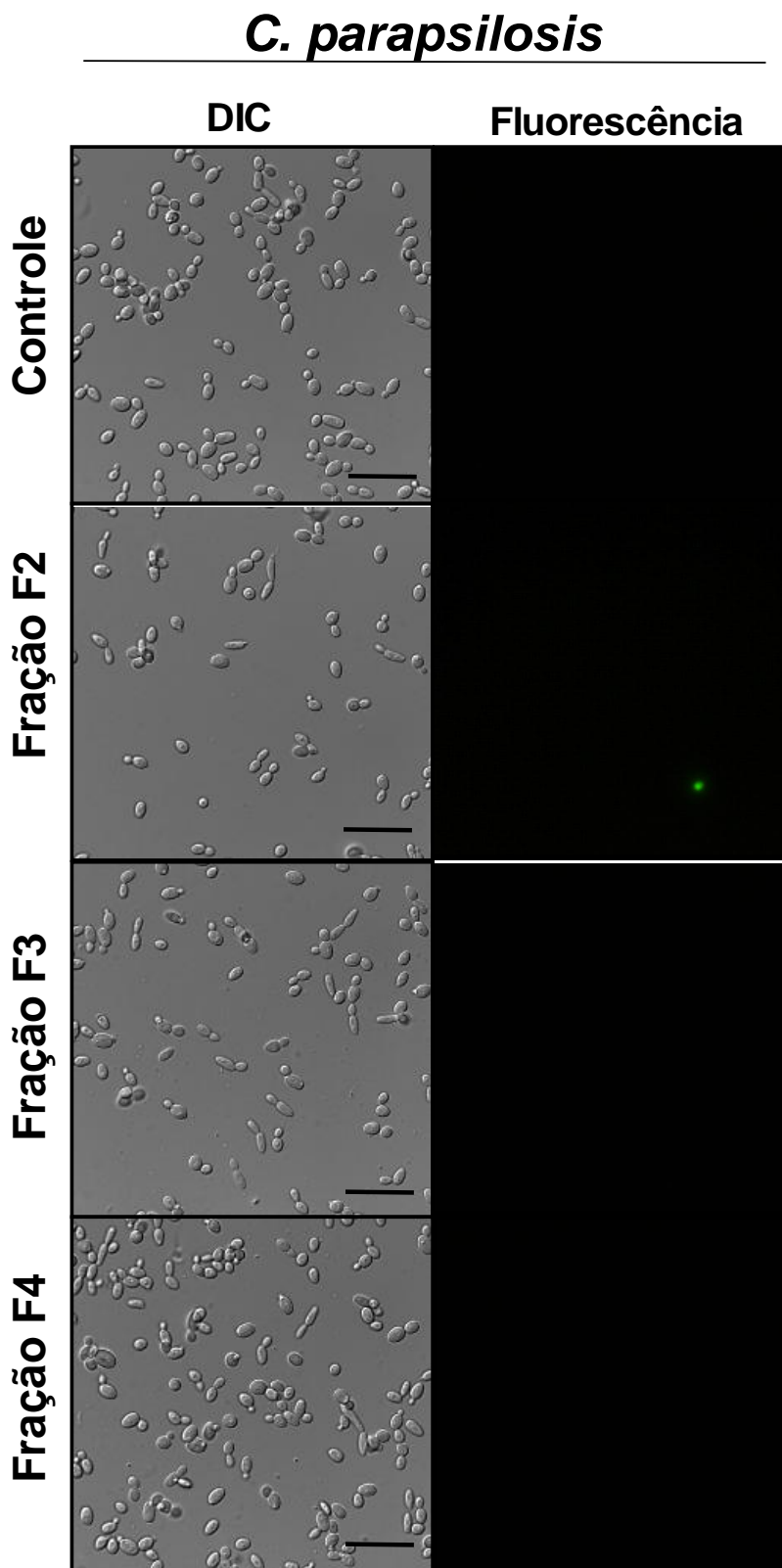


Figura 19: Imagens de microscopia de fluorescência das células da levedura *C. parapsilosis* incubadas com a sonda 2',7'- diclorofluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = $20 \mu\text{m}$.

4.8 Avaliação das frações de interesse quanto à inibição do crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv e M299

A busca por extratos, frações e substâncias isoladas de origem natural ou sintética que sejam capazes de inibir o crescimento micobacteriano é essencial para o tratamento da TB, frente à resistência aos antimicrobianos convencionais. Neste contexto, como parte da estratégia de *screening*, as frações F2 e F3 nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ também foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana contra a cepa laboratorial de baixa virulência, a *Mtb* H37Rv.

Das frações utilizadas no experimento, somente F2 manteve-se o potencial inibitório frente a *Mtb* H37Rv, destacando-se por inibir aproximadamente 60% do crescimento micobacteriano na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentando valores de MIC_{50} $39,2 \pm 1,6$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que F3 aproximadamente 40% de inibição e $\text{MIC}_{50} > 100$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

