

**CaThi, PEPTÍDEO SIMILAR A TIONINA DE FRUTOS DE *Capsicum
annuum* L.: CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
SINERGÍSTICA E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE FUNGOS**

GABRIEL BONAN TAVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY

RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL 2016

CaThi, PEPTÍDEO SIMILAR A TIONINA DE FRUTOS DE *Capsicum annuum* L.: CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SINERGÍSTICA E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE FUNGOS

GABRIEL BONAN TAVEIRA

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

640 / 2016

Taveira, Gabriel Bonan

CaThi, peptídeo similar a tionina de frutos de *Capsicum annum* L.:
caracterização, atividade antimicrobiana e sinérgica e mecanismo de
ação sobre fungos / Gabriel Bonan Taveira. – Campos dos Goytacazes, 2016.
xiv, 125, [2] f. : il.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e
Biotecnologia. Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos.

Área de concentração: Biologia celular

Orientador: Gomes, Valdirene Moreira

Bibliografia: f. 102-125

1. Peptídeos antimicrobianos 2. Peptídeo similar a tionina 3. Atividade
antifúngica 4. Mecanismo de ação 5. Sinérgico I. Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro II. Título

571.6

T223c

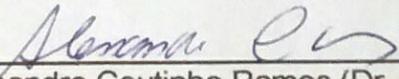
CaThi, PEPTÍDEO SIMILAR A TIONINA DE FRUTOS DE *Capsicum annuum* L.: CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SINERGÍSTICA E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE FUNGOS

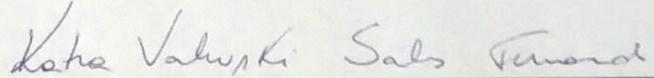
GABRIEL BONAN TAVEIRA

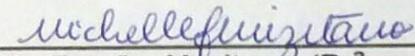
Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

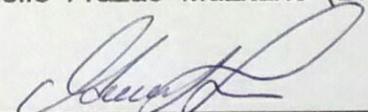
Aprovada em 28 de abril de 2016.

Comissão Examinadora:


Prof.^o Alessandro Coutinho Ramos (Dr. em Produção Vegetal) – UENF


Prof.^a Kátia Valevski Sales Fernandes (Dr.^a em Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas) – UENF


Prof.^a Michelle Frazão Muzitano (Dr.^a em Química de Produtos Naturais) – UFRJ


Prof.^a Valdirene Moreira Gomes (Dr.^a em Ciências) – UENF (Orientadora)

Aos meus pais Alexandre e Ana Regina, aos meus irmãos Júlio e Cláudia e ao meu sobrinho Antônio por sempre apoiarem minhas decisões, por sonharem o meu sonho junto comigo, por nunca medirem esforços para me ajudar a cada etapa da minha vida, dedico.

ABREVIATURAS	XI
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	XII
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Peptídeos Antimicrobianos	1
1.2. Peptídeos Antimicrobianos de Plantas	4
1.3. Tioninas	9
1.3.1. Classificação das Tioninas	10
1.3.2. Atividades <i>in vitro</i> e Mecanismo de Ação das Tioninas	12
1.4. Fungos de Importância Agrícola e Médica	14
1.4.1. Fitopatógenos do Gênero <i>Fusarium</i>	14
1.4.2. <i>Candida</i> sp: um Problema Emergente	16
1.5. Fluconazol	18
1.6. As Pimentas do Gênero <i>Capsicum</i>	20
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Materiais Biológicos	25
3.1.1. Plantas de <i>Capsicum annuum</i>	25
3.1.2. Microrganismos	25
PARTE I: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO DA FRAÇÃO F1 DE FRUTOS DE <i>C. annuum</i>	26
I.3.1. Extração Proteica	26
I.3.2. Cromatografia de Fase Reversa em HPLC para a Obtenção da Fração F1	26
I.3.3. Quantificação de Proteínas	27
I.3.4. Eletroforese em Gel de Tricina na Presença de SDS	27
I.3.4.1. Preparo da Amostra e Condição de Corrida	27
I.3.4.2. Coloração e Descoloração do Gel	28
I.3.5. Caracterização por Sequenciamento N-Terminal do Peptídeo	28
I.3.5.1. Preparo da Amostra para Sequenciamento	28
I.3.5.2. Eletrotransferência do Peptídeo para Sequenciamento e Análise	28

PARTE II: ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA Fração F1 SOBRE LEVEDURAS PATOGÊNICAS	29
II.3.1. Análise da Inibição do Crescimento das Células de Leveduras	29
II.3.2. Efeito da Fração F1 sobre a Permeabilização de Membranas de Leveduras	30
II.3.3. Determinação da Concentração da Fração F1 para se ter 50 % de Inibição do Crescimento sobre as Leveduras do Gênero <i>Candida</i>	31
II.3.4. Análise de Viabilidade Celular	31
II.3.5. Efeito da Fração F1 sobre a Permeabilização de Membranas de Leveduras do Gênero <i>Candida</i>	32
II.3.6. Ensaio de Determinação da Indução de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular	32
II.3.7. Ensaio de Determinação da Funcionalidade Mitocondrial	33
II.3.8. Detecção da Atividade de Caspases induzida pela Fração F1 em Células de <i>C. tropicalis</i>	33
II.3.9. Ensaio para a Verificação da Externalização de Fosfatidilserina em Células de <i>S. cerevisiae</i> na Presença da Fração F1	34
II.3.9.1. Preparo da Levedura para Obtenção de Esferoplastos	34
II.3.9.2. Detecção da Externalização de Fosfatidilserina	35
II.3.10. Localização da Fração F1 Conjugada ao FITC por Microscopia Óptica	36
II.3.11. Análise Eletroforética da Mobilidade do DNA na Presença da Fração F1	36
II.3.12. Verificação do Fluxo de H ⁺ Utilizando o Sistema de Eletrodos Vibráteis Íons-Seletivos	37
II.3.13. Ensaio de Combinação do Fluconazol com a Fração F1 para a Verificação de Efeito Sinérgico	39
II.3.14. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
PARTE III: ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA FRAÇÃO F1 SOBRE O FUNGO <i>Fusarium solani</i>	40
III.3.1. Obtenção de Esporos de Fungos Filamentosos e Verificação de Viabilidade	40
III.3.2. Análise da Inibição da Germinação dos Esporos Fúngicos na Presença da Fração F1	41
III.3.3. Efeito da Fração F1 sobre a Permeabilização de Membranas de <i>F. solani</i>	41
III.3.4. Detecção de H ₂ O ₂ em Esporos de <i>F. solani</i> após Tratamento com a Fração F1	41
III.3.5. Localização da Fração F1 Conjugada ao FITC por Microscopia Óptica	42
III.3.6. Ensaio de Combinação do FLC com a Fração F1 para a Verificação do	42

Efeito Sinérgico em <i>F. solani</i>	
III.3.7. Viabilidade Celular das Células Tratadas com a Combinação de FLC e a Fração F1	42
4. RESULTADOS	43
PARTE I: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO F1	43
I.4.1. Perfil Eletroforético da Fração F/0-70 de Frutos de <i>C. annuum</i>	43
I.4.2. Cromatografia de Fase Reversa em HPLC e Obtenção da Fração F1	44
I.4.3. Perfil Eletroforético da Fração F1	45
I.4.4. Análise da Sequência de Aminoácidos da Fração F1	46
PARTE II: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA CaThi SOBRE LEVEDURAS	48
II.4.1. Ensaio de Inibição do Crescimento contra Leveduras na Presença da CaThi	48
II.4.2. Efeito da CaThi sobre a Permeabilização de Membranas de Leveduras	50
II.4.3. Determinação do IC ₅₀ de CaThi sobre Leveduras	51
II.4.4. Efeito da CaThi sobre a Viabilidade Celular de Leveduras	53
II.4.5. Efeito de CaThi sobre a Permeabilização de Membranas de Leveduras	55
II.4.6. Efeito da CaThi sobre o Aumento da Produção Endógena de ROS em Leveduras	58
II.4.7. Análise da Funcionalidade Mitocondrial em Células da Levedura <i>S. cerevisiae</i> Tratada com CaThi	60
II.4.8. Detecção da Atividade de Caspases em Células de <i>C. tropicalis</i> Induzida por CaThi	62
II.4.9. Verificação da Translocação da Fosfatidilserina Induzida em Células da Levedura <i>S. cerevisiae</i> pela CaThi	63
II.4.10. Localização de CaThi nas Células de Leveduras	65
II.4.11. Ensaio de Verificação da Mudança de Mobilidade Eletroforética do DNA	67
II.4.12. Análise de Fluxo de H ⁺ Utilizando o Sistema de Eletrodos Vibráteis Íons-Seletivos	68
II.4.13. Atividade Sinérgica da Combinação do FLC com CaThi sobre Diferentes Células de Levedura do Gênero <i>Candida</i>	71
II.4.14. Alterações Morfológicas do FLC, CaThi e FLC + CaThi no Crescimento das Leveduras do Gênero <i>Candida</i>	75
PARTE III: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA CaThi SOBRE O FUNGO <i>Fusarium solani</i>	78

III.4.1. Análise da Atividade Antimicrobiana da CaThi contra Células de <i>Fusarium solani</i>	78
III.4.2. Efeito da CaThi sobre a Permeabilização de Membranas de <i>F. solani</i>	80
III.4.3. Detecção da Indução de H ₂ O ₂ em Esporos de <i>F. solani</i> após Tratamento com CaThi	82
III.4.4. Localização de CaThi nas Células de <i>F. solani</i>	83
III.4.5. Atividade Sinérgica da Combinação do FLC com CaThi contra Células de <i>F. solani</i>	86
III.4.6. Alterações Morfológicas e Teste da Viabilidade Celular do Fungo <i>F. solani</i> Proveniente do Ensaio de Sinérgismo	87
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÕES	101
7. REFERÊNCIAS	102
ANEXO I. Thionin-like Peptide From <i>Capsicum annuum</i> Fruits With High Activity Against Human Pathogenic Bacteria and Yeasts (Peptide Science).	
ANEXO II. Thionin-like peptide from <i>Capsicum annuum</i> fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against <i>Candida</i> species (BMC Microbiology).	

ABREVIATURAS

ABC	do inglês, <i>ATP-binding cassette transporters</i>
AMPs	do inglês, <i>antimicrobial peptides</i>
CaThi	do inglês, <i>Capsicum annuum thionin-like peptide</i>
CDR	do inglês, <i>Candida drug resistance</i>
DAF ₂ DA	3,4-diaminometil-2',7'-difluoresceína diacetato
DAPI	do inglês, <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DIC	do inglês, <i>differential interference contrast</i>
DMSO	do inglês <i>dimethyl sulfoxide</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
F1	fração F1 proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C2C18 a partir da fração F/0-70 obtida dos frutos maduros de <i>C. annuum</i>
FLC	fluconazol
FITC	do inglês, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
F/0-70	fração precipitada com 70% de sulfato de amônio
HPLC	do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>
H ₂ DCFDA	2',7' diclorofluoresceína diacetato
IC ₅₀	do inglês <i>inhibitory concentration that diminishes a specified response to 50%</i>
kDa	quilodaltons
LTPs	do inglês <i>lipid transfer proteins</i>
MDR	do inglês, <i>multidrug resistance</i>
MSF	do inglês, <i>major facilitator superfamily</i>
NO	do inglês, <i>nitric oxide</i>
PBS	do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>
PDB	do inglês, <i>protein database</i>
PMSF	do inglês <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
PS	fosfatidilserina
PVDF	fluoreto de polivinilideno
ROS	do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEMED	N, N", N"', N''''-tetrametiletlenodiamino
TFA	do inglês <i>trifluoroacetic acid</i>
Tris	Tris (hidroximetil) amino etano
YPD	do inglês, <i>yeast peptone dextrose</i>
Z-VAD-FMK	do inglês, <i>carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethyl ketona</i>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1:** Representação esquemática das principais classes estruturais de peptídeos incluindo: α -hélices, β -folhas, mistura de α -hélices/ β -folhas, cíclicos e lineares. As pontes dissulfeto, nos AMPs que as possuem, são representadas pelas bolas interligadas. Entre parênteses é apresentado o nome do AMP (Adaptada de Silva *et al.*, 2011). **2**
- Figura 2:** Representação esquemática dos mecanismos de permeabilização de membrana propostos para os peptídeos antimicrobianos e membranas de bactérias. A) Modelo aduela de barril; B) Poro toroidal; C) Modelo balsa; D) Modelo tapete; E) Eletroporação molecular (Adaptado de Nguyen *et al.*, 2011). **4**
- Figura 3:** Representação esquemática da estrutura tridimensional de uma tionina representada pela viscotoxina A3 isolada de *V. album* mostrando os elementos da estrutura secundária (cinza) e as pontes dissulfeto (amarelo). PDB ID: 1ED0, Software mmdb. **12**
- Figura 4:** Representação esquemática do modo de ação dos azóis. Os azóis, tais como o fluconazol, inibem *ERG11p*, causando o bloqueio da produção de ergosterol e levando ao acúmulo de um esteroide intermediário tóxico para as células fúngicas (adaptado de Cowen, 2008). **19**
- Figura 5:** Visualização eletroforética por gel de tricina, na presença de SDS, da fração F/0-70 obtida de frutos maduros de *C. annuum* tratada com β -mercaptoetanol. (M) marcador de massa molecular (Da), (F/0-70) fração obtida após fracionamento com sulfato de amônio (0-70% saturação) e aquecimento (80 °C) do extrato proteico bruto de frutos de *C. annuum*. **43**
- Figura 6:** Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 da fração F/0-70 obtida dos frutos maduros de *C. annuum*. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida realizada com 0,1% de TFA (Solvente A) e a amostra eluída usando um gradiente de propanol. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL.min⁻¹. F1 a F7, picos retidos na coluna e eluídos em gradiente de propanol. **44**
- Figura 7:** Visualização eletroforética por gel de tricina, na presença de SDS, da fração F1 tratada com β -mercaptoetanol, obtida através do fracionamento da fração F/0-70, de *C. annuum* por cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna C2/C18. (M) marcador de massa molecular (Da). (F1) fração F1, pico retido e eluídos em gradiente de propanol proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em HPLC. **45**
- Figura 8:** Alinhamento dos 33 resíduos de aminoácidos obtidos do peptídeo de 7 kDa da fração F1 com as seguintes sequências de peptídeos similares às tioninas: *C. annuum*

thionin-like peptide (1) (gi: 164698852); *C. annuum thionin-like peptide* (2) (gi: 6552502); *C. annuum γ-thionin 1* (gi: 6601331). Os resíduos de Cys conservados estão destacados dentro de caixas. 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. A partir deste resultado o peptídeo de 7 kD será denominado de CaThi (do inglês *Capsicum annuum thionin-like peptide*). **47**

Figura 9: Inibição do crescimento das células das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis* na ausência de CaThi (controle) e na presença de 100 µg.mL⁻¹ de CaThi. **49**

Figura 10: Células de leveduras, após ensaio de permeabilização da membrana, visualizadas por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente Sytox green. As células foram tratadas com 50 µg.mL⁻¹ de CaThi durante 24 h e em seguida, analisadas quanto a permeabilização da membrana. As células controle foram tratadas apenas com sonda Sytox green. Barras de 10 µm. **50**

Figura 11: Inibição do crescimento das células das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis* e *C. mogii* na ausência de CaThi (controle) e na presença de diferentes concentrações de CaThi (µg.mL⁻¹). A partir destes dados de inibição do crescimento em função da concentração da substância usada, foram determinadas as IC₅₀ para cada levedura. **52**