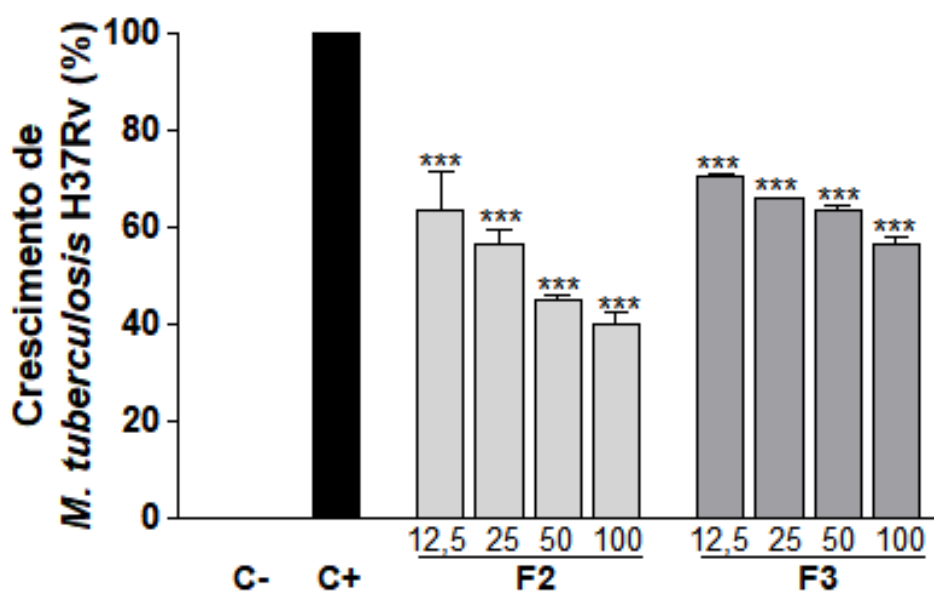


Figura 20: Visualização gráfica do efeito das frações F2 e F3 obtidas, a partir de frutos *Capsicum annuum*, no crescimento da cepa *Mtb* H37Rv. A suspensão bacteriana (1×10^6 CFU/poço) de *Mtb* H37Rv foi tratada e não tratada (C+) com as frações nessas concentrações. Após cinco dias, o método do MTT foi utilizado para estudo do efeito inibitório. As barras para cada amostra referem-se às concentrações em ordem crescente. Valores são reportados como média \pm desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com $p < 0,001$ (***).

Após a avaliação inicial quanto à atividade antimicobacteriana em cultura de *Mtb* H37Rv, as frações F2 e F3 também foram selecionadas para testes em cultura de *Mtb* hipervirulenta M299. As frações de interesse avaliadas, foram capazes de inibir o crescimento micobacteriano do isolado clínico M299 em aproximadamente 30%, na maior das concentrações testadas ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), apresentando valores de $\text{MIC}_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

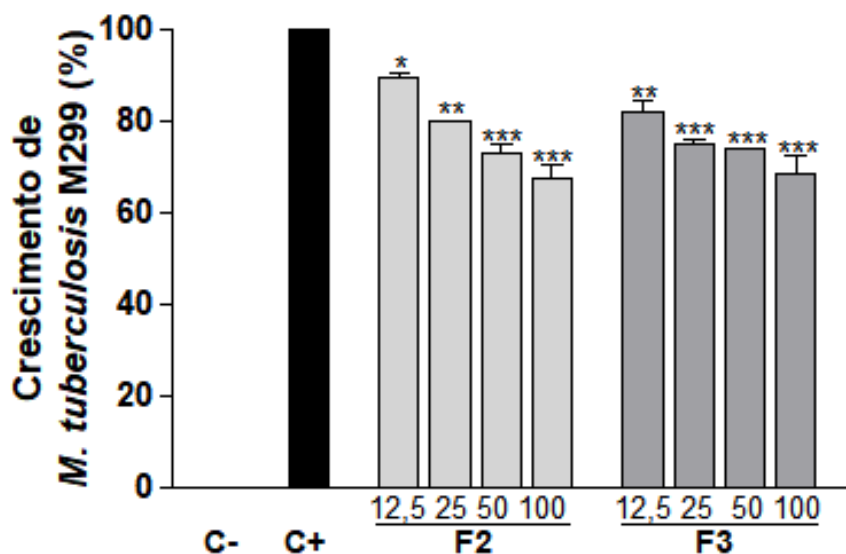


Figura 21: Visualização gráfica do efeito das frações F2 e F3 obtidas, a partir de frutos *Capsicum annuum*, no crescimento do isolado clínico *Mtb* M299. A suspensão bacteriana (1×10^6 CFU/poço) de *Mtb* M299 foi tratada ou não tratada (C+) nessas concentrações durante 5 dias. Após este período, o método do MTT foi utilizado para estudo do efeito inibitório. As barras para cada amostra referem-se às concentrações em ordem crescente. Valores são reportados como média \pm desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*).

4.9 Efeito das frações F2, F3 e F4 na viabilidade celular utilizando o método MTT

Para excluir a possibilidade de que os efeitos anti-microbianos dessas frações sobre espécies de *Candida* e *Mtb* estivessem, também, associados à toxicidade em células do hospedeiro, monitoramos a viabilidade de macrófagos e monócitos (células de cultura aderentes e em suspensão, respectivamente), avaliando a capacidade dessas células em metabolizar o MTT em cristal de formazan.

A fração F2 não apresentou citotoxicidade para ambas as linhagens, macrófagos murino RAW 264.7 e monócitos humanos THP-1, independente da concentração testada, apresentando $IC_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p > 0,05$ em relação ao controle não tratado).

As frações F3 e F4 não foram tóxicas para macrófagos RAW 264.7 ou monócitos THP-1 cultivados a 12,5 - 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apenas na maior concentração testada apresentou baixa citotoxicidade significativa, $IC_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