Figura 12: (A) Crescimento de colônias na condição controle e após o tratamento com CaThi na sua IC₅₀ durante 24 h, a partir das quais foram calculadas a viabilidade das células de leveduras. (B) Quantificação de células e de porcentagem de morte celular das leveduras, na condição controle e após o tratamento com a IC₅₀ da CaThi durante 24 h. (*) Indica a significância pelo teste T (P <0,05). Os experimentos foram realizados em triplicata. **54**

Figura 13: Diferentes células de leveduras após ensaio de permeabilização da membrana, visualizadas por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente Sytox green. As células foram tratadas com CaThi nas suas IC₅₀ durante 24 h e em seguida, analisadas

quanto a permeabilização da membrana. As células-controle foram tratadas apenas com sonda Sytox green. Barras de 5 μm . **56**

Figura 14: Diferentes células de leveduras após a ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente 2', 7' diacetato diclorofluoresceína (H_2DCFDA). As células foram tratadas com CaThi nas suas IC_{50} durante 24 h e em seguida, analisadas para detecção de ROS. As células controle foram tratadas apenas com sonda H_2DCFDA . Barras de 5 μm . **59**

Figura 15: Células de *C. tropicalis* após ensaio de funcionalidade mitocondrial, visualizadas por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente Rodamina 123. As células foram tratadas com 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CaThi durante 24 h e em seguida, analisadas quanto a funcionalidade mitocondrial. As células controle foram tratadas apenas com sonda Rodamina 123. Barras de 10 μm . **61**

Figura16: Atividade de caspase em células de *C tropicalis* após 24 h de incubação com 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CaThi . As células-controle e as células tratadas com CaThi foram incubadas com a sonda FITC-VAD-FMK e analisadas por microscopia de fluorescência. A fluorescência verde indica coloração positiva para a atividade da caspase. Barras de 10 μm . **62**

Figura 17: Esferoplastos de *S. cerevisiae* incubados durante 2 h com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CaThi e depois tratados com anexina V (AnnV) e iodeto de propídio (PI), mostrando a exposição de fosfatidilserina para a monocamada externa (fluorescência verde). Controle (esferoplastos em meio de ensaio) é AnnV^- e PI^- , H_2O_2 (esferoplastos tratados com H_2O_2) são AnnV^+ e PI^- , células mortas por calor (esferoplastos tratados a 100 $^\circ\text{C}$) são AnnV^- e PI^+ (fluorescência vermelha). Barras de 5 μm . **64**

Figura 18: Células de *C. albicans* e *C tropicalis* incubadas por 24 h com 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CaThi -FITC (setas abertas) visualizadas por microscopia de fluorescência. Os núcleos foram marcados por DAPI (setas cheias), após o período de incubação com CaThi -FITC. Sobreposição das imagens de marcações com DAPI e FITC (note a sobreposição da marcação verde [CaThi -FITC] e azul [DAPI] setas pontilhadas) indicam a localização nuclear de CaThi -FITC. Barras de 20 μm . (*) Indica a posição do aumento digital. **66**

Figura 19: Visualização eletroforética da mobilidade do DNA extraído de *S. cerevisiae* na presença de CaThi em gel de agarose 0,8%. Primeira raia, controle, mobilidade de 100 ng de DNA; Segunda raia, mobilidade de 100 ng DNA incubados com 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CaThi ; Terceira raia, controle positivo, mobilidade de 100 ng de DNA incubados 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de poli-L-lisina. **67**

Figura 20: Efeito dose-resposta de CaThi sobre a taxa de efluxo de H⁺ extracelular na levedura *C. tropicalis*. Os dados foram analisados por One-Way ANOVA combinado com teste Tukey's. As médias com a mesma letra não possuem diferenças significantes pelo teste Tukey's ($p \leq 0.05$). **69**

Figura 21: Diferença de voltagem (A), taxa de efluxo de H⁺ (B) e pH da superfície (C) nas células de levedura *C. tropicalis* tratados ou não (controle) com 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi. Para os dados de efluxo de H⁺ e pH da superfície, as médias são significativamente diferentes pelo Student T-test ($p \leq 0.01$). Ref representa o *background* de referência. **70**

Figura 22: Inibição do crescimento das células das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis* e *C. mogii* na ausência de FLC (controle) e na presença de diferentes concentrações de FLC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). A partir destes dados de inibição do crescimento em função da concentração da substância usada, foram determinadas as IC₅₀ para cada levedura. **72**

Figura 23: Células das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis* e *C. mogii* por DIC após o ensaio de inibição de crescimento na presença de FLC, CaThi e FLC + CaThi. Barras de 5 μm . **76**

Figura 24: Células das leveduras *C. pelliculosa* e *C. buinensis* visualizadas por microscopia eletrônica de varredura após o ensaio de inibição de crescimento. Seta cheia (formação de pseudohifas); seta aberta (aglomeração de células); asterisco (material amorfo). Barras de 10 μm . **77**

Figura 25: Inibição do crescimento do fungo *F. solani* tratado com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi durante 60 h de incubação. Controle - células crescidas na ausência de CaThi. **78**

Figura 26: Células de *F. solani* visualizadas por microscopia de campo claro após 12, 24, 48 e 60 h de incubação com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi. Barras de 20 μm . **79**

Figura 27: Células de *F. solani* após ensaio de permeabilização da membrana, visualizadas por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente Sytox green. As células foram tratadas com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com CaThi por 12, 24, 48 e 60 h de incubação e em seguida, analisadas quanto à permeabilização da membrana. Barras de 20 μm . **81**

Figura 28: Produção endógena de H₂O₂ dos esporos de *F. solani* através da análise de precipitação com DAB que precipitou no local da produção de H₂O₂ formando uma área escura nos esporos. Esporos tratados com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi em diferentes tempos de

incubação (10, 20, 30, 40, 50 e 60 min). H₂O₂ foi utilizado como controle positivo e água como controle negativo. Barras de 10 µm. **82**

Figura 29: Células de *F. solani* incubadas por 60 h com 20 µg.mL⁻¹ de CaThi-FITC por microscopia de fluorescência. Os núcleos foram marcados DAPI, após o período de incubação com CaThi-FITC. Barras de 50 µm **84**

Figura 30: Inibição do crescimento das células de *F. solani* na presença de CaThi, FLC, e CaThi + FLC durante 60 h de incubação. Controle - células crescidas na ausência de FLC e CaThi. **86**

Figura 31: (A) Células de *F. solani* visualizadas por microscopia de campo claro do fungo na presença de FLC e CaThi sozinhos e após o ensaio de sinergismo. Barra de 20 µm. (B) Viabilidade de células do fungo após o tratamento com FLC (25 µg.mL⁻¹) + CaThi (5 µg.mL⁻¹) durante 60 h. Controle - células crescidas na ausência de FLC e CaThi. **88**

Figura 32: Representação esquemática dos principais resultados acerca do mecanismo de ação de CaThi com células de fungos, levando o microrganismo à morte. (→, entrada), (|→, bloqueio), (—, associado com), (↪, externalização de PS) (└┘, conjunto de eventos que levam à morte celular), PS, fosfatidilserina, ROS, espécies reativas de oxigênio, H⁺, prótons. **100**

Tabela 1: Famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas incluindo: classificação, características estruturais, banco de dados e número de pontes dissulfeto. PDB¹ refere-se ao *Protein Database* e, PD² ao número de pontes dissulfeto (Adaptada de Benko-Iseppon *et al.*, 2010). **6**

Tabela 2: IC₅₀* (µg.mL⁻¹) do CaThi contra diferentes espécies de *Candida*. **53**

Tabela 3: Porcentagem de células de leveduras fluorescentes após tratamento com CaThi. **57**

Tabela 4: IC₅₀* (µg.mL⁻¹) do FLC contra diferentes espécies de *Candida*. **73**

Tabela 5: Porcentagem de inibição da CaThi e FLC sozinhos e em combinação mostrando o efeito sinérgico contra células de leveduras *in vitro*. **74**

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar um peptídeo presente na fração F1 que foi previamente isolado de frutos de pimenta (*Capsicum annuum*), e estudar sua atividade antimicrobiana e sinérgica com a droga fluconazol, além de caracterizar o seu mecanismo de ação sobre células fúngicas. O peptídeo de 7 kDa da fração F1 foi submetido ao sequenciamento de aminoácidos N-terminal por degradação de Edman. Este também foi submetido a ensaios de atividade antimicrobiana sobre *Saccharomyces cerevisiae*, seis espécies de *Candida* e *Fusarium solani*. Para as seis espécies de *Candida* testadas, a IC₅₀ foi também determinada. Ensaios de viabilidade e de permeabilização da membrana plasmática, de análise da produção endógena de ROS, de funcionalidade mitocondrial, de ativação de caspase, de translocação da fosfatidilserina, localização por fluorescência do peptídeo de 7 kDa, e o efeito da combinação do peptídeo com o fluconazol também foram investigados em células de fungos. A estrutura parcial primária do peptídeo de 7 kDa a partir da fração F1 apresentou semelhança com peptídeos similares à tionina e, por esta razão o peptídeo foi nomeado CaThi (*Capsicum annuum* tionina-like peptide). CaThi teve uma forte atividade antimicrobiana sobre seis espécies de *Candida* patogênicas, com IC₅₀ variando de 10 a 40 µg.mL⁻¹. A atividade antimicrobiana de CaThi sobre as espécies de *Candida* foi candidacida; para as células de *F. solani*, 50 µg.mL⁻¹ foi capaz de inibir em 83% o desenvolvimento do fungo. Além disso, CaThi causou permeabilização da membrana plasmática de todos os fungos testados e induziu estresse oxidativo apenas em *C. tropicalis* e *F. solani*. Em *S. cerevisiae* CaThi causou translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. Observou-se que CaThi foi capaz de causar a dissipação do potencial da membrana mitocondrial, ativação de caspases e alteração do fluxo de H⁺ em células de *C. tropicalis*. CaThi foi encontrada no citoplasma de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *F. solani*, e adicionalmente foi localizada no núcleo de *C. tropicalis*, sugerindo um possível alvo nuclear. CaThi agiu sinérgicamente com fluconazol e inibiu todas as leveduras testadas, atingindo 100% de inibição em *C. parapsilosis* e *F. solani*, com concentrações inferiores ao IC₅₀. Os resultados aqui relatados podem vir a contribuir para os esforços futuros com o objetivo de empregar este AMP derivado de plantas como novas substâncias terapêuticas e pesticidas.

ABSTRACT

This work had the aim of characterizing one peptide presented in the F1 fraction which was previously isolated from pepper fruits (*Capsicum annuum*) and to study its antimicrobial and synergistic activity with the Fluconazole drug as well as to characterize its mechanism of action against fungal cells. The 7 kDa peptide of F1 fraction was submitted to N-terminal amino acid sequence by Edman degradation. It was also submitted to antimicrobial activity assays against *Saccharomyces cerevisiae*, six *Candida* species and *Fusarium solani*. For the six *Candida* species tested, the IC₅₀ was also determined. Viability and plasma membrane permeabilization assays, analysis of endogenous ROS production, mitochondrial functionality, caspase activation, phosphatidylserine membrane leaflet translocation, the 7 kDa peptide localization, and the combination effect of the 7 kDa plus fluconazole were also investigated in fungi cells. The partial primary structure of the 7 kDa peptide from fraction F1 presented similarity with thionin-like peptides and for this reason this peptide was named CaThi (*Capsicum annuum* thionin-like peptide). CaThi had strong antimicrobial activity against six tested pathogenic *Candida* species, with IC₅₀ ranging from 10 to 40 µg.mL⁻¹. CaThi antimicrobial activity on *Candida* species was candidacidal; for *F. solani* cells, 50 µg.mL⁻¹ was able to inhibit 83% the development of this fungus. Moreover, CaThi caused plasma membrane permeabilization in all fungi tested and induces oxidative stresses only in *Candida tropicalis* and *F. solani*. In *S. cerevisiae*, CaThi caused phosphatidylserine externalization of the inner leaflet to the outer leaflet of the cell membrane. We observed that CaThi, was able to cause dissipation of mitochondrial membrane potential, caspase activation and altered H⁺ flux in *C. tropicalis* cells. CaThi was localized in the cytoplasm of *C. albicans*, *C. tropicalis* and *F. solani*, and it was additionally localized in nuclei in *C. tropicalis*, suggesting a possible nuclear target. CaThi acted synergistically with fluconazole inhibiting all tested yeasts, reaching 100% inhibition in *C. parapsilosis* and *F. solani*, with concentrations below their IC₅₀. The results reported herein may ultimately contribute to future efforts aiming to employ this plant-derived AMP as a new therapeutic and pesticide substance.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são moléculas comuns do sistema de defesa imune de praticamente todas as formas de vida, com representantes em organismos que variam desde bactérias, plantas, peixes, aves, anfíbios, insetos, mamíferos e até mesmo vírus (Zasloff, 2002; Silva *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2012). Estes participam de um antigo sistema de defesa, a imunidade inata, que é o principal mecanismo de resposta para a maioria dos organismos vivos durante os estágios iniciais de uma infecção (Brown e Hancock, 2006; Porto *et al.*, 2012). Estes peptídeos geralmente exibem uma ampla gama de atividade inibitória a qual inclui vírus, bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, insetos e outros (Berrocal-Lobo *et al.*, 2009; Silva e Machado, 2012). Os AMPs podem ser expressos constitutivamente ou induzidos em resposta à exposição a microrganismos invasores (Bowdish *et al.*, 2005).

Os AMPs apresentam aproximadamente de 12 a 100 resíduos de aminoácidos, massa molecular inferior a 10 kDa, possuem de 2 a 9 resíduos de lisina ou arginina carregados positivamente que conferem uma carga líquida positiva em pH fisiológico (Van't Hof *et al.*, 2001; Lai e Gallo, 2009; Wu *et al.*, 2010). A presença de um grande número de resíduos de cisteínas (4, 6 ou 8) é uma importante característica desses peptídeos, sendo que estas se conectam aos pares formando pontes dissulfeto, o que confere a essas moléculas uma alta estabilidade a condições físico-químicas extremas (Broekaert *et al.*, 1997; Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

Esses peptídeos apresentam uma estrutura tridimensional bastante variada, incluindo α -hélices (magainina, cecropina e catalicidina), folhas β (α -defensina 1 de humanos), uma combinação de α -hélices e folhas β (β -defensina 1 de humanos e defensinas de plantas) e podem ainda apresentar uma configuração cíclica (ciclotídeos) ou uma estrutura linear e com *loops* flexíveis (indolicidinas) (Figura 1) (Hancock *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2011).

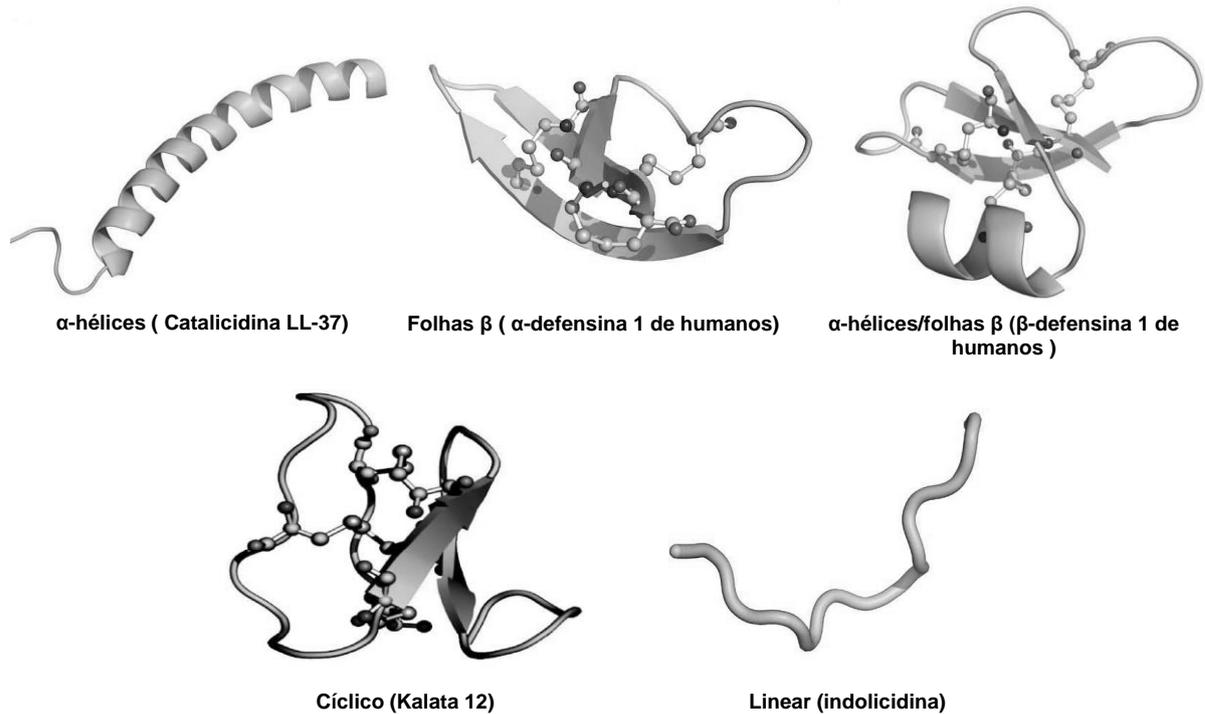


Figura 1: Representação esquemática das principais classes estruturais de peptídeos incluindo: α -hélices, β -folhas, mistura de α -hélices/ β -folhas, cíclicos e lineares. As pontes dissulfeto, nos AMPs que as possuem, são representadas pelas bolas interligadas. Entre parenteses é apresentado o nome do AMP (Adaptada de Silva *et al.*, 2011).

Os AMPs possuem um mecanismo de ação que ainda não é completamente conhecido. Contudo, de uma forma geral, se observa que AMPs carregados positivamente podem agir diretamente sobre membranas celulares, negativamente carregadas (Brogden, 2005). Vários modelos para a permeabilização da membrana pelos AMPs já foram descritos, incluindo a formação dos poros (tipo aduela de barril ou poro toroidal), estreitamento de membrana (modelos balsas ou eletroporação molecular) e micelização com um efeito detergente (modelo tapete). Após esse primeiro contato, seguido da permeabilização, pode ocorrer o acesso dos AMPs ao espaço intracelular, seguido do extravasamento de diferentes íons e outros metabólitos, perda de componentes citoplasmáticos, dissipação de potenciais de membrana e por fim a morte celular. Esses efeitos podem explicar a ação lítica de alguns AMPs sobre patógenos (Brogden, 2005; Giuliani *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2012).

No modelo aduela de barril, os domínios hidrofóbicos do AMP interagem com os grupos acil dos fosfolipídeos de membrana, enquanto a porção hidrofílica do AMP forma o interior do poro. Este tipo de poro transmembranar é induzido por AMPs muito hidrofóbicos (Figura 2A) (Brogden, 2005; Teixeira *et al.*, 2012). No modelo poro toroidal, os AMPs se inserem na membrana de forma perpendicular, intercalados com os fosfolipídeos, provocando uma curvatura nesta através da ligação de sua face polar com a cabeça polar do lipídeo, o que forma o poro toroidal. Este tipo de poro é induzido por AMPs como as magaininas, protegrinas e melitina (Yeaman e Yount, 2003; Teixeira *et al.*, 2012) (Figura 2B). No modelo balsa, o AMP se liga à membrana, gerando uma massa desproporcional, que direciona a translocação do AMP pela mesma, produzindo uma curvatura (Figura 2C) (Pokorny *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2012). No modelo tapete, uma alta concentração de AMPs se liga paralelamente a membrana e desestabiliza sua estrutura fluida sem atravessar a bicamada, provocando ruptura e formando micelas (Figura 2D) (Yeaman e Yount, 2003; Teixeira *et al.*, 2012). No modelo de eletroporação molecular, os AMPs são capazes de gerar um campo elétrico externo, por sua densidade de carga, produzindo poros na membrana. Este mecanismo é particularmente importante para descrever a ação dos AMPs que apresentam atividade antimicrobiana sem a formação aparente de poros transmembranares, fornecendo uma nova visão para os meios pelos quais os AMPs aumentam a permeabilidade da membrana, sem necessariamente se inserirem na membrana para causar a sua ruptura (Figura 2E) (Teixeira *et al.*, 2012).

Embora a permeabilização da membrana celular seja um fator importante para a atividade antimicrobiana dos AMPs, vários estudos indicam que a permeabilização sozinha não é suficiente para explicar o amplo espectro de atividade antimicrobiana apresentado pelos AMPs (Jenssen *et al.*, 2006; Franco, 2011). Após a interação com a membrana, os AMPs podem disparar uma série de reações subsequentes como: indução de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*); inibição da síntese de proteínas, inibição da atividade mitocondrial e também podem disparar cascatas de sinalização que conduzem a apoptose (Yonezawa *et al.*, 1992; Boman *et al.*, 1993; Helmerhorst *et al.*, 1999; Aerts *et al.*, 2009; Carvalho e Gomes, 2009; Kulkarni *et al.*, 2009; Mello *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2012, Vieira *et al.*, 2015).

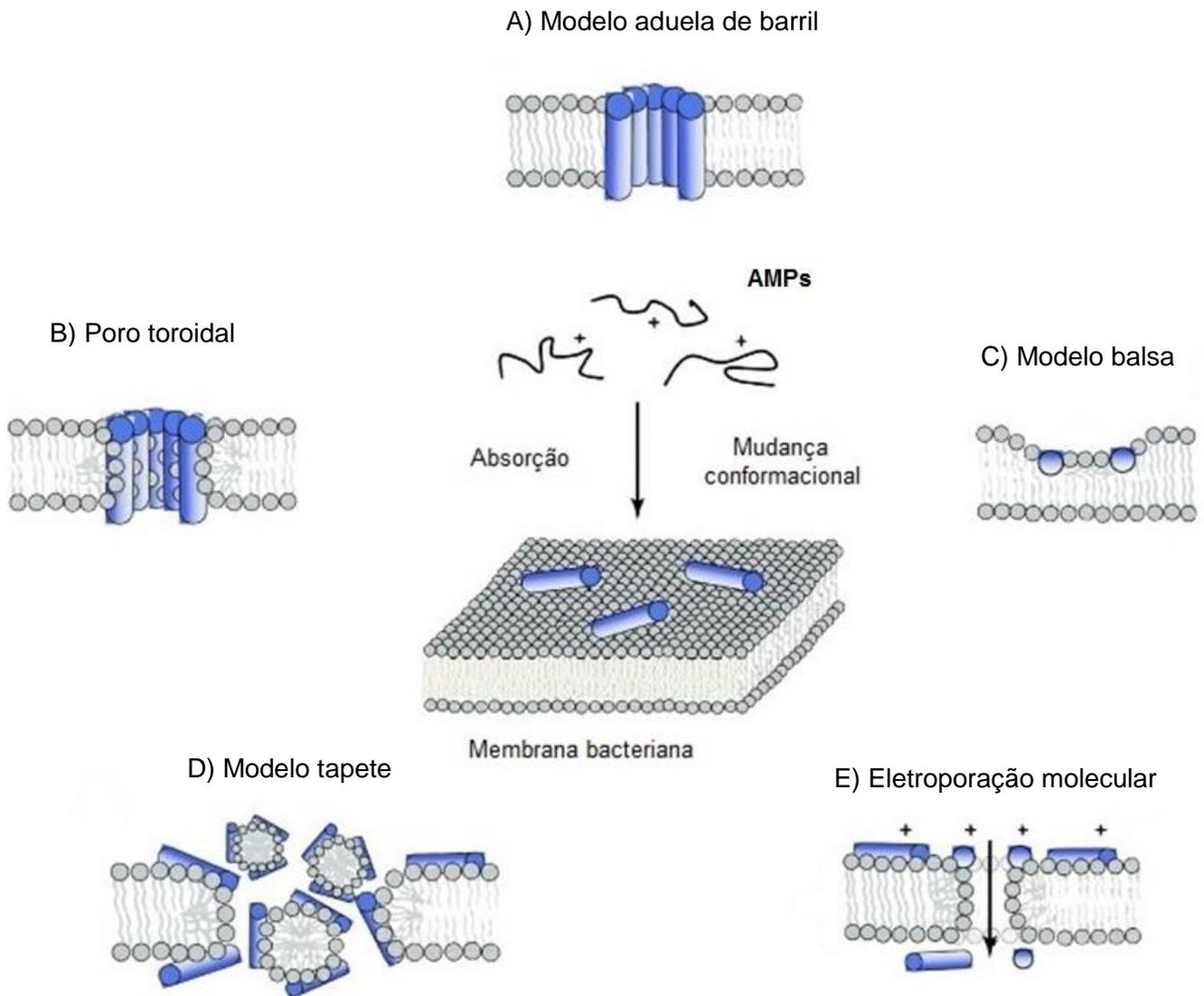


Figura 2: Representação esquemática dos mecanismos de permeabilização de membrana propostos para os peptídeos antimicrobianos e membranas de bactérias. A) Modelo aduela de barril; B) Poro toroidal; C) Modelo balsa; D) Modelo tapete; E) Eletroporação molecular (Adaptado de Nguyen *et al.*, 2011).

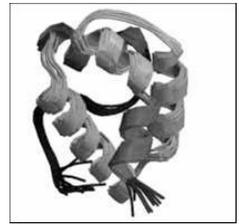
1.2. Peptídeos Antimicrobianos de Plantas

As plantas, por serem organismos sésseis, estão constantemente sujeitas a inúmeros fatores de estresses abióticos, como umidade, variações de temperatura e pH e a estresses bióticos como as infecções por vírus, bactérias e fungos, além de herbivoria, principalmente por insetos, durante todo seu ciclo de desenvolvimento

(Mithöfer e Boland, 2012). No entanto, ao longo do processo de evolução, diversas formas de defesa foram selecionadas pelas plantas, dentre elas a síntese de componentes com alta atividade antimicrobiana, que podem ser divididos segundo a sua natureza química em: metabólitos secundários (fitoalexinas e fitoanticipinas) e em polipeptídeos antimicrobianos, os quais são por sua vez subdivididos em dois grupos: polipeptídeos com massa molecular superior a 10 kDa e polipeptídeos com massa molecular inferior a 10 kDa, chamados de AMPs (Tulasi e Nadimpali, 1997; Wittstock e Gershenzon, 2002; Egorov e Odintsova, 2012).

AMPs de plantas compartilham das características gerais dos AMPs como carga global positiva, a presença de ligações dissulfeto e o fato de possuírem a membrana citoplasmática como principal alvo (Castro e Fontes, 2005). Os AMPs de plantas podem ser divididos levando-se em consideração as suas características estruturais (Tabela 1). Dentre eles, podem-se encontrar as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs, do inglês *lipid transfer proteins*), as quais inicialmente se acreditavam participar do transporte de lipídeos entre organelas; 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*), a primeira proteína cuja atividade contra patógenos de plantas foi detectada *in vitro*; os peptídeos tipo-heveína, descritos inicialmente como os peptídeos mais abundantes do látex de seringueiras (*Hevea brasiliensis*); os peptídeos tipo-knotina, isolados inicialmente de sementes de maravilha (*Mirabilis jalapa*); os peptídeos MBP-1, isolados de milho (*Zea mays*); pequenos peptídeos denominados Ib-AMPs, isolados de sementes de balsamina (*Impatiens balsamina*); os peptídeos circulares, conhecidos como ciclotídeos encontrados nas famílias das Rubiaceae e Violaceae e os inibidores de proteinases, isolados de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.) (Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

Tabela 1: Famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas incluindo: classificação, características estruturais, banco de dados e número de pontes dissulfeto. PDB¹ refere-se ao *Protein Database* e, PD² ao número de pontes dissulfeto (Adaptada de Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

FAMÍLIA	NOME	ESTRUTURA PROTEICA	PDB ¹	PD ²	REFERÊNCIA
Defensina de planta	<i>Rs-AFP2</i>		1AYJ	4	Terras <i>et al.</i> , 1992 Aerts <i>et al.</i> , 2007 Tavares <i>et al.</i> , 2008
α - e β -tioninas	α -1 purotionina		1BHP	4	Ohtani <i>et al.</i> , 1977
Tioninas	Crambina		1AB1	3	Schrander-Fischer e Apel, 1994
Proteína transportadora de lipídeos	<i>Ace-AMP1</i>		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	<i>Ace-AMP2</i>		1HEV	4	Broekaert <i>et al.</i> , 1992 Lipkin <i>et al.</i> , 2005
Knotina	<i>Mj-AMP1</i>		1DKC	3	Cammue <i>et al.</i> , 1992 García-Olmedo <i>et al.</i> , 2001
Macadamia	<i>MiAMP1</i>		1C01	3	Marcus <i>et al.</i> , 1997 McManus <i>et al.</i> , 1999 Stephens <i>et al.</i> , 2005

continuação...

Impatiens	<i>ib</i>-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	-	-	-	Bloch <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	-	-	-	Jennings <i>et al.</i>, 2001 Kamimori <i>et al.</i>, 2005 Sando <i>et al.</i>, 2011
Inibidores de proteinases	CaTi	-	-	-	Ribeiro <i>et al.</i>, 2007

De maneira geral, os AMPs de plantas apresentam um mecanismo de ação que envolve a interação com diferentes estruturas de membrana, levando à formação de canais iônicos, culminando no aumento da permeabilidade e podendo levar à morte celular (Giuliani *et al.*, 2007). Além de seu papel fundamental na proteção do hospedeiro, é importante utilizar essas moléculas como modelos de estudo a fim de se determinar seu exato mecanismo de ação antimicrobiano, devido à potencial atividade contra microrganismos patogênicos, incluindo aqueles que apresentam resistência a compostos antimicrobianos convencionais (Zaslhoff, 2002; Hammami *et al.*, 2009).

Apesar da grande variedade de AMPs de plantas, apenas três foram melhores caracterizados: as defensinas de plantas, as LTPs e as tioninas (Broekaert *et al.*, 1997; Egorov *et al.*, 2005; Carvalho e Gomes, 2007; 2009).

As defensinas de plantas são peptídeos pequenos (45 – 54 resíduos de aminoácidos) que apresentam massa molecular entre 5 e 8 kDa. São altamente básicos, ricos em cisteínas (oito resíduos) o que permite a formação de quatro pontes dissulfeto, e possuem atividade antimicrobiana em concentrações micromolares (Thevissen *et al.*, 2003a; Aerts *et al.*, 2008; Carvalho e Gomes, 2009). Foram primeiramente isoladas de sementes de trigo e cevada (Colilla *et al.*, 1990). Elas são ativas contra várias classes de fungos fitopatogênicos e também patógenos de humanos como, por exemplo, a levedura *Candida albicans* (Thevissen *et al.*, 2003b). Em relação ao modo de ação das defensinas de plantas, foi mostrado que elas induzem uma variedade de respostas na membrana fúngica, resultando na alteração do fluxo de Ca^{2+} e K^{+} e mudanças no potencial de membrana (Thevissen *et al.*, 1996; 1999; 2003b). Também já foi verificado que algumas defensinas necessitam de ligantes específicos (esfingolipídeos) na membrana alvo de leveduras (Thevissen *et al.*, 2004). Outras observações importantes foram a descoberta de que as defensinas induzem a produção endógena de ROS em células de *C. albicans* (Aerts *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2011) e que também o modo de ação pode estar relacionado com um alvo intracelular (Lobo *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2011).