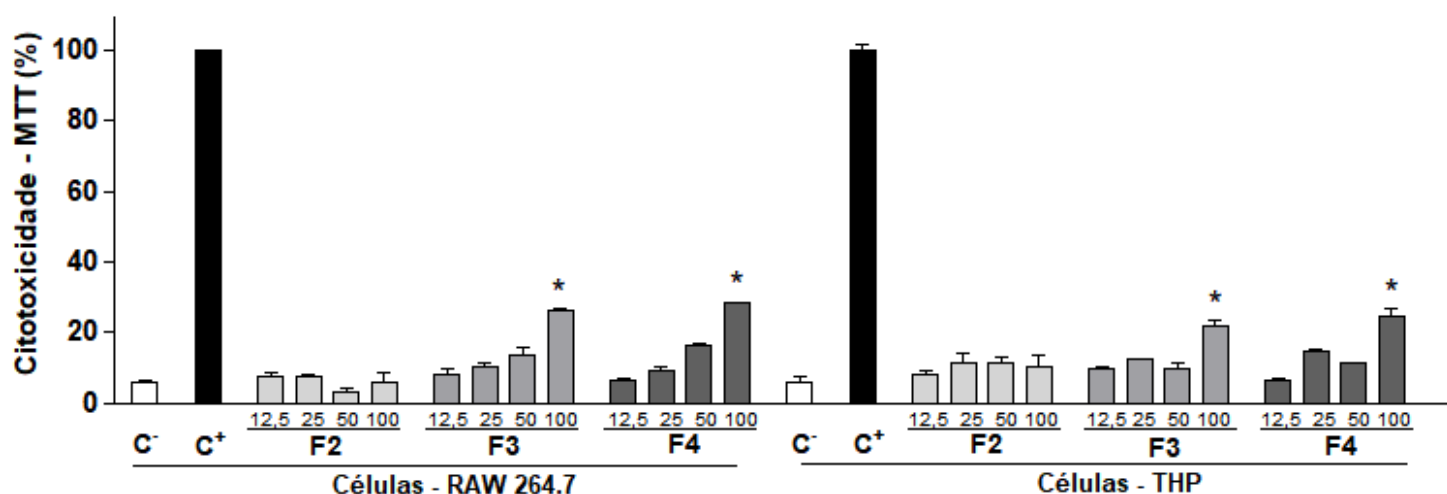


Figura 22: Avaliação da citotoxicidade das frações F2, F3 e F4 de frutos *Capsicum annuum* em culturas de macrófagos RAW 264.7 e monócito THP-1 pelo método de MTT. As linhagens celulares foram tratadas após 24 h com as frações F2, F3 e F4 nas concentrações [12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$]. Posteriormente, a solução de MTT foi adicionada às culturas celulares por 2 h e os cristais de formazan obtidos foram dissolvidos com isopropanol acidificado. Células não tratadas de cada linhagem celular foram usadas como um controle (citotoxicidade – 0%) e 1% do detergente Triton X-100 foram adicionados como tratamento no controle positivo (citotoxicidade – 100%). Média aritmética \pm desvio padrão ($n = 3$). $P < 0,05$ (*) comparadas com células não tratadas.

5. DISCUSSÃO

As plantas, por serem organismos sésseis, estão expostas constantemente aos diversos tipos de fatores abióticos e bióticos, o que inclui a presença de um grande número de organismos fitopatogênicos. Sendo assim, para garantir a sua sobrevivência em condições desfavoráveis, modulam uma rápida resposta de defesa contra situações de estresse (CASTRO; FONTES, 2005). Neste contexto, os AMPs de plantas desempenham uma defesa importante frente a invasão de um patógeno, ataque de inseto ou até mesmo um estresse ambiental (THEVISSSEN et al., 2004).

Nos últimos anos, um número crescente de proteínas e peptídeos foram isolados e purificados de plantas, os quais têm demonstrado ampla atividade antimicrobiana (NAWROT et al., 2014; HOLASKOVA et al., 2015; TAM et al., 2015). Alguns peptídeos purificados e caracterizados de diversos tipos de sementes e frutos de pimenta apresentam atividade biológica de inibir o crescimento de patógenos *in vitro*. Conforme descrito por TAVEIRA et al. (2014), a atividade antimicrobiana sobre bactérias e leveduras foi observada para um peptídeo semelhante à tionina, sendo denominado *CaThi*, isolado de frutos de *C. annuum*. Com base no trabalho desenvolvido por TAVEIRA et al. (2014), decidimos analisar as outras frações obtidas de *C. annuum* que ainda não haviam sido testadas quanto ao seu potencial antimicrobiano sobre quatro leveduras patogênicas: *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* e contra duas cepas de micobactérias: *Mtb* H37Rv e M229.

A cromatografia de fase reversa é amplamente utilizada por pesquisadores para a purificação de proteínas (DOS SANTOS et al., 2017). Inicialmente, seis frações foram obtidas por cromatografia de fase reversa em HPLC a 220 nm da F/0-70. Essas frações foram denominadas F1 a F6 (Figura 8A). Todas as frações obtidas por HPLC foram testadas em um ensaio antifúngico inicial e, então, selecionadas aquelas com maior atividade antifúngica.

Assim, observamos que as frações de interesse na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram capazes de inibir significativamente o crescimento das espécies de *Candida*, especialmente as frações F2, F3 e F4 (Figura 10). A fração F2 foi notavelmente a mais eficaz contra a levedura *Candida parapsilosis*.

Para avaliar o potencial antifúngico dessas frações, foi realizado o teste de viabilidade celular em leveduras. Observamos que quando as diferentes espécies do gênero *Candida* foram tratadas com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações F2, F3 e F4, obteve-se um efeito fungicida. Taveira et al. (2016) avaliaram o perfil antifúngico da tionina denominada *CaThi* obtida de frutos de *C. annuum* em *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. buinensis*, *C. parapsilosis* e *C.*

pelliculosa, quando tratados com seus respectivos IC₅₀. Os resultados apontaram para um efeito fungicida desta tionina.

Devido à atividade antifúngica promissora apresentada pelas frações F2 e F3, as bandas de ~ 5 kDa e ~ 6 kDa presentes nestas frações foram submetidas à identificação de seus resíduos de aminoácidos por espectrometria de massas. Após o alinhamento das sequências de aminoácidos, através da análise em bases de dados, verificou-se que estes peptídeos têm similaridade de sequência primária com a família de defensinas de plantas de várias espécies de *Capsicum*, pertencentes à família Solanaceae (Figura 9). Obtivemos duas defensinas, correspondentes às bandas de aproximadamente 5 kDa e 6 kDa nas frações de interesse, denominadas *CaDef 2.1* e *CaDef 2.2*. Ressaltamos que *CaDef 2.2* presentes em F2 e F3 possuíam a mesma sequência de aminoácidos, embora não pudéssemos afirmar se é a mesma defensina ou uma isoforma, uma vez que não obtivemos a sequência primária completa.

Os peptídeos presentes nas frações de interesse foram capazes de causar inibição do crescimento de quatro espécies de leveduras numa concentração de 100 µg.mL⁻¹ (Fig. 10), enfatizando que os mesmos desempenham atividades biológicas muito semelhantes a outras defensinas já descritas na literatura (SAGARAM et al., 2011; VIEIRA et al., 2015; HAYES et al., 2018). As defensinas de plantas estão presentes em todos os órgãos vegetais e têm papéis relevantes no crescimento e desenvolvimento das plantas, como nas respostas de defesa contra patógenos (COOLS et al., 2017; SHAFEE et al., 2016; LAY; ANDERSON, 2005). Elas possuem uma variedade de atividades biológicas descritas. Até o momento, apenas algumas defensinas demonstraram inibir o crescimento de bactérias, enquanto que sua atividade antifúngica foi estudada extensivamente (STOTZ; THOMSON; WANG, 2009; THEVISSSEN et al., 1996). Além disso, nossos resultados obtidos em ensaios corroboram com o fato de que outros peptídeos presentes nessas frações também poderiam interagir sinergicamente entre as defensinas de plantas contidas nas frações F2 e F3.

Estudos realizados por BLEACKLEY et al. (2017) revelaram uma interação sinérgica entre defensinas de *Nicotiana glauca* e um peptídeo inibidor de tripsina pancreático bovino, os quais acarretaram numa inibição contra fungos filamentosos e leveduras como *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum graminicola* e *C. albicans*. Portanto, pode haver um aumento da atividade *in vitro* de dois peptídeos antifúngicos de famílias diferentes.

Análises feitas através de microscopia óptica revelaram alterações morfológicas nas células de leveduras, principalmente em *C. buinensis* e *C. tropicalis*, quando tratadas principalmente com frações F2 e F3, na qual observamos células menos desenvolvidas, com o

citoplasma mais condensado, aglomeradas e com aparente dificuldade na liberação de brotos (Figura 12-19). Já foi citado que diversas defensinas de plantas são capazes de induzir alterações na morfologia de fungos e tais alterações incluem aglomeração celular, alongamento celular, hiper-ramificação das hifas e principalmente, a redução do número de células, variando de acordo com o fungo testado (OSBORN et al., 1995; WU et al., 2011).

Entre as defensinas de plantas, são conhecidos vários mecanismos de ação que levam à morte de células fúngicas (YEAMAN; BÜTTNER; THEVISSSEN, 2018; SOARES et al., 2017; GAMES et al., 2008). De acordo com esses estudos, também demonstramos alguns possíveis mecanismos de ação dos peptídeos presentes nas frações F2, F3 e F4. Assim, quando as membranas de levedura são tratadas com as frações de interesse, elas ficam estruturalmente comprometidas, acarretando em permeabilização, exceto em *C. parapsilosis* (Figura 12-15). Este ensaio faz uso do corante fluorescente SYTOX Green, que só passa por membranas estruturalmente comprometidas e fluoresce quando se liga a ácidos nucleicos. Outros estudos também mostraram a capacidade das defensinas de plantas em causar permeabilização de membranas celulares em células fúngicas (THEVISSSEN; TERRAS; BROEKAERT, 1999; MELLO et al., 2011; SOARES et al., 2017). A permeabilização da membrana celular tratada com AMPs tem sido bem descrita para peptídeos como defensinas, que podem causar alterações na permeabilidade da membrana plasmática, resultando na entrada de Ca^{+2} , efluxo de K^{+} e colapso do potencial de membrana que acarreta em funções fisiológicas vitais de restauração, aumentando a demanda de energia celular. Estas observações sugerem a interação dos peptídeos de plantas com membranas fúngicas (THEVISSSEN et al., 2004; COOLS et al., 2017).

Até recentemente, acreditava-se que a permeabilização da membrana era uma consequência da interação da defensina com a membrana fúngica, que seria o principal responsável pela inibição do crescimento. Entretanto, alguns estudos atuais sugerem outros alvos intracelulares e a capacidade de permeabilização da membrana pode ser um evento secundário ao aumento endógeno da produção de espécies reativas de oxigênio (SOARES et al., 2017). As mitocôndrias são o principal local do metabolismo oxidativo da célula e seu envolvimento na produção e degradação de ROS têm sido amplamente relatado. Espécies reativas de oxigênio são moléculas que aparecem nos estágios iniciais do processo apoptótico e o aumento de ROS no meio pode ser tóxico para microrganismos causando a oxidação de diferentes componentes celulares (KOWALTOWSKI et al., 2009; KULKARNI et al., 2009). Vários estudos mostraram que o aumento na produção de ROS em microrganismos alvo é um modo de ação empregado recorrentemente por defensinas e vários outros AMPs. (AERTS et

al., 2007; RIBEIRO; CÔRTE-REAL; JOHANSSON, 2006; MELLO et al., 2014). Portanto, analisamos o evento de permeabilização de membrana em espécies de *Candida* induzidas pelas frações F2, F3 e F4 foi seguido ou não por estresse oxidativo. Curiosamente, apenas a fração F2 induziu a produção de ROS em *C. buinensis* e *C. tropicalis*. Nós especulamos que os peptídeos presentes em F2 se ligam a um domínio de membrana específico de *C. buinensis* e *C. tropicalis*, o qual desencadeia um aumento da resposta ao estresse oxidativo através da produção de ROS. Por outro lado, neste estudo, não pudemos associar o papel dos peptídeos presentes nessas frações e produção de ROS com a inibição do crescimento em *Candida*, pelo menos para a concentração testada, visto que após 24 h muitas células de leveduras sofreram morte celular e estavam com baixo metabolismo basal. No entanto, mais estudos são necessários para analisar essa problemática. KULKARNI et al. (2009) mostraram que o aumento na produção de ROS nos organismos alvo é um mecanismo de ação proposto por pesquisadores que compararam a ação de defensinas à outros AMPs, sugerindo que acarretam em eventos de morte celular programada.

Neste estudo investigamos também os efeitos antimicobacterianos das frações F2 e F3 diretamente em cepas de *Mtb* H37Rv e M299. É de suma importância a busca por novos fármacos anti-Tb que sejam mais potentes, eficazes e que possibilitem a diminuição do período de tratamento, favorecendo a conclusão da terapia, reduzindo os efeitos adversos, o risco de resistência e o custo com o tratamento (ORME, 2011). É importante ressaltar que devido à evolução da resistência aos fármacos entre cepas de *Mtb* e sua rápida disseminação em todo o mundo, o uso de AMPs naturais e sintéticos e sua combinação com drogas convencionais poderão permitir o estabelecimento de uma nova geração de antibióticos promissores (MOHANTY et al., 2013; KHARA et al., 2015).