As LTPs pertencem a outro grupo de AMPs de plantas bem caracterizado. Estes são peptídeos que podem ser agrupados em duas diferentes famílias. As LTPs do tipo 1 possuem uma massa molecular de aproximadamente 9 kDa, são básicas, possuem de 90 - 95 resíduos de aminoácidos e apresentam ponto isoelétrico entre 9 e 10. Já as LTPs do tipo 2 possuem uma massa molecular em torno de 7 kDa, e em geral apresentam em torno de 70 resíduos de aminoácidos e um alto ponto isoelétrico. Quatro pontes dissulfeto são conservadas em ambos os tipos de LTPs (Castro e Fontes, 2005; Carvalho e Gomes, 2007; Sels *et al.*, 2008). Muitas LTPs já foram isoladas de diferentes espécies de plantas e caracterizadas por possuírem atividade antifúngica *in vitro*, estando envolvidas no processo de inibição do crescimento de fungos e bactérias (Terras *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 1993; Carvalho e Gomes, 2007). Estudos têm demonstrado que as LTPs apresentam a capacidade de inibir o crescimento de muitos fitopatógenos como *Pseudomonas*

solanaceum, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Trichoderma viride* (Terras *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 2001; Carvalho e Gomes, 2007). O mecanismo de inibição do crescimento de microrganismos na presença deste peptídeo ainda não foi determinado, mas já foi visto que LTPs de sementes de girassol e pimentão são capazes de permeabilizar membranas fúngicas, quando visualizadas na presença do corante *Sytox green* (Regente *et al.*, 2005; Diz *et al.*, 2006). Esses dados indicam que um evento de permeabilização da membrana do microrganismo pode estar envolvido ou fazer parte do mecanismo de ação das LTPs.

O terceiro grupo de peptídeos de plantas mais caracterizado são as tioninas, objeto de estudo deste trabalho e por isso melhor detalhado abaixo.

1.3.Tioninas

As tioninas constituem uma família de peptídeos básicos ($pI > 8$), com baixa massa molecular (~ 5 kDa) e são ricos em resíduos de arginina, lisina e cisteínas. Seus diversos membros têm alta similaridade de sequência e de estrutura, além de apresentarem efeitos tóxicos contra microrganismos, células animais e vegetais (Castro e Fontes, 2005, Kido *et al.*, 2010). Em 1942, Balls e colaboradores cristalizaram e purificaram uma molécula tóxica a partir do endosperma de trigo (*Triticum aestivum*), de natureza proteica, de baixa massa molecular, com alto teor de enxofre, denominada purotionina, sendo este o primeiro registro de uma tionina. Desde então diferentes tioninas vêm sendo isoladas de uma grande variedade de espécies de plantas, tanto de monocotiledôneas quanto de dicotiledôneas (Broekaert *et al.*, 1997).

O nome tionina é utilizado para dois grupos de peptídeos de plantas distintos, sendo os melhores caracterizados: as α - β -tioninas O segundo grupo, denominado de γ -tioninas foi inicialmente considerado como um novo subgrupo das tioninas, por apresentarem a mesma massa molecular e similaridade do padrão de pontes dissulfeto, mas sua conformação estrutural as diferenciava das α - β -tioninas (Broekaert *et al.*, 1997; Terras *et al.*, 1995; Thevissen *et al.*, 2004). Devido à sua similaridade estrutural com as defensinas de insetos e mamíferos, as γ -tioninas foram renomeadas como defensinas de plantas (Terras *et al.*, 1995; Stec, 2006). As tioninas estão presentes em quase todos os tecidos fundamentais da planta, se

localizam predominantemente no meio intracelular, mas também podem ser encontradas no espaço extracelular das plantas, em diversos tecidos (Benko-Iseppon *et al.*, 2010). Sua ampla distribuição a partir do endosperma às folhas e a síntese deste peptídeo em resposta a invasão bacteriana, sugerem um papel importante na defesa contra patógenos (Bohlmann e Apel, 1991). O seu efeito tóxico foi descrito a partir da lise membranar, no entanto o mecanismo preciso da toxicidade permanece desconhecido. A atividade antifúngica das tioninas é um resultado de interações diretas proteína-membrana pela interação eletrostática de tioninas carregadas positivamente com fosfolípidos de carga negativa nas membranas de fungos, o que pode resultar na formação de poros ou em uma interação específica com um domínio lipídico (De Lucca *et al.*, 2005; Nawrot *et al.*, 2014).

1.3.1. Classificação das Tioninas

As α -/ β -tioninas são classificadas em cinco tipos estruturais (I - V) com base em suas estruturas primárias e padrões de formação de pontes dissulfeto.

Tioninas do tipo I: tem como representantes as purotioninas, estão presentes no endosperma dos grãos da família Poaceae, são altamente básicas e possuem 45 resíduos de aminoácidos, sendo oito deles cisteínas, permitindo a formação de quatro pontes dissulfeto. Tioninas do tipo II: foram isoladas de folhas e frutos da planta *Pyricularia pubera* e também de folhas de cevada (*H. vulgare*). Estas são menos básicas que as tioninas do tipo I e possuem de 46 - 47 resíduos de aminoácidos, formando quatro pontes dissulfeto. Tioninas do tipo III: têm sido extraídas das folhas e caules de espécies de visco como *Viscum album*, *Phoradendron tomentosum*, *Phoradendron liga* e *Dendrophthora clavata* tendo em torno de 45 - 46 resíduos de aminoácidos. As tioninas do tipo III possuem apenas seis resíduos de cisteína, o que permite a formação de três pontes dissulfeto as quais são conservadas, como as cisteínas das tioninas do tipo I e II em relação a formação das pontes disulfeto e possuem um carácter menos básico que as do tipo I. Tioninas do tipo IV: estas foram isoladas de sementes de *Crambe abyssinica*, são representadas pela crambina, possuem 46 resíduos de aminoácidos, formam três pontes dissulfeto, apresentam carga neutra, no entanto possuem um carácter hidrofóbico, são anfipáticas possuindo dois resíduos de arginina. As tioninas do tipo

V são formas truncadas de tioninas regulares encontradas em alguns grãos como, por exemplo, no trigo (Vernon, 1992; Milbradt *et al.*, 2003; Egorov *et al.*, 2005; Stec, 2006).

A estrutura secundária das tioninas é bem conservada sendo composta de duas folhas- β e duas α -hélices antiparalelas, com resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos segregados no exterior e interior da superfície das hélices, respectivamente (Figura 3). Essa distribuição anfipática confere às tioninas sua capacidade de romper as membranas microbianas e lipossomas (Bohlmann e Apel, 1991; Caaveiro *et al.*, 1997). Uma das tioninas melhor estudada estruturalmente é viscotoxina isolada a partir de folhas e caules de *V. album*. Este tionina é tóxica contra diferentes linhagens celulares, particularmente contra células tumorais. Esta tionina induz o aparecimento de imperfeições na superfície de membranas que levam à desestabilização e destruição das mesmas (Guzmán-Rodríguez, 2015). As tioninas foram incluídas no grupo PR-13 de proteínas relacionadas à patogênese (PR, do inglês *pathogenesis related*) devido ao aumento de sua expressão frente ao ataque de patógenos (Epple *et al.*, 1997). Estudos mostram ainda o aumento da resistência a patógenos fúngicos ou bacterianos em plantas transgênicas expressando genes para tionina. Estes estudos indicam claramente que a superexpressão de uma única tionina desequilibra a interação planta-patógeno, reforçando ainda mais o papel das tioninas na defesa de plantas (Kido *et al.*, 2010).

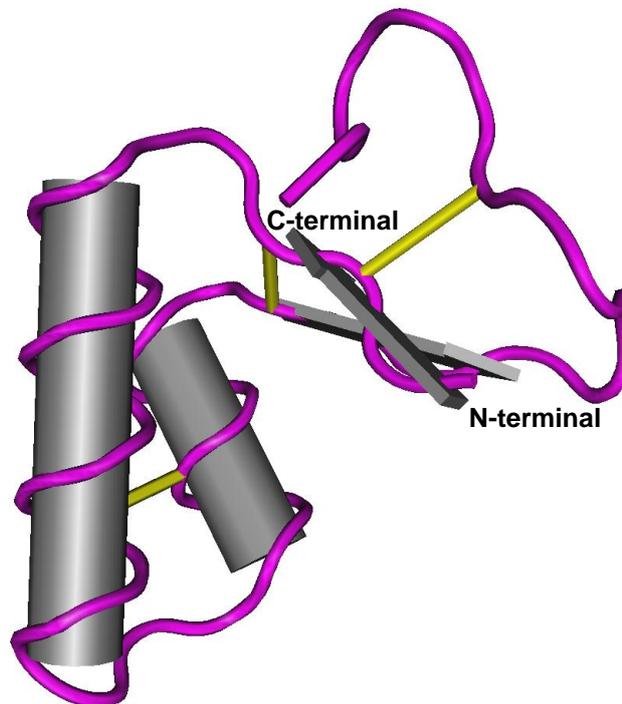


Figura 3: Representação esquemática da estrutura tridimensional de uma tioniina representada pela viscotoxina A3 isolada de *V. album* mostrando os elementos da estrutura secundária (cinza) e as pontes dissulfeto (amarelo). PDB ID: 1ED0, Software mmdb.

1.3.2. Atividades *in vitro* e Mecanismo de Ação das Tioninas

A principal característica das tioninas, com exceção da crambina, é seu efeito tóxico em sistemas biológicos. Muitas delas são tóxicas contra leveduras, fungos fitopatogênicos, bactérias Gram positivas e Gram negativas, protozoários e insetos (Lee *et al.*, 2000, Stec, 2006; Berrocal-Lobo *et al.*, 2009; Kido *et al.*, 2010). Além da atividade tóxica contra diversos organismos, outras atividades têm sido descritas para as tioninas, como por exemplo: efeito citotóxico em células tumorais; efeito inibitório em sistemas *in vitro*, sendo capazes de inibir a síntese de proteínas em sistemas de células-livres provavelmente através de uma interação direta com mRNA ou a nível traducional; interferência na síntese do DNA; inibição da atividade de β -glucuronidases; fortes efeitos imunomodulatórios (Castro e Fontes, 2005). Alguns trabalhos já demonstraram que as tioninas atuam como proteínas de reserva

fornecendo uma fonte de enxofre e especialmente como efetores na defesa de plantas (Castro e Fontes, 2005; Kido *et al.*, 2010).

Quanto ao mecanismo de ação das tioninas sobre microrganismos, este foi primeiro investigado na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foi mostrado que uma tionina de sementes de *T. aestivum* causava permeabilização nas células desta levedura, o que foi evidenciado pelo extravasamento no meio de cultura de diversos íons como K^+ e PO_4^{3-} e também, de alguns componentes celulares (Broekaert *et al.*, 1997). Thevissen *et al.* (1996) demonstraram que α -hordotionina alterou a permeabilidade da membrana do fungo *Neurospora crassa* causando um aumento da entrada de Ca^{2+} , efluxo de K^+ , além de alcalinização do meio.

Muitas evidências experimentais indiretas indicam que as tioninas formam poros e/ou desintegração da membrana plasmática, seguido de uma massiva despolarização e perda de componentes do citoplasma, mediante aumento da concentração de tionina no meio. No entanto, apenas alguns estudos diretos em condições bem controladas foram efetuados e o mecanismo preciso de permeabilização da membrana causada pelas tioninas permanece desconhecido (Stec, 2006).

Três mecanismos têm sido propostos para a ação da tioninas em membranas citoplasmáticas. O primeiro mecanismo propõe que as tioninas se organizam na superfície de uma bicamada, formando um canal íon-seletivo (Hughes *et al.*, 2000). Esta proposta é suportada por estudos de correntes iônicas, no entanto, essa proposta não suporta a visão de que apenas a formação de canais iônicos é a única ou a direta razão para a lise celular. Na segunda proposta as tioninas modificam a superfície da membrana citoplasmática pela formação de um “tapete” de tioninas, aumentando a rigidez da membrana e o aumento simultâneo da fluidez nas bordas do tapete fazendo com que a membrana entre em colapso (Richard *et al.*, 2002). O terceiro mecanismo indica que, após a ligação das tioninas à membrana, ocorre um efeito combinado do enrijecimento da membrana e a retirada dos fosfolípídeos levando à desestabilização final da membrana (Stec *et al.*, 2004).

Entretanto diferentes efeitos parecem ser decorrentes da perda da integridade da membrana plasmática, como a despolarização da membrana, e aumento da permeabilidade de íons, ligação direta ao DNA e RNA, inibição da síntese proteica, inibição da síntese de DNA através da inibição da enzima ribonucleotídeo redutase

(Nakanishi *et al.*, 1979; Thevissen *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2002, Stec, 2006). Todos estes acontecimentos, que se seguem à lise da membrana celular, podem ampliar os efeitos tóxicos iniciais, e levar à alteração de muitos processos celulares cruciais, culminando na morte celular.

1.4. Fungos de Importância Agrícola e Médica

1.4.1. Fitopatógenos do Gênero *Fusarium*

Fungos filamentosos são importantes agentes fitopatogênicos, podendo estes ser os maiores causadores de doenças de plantas, agindo como parasitas obrigatórios ou facultativos. No Brasil, muitas culturas de plantas economicamente importantes têm sua produtividade diminuída devido à ocorrência de doenças causadas por fungos fitopatogênicos. Somente na área agrícola, o dispêndio brasileiro em agrotóxicos atinge à cifra de US\$ 1,6 bilhões/ano, correspondendo a um alarmante volume de produtos altamente poluentes lançados no campo diariamente, trazendo inúmeros efeitos adversos, incluindo toxicidade ao homem e organismos não alvos (Kalpana *et al.*, 2005; Di Maro *et al.*, 2010). Paradoxalmente, apesar do uso crescente de defensivos agrícolas, observa-se um aumento das doenças em plantas causadas por fungos que estão se tornando cada vez mais resistentes aos fungicidas atualmente disponíveis.

Entre os fitopatógenos de relevância agrônômica estão os fungos do gênero *Fusarium*. Estes são saprófitos, e estão presentes em regiões de clima tropical e temperado, sendo amplamente distribuídos no solo, plantas e outros substratos orgânicos (Summerell *et al.*, 2010). O gênero *Fusarium* constitui um dos grupos de fungos filamentosos mais estudados, e contém algumas das espécies de patógenos de plantas mais importantes economicamente que afetam culturas de milho, trigo, batata, banana, tomate e numerosos outros vegetais (Brown *et al.*, 2006). Fungos deste gênero apresentam facilidade em formar diversas colônias nas plantas e, conseqüentemente, espalham-se rapidamente para o solo e outras plantas (Burgess, 1981). Doenças causadas por esses fitopatógenos não só levam a diminuição da produção, como também podem comprometer as colheitas devido à produção de micotoxinas que afetam a saúde do consumidor (Summerell *et al.*, 2010; van der Lee *et al.*, 2015). Infecções causadas por *Fusarium* causam perdas de

bilhões de dólares sendo necessários grandes investimentos em pesticidas e outras medidas para mantê-los sob controle (van Diepeningen e Hoog, 2016).

Na área agronômica, várias estratégias têm sido adotadas ao longo dos anos, para minimizar as doenças causadas por *Fusarium* e outros fungos fitopatogênicos nas lavouras. Essas estratégias são baseadas em métodos genéticos, químicos e biológicos. O uso de genótipos resistentes é uma das principais abordagens genéticas utilizadas (Gravina *et al.*, 2004; Lapin e van den Ackerveken, 2013), mas isso se restringe a poucas culturas e fitopatógenos. Portanto, a descoberta de novos agentes antifúngicos, particularmente aqueles produzidos pelas próprias plantas, é de suma importância (Xuan *et al.*, 2003; Mahlo *et al.*, 2010; Pane *et al.*, 2013). Durante a última década, muitos estudos têm sido concentrados na análise de proteínas antifúngicas de diferentes fontes vegetais, pelo valor econômico que elas agregam dada à sua capacidade em proteger culturas importantes do ataque desses patógenos (Park *et al.*, 2007; Hegedüs e Marx, 2013).