Até o presente momento não existem estudos que demonstraram atividade antimicrobiana de defensinas de plantas contra *M. tuberculosis*. Trabalhos relacionados a AMPs e sua atividade antimicobacteriana ainda são escassos. Todavia, as defensinas de mamíferos foram relatadas como pioneiras nas pesquisas relacionadas à Tb, através de suas propriedades imunomodulatórias e microbicidas, constituindo o maior e o mais diverso grupo de AMPs do sistema de defesa pulmonar do hospedeiro (ARRANZ-TRULLÉN et al., 2017).

Neste trabalho avaliamos o efeito das frações F2 e F3 contra duas cepas de *Mtb* com diferentes níveis de virulência, sendo uma de baixa virulência (H37Rv) e outra hipervirulenta (M299). Ambas as frações inibiram 60 e 30% do crescimento das cepas testadas, respectivamente na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo a fração F2 mais ativa contra H37Rv.

Segundo Hancock; Sahl (2006), a maioria dos AMPs possuem um espectro de ação rápido, seletivo e amplo, sendo considerado uma fonte promissora de novas moléculas terapêuticas contra agentes infecciosos. No entanto, é essencial a investigação sobre a toxicidade de qualquer candidato a fármaco, que constitui a principal causa da desaprovação de novos produtos bioativos (MAHER; MCCLEAN, 2006). As culturas de células são um sistema de teste apropriado para o ensaio de citotoxicidade quantitativa, como método de MTT. Além disso, a avaliação do efeito da toxicidade no crescimento de suspensões e cultura de células aderentes é importante, uma vez que as células em suspensão têm mais área superficial e elevada a taxa metabólica. Observamos que as frações F2, F3 e F4 não foram tóxicas para cultura de células aderentes (macrófagos RAW 264.7), bem como para linhagem celular em suspensão (monócitos THP-1) em todas as concentrações testadas ($IC_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Assim, as atividades inibitórias observadas para as frações não foram afetadas pela sua citotoxicidade para macrófagos ou monócitos, mostrando seletividade contra patógenos.

Diante do exposto, os AMPs presentes nas frações por nós identificadas possuem um amplo espectro de atividade contra diferentes patógenos e possuem baixa citotoxicidade em células de mamíferos, e por isso, acreditamos que estes podem constituir uma alternativa viável, para a produção de novos fármacos contra microrganismos resistentes à múltiplas fármacos. Apesar do mecanismo de ação dos AMPs ainda não ter sido completamente elucidado, os resultados obtidos são promissores, podendo abrir novas possibilidades para o tratamento de diversas doenças, inclusive as negligenciadas.

6. CONCLUSÃO

As análises realizadas e obtidas durante o desenvolvimento deste trabalho permitem concluir que:

- A fração F/0-70 de frutos *Capsicum annuum*, caracterizou-se por apresentar seis diferentes frações ricas, compostas majoritariamente por proteínas de baixa massa molecular;
- O alinhamento das bandas obtidas de 5 kDa e 6 kDa das frações F2 e F3 mostrou similaridades com duas defensinas de plantas presentes em espécies de *Capsicum*, e por isso foram nomeados de *CaDef 2.1* e *CaDef 2.2*;
- As frações testadas F2, F3 e F4 dos frutos de *C. annuum* inibiram significativamente o crescimento de leveduras das espécies *C. buinensis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, sendo a fração F2 a mais efetiva e capaz de induzir alterações morfológicas em *C. buinensis* e *C. tropicalis*;
- As frações F2, F3 e F4 apresentaram um efeito fungicida sobre as diferentes leveduras do gênero *Candida*;
- As frações F2, F3 e F4 foram capazes de comprometer a membrana plasmática das leveduras, exceto em *C. parapsilosis* e promover aumento na produção de ROS nas células de leveduras de *C. buinensis* e *C. tropicalis*;
- A fração F2 foi capaz de inibir significativamente o crescimento das cepas *M. tuberculosis* H37Rv e M299;
- As frações não apresentaram citotoxicidade em células de mamíferos pelo método de MTT, nas concentrações utilizadas;
- Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que a fração F2 foi a mais promissora (*in vitro*) para estudos prospectivos que visam à geração de novos fármacos com potencial antimicrobiano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASZEK, Ł. et al. Properties of capsaicin and its utility in veterinary and human medicine. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 14–19, abr. 2019.

AERTS, A. M. et al. 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**, v. 13, n. 4, p. 243–247, 2007.

AGIZZIO, A. P. et al. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 416, n. 2, p. 188–195, ago. 2003.

AGIZZIO, A. P. et al. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, v. 171, n. 4, p. 515–522, out. 2006.

AL AKEEL, R. et al. Screening, purification and characterization of anionic antimicrobial proteins from *Foeniculum vulgare*. **Molecules**, v. 22, n. 4, p.1-10, abr. 2017.

ALINE, J. et al. Fungos De Interesse: Aplicações Biotecnológicas Fungi of Interest: Biotechnological Applications. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p. 55–59, 2015.

ARRANZ-TRULLÉN, J. et al. Host antimicrobial peptides: The promise of new treatment strategies against tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, nov. 2017.

ARROYO, A. G.; IRUELA-ARISPE, M. L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. **Cardiovascular Research**, v. 86, n. 2, p. 226–235, maio 2010.

BALADRÓN, V. et al. Eng1p, an Endo-1,3-β-Glucanase Localized at the Daughter Side of the Septum, Is Involved in Cell Separation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 5, p. 774–786, out. 2002.

BARD, G. C. V. et al. Purification, biochemical characterization, and antimicrobial activity of a new lipid transfer protein from *Coffea canephora* seeds. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1-16, out. 2016.

BARD, G. C. V. et al. Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are α-amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology.

Biopolymers, v. 102, n. 4, p. 335–343, jul. 2014.

BAUMANN, T. et al. Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p. 2787–2798, ago. 2010.

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

BERROCAL-LOBO, M. et al. Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato whose Gene is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 128, n. 3, p. 951–961, mar. 2002.

BIZERRA, F. C. et al. Breakthrough Candidemia Due to Multidrug-Resistant *Candida glabrata* during Prophylaxis with a Low Dose of Micafungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2438–2440, abr. 2014.

BLEACKLEY, M. R. et al. Synergistic activity between two antifungal proteins, the plant defensin *NaD1* and the bovine pancreatic trypsin inhibitor. **mSphere**, v. 2, n. 5, p. 1–12, 2017.

BLOCH, C.; RICHARDSON, M. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat γ -purothionins. **FEBS Letters**, v. 279, n. 1, p. 101–104, 11 fev. 1991.

BLOCHET, J. E. et al. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. **FEBS Letters**, v. 329, n. 3, p. 336–340, 30 ago. 1993.

BOHLMANN, H. et al. Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene *Thi2.1*, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. **FEBS Letters**, v. 437, n. 3, p. 281–286, 23 out. 1998.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, v. 254, n. 3, p. 197–215, set. 2003.

BOSSCHE, H. VANDEN; KOYMANS, L. Review Article Cytochromes P450 in fungi. **Mycoses**, v. 41, p. 32–38, abr. 1998.

BOWDISH, D.; DAVIDSON, D.; HANCOCK, R. A Re-evaluation of the Role of Host Defence Peptides in Mammalian Immunity. **Current Protein & Peptide Science**, v. 6, n. 1, p. 35–51, 2005.

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

BROEKAERT, W. F. et al. Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. **Plant Physiology**, v. 108, n. 4, p. 1353–1358, 1 ago. 1995.

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

BROEKAERT, W. F. et al. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. **Biochemistry**, v. 31, n. 17, p. 4308–4314, maio 1992.

BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 19 dez. 2012.

CAMMUE, B. P. A. A remarkable new *Amorphophallus* (Araceae) from India. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 2228–2233, 1992.

CAMMUE, B. P. A. et al. A Potent Antimicrobial Protein from Onion Seeds Showing Sequence Homology to Plant Lipid Transfer Proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 445–455, 1995.

CAMPOS, R.; PIANTA, C. Tuberculose : histórico , epidemiologia e imunologia , de 1990 a 1999, e co-infecção TB / HIV, de 1998 a 1999 , Rio Grande do Sul – Brasil. **Boletim da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 61–71, 2001.

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

CARVALHO, A.O. et al. Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 122, n. 3, p. 328–336, nov. 2004.

CARVALHO, A. O. et al. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna*

- unguiculata* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 137–146, fev. 2001.
- CASTRO, M.; FONTES, W. Plant Defense and Antimicrobial Peptides. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 11–16, 2005.
- COOLS, T. L. et al. Antifungal plant defensins: Increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. **Future Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 441–454, 2017.
- CRAIK, D. J. et al. Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1327–1336, dez. 1999.
- DANG, L.; VAN DAMME, E. J. M. Toxic proteins in plants. **Phytochemistry**, v. 117, p. 51–64, set. 2015.
- DE SIQUEIRA, H. R. Enfoque Clínico da Tuberculose Pulmonar. **Pulmão RJ**, v. 21, n. 1, p. 15–18, 2012.
- DEEPA, N. et al. Antioxidant activity in some red sweet pepper cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 572–578, set. 2006.
- DHATWALIA, V. K. et al. Isolation , Characterization and Antimicrobial Activity at Diverse Dilution of Wheat Puroindoline Protein. **World**, v. 5, n. 3, p. 297–300, 2009.
- DIAS, G. B. et al. Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. seeds. **Protein Journal**, v. 32, n. 1, p. 15–26, 2013.
- DIZ, M. S. S. et al. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. v. 1760, p. 1323–1332, 2006.
- DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 25 jan. 2016.
- DOS SANTOS, L. DE A. et al. Purification and characterization of peptides from *Capsicum annuum* fruits which are α -amylase inhibitors and exhibit high antimicrobial activity against fungi of agronomic importance. **Protein Expression and Purification**, v. 132, p. 97–107,

2017.

DOSENOVIC, S. et al. Interventions for Neuropathic Pain: An Overview of Systematic Reviews. **Anesthesia and Analgesia**, v. 125, n. 2, p. 643–652, 2017.

DUBOC, P. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* during cell cycle oscillations. **Journal of Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 57–72, 18 out. 1996.

DUVICK, J. P. et al. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 26, p. 18814–18820, 1992.

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

FANT, F.; VRANKEN, W. F.; BORREMANS, F. A. M. The three-dimensional solution structure of *Aesculus hippocastanum* antimicrobial protein 1 determined by ¹H nuclear magnetic resonance. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 37, n. 3, p. 388–403, 15 nov. 1999.

FIGUEIRA, T. N. et al. Challenging metastatic breast cancer with the natural defensin PvD1. **Nanoscale**, v. 9, n. 43, p. 16887–16899, out. 2017.

FUJIMURA, M. et al. Purification, Characterization, and Sequencing of Novel Antimicrobial Peptides, Tu -AMP 1 and Tu -AMP 2, from Bulbs of Tulip (*Tulipa gesneriana* L.). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 3, p. 571–577, 22 jan. 2004.

GAMES, P. D. et al. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, v. 29, n. 12, p. 2090–2100, dez. 2008.

GAO, A.-G. et al. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 12, p. 1307–1310, 1 dez. 2000.

GARCIA-OLMEDO, F. et al. The thionins: A protein family that includes purothionins, viscotoxins, and crambins. **Oxford Surv Plant Mol Cell Biol**, v. 6, n. 1949, p. 31–60, 1989.

GARCÍA-OLMEDO, F. et al. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. **FEBS Letters**, v. 498, n. 2–3, p. 219–222, jun. 2001.

GAUTIER, M. F. et al. *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. **Plant Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 43–57, abr. 1994.

GENNARO, R.; ZANETTI, M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, n. 1, p. 31–49, 2000.

GUPTA, N.; JORWAL, P. Treatment outcomes associated with multidrug-resistant tuberculosis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 125, 2018.

GUZMAN, I. et al. Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. **Plant Science**, v. 179, n. 1–2, p. 49–59, jul. 2010.

HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919–934, 2013.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551–1557, dez. 2006.

HANCOCK, R. E. W.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8856–8861, 2000.

HAYES, B. M. E. et al. The Plant Defensin NaD1 Enters the Cytoplasm of *Candida albicans* via Endocytosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 20, 2018.