Outra grande preocupação em relação a este gênero é que um grande número de espécies de *Fusarium*, não só são capazes de causar infecções em plantas, mas também em animais e humanos (Nucci *et al.*, 2014). O número de casos registrados de infecções humanas causadas por *Fusarium* spp. está aumentando em todo o mundo devido a um aumento no número de pessoas suscetíveis e imunocomprometidas, que hoje podem ser diagnosticadas devido ao desenvolvimento de melhores métodos de detecção da infecção (Nucci *et al.*, 2014; Dalyan-Cilo *et al.*, 2015). Sete complexos de espécies oportunistas podem causar infecções em seres humanos são elas: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. fujikuroi*, *F. chlamydosporum*, *F. dimerum* e *F. sporotrichioides*. Em particular, os membros dos complexos de espécies de *Fusarium solani* e *F. oxysporum* têm sido encontrados em infecções humanas em todo o mundo (O'Donnell *et al.*, 2008, 2009; van Diepeningen e Hoog, 2016). Um dos principais problemas dessas infecções é o fato de que são espécies de *Fusarium* relativamente mais insensíveis aos compostos antifúngicos disponíveis no mercado, principalmente aos derivados de azóis (Nucci *et al.*, 2007; Guarro, 2013).

1.4.2. *Candida* sp: um Problema Emergente

Leveduras do gênero *Candida*, principalmente a espécie *C. albicans*, são leveduras que se relacionam com o hospedeiro de forma comensal e podem ser isoladas a partir do trato gastrointestinal, mucosa oral e vaginal de muitos, se não, de todos os indivíduos saudáveis. No entanto, não causam problemas normalmente, mas podem causar infecções em indivíduos que estejam com o sistema imunológico comprometido (Millon *et al.*, 1994; Morschhäuser, 2016).

Existem mais de 150 espécies de *Candida*, mas somente 15 são reconhecidas como frequentes patógenos ao homem, são elas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa* e *C. norvegenis* (Pfaller *et al.*, 2005; Pappas, 2006).

O número de infecções causadas por *Candida* tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido ao aumento da população de risco, que incluem transplantados, pacientes com câncer e pacientes soro positivos para HIV. Essa deficiência do sistema imune pode ocasionar infecções superficiais e localizadas, chamadas de candidíase e infecções sistêmicas chamadas de candidemia (Millon *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 2012; Perlin *et al.*, 2015). A candidemia, por exemplo, é a forma de infecção mais preocupante, responsável por elevados índices mundiais e brasileiros de mortalidade de 40% e 61%, respectivamente, índices de mortalidade maiores que os provocados por infecções bacterianas (Pappas, 2011; Rossi, 2011). Dados ainda mais alarmantes revelam que o número de infecções fúngicas no Brasil é de 2 a 8 vezes maior do que nos Estados Unidos e na Europa (Colombo *et al.*, 2007; Rossi, 2011)

C. albicans é hoje a principal causa de candidíase e candidemia, sendo a quarta causa mais comum de infecções hospitalares (Gudlaugsson *et al.*, 2003; Pappas *et al.*, 2003; Arendrup, 2010). A epidemiologia de infecções por *Candida*, no entanto, vem mudando nos últimos anos, sendo observado um número cada vez maior de pacientes infectados com espécies não-*albicans*, dentre essas, as de maior importância clínica são *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, que juntas são responsáveis por 90% dos casos de candidíase em todo o mundo (Pfaller *et al.*, 2010; Pfaller *et al.*, 2011). Outro problema emergente são as infecções entre bebês que nascem muito abaixo do peso, causadas geralmente por *C. albicans* e *C.*

parapsilosis. No entanto, quase todas as espécies de *Candida* já foram reportadas como causadoras desse problema (Chapman, 2007; Pacifici, 2016).

Essa mudança epidemiológica de infecções causadas por *Candida* está relacionada em parte à seleção de cepas de *Candida* menos susceptíveis às drogas, devido ao uso generalizado de drogas azólicas, principalmente o fluconazol, como um agente profilático e terapêutico (Sanguinetti *et al.*, 2015)

As diferentes espécies de *Candida* exibem variações no grau de susceptibilidade às drogas azólicas, por exemplo, a espécie *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol com uma alta taxa global de resistência de quase 80%, já *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* possuem uma taxa menor de resistência primária ao fluconazol variando de 4 a 16%. Entretanto o número de espécies raras de *Candida* que apresentam resistência aos azóis vem aumentando a cada ano (Pfaller *et al.*, 2010).

Apesar de ser menos comum que a resistência intrínseca, estudos tem mostrado que a resistência adquirida está surgindo em todo o mundo. Estudos mostram que o uso prolongado de fluconazol em pacientes HIV positivos com infecções fúngicas tem favorecido a aquisição de resistência, especialmente em espécies como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Sanglard, 2002). Outra grande preocupação é a resistência cruzada entre as espécies de *Candida* para diferentes antifúngicos. A resistência cruzada entre os azóis já foi observada para muitas espécies de *Candida*, incluindo *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, espécies consideradas susceptíveis ao fluconazol começam a apresentar reduzida suscetibilidade, bem como o surgimento de isolados resistentes e multirresistentes (Krcmery e Barnes, 2002).

As doenças humanas causadas por fungos têm causado grandes prejuízos econômicos mundiais. Só os Estados Unidos gastaram entre o ano de 2008 e 2011, cerca de 7 bilhões de dólares por ano, no tratamento de pacientes acometidos por infecções causadas por fungos resistentes às drogas comerciais disponíveis no mercado. Esse prejuízo aumenta a cada ano e estima-se que pelo menos 60 mil dólares são gastos a mais, para tratar um paciente com infecções fúngicas invasivas, do que o tratamento de um paciente internado sem a infecção (Menzin *et al.*, 2011; Neoh *et al.*, 2014).

1.5. Fluconazol

O fluconazol pertence à classe dos derivados azólicos, mais especificamente aos triazóis. É um composto sintético facilmente solúvel em água, o que confere uma das características mais importantes da droga, sua elevada penetração nos líquidos biológicos de todos os organismos (Casalinuovo *et al.*, 2004). Os azóis têm sido uma das classes de drogas antifúngicas mais utilizadas por décadas contra diversos fungos, tendo como alvo a via de biossíntese de ergosterol de fungos (Cowen, 2008).

O mecanismo de ação dos derivados azólicos se dá pelo bloqueio da incorporação do acetato de ergosterol, inibindo a lanosterol 14- α -esterol demetilase ou *ERG11p*, por interferência no citocromo P-450 e levando ao acúmulo de um esteroide intermediário na via de biossíntese do ergosterol o 14- α -metil-3,6-diol que é tóxico à membrana do fungo (Figura 4). Este metilesterol não possui a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol, e seu acúmulo na membrana plasmática do fungo leva à formação da membrana com propriedades alteradas, prejudicando as funções básicas, necessárias para o seu desenvolvimento (Lupetti *et al.*, 2002; Cowen, 2008).

Dentre os derivados azólicos, o fluconazol é o mais utilizado e efetivo para o tratamento de candidíase. Entretanto, inúmeros relatos de falhas no tratamento estão aparecendo na literatura, devido ao aparecimento de cepas resistentes a azóis que superexpressam transportadores de efluxo de multidrogas incluindo a família ABC (do inglês *ATP-binding cassette transporters*) ou MFS (MFS, do inglês *major facilitator superfamily*) (Cannon *et al.*, 2009; Iwazaki *et al.*, 2010).

São pelo menos três, os principais mecanismos descritos para a aquisição de resistência aos azóis por diferentes espécies de *Candida*. O primeiro mecanismo associado à resistência dos azóis é a superexpressão de transportadores de efluxo de multidrogas, resultando na diminuição da concentração da droga na enzima alvo da célula fúngica, a lanosterol 14- α -esterol demetilase. Em espécies de *Candida* essas bombas de efluxo da superfamília ABC são codificadas pelos genes *CDR* (do inglês, *Candida drug resistance*) e os genes *MDR* (do inglês, *multidrug resistance*) codificam os transportadores MFS. Já foi demonstrado que a indução de bombas de efluxo codificadas por *CDR* confere resistência a quase todos azóis, enquanto a indução das bombas de efluxo codificadas por *MDR* parece ser seletiva apenas para

resistência ao fluconazol. Diversas espécies de leveduras do gênero *Candida* apresentaram esse aumento da regulação das bombas de efluxo, codificadas tanto por genes *CDR* e *MDR* conferindo resistência às drogas azólicas, dentre elas *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* (Sanglard *et al.*, 1995; Pfaller, 2012).

Outro mecanismo comum de resistência a azóis envolve a alteração ou o estímulo da expressão da enzima alvo a lanosterol 14- α -esterol demetilase, que é codificada pelo gene *ERG11*. As mutações neste gene impedem ligação dos azóis no sítio enzimático. Em *C. krusei* a resistência intrínseca ao fluconazol tem sido atribuída à reduzida afinidade de ERG11p ao fluconazol. Estudos mostraram que isolados de *Candida* de alguns doentes, com susceptibilidade reduzida a azóis tinham concentrações intracelulares de ERG11p mais elevadas que as de cepas susceptíveis a azóis; assim, a droga em concentrações terapêuticas normais não inibe a síntese de ergosterol (Sanglard e Odds, 2002; Perlin *et al.*, 2007).

O terceiro mecanismo de resistência às drogas azólicas envolve o desenvolvimento de vias alternativas. Mutações no gene *ERG3* evitam a formação de 14- α -metil-3,6-diol que é tóxico à membrana do fungo, transformando-o em 14- α -metilfecosterol que não é tóxico. Mantendo deste modo a funcionalidade da membrana plasmática e, portanto, anula os efeitos deletérios dos azóis nas membranas fúngicas (Lupetti *et al.*, 2002).

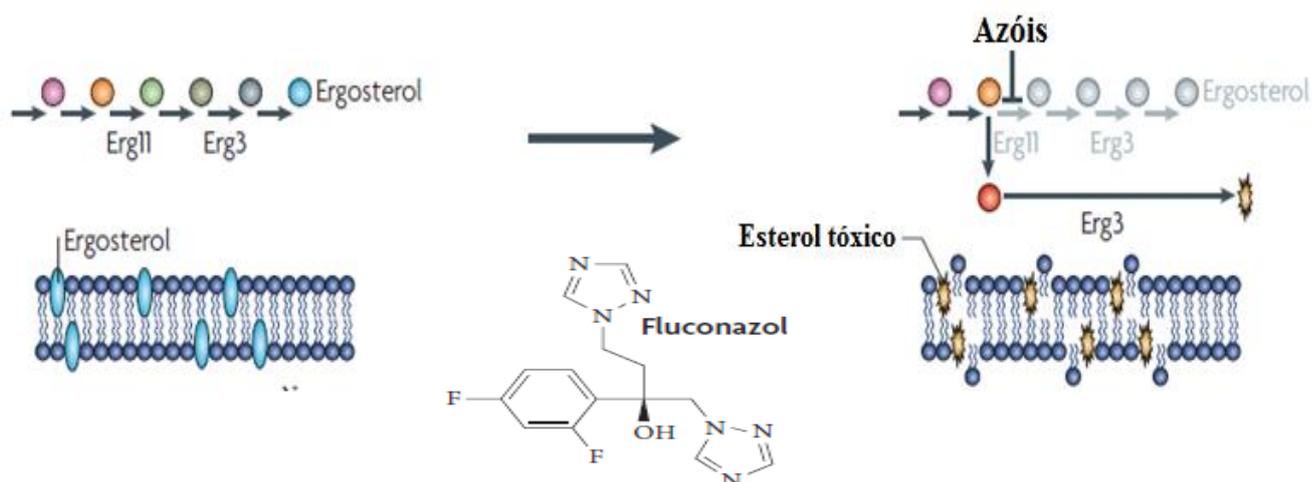


Figura 4: Representação esquemática do modo de ação dos azóis. Os azóis, tais como o fluconazol, inibem *ERG11p*, causando o bloqueio da produção de ergosterol e levando ao acúmulo de um esteroide intermediário tóxico para as células fúngicas (adaptado de Cowen, 2008).

1.6. As Pimentas do Gênero *Capsicum*

Nativo das Américas, o gênero *Capsicum* conta com mais de 30 espécies já descritas, e pertence à família das Solanaceae. Das diferentes espécies de *Capsicum* existentes, apenas cinco delas são consideradas domesticadas: *C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. pubescens* e *C. frutescens*, sendo estas espécies identificadas pelas suas características morfológicas. Entre estas, estão a morfologia da flor, incluindo cor, constrição do cálice e número de flores por axila, as quais são as mais utilizadas nas descrições taxonômicas (Pozzobon *et al.*, 2006; Moscone *et al.*, 2007; Ince *et al.*, 2010).

No Brasil, o gênero *Capsicum* é de grande importância cultural, econômica e biológica, devido à utilização dos frutos na preparação de pratos típicos e regionais. As diferentes formas da utilização desses frutos estão relacionadas com aspectos multiculturais e étnicos e é provavelmente o resultado da diversidade genética observada em cada região do país, já que o Brasil é considerado um dos centros de diversidade de *Capsicum* (Sudré *et al.*, 2010).

Embora o cultivo de pimentas ainda seja feito de maneira rústica, estima-se que o mercado movimentava cerca de 100 milhões de dólares por ano (Ribeiro *et al.*, 2008). Ainda de acordo com os autores, as pimentas vermelhas representam o terceiro lugar na produção e consumo de vegetais para utilização de temperos no Brasil, perdendo apenas para o alho e cebola (Simonne *et al.*, 1997; Rodríguez-Burruezo *et al.* 2010).

Além de sua indispensável utilização na culinária devido às suas propriedades organolépticas, este gênero é nutritivo sendo muito rico nas vitaminas A, B e C, ácido fólico, tiamina e também em minerais como molibdênio, manganês e potássio. Adicionalmente, na área médica, este gênero tem inúmeras propriedades farmacológicas devido à presença de alcalóides conhecidos como capsaicinóides (Reyes-Escogido *et al.*, 2011). Em algumas partes do mundo, as pimentas são utilizadas como estimulante digestivo, como afrodisíaco, no combate à disenteria e às infecções intestinais, além de seu uso como antiparasitário e cicatrizante (Viñals *et al.*, 1996), sendo as espécies *C. frutescens* e *C. annuum* as principais utilizadas para fins medicinais (Bosland, 1996). A importância econômica, nutritiva e farmacológica deste gênero é responsável pela sua alta demanda. No entanto, a produção mundial é dificultada pelos limites impostos por fitopatógenos tais como

vírus, bactérias e fungos (Jones *et al.*, 1998; Ristaino e Stephen, 1999; Diz *et al.*, 2006).

Plantas do gênero *Capsicum* representam um valioso recurso genético, pois possuem potencial de uso agrônomo, farmacêutico e industrial. Suas sementes possuem proteínas e especialmente diferentes famílias de AMPs, que atuam na defesa de plantas contra patógenos, podendo potencialmente ser utilizadas para o desenvolvimento de produtos naturais para o controle de doenças e pragas em plantas cultivadas e que também são capazes de controlar microrganismos causadores de doenças em animais. Por este motivo, nos últimos anos, nosso grupo vem pesquisando a presença dessas proteínas e peptídeos em diferentes espécies do gênero *Capsicum* e avaliando sua atividade antimicrobiana, principalmente contra fungos fitopatogênicos e contra leveduras de importância médica.

Um dos primeiros trabalhos descritos foi o isolamento de uma fração rica em peptídeos, denominada F1, obtida de extrato de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.) a qual apresentava alta atividade inibitória sobre o desenvolvimento das leveduras *Schizosaccharomyces pombe*, *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Diz *et al.*, 2006). Neste trabalho foi também mostrado que um dos peptídeos presentes nesta fração apresentou similaridade de sequência com outras proteínas pertencentes à família das LTPs de plantas e apresentava massa molecular de 9 kDa, sendo denominada de CaLTP₁. LTPs imuno-relacionadas com CaLTP₁ também foram detectadas em outras espécies de *Capsicum*. Em um trabalho posterior a CaLTP₁ exibiu atividade antifúngica contra *Colletotrichum lindemuthianum* e especialmente contra *C. tropicalis*, causando várias alterações morfológicas, incluindo a formação de pseudohifas. Este peptídeo também foi capaz de inibir a atividade da α -amilase de mamífero *in vitro* (Diz *et al.*, 2011).

Ribeiro *et al.* (2012b) purificaram uma albumina 2S, também de sementes de *C. annuum*, a qual foi denominada de Ca-Alb. Esta proteína inibiu o crescimento das leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Ca-Alb também foi capaz de induzir o aumento da produção endógena de NO nestas leveduras, indicando que a inibição pode ter ocorrido devido a um estresse oxidativo causado pela albumina 2S. Ca-Alb também mostrou a capacidade de inibir a acidificação do meio de crescimento de *S. Cerevisiae* em presença de glicose. Este

mesmo grupo também estudando peptídeos presentes em sementes de *C. annuum* publicaram o isolamento de um novo inibidor de tripsina, chamado CaTI. Este peptídeo apresentou uma massa molecular de 6 kDa e valor de pI de aproximadamente 9. CaTI também demonstrou propriedades antifúngicas inibindo o crescimento das leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans* sendo também capaz de causar várias alterações morfológicas nas células de leveduras, tais como desorganização da parede celular, aglomeração celular, e liberação do conteúdo citoplasmático (Ribeiro *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2013).

Outro trabalho, relacionado a peptídeos em sementes de pimenta, mostrou a presença de AMPs, agora isolados de sementes de *C. chinense* Jacq. Três diferentes frações ricas em peptídeos denominadas PEF1, PEF2 e PEF3 apresentaram alta atividade antifúngica contra diferentes leveduras. A fração PEF2 causou diferentes alterações morfológicas em células de *C. tropicalis*. O sequenciamento N-terminal de peptídeos presentes na fração PEF2 e PEF3 mostrou alto grau de similaridade desses peptídeos com inibidores de proteinases serínicas, com elevada atividade inibitória contra tripsina e baixa atividade inibitória contra a quimotripsina (Dias *et al.*, 2013).

Recentemente, Bard *et al.* (2014) identificaram sete frações proteicas de semente de *C. baccatum*, denominadas de H1 - H7. Dois peptídeos presentes na fração H4, a qual apresentava alta atividade antifúngica, foram submetidos à sequenciamento amino-terminal e as sequências mostraram similaridade com proteínas da família das vicilinas. A fração H4 além das propriedades antifúngicas, inibiu fortemente a atividade de α -amilase salivar humana e do inseto *Callosobruchus maculatus*. Estes dados sugerem que a fração H4 isolada de sementes de *C. baccatum* pode atuar diretamente na defesa das plantas não só sobre patógenos, mas também pragas.

Bard *et al.* (2015) também isolaram um peptídeo de aproximadamente 6 kDa, agora a partir de extratos de sementes de um híbrido de *Capsicum* (Ikeda x UENF 1381). Este peptídeo, denominado HyPep, mostrou 100% de identidade com um inibidor de proteinase serínica, além de forte atividade antifúngica contra as leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *K. marxianus*. HyPep também exibiu atividade inibitória contra α -amilase salivar humana e do inseto *C. maculatus*, bem como atividade inibitória de tripsina bovina.

Os exemplos de trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, acima descritos, mostram a grande diversidade de peptídeos com atividade antimicrobiana em plantas de pimentas. No entanto, até o momento, todos os trabalhos relatados descrevem a presença de AMPs apenas em sementes das diferentes espécies do gênero de *Capsicum* e muito pouco se conhece sobre AMPs em frutos. Taveira (2012) descreveu pela primeira vez a presença de AMPs em frutos de plantas de *C. annuum*. Naquele trabalho, sete diferentes frações foram obtidas a partir desses frutos e algumas foram tóxicas para as células de leveduras e fungos filamentosos. A fração denominada F1 foi a que apresentou o maior efeito inibitório. Nos testes contra bactérias, a fração F1 foi a única que causou redução do crescimento das espécies *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. F1 também foi capaz de inibir acidificação do meio, induzida por glicose, em células de *S. cerevisiae* em aproximadamente 78%. Resultado oposto foi obtido para células de *C. albicans* para as quais foi observado um estímulo de 50% da acidificação do meio. Partindo-se desses resultados, neste trabalho demos continuidade à investigação da presença de AMPs nos frutos de *C. annuum*, visando uma melhor caracterização da fração F1 e seu potencial antimicrobiano.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Caracterizar o peptídeo de 7 kDa isolado da fração F1 obtido de frutos de *Capsicum annuum*, avaliar a atividade antimicrobiana e sinérgica deste peptídeo com a droga azólica Fluconazol e caracterizar seu mecanismo de ação sobre células fúngicas.

2.2. Objetivos Específicos:

1. Isolar e caracterizar bioquimicamente o peptídeo de 7 kDa isolado da fração F1 de frutos de plantas de *Capsicum annuum*;
2. Avaliar o efeito antimicrobiano do peptídeo de 7 kDa sobre fungos;
3. Avaliar a viabilidade das células de leveduras patogênicas na presença do do peptídeo de 7 kDa ;
4. Avaliar o efeito do peptídeo de 7 kDa sobre a permeabilização de membranas de fungos;
5. Avaliar se ocorre a indução de estresse oxidativo em células fúngicas tratadas com o peptídeo de 7 kDa;
6. Determinar a localização do peptídeo de 7 kDa em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *F. solani*;
7. Avaliar a afinidade de ligação do peptídeo de 7 kDa ao DNA de *S. cerevisiae*;
8. Avaliar se ocorre a externalização de fosfatidilserina na presença do peptídeo de 7 kDa em células de *S. cerevisiae*;
9. Avaliar a atividade de caspases e a funcionalidade mitocondrial em células de *C. tropicalis* na presença do peptídeo de 7 kDa ;
10. Avaliar o fluxo de H⁺ em células de *C. tropicalis* na presença do peptídeo de 7 kDa ;
11. Avaliar o efeito da combinação do peptídeo de 7 kDa com fluconazol e o efeito morfológico contra fungos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais Biológicos

3.1.1. Plantas de *Capsicum annuum*

As plantas de *Capsicum annuum* (pimenta) (acesso UENF 1381) foram fornecidas pela Prof^a. Dra. 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 plantas foram cultivadas em câmara de crescimento a 28 °C e 80 UR com fotoperíodo de 16 h para o dia e 8 h para 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 tratamento.

3.1.2. Microrganismos

As espécies de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (1038), *Candida albicans* (CE022), *Candida tropicalis* (CE017) e *Candida parapsilosis* (CE002) e o fungo filamentoso *Fusarium solani* (4014) foram cultivados e conservados 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 *Candida pelliculosa* (3974), *Candida buinensis* (3982) e *Candida mogii* (4674) foram obtidas da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Todos os fungos foram mantidos em agar Sabouraud (1% de peptona, 2% de glicose e 1,7% de agar-agar) (Merck) e conservadas no LFBM, do CBB da UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

PARTE I: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO DA FRAÇÃO F1 DE FRUTOS DE *C. annuum*

I.3.1. Extração Proteica

Os frutos maduros de *C. annuum* foram coletados e abertos com o auxílio de um estilete para a retirada das sementes. Os frutos (sem as sementes), correspondendo a 80 g (aproximadamente 40 frutos), foram triturados em um multiprocessador de alimentos combinado ao tampão de extração (10 mM de Na₂HPO₄, 15 mM de NaH₂PO₄, 0,1 M de KCl, 1,5% de EDTA, pH 5,4) (Sigma) na proporção 1:5 (frutos (g):tampão (mL)) até a completa homogenização do fruto. Para completar a extração proteica, esta homogenização foi agitada por 2 h a 4 °C. Este extrato bruto foi submetido a uma centrifugação (15.400 x g por 30 min a 4 °C), o sedimento insolúvel foi descartado e, ao sobrenadante, 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 x g por 30 min a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso separadamente em água destilada e aquecido a 80 °C por 15 min. Após aquecimento, foi novamente submetido a uma centrifugação (10.000 x g por 10 min), no qual o precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido, dialisado (tubo de diálise benzoilado, Sigma) e liofilizado (K105, Liotop). Esta fração final foi chamada F/0-70 e submetida à cromatografia de fase reversa em HPLC (coluna C2/C18). Este procedimento foi feito segundo método descrito por Taveira *et al.* (2014).

I.3.2. Cromatografia de Fase Reversa em HPLC para a Obtenção da Fração F1

Uma coluna de fase reversa C2/C18 (μ RPC C2/C18, GE-Healthcare) acoplada a uma coluna guarda C8 (Pelliguard, 20 x 4,6 mm, Sigma) foi empregada sequencialmente no processo de isolamento do peptídeo de interesse da fração F1 (7 kDa) de frutos de *C. annuum* em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Prominence, Shimadzu). A coluna foi equilibrada com a solução A (0,1% de ácido trifluoracético [TFA]) (Sigma) foram aplicados 500 μ g da F/0-70 solubilizada em 500 μ L da solução A e a corrida iniciada com a solução A, durante os primeiros 8 min seguido por um gradiente da solução B (100% de propanol (Sigma) em 0,1% de TFA) que foi formado da seguinte forma: de 8 a 65 min, a concentração do solvente

B aumentou para 40%, de 65 a 66 min, a concentração de solvente B aumentou para 50% e foi mantido a esta concentração durante 1 min. Em seguida, a concentração do solvente B foi reduzida a 0% e foi mantida a esta concentração até o final da corrida a 75 min. O fluxo usado foi 0,5 mL.min⁻¹. A eluição das proteínas da coluna foi acompanhada por absorvâncias lidas a 280 ± 4 nm em um detector de arranjo de diodo (Taveira *et al.*, 2014).

I.3.3. Quantificação de Proteínas

As determinações quantitativas de proteínas foram feitas pelo método do ácido bicinconínico, segundo Smith *et al.* (1985), sendo a ovalbumina (Sigma) utilizada como padrão.

I.3.4. Eletroforese em Gel de Tricina na Presença de SDS

Todo o processo de purificação foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida, usando o sistema de gel descontínuo, segundo método descrito por Schägger e von Jagow (1987). Foram usadas placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 mm.

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%. Os géis foram montados no Mini Protean Tetra System (Biorad).

I.3.4.1. Preparo da Amostra e Condição de Corrida

A fração F/-0-70 de frutos de *C. annuum* e a obtida após a cromatografia de fase reversa em HPLC (C2/C18) 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 centrifugados a 16,000 x g por 2 min. Após este procedimento, 20 µL de cada amostra foram aplicados ao gel de concentração. A eletroforese foi feita a uma voltagem constante de 18 V por um período de aproximadamente 16 h. Foram usados os seguintes marcadores de massa molecular: mioglobina (16.950 Da), mioglobina I + II (14.440 Da), mioglobina I + III (10.600 Da), mioglobina I (8.160 Da), mioglobina II (6.210 Da), glucagon (3.480 Da) e mioglobina III (2.510 Da) (MW-SDS-17S, Sigma).

I.3.4.2. Coloração e Descoloração do Gel

Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado numa solução corante (0,05% de Comassie Blue R, 70% de ácido acético e 40% de metanol). Depois de corado, o gel foi transferido para uma solução descorante (40% de ácido acético e 7% de metanol) e mantido até a visualização das bandas de proteína.

Imagens dos géis corados foram capturadas pelo fotodocumentador LAS500 (Ge HealthCare).

I.3.5. Caracterização por Sequenciamento N-Terminal do Peptídeo

I.3.5.1. Preparo da Amostra para Sequenciamento

A fração F1 obtida em sistema HPLC, contendo o peptídeo de interesse, foi tratada com tampão de amostra contendo 5% de β -mercaptoetanol (Sigma), para redução das pontes de dissulfeto e vinil piridina (5 μ L para 60 μ L da amostra) (Sigma), para marcar os resíduos de cisteína. Após este procedimento, a amostra foi incubada por 30 min a 37 °C, depois por 15 min a 60 °C e então submetida à eletroforese em gel de tricina na presença de SDS, segundo método descrito por Schägger e von Jagow (1987), sendo feita a seguinte alteração: uma pré-corrída de 45 min na presença de 5 μ M de glutathiona reduzida e 0,1 mM de tioglicolato de sódio, adicionados no tampão catodo antes da amostra ser aplicada.

I.3.5.2. Eletrotransferência do Peptídeo para Sequenciamento e Análise

Após o término da eletroforese, o gel foi retirado das placas e o peptídeo eletrotransferido para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Milipore) utilizando uma célula comercial “Trans-blot” semi-seco (W.E.P. Company). Foi empregado o seguinte procedimento:

- 1- O gel foi imerso em tampão de transferência (182 mM de glicina, 25 mM de Tris e 20% de metanol) por 20 min;
- 2- A membrana de PVDF foi cortada nas mesmas dimensões do gel e imersa, rapidamente, em 100% de metanol, depois imersa em água para retirar o excesso de metanol e imersa no tampão de transferência por 20 min;

- 3- Foi montado, sobre a célula de transferência, um “sanduíche” com oito folhas de papel de filtro Whatman 3 MM previamente embebidas em tampão de transferência. Sobre essa camada de papel foi colocada a membrana e acima da membrana, o gel sendo então finalizado com mais uma camada de oito folhas do mesmo papel já embebidas no tampão de transferência. Durante a montagem desse “sanduíche” teve-se o cuidado de retirar as bolhas de ar entre as camadas para que estas não interferissem na transferência do peptídeo. Após esse procedimento, a célula de transferência foi fechada e aplicada uma corrente constante de 1mA/cm² por 2 h no sentido gel-membrana;
- 4- Após a transferência, o “sanduíche” foi cuidadosamente desfeito, sendo a membrana submetida à coloração com 0,1% de Ponceau S (GE HealthCare) para determinação do sucesso da transferência (Towbin *et al.*, 1979);
- 5- A banda de interesse foi então recortada do gel e lavada rapidamente por três vezes em água;
- 6- A sequência de aminoácidos do peptídeo contido na membrana de PVDF foi determinada por degradação de Edman, na qual é empregado um sequenciador automático de proteínas (Shimadzu PSQ-23A) (Allen, 1989).

A comparação da sequência de aminoácidos obtida e o alinhamento foram feitos usando-se o algoritmo do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/Blast>) (Chapman *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1994) e do Clustal (<http://www.expasy.org>) (Sievers *et al.*, 2011), respectivamente.

PARTE II: ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA FRAÇÃO F1 SOBRE LEVEDURAS PATOGÊNICAS

II.3.1. Análise da Inibição do Crescimento das Células de Leveduras

Alíquotas das espécies de leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis* foram retiradas de uma placa de Petri que possuía colônias crescidas e colocadas em novas placas, contendo ágar Sabouraud, fazendo-se estriações sobre o meio para a obtenção de um crescimento celular homogêneo. Esta nova placa foi então deixada na estufa a 30 °C por 24 h e em seguida usada para a obtenção das células utilizadas no ensaio. Com o auxílio de uma alça de semeadura, uma alíquota celular

Taveira, G.B

foi retirada e adicionada a 10 mL de meio líquido (caldo Sabouraud, 1% de peptona, 2% de glicose) (Merck) para que se pudesse fazer a quantificação das mesmas numa câmara de Neubauer (Optik Labor), com auxílio de um microscópio óptico (Axioplan.A2, Zeiss).

Inicialmente, as células das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis* (1×10^4 cel.mL⁻¹) foram incubadas em caldo Sabouraud contendo 100 µg.mL⁻¹ da fração F1, tendo sido o volume final de ensaio ajustado para 200 µL. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços) (Nunc) a 30 °C, por um período de 24 h. O reflexo do crescimento celular foi determinado pela densidade óptica, monitorada a cada 6 h, em um leitor de microplacas, num comprimento de onda de 620 nm. Todo o procedimento foi realizado sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar, segundo método adaptado de Broekaert *et al.* (1990).

II.3.2. Efeito da Fração F1 sobre a Permeabilização de Membranas de Leveduras

As células das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis* (1×10^4 cel.mL⁻¹) foram incubadas em caldo Sabouraud contendo 50 µg.mL⁻¹ da fração F1, tendo sido o volume final de ensaio ajustado para 200 µL. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços) a 30 °C, por um período de 24 h.

A permeabilização da membrana das células das leveduras tratadas com a fração F1 foi avaliada através da utilização do corante fluorescente Sytox green, segundo metodologia descrita por Thevissen *et al.* (1999). Imediatamente após as 24 h de incubação com a fração F1, 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 instruções fornecidas pelo fabricante. As células do controle foram incubadas apenas com o corante Sytox green, nas mesmas condições. Em seguida, as células foram analisadas em microscópio óptico (Axioplan.A2, Zeiss), acoplado a uma câmara AxioCAM MRc5 (Zeiss) e as imagens foram analisadas pelo software Axiovision, versão 4.0 (Zeiss). O microscópio estava equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 - 490 nm e emissão de 500 nm). Os resultados representam experimentos em triplicata.

II.3.3. Determinação da Concentração da Fração F1 para se ter 50 % de Inibição do Crescimento Sobre as Leveduras do Gênero *Candida*

O ensaio para a determinação da concentração da fração F1 para se ter 50 % de inibição do crescimento sobre as leveduras do gênero *Candida* (IC₅₀) foi realizado como descrito no item II.3.1., com as seguintes modificações: as leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* e *C. mogii* foram incubadas em caldo Sabouraud contendo as concentrações da fração F1 que variaram do seguinte modo: 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10 µg.mL⁻¹ para as leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. pelliculosa*. De 50, 40, 30, 20, 10 µg.mL⁻¹ para a levedura *C. mogii* e de 10, 8, 6, 4, 2 e 1 µg.mL⁻¹ para a levedura *C. buinensis*. As células controle foram cultivadas na ausência da fração F1. As densidades ópticas foram representadas graficamente após 24 h de ensaio em função do tempo e a partir destes gráficos foram calculadas as porcentagens de inibição para todas as concentrações testadas (curvas de dose-resposta).

A IC₅₀, para o tempo de 24 h de incubação com a fração F1, foi determinada a partir dos dados das curvas de dose-resposta (usando os parâmetros da percentagem de inibição de crescimento em função da concentração de proteína).

II.3.4. Análise de Viabilidade Celular

Para analisar o efeito da fração F1 sobre a viabilidade celular de leveduras do gênero *Candida*, foi feito o mesmo procedimento descrito no item II.3.1., sendo que neste ensaio foram usados os valores de IC₅₀ previamente determinados da fração F1 para cada levedura. As células controle (sem a fração F1) foram lavadas e diluídas 1.000 vezes. 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, e cultivadas a 30 °C, durante 48 h. No final deste período as unidades formadoras de colônias foram determinadas para cada espécie, e as placas de Petri, foram fotografadas (Vermelho *et al.*, 2006). O mesmo procedimento foi repetido com as leveduras tratadas com a fração F1. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados são mostrados assumindo que o controle representa 100% de viabilidade celular. Os cálculos do desvio-padrão e teste T foram feitos com software Prism (versão 5.0).

II.3.5. Efeito da Fração F1 sobre a Permeabilização de Membranas de Leveduras do Gênero *Candida*

O ensaio para verificação da permeabilização das membranas das leveduras do gênero *Candida* foi realizado como descrito nos itens **II.3.1.** e **II.3.2.** com as seguintes modificações: as células foram incubadas na presença e na ausência dos valores correspondentes às IC₅₀ da fração F1 para cada levedura a 30 °C, durante 24 h e depois as células foram analisadas quanto à permeabilização.

Para indicar a permeabilização de membrana, a porcentagem de células fluorescentes foi determinada pela contagem das células visualizadas por DIC e fluorescência para cada levedura (imagens analisadas, n = 5). O número total de células visualizadas em DIC de cada levedura (no controle e teste) foi assumido como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os cálculos do teste T foram feitos com o software Prism (versão 5.0).

II.3.6. Ensaio de Determinação da Indução de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular

Para avaliar se o mecanismo de ação da fração F1 envolve a indução de estresse oxidativo, foi feito um experimento como descrito no item **II.3.5.**, com as seguintes diferenças: a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) foi utilizada para medir espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, segundo metodologia descrita por Mello *et al.* (2011). Este corante entra passivamente na célula e é desacetilado por esterases intracelulares e ao ser oxidado por ROS se torna fluorescente.

Este ensaio foi feito como descrito no item **II.3.1.**, com as seguintes diferenças: a fração F1 foi incubada com as leveduras com suas respectivas IC₅₀. Após 24 h de incubação na presença e ausência das respectivas IC₅₀ da fração F1, as amostras foram novamente incubadas agora com 20 µM da sonda H₂DCFDA, ao abrigo da luz, por 2 h à temperatura ambiente e com agitação constante de 500 rpm. Então 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). Os resultados representam experimentos em triplicata.

II.3.7. Ensaio de Determinação da Funcionalidade Mitocondrial

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada através do corante fluorescente Rodamina 123 (Sigma). A Rodamina 123 é um corante fluorescente catiônico que tem alta afinidade ao potencial elétrico de membranas, assim, ele marca mitocôndrias ativas em células vivas. Este ensaio foi feito como descrito no item **II.3.1.**, com as seguintes diferenças: Após a incubação com a fração F1, as células de *C. tropicalis* foram ressuspensas e incubadas com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Rodamina 123, sob agitação constante a 500 rpm e ao abrigo da luz por 2 h, e em seguida foram analisadas por DIC no microscópio óptico equipado com um filtro de fluorescência (comprimento de onda de excitação de 506 nm, comprimento de onda de emissão de 530 nm). As células controle tiveram o mesmo tratamento das células tratadas com a fração F1.

II.3.8. Detecção da Atividade de Caspases Induzida pela Fração F1 em Células de *C. tropicalis*

A detecção de atividade de caspases foi realizada utilizando o marcador *in situ* CaspACE FITC-VAD-FMK (Promega), como descrito pelo fabricante. O marcador FITC-VAD-FMK é um análogo do inibidor de caspases Z-VAD-FMK (carbобензохи-валил-аланил-аспартил-[O-метил]-флуорометилкетона). O N-terminal carbобензохи (Z) é substituído pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC) criando uma marcação fluorescente para apoptose. Esse complexo entra na célula onde atua como um pseudo-substrato que inibe de modo irreversível as caspases através da ligação ao resíduo de cisteína no seu sítio ativo e torna-se fluorescente.

Este ensaio foi feito como descrito no item **II.3.1.**, com as seguintes diferenças: Após a incubação com a fração F1, as células de *C. tropicalis* foram ressuspensas, lavadas uma vez em 500 μL de PBS (10mM NaH_2PO_4 , 0,15M NaCl) pH 7,4 e novamente ressuspensas em 50 μL da solução de coloração (fornecida pelo kit) contendo 50 μM do marcador FITC-VAD-FMK. Após incubação de 20 min a 30 °C, sob agitação constante a 500 rpm, as células foram mais uma vez lavadas em 500 μL de PBS e ressuspensas em 20 μL de PBS. As células do controle negativo (na ausência da fração F1) e positivo (incubadas com 300 mM de ácido acético) tiveram o mesmo tratamento das células tratadas com o peptídeo. As células foram analisadas por DIC no microscópio óptico equipado com um filtro de

Taveira, G.B

fluorescência para detecção da fluoresceína (comprimento de onda de excitação, 450-490 nm, comprimento de onda de emissão de 500 nm).

II.3.9. Ensaio para a Verificação da Externalização de Fosfatidilserina em Células de *S. cerevisiae* na Presença da Fração F1

II.3.9.1. Preparo da Levedura para Obtenção de Esferoplastos

A obtenção de esferoplastos de *S. cerevisiae* foi feita de acordo com o método descrito por Okorokov & Lehle (1998). Inicialmente o volume do pré-inóculo adicionado em 400 mL do meio YPD (2g/L de peptona, 1g/L de extrato de levedura, 2g/L de glicose) (Sigma) foi calculado considerando o tempo de geração da cepa utilizada, de acordo com sua curva de crescimento, previamente determinada. Dessa forma, após aproximadamente 15 h a 30 °C sob agitação de 250 rpm, as células foram crescidas até o meio da fase logarítmica. Neste ponto, a suspensão celular da cultura foi centrifugada a 3.000 x *g* por 7 min a 4 °C, e em seguida, foi feito o descarte do meio e a determinação do peso úmido do sedimento de células.

Para cada 1 g de peso úmido de células foram adicionados 5 mL de tampão de esferoplastos (1,2 mol de sorbitol, 50 mM de Tris, pH 7,2), 0,9 mg do complexo enzimático lítico (Liticase - Sigma) e 12 µL de β-mercaptoetanol (concentração final de 30 mM). Esta suspensão celular em tampão de esferoplastos foi incubada a 37 °C sob fraca agitação manual. O monitoramento cinético da hidrólise da parede celular foi realizado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm, misturando 10 µL da suspensão celular em 990 µL de água. Este monitoramento foi feito a cada 5 ou 10 min a partir do tempo 0 (zero) de incubação até o tempo máximo de 50 min ou até que a absorbância chegasse a 20% do valor inicial.

O tubo com a suspensão de esferoplastos, após a incubação, foi transferido para o gelo e a reação de hidrólise da parede celular foi finalizada pela adição do tampão de parada, *stop solution* (1,2 mol de sorbitol, 20 mM de Tris, 20 mM de EDTA, pH 7,4), e uma concentração final de 1mM de benzamidina e 1mM de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF). A suspensão de esferoplastos foi adicionada ao tubo da centrífuga sobre uma solução colchão (1,4 mol de sorbitol, 50 mM de Tris, pH 7,4). Isso foi feito com auxílio de uma pipeta, devagar, evitando a mistura entre a suspensão e a solução colchão. Este material foi então centrifugado a 3.500

x g por 5 min a 4 °C, para que fosse possível eliminar os resíduos de enzimas líticas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as paredes dos tubos foram secas com papel para evitar que possíveis enzimas hidrolíticas atuassem nos esferoplastos.

II.3.9.2. Detecção da Externalização de Fosfatidilserina

Os esferoplastos (1×10^4 esferoplastos.mL⁻¹) foram incubados em tampão de esferoplastos contendo 50 µg.mL⁻¹ da fração F1. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços) por um período de 2 h de incubação a 30 °C e o volume final de ensaio, ajustado para 200 µL. Após este tempo, os esferoplastos foram lavados em tampão de esferoplastos e centrifugados a 200 x g por 5 min. O sedimento foi ressuspensão em 100 µL do kit de marcação Annexin-V-Fluos (Roche), preparado seguindo as recomendações do fabricante, e incubado sob agitação, protegido da luz por 15 min. Em seguida, os esferoplastos foram analisados por DIC e por microscopia de fluorescência no microscópio óptico equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção de fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 – 490 nm e emissão de 500 nm). Como controle positivo, foi utilizado 2,5 mM de peróxido de hidrogênio nas mesmas condições da fração F1. Como controle negativo, foi feito o aquecimento dos esferoplastos a 100 °C por 1min. O Kit Annexin-V-Fluos (Roche) contém anexina V, que é uma proteína ligadora de fosfolípidos dependente de cálcio, que se liga a fosfolípidos de carga negativa com alta especificidade para fosfatidilserina, que durante os estágios iniciais da apoptose, é translocada para o folheto externo da membrana plasmática e iodeto de propídio, que é um corante de ácido nucléico impermeável as células vivas ou apoptóticas, mas que cora células mortas com uma fluorescência vermelha e que portanto, serve para a diferenciação de células necróticas.

II.3.10. Localização da Fração F1 Conjugada ao FITC por Microscopia Óptica

Cem microgramas da fração F1 foram ressuspensos em 100 µL de tampão carbonato de sódio-bicarbonato de sódio 750 mM, pH 9,5 contendo 50 µg.mL⁻¹ FITC (previamente solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO)). Esta solução foi incubada ao abrigo da luz sob agitação constante de 500 rpm por 2 h a 30 °C. Após a incubação, a amostra foi submetida a uma cromatografia de gel filtração em coluna Sephadex

Taveira, G.B

G25 (Sigma) (40 x 1,5 cm) para a eliminação de FITC livre. A coluna foi equilibrada em 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0 num fluxo de 0,3 mL.min⁻¹. Toda a amostra acoplada ao FITC foi solubilizada em 1 mL de tampão de equilíbrio e aplicada cuidadosamente na coluna e então a corrida foi iniciada nas mesmas condições. Após o acoplamento, este ensaio foi feito como descrito no item **II.3.1.** com as seguintes diferenças: 10 µg.mL⁻¹ da fração F1-FITC foram incubadas com as células de *C. albicans* e *C. tropicalis*, durante 24 h em microplacas de 96 poços. Após este tempo, uma alíquota de cada suspensão de células foi removida e incubada com 50 µg.mL⁻¹ de 4', 6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato (DAPI), durante 10 min, para a marcação de núcleos. As células foram analisadas por DIC no microscópio óptico (Axioplan.A2, Zeiss) equipado com um filtro de fluorescência para detecção da fluoresceína (comprimento de onda de excitação, 450-490 nm, comprimento de onda de emissão de 500 nm) e DAPI (comprimento de onda de excitação, 385-400nm, e comprimento de onda de emissão 450-465nm).

II.3.11. Análise Eletroforética da Mobilidade do DNA na Presença da Fração F1

O DNA de *S. cerevisiae* foi extraído utilizando o kit “DNeasyplant mini kit” (Qiagen) a partir de uma cultura de *S. cerevisiae* crescida em caldo Sabouraud por 24 h. O DNA extraído foi quantificado utilizando o NanoDrop 2000 (Applied Biosystems).

O teste baseia-se na alteração da mobilidade eletroforética do DNA em gel de agarose devido à ligação da proteína ao DNA. Esta ligação resulta na formação de um complexo que tem mobilidade atrasada em relação à mobilidade relativa do DNA livre, ou seja, não ligado. Este ensaio foi realizado como descrito por Park *et al.*(1998).

O preparo do gel de agarose se deu da seguinte forma: foram pesados 0,8 g de agarose (Sigma) e foram adicionados a ela 100 mL de tampão TAE (40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético, 1 mM de EDTA e água). A agarose foi fundida, com atenção para que a solução não entrasse em fervura, resfriada, foram adicionados 3,5 µL do corante Gel red (Biotium) e então o gel foi homogeneizado e vertido sobre o suporte previamente preparado. Esperou-se 1 h após a solidificação, que ocorreu em temperatura ambiente, para a utilização do gel.