HEGEDÜS, N.; MARX, F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 132–145, 2013.

HOLASKOVA, E. et al. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1005–1023, nov. 2015.

HUANG, X.; XIE, W. J.; GONG, Z. Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. **FEBS Letters**, v. 478, n. 1–2, p. 123–126, 2000.

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

KAMIMORI, H. et al. Studies on the membrane interactions of the cyclotides kalata B1 and

kalata B6 on model membrane systems by surface plasmon resonance. **Analytical Biochemistry**, v. 337, n. 1, p. 149–153, fev. 2005.

KHARA, J. S. et al. Designing α -helical peptides with enhanced synergism and selectivity against *Mycobacterium smegmatis*: Discerning the role of hydrophobicity and helicity. **Acta Biomaterialia**, v. 28, p. 99–108, dez. 2015.

KOBAYASHI, Y. et al. A new α -helical motif in membrane active peptides. **Neurochemistry International**, v. 18, n. 4, p. 525–534, jan. 1991.

KOUASSI, C. K.; KOFFI-NEVRY, R. Evaluation de la connaissance et utilisation des variétés de piment (*Capsicum*) cultivées en Côte d' Ivoire. **Int. J. Biol. Chem. Sci.**, v. 6, n. February, p. 175–185, 2012.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333–343, ago. 2009.

KULKARNI, M. M. et al. Antimicrobial Peptide-induced Apoptotic Death of *Leishmania* Results from Calcium- dependent, Caspase-independent Mitochondrial Toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 23, p. 15496–15504, jun. 2009.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, p.1-24, jan. 2018.

LAY, F. T.; ANDERSON, M. A. Defensins – Components of the Innate Immune System in Plants. p. 85–101, 2005.

LIPKIN, A. et al. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. **Phytochemistry**, v. 66, n. 20, p. 2426–2431, out. 2005.

LUNING, P. A. et al. Aroma Changes in Fresh Bell Peppers (*Capsicum annuum*) after Hot-air Drying. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1269–1276, nov. 1995.

LYON, S. M.; ROSSMAN, M. D. Pulmonary Tuberculosis. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 1, fev. 2017.

MAHER, S.; MCCLEAN, S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.

71, n. 9, p. 1289–1298, abr. 2006.

MARCUS, J. P. et al. Purification, characterisation and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. **European Journal of Biochemistry**, v. 244, n. 3, p. 743–749, 1997.

MARIA, C.; PINTO, F. Farmacológicas e Medicinais e seu Potencial para o Pepper *Capsicum*: Chemical, Nutrition, Pharmacology and Medical Properties and Its Potential for Agribusiness. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 3, n. 2, p. 108–120, 2013.

MARÓTI GERGELY, G. et al. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 363–374, 2011.

MARSHALL, S. H.; ARENAS, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 3, 15 dez. 2003.

MCMANUS, A. M. et al. MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a greek key β -barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins 1 Edited by P. E. Wright. **Journal of Molecular Biology**, v. 293, n. 3, p. 629–638, out. 1999.

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

MELLO, E. O. et al. Functional expression and activity of the recombinant antifungal defensin PvD1r from *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) seeds. **BMC Biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2014.

MENICHINI, F. et al. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 553–560, maio 2009.

MOHANTY, S. et al. Cationic Antimicrobial Peptides and Biogenic Silver Nanoparticles Kill *Mycobacteria* without Eliciting DNA Damage and Cytotoxicity in Mouse Macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3688–3698, ago. 2013.

MOODLEY, R.; GODEC, T. R. Short-course treatment for multidrug-resistant tuberculosis:

- the STREAM trials. **European Respiratory Review**, v. 25, n. 139, p. 29–35, 29 mar. 2016.
- MOODLEY, S. et al. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay is a rapid, cheap, screening test for the in vitro anti-tuberculous activity of chalcones. **Journal of Microbiological Methods**, v. 104, p. 72–78, set. 2014.
- MORGAN, J. Global trends in candidemia: Review of reports from 1995–2005. **Current Infectious Disease Reports**, v. 7, n. 6, p. 429–439, dez. 2005.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.
- NASCIMENTO FILHO, H. R. DO; BARBOSA, R. I.; LUZ, F. J. DE F. Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia brasileira: II. Hábitos e formas de uso. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 4, p. 561–568, 2007.
- NAWROT, R. et al. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 181–196, maio 2014.
- NESVIZHSKII, A. I. et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646–4658, 2003.
- ODDS, F. C. et al. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1066–1075, 1 ago. 2007.
- OHTANI, S. et al. Complete a Lethal Primary Protein Structures for Brewer's of Two Yeast Subunits from of Purothionin Flour. v. 82, n. 3, p. 753–767, 1977.
- ORME, I. M. Development of new vaccines and drugs for TB: limitations and potential strategic errors. **Future Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 161–177, fev. 2011.
- OSBORN, R. W. et al. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. **FEBS Letters**, v. 368, n. 2, p. 257–262, jul. 1995.
- PARISI, K. et al. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, p. 1–12, fev. 2018.
- PATEL, S. U. et al. Structural Studies of *Impatiens balsamina* Antimicrobial Protein (Ib-

AMP1). **Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 983–990, jan. 1998.

PAULA, J. A. M. et al. Gênero Pimenta: Aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 363–379, 2010.

PESCHEL, A.; SAHL, H.-G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 529–536, jul. 2006.

POETA, P. et al. Tuberculosis in the 21th century: Current status of diagnostic methods. **Experimental Lung Research**, p. 1–9, jan. 2019.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides : premises and promises. v. 24, p. 536–547, 2004.

REILLY, C. A. et al. Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 2, p. 259–267, abr. 2001.

RIBEIRO, G. F.; CÔRTE-REAL, M.; JOHANSSON, B. Characterization of DNA Damage in Yeast Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide, Acetic Acid, and Hyperosmotic Shock. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 10, p. 4584–4591, out. 2006.

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

ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 753–775, 2017.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, p. 1–20, 2016.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 5, 2014.

RUIZ-HERRERA, J. et al. Structural organization of the components of the cell wall from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 140, n. 7, p. 1513–1523, jul. 1994.