O DNA da levedura, na concentração de 10 ng foi incubado com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração F1 em 20 μL de tampão de ligação (5% de glicerol, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 1 mM de ditioneitol, 20 mM de KCl, e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de albumina sérica bovina). A reação foi incubada por 30 min a 30 °C e depois 4 μL de tampão de amostra (10 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 0,03% de azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol FF, 10% de glicerol, 10 mM de EDTA) foram adicionados à amostra e o volume total foi aplicado em um gel de agarose a 0,8%. A água foi utilizada como controle negativo e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de poli-L-lisina (Sigma), a qual tem a capacidade de se ligar ao DNA, como controle positivo. A corrida foi realizada a uma tensão de 4 V.cm^{-2} e a imagem do gel foi captada pelo ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare). O gel foi corado com Gel red.

II.3.12. Verificação do Fluxo de H^+ Utilizando o Sistema de Eletrodos Vibráteis

O fluxo de prótons na superfície da levedura *C. tropicalis* foi medido utilizando uma sonda vibrátil H^+ seletiva. A partir deste dado foi calculada a diferença de voltagem extracelular e de pH na superfície da levedura *C. tropicalis*. Inicialmente foi feito um pré-inóculo onde uma alíquota de células de *C. tropicalis* foi retirada de placas de Petri e adicionada em 40 mL de caldo Sabouraud. Este pré-inóculo cresceu por 24 h a 30 °C sob agitação constante a 250 rpm. Após o período de crescimento, 10 μL deste pré-inóculo foram retirados e adicionados no centro de uma placa de Petri (60 x 15 mm) contendo uma camada bem fina de agar Sabouraud, onde cresceu por 24 h a 30 °C. Depois de 24 h de crescimento, 5 mL de caldo Sabouraud foram vertidos cuidadosamente dentro da placa de Petri, e então as medições do fluxo de H^+ foram realizadas. Para as células-controle as medições do fluxo de H^+ ocorreram imediatamente após a adição de 5 mL de caldo Sabouraud, sem a adição da fração F1 no meio. Para os testes, a cada 10 min de leitura de fluxo de H^+ , foram adicionados 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração F1 ao meio até atingir a concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A técnica de eletrodos vibráteis íons-seletivos foi realizada como descrita por Feijó *et al.* (1999) e Ramos *et al.* (2008).

Os microeletrodos vibráteis H^+ -específicos foram produzidos como descritos por Feijó *et al.* (1999). Brevemente, os microeletrodos foram produzidos a partir microcapilares de borossilicato com diâmetro externo de 1,5 mm e 1,12 mm de

diâmetro interno (www.sutter.com), utilizando o aparelho Puller Flaming Brown, Sutter P-98 (Sutter Instruments, Novato, CA). Posteriormente, os microeletrodos foram apoiados sobre um suporte de vidro coberto por um becker de vidro (1 L) e levados para secagem a estufa a 250 °C por 3 h. Após este período, foi realizada a silanização dos microcapilares, por exposição a vapor de silano N, N-dimetiltrimetilsilamina (C₅H₁₅NSi, Fluka 41716), e deixados por mais 3 h para secar, sob as mesmas condições. Após a vaporização com silano, os microeletrodos foram preenchidos com uma solução de eletrólito (15 mM de KCl e 40 mM de KH₂PO₄, pH 6,0, para H⁺) correspondente a uma coluna de 1,5 mm do eletrodo. Após esta etapa, foram preenchidos na ponta, com uma coluna de 20 a 25 µm do respectivo coquetel seletivo, contendo os ionóforos do íon de interesse (Fluka, Milwaukee, WI). Para estabelecer o contato elétrico com o meio, foi inserido na extremidade basal do microeletrodo, um suporte com um eletrodo de Ag/AgCl (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

O eletrodo de referência funciona como uma referência seca (DRIREF-2, World Precision Instruments), inserido no meio de banho da amostra. Os sinais foram medidos pelo amplificador (www.applicableelectronics.com), sendo a vibração e o posicionamento do eletrodo controlado por motores posicionais (stepper-motors), os quais permitem um movimento tridimensional. O controle dos motores, a aquisição de dados e o seu processamento preliminar foram ajustados no software ASET (Science Wares [East Falmouth, MA] – www.sciencewares.com). A calibração dos eletrodos foi realizada por medição do potencial (mV) registrado em três soluções contendo o íon de interesse (H⁺), com pHs conhecidos: 5, 6 e 7.

Os dados da microsonda vibrátil seletiva foram coletados pelo software ASET, que fornece a informação necessária para calcular o fluxo iônico em um determinado ponto [x, y, z] do espaço, por meio da lei de Fick ($J = D (dc/dx)$). O coeficiente de difusão (D) é um valor tabelado para cada íon (de acordo com Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Co.). A diferença espacial (dx) resulta do cálculo da distância entre os dois pontos em que foram realizadas as medições das concentrações para cálculo do fluxo (10 µm). A diferença de concentração (dc) é um vetor que varia ao longo do ensaio. Em cada ponto, a concentração pode ser calculada a partir do valor de mV registrado no dado ponto e

da equação previamente determinada para o ionóforo durante o processo de calibração.

Os dados coletados foram analisados por One-Way ANOVA combinado com teste Tukey`s ($p \leq 0.05$) ou apenas pelo Student T-test ($p \leq 0.01$).

II.3.13. Ensaio de Combinação do Fluconazol com a Fração F1 para a Verificação de Efeito Sinérgico

Inicialmente, foi feita a determinação do IC_{50} do FLC para as seis leveduras como descrito no item **II.3.1.** para a determinação do IC_{50} para o FLC com as seguintes modificações: as leveduras foram incubadas em caldo Sabouraud contendo as concentrações do fluconazol (FLC) (Sigma) 20, 15, 10, 5, 2,5, 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pelliculosa* e *C. mogii*, para *C. parapsiiosis* as concentrações variaram de 2, 1,5, 1, 0,5 e 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para *C. buinensis* as concentrações variaram de 1, 0,5, 0,25 e 0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para determinação do efeito sinérgico, o ensaio foi feito como descrito no item **II.3.1.**, com as seguintes diferenças: as células de levedura foram incubadas em caldo Sabouraud contendo a concentração correspondente ao IC_{50} , ou concentrações abaixo do IC_{50} , para o FLC, combinado à fração F1 em concentrações variando de 1,3 a 4,0 vezes abaixo do IC_{50} , para as respectivas leveduras testadas. As células-controle cresceram na ausência da fração F1 e FLC e na presença das concentrações individuais destas substâncias. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os cálculos do teste T foram feitos com o software Prism (versão 5.0).

Após o ensaio de sinergismo, as células teste e controle foram analisadas por DIC em microscopia óptica (Axioplan.A2, Zeiss).

II.3.14. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura, células *C. pelliculosa* e *C. buinensis* foram cultivadas durante 24 h em caldo de Sabouraud, na presença de FLC (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), fração F1 (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), e FLC combinado a fração F1 (2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 0,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente ou na ausência destas substâncias. Em seguida, foram fixadas durante 30 min à temperatura ambiente numa solução

contendo 2,5% de glutaraldeído e 4,0% de formaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato, pH 7,0. Subsequentemente, as células foram lavadas três vezes em 0,1 M de tampão cacodilato, pH 7,0; pós-fixadas durante 30 min à temperatura ambiente com 1,0% de tetróxido de ósmio diluído em 0,1 M de tampão cacodilato, pH 7,0 ; e lavadas novamente com este mesmo tampão. Após este procedimento, as células de levedura foram desidratadas gradualmente em etanol (15, 30, 50, 70, 90 e por fim 100%), secas por ponto crítico (Critical Point Dryer, Bal-Tec CPC 030) usando CO₂ como líquido substituinte. As amostras foram depositadas em stub e então cobertas com uma camada de 20 nm de ouro (Sputter Coaster, Bal-Tec SCD 050) e observadas no microscópio eletrônico de varredura DSEM 962 Zeiss.

PARTE III: ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA FRAÇÃO F1 SOBRE O FUNGO *Fusarium solani*

III.3.1. Obtenção de Esporos de Fungos Filamentosos e Verificação de Viabilidade

Inicialmente, os esporos de *F. solani* foram raspados de uma placa de Petri contendo o fungo já crescido em agar Sabouraud, com o auxílio de uma espátula metálica. Estes esporos foram depositados em tubos de microcentrífugas de 1,5 mL e ressuspensos em 1 mL de água estéril. Depois da preparação deste estoque, a viabilidade dos esporos foi verificada da seguinte forma: em uma placa de kline foram pipetados 3 µL dos estoques dos esporos e incubados com 3 µL de sacarose 20% e o volume final foi ajustado para 20 µL. Após 24 h, verificamos a viabilidade dos esporos por emissão de tubo germinativo. Apenas os tubos que continham esporos viáveis foram usados para os ensaios de inibição de crescimento.

III.3.2. Análise da Inibição da Germinação dos Esporos Fúngicos na Presença da Fração F1

Este ensaio foi feito como descrito no item II.3.1. com as seguintes diferenças: foi usada a concentração de 1×10^4 esporos.mL⁻¹ , 50 µg.mL⁻¹ da fração F1 e o tempo total do ensaio foi de 60 h. Para observação de alterações morfológicas, nos tempos de 12, 24, 48 e 60 h foram retiradas alíquotas dos ensaios e estas foram

depositadas sobre lâminas, cobertas com lamínula e então observadas em microscópio óptico (Axioplan.A2, Zeiss).

III.3.3. Efeito da Fração F1 sobre a Permeabilização de Membranas de *F. solani*

A permeabilização da membrana dos esporos de *F. solani* tratados com a fração F1 foi avaliada como descrito no item III.3.2. e II.3.2., com as seguintes modificações: neste ensaio alíquotas de 96 µL de células-controle (ausência da fração F1) e na presença da fração F1 (50 µg. mL⁻¹) foram retiradas e analisadas em diferentes tempos de incubação 12, 24, 48 e 60 h.

III.3.4. Detecção de H₂O₂ em Esporos de *F. solani* após Tratamento com a Fração F1

Para investigar se a fração F1 é capaz de induzir a produção de H₂O₂ em esporos de *F. solani*, foi preparada uma solução de 3,3'diaminobenzidina (DAB) (Sigma) de 1 mg.mL⁻¹ em água, sob agitação constante por 2 h, ao abrigo da luz, como descrito por Thordal-Christensen *et al.* (1997) e Liu *et al.* (2012). Os esporos fúngicos (1 x 10⁴ esporos.mL⁻¹) foram incubados com a fração F1 (50 µg.mL⁻¹) em tubos de microcentrífuga em um volume final de 100 µL de caldo Sabouraud acrescido de DAB a uma concentração final de 0,5 mg.mL⁻¹. Como controle negativo foram usados esporos incubados na ausência da fração F1 e como controle positivo os esporos foram incubados com 200 mM de H₂O₂. O monitoramento foi feito em microscópio óptico a cada 10 min por um tempo total de 60 min. O DAB polimeriza imediatamente e localmente, assim que entra em contato com o H₂O₂ na presença de peroxidase, e observamos a presença de peróxidos como um precipitado insolúvel marrom no local da reação.

III.3.5. Localização da Fração F1 Conjugada ao FITC por Microscopia Óptica

O acoplamento da fração F1 ao FITC foi realizado como descrito no item II.3.11., com as seguintes diferenças: neste caso foram usados 20 µg.mL⁻¹ da fração F1-FITC para a incubação com os esporos de *F. solani*, durante 60 h em microplacas de 96 poços. Após este tempo, uma alíquota de cada suspensão de celular foi removida e incubada com 50 µg.mL⁻¹ de DAPI, durante 10 min, para a marcação de núcleos.

III.3.6. Ensaio de Combinação do FLC com a Fração F1 para a Verificação do Efeito Sinérgico em *F. solani*

O ensaio de combinação das substâncias foi realizado com descrito no item **II.3.13.**, com a seguinte diferença: as concentrações utilizadas para a o teste das substâncias sozinhas ou em combinação foram 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de FLC e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração F1 e o tempo de incubação foi de 60 h. Como controle, o fungo foi crescido na presença das substâncias individuais e na ausência das substâncias.

Após o ensaio de sinérgismo, as células teste e controle foram analisadas por DIC no microscópio óptico (Axioplan.A2, Zeiss).

III.3.7. Viabilidade Celular das Células Tratadas com a Combinação de FLC e a Fração F1

Para analisar o efeito da fração F1 sobre a viabilidade celular do fungo *F. solani*, foi realizado um ensaio de inibição do crescimento como descrito no item **III.3.6.** Após este ensaio, o volume total do poço contendo as células-controle (na ausência das substâncias) foi retirado e espalhado com uma alça de Drigalski sobre a superfície de uma placa de Petri contendo agar Sabouraud. O mesmo procedimento foi seguido para o teste de combinação das substâncias FLC (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) mais a fração F1 (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Ambas as placas foram cultivadas a 30 °C durante 60 h. No final deste período as placas de Petri foram fotografadas.

4. RESULTADOS

PARTE I: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO F1

I.4.1. Perfil Eletroforético da Fração F/0-70 de Frutos de *C. annuum*

A figura 5 mostra o perfil eletroforético da fração F/0-70 obtida após a extração proteica de frutos de pimenta *C. annuum*, onde se observa na segunda raia algumas proteínas com massa molecular acima de 16.9 kDa, mas predominantemente visualiza-se peptídeos de menor massa molecular variando entre 6 e 15 kDa, com destaque para uma banda mais abundante de aproximadamente 7 kDa (seta).

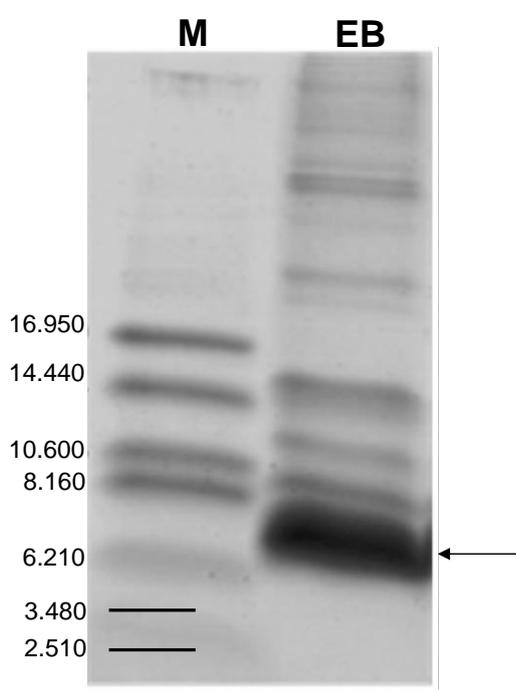


Figura 5: Visualização eletroforética por gel de tricina, na presença de SDS, da fração F/0-70 obtida de frutos maduros de *C. annuum* tratada com β -mercaptoetanol. (M) marcador de massa molecular (Da), (F/0-70) fração obtida após fracionamento com sulfato de amônio (0-70% saturação) e aquecimento (80 °C) do extrato proteico bruto de frutos de *C. annuum*.

I.4.2. Cromatografia de Fase Reversa em HPLC e Obtenção da Fração F1

A fração F/0-70, obtida após a extração proteica de frutos de pimenta *C. annuum*, foi submetida à cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna C2/C18, onde foi usado o solvente propanol como eluente da amostra para o fracionamento dos peptídeos. O cromatograma da fração F/0-70 apresentou a presença de sete frações denominadas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 (Figura 6). Ressalta-se que em um estudo prévio (Taveira, 2012) foi realizado uma prospecção da atividade antimicrobiana dessas sete