SAGARAM, U. S. et al. Structure-activity determinants in antifungal plant defensins *msdef1* and *mtdef4* with different modes of action against *Fusarium graminearum*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

SEGURA, A. et al. Snakin-1, a Peptide from Potato that is Active Against Plant Pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 1, p. 16–23, jan. 1999.

SCHRADER-FISCHER, G.; APEL, K. Organ-specific expression of highly divergent thionin variants that are distinct from the seed-specific crambin in the crucifer *Crambe abyssinica*. **Mol Gen Genet**, v. 245, p. 380–389, 1994.

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

SELS, J. et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941–950, 2008.

SHABIR, U. et al. Fish antimicrobial peptides (AMP's) as essential and promising molecular therapeutic agents: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 50–56, 2018.

SHAFEE, T. M. A. et al. The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 9, p. 2345–2356, 2016.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539–539, abr. 2014.

SIGNORINI, T. et al. Diversidade genética de espécies de *Capsicum* com base em dados de isozimas. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 534–539, 2013.

SILVA, O. N. et al. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: From natural screenings to biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1–14, nov. 2011.

SINGH, S. et al. Oxidative DNA damage by capsaicin and dihydrocapsaicin in the presence of Cu(II). **Cancer Letters**, v. 169, n. 2, p. 139–146, ago. 2001.

SITARAM, N. Antimicrobial Peptides with Unusual Amino Acid Compositions and Unusual

Structures. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 679–696, mar. 2006.

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

SOARES, J. R. et al. Interaction between the plant *ApDef1* defensin and *Saccharomyces cerevisiae* results in yeast death through a cell cycle- and caspase-dependent process occurring via uncontrolled oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 1, p. 3429–3443, 2017.

SOARES, J. R. et al. Antimicrobial Peptides from *Adenantha pavonina* L. Seeds: Characterization and Antifungal Activity. **Protein & Peptide Letters**, v. 19, n. 5, p. 520–529, abr. 2012.

SOUZA, G. S. et al. The toxic effect of Vu -Defr, a defensin from *Vigna unguiculata* seeds, on *Leishmania amazonensis* is associated with reactive oxygen species production, mitochondrial dysfunction, and plasma membrane perturbation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 455–464, 2018.

STEC, B. Plant thionins – the structural perspective. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 12, p. 1370–1385, 22 jun. 2006.

STEFFEN, H. et al. Naturally Processed Dermcidin-Derived Peptides Do Not Permeabilize Bacterial Membranes and Kill Microorganisms Irrespective of Their Charge. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2608–2620, ago. 2006.

STOTZ, H. U.; THOMSON, J. G.; WANG, Y. Plant defensins: defense, development and application. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 11, p. 1010–1012, 2009.

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

TAILOR, R. H. et al. A Novel Family of Small Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Seed of *Impatiens balsamina* is Derived from a Single Precursor Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 39, p. 24480–24487, set. 1997.

TAVARES, L. et al. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. **Peptides**, v. 29, p. 1842–1851, 2008.

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

TAVEIRA, G. B. et al. Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: Mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species Applied microbiology. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2016.

TERRAS, F. R. G. et al. Analysis of Two Novel Classes of Plant Antifungal Proteins from Radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 15301–15309, 1992.

THEVISSSEN, K. et al. Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. **Peptides**, v. 26, n. 7, p. 1113–1119, jul. 2005.

THEVISSSEN, K. et al. Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 6, p. 3900–3905, 2004.

THEVISSSEN, K.; TERRAS, F. R. G.; BROEKAERT, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5451–5458, 1999.

THEVISSSEN, K. et al. Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. v. 271, n. 25, p. 15018–15025, 1996.

VERMELHO, A.B. et al. **Práticas de Microbiologia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Guarabara Koogan. 2006. 256p.

VIEIRA, M. E. B. et al. Isolation, characterization and mechanism of action of an antimicrobial peptide from *Lecythis pisonis* seeds with inhibitory activity against *Candida albicans*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 47, n. 9, p. 716–729, 2015.

WANG, S. et al. N-Terminal Deletion of Peptide:N-Glycanase Results in Enhanced Deglycosylation Activity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. 1-8, dez. 2009.

WEIDMANN, J.; CRAIK, D. J. Discovery, structure, function, and applications of cyclotides: circular proteins from plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 16, p. 4801–4812, ago. 2016.

WHITE, A. M.; CRAIK, D. J. Discovery and optimization of peptide macrocycles. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, n. 12, p. 1151–1163, dez. 2016.

WONG, J. H.; NG, T. B. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. **Peptides**, v. 26, n. 7, p. 1120–1126, jul. 2005a.

WONG, J. H.; NG, T. B. Vulgarinin, a broad-spectrum antifungal peptide from haricot beans (*Phaseolus vulgaris*). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 8, p. 1626–1632, ago. 2005b.

WU, X. et al. An antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* cv. ‘Cloud Bean’. **Phytomedicine**, v. 18, n. 2–3, p. 104–109, jan. 2011.

YE, X.; NG, T. B. Hypogin, a novel antifungal peptide from peanuts with sequence similarity to peanut allergen. **Journal of Peptide Research**, v. 57, n. 4, p. 330–336, abr. 2001.

YEAMAN, M. R.; BÜTTNER, S.; THEVISSSEN, K. Regulated Cell Death as a Therapeutic Target for Novel Antifungal Peptides and Biologics. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–20, 2018.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389–395, jan. 2002.

ZHU, S.; GAO, B.; TYTGAT, J. Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CS $\alpha\beta$ superfamily. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 19–20, p. 2257–2269, out. 2005.

ZIGLIO, A. C. **Uso da capsaicina como preservante de madeiras ao ataque de fungo apodrecedor**. São Carlos: Universidade de São Paulo, 20 jul. 2010. Dissertação de Mestrado

ZOTTICH, U. et al. An antifungal peptide from *Coffea canephora* seeds with sequence homology to glycine-rich proteins exerts membrane permeabilization and nuclear localization in fungi. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3509–3516, jun. 2013.

ZOTTICH, U. et al. Biochimica et Biophysica Acta Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. **BBA - General Subjects**, v. 1810, n. 4, p. 375–383, 2011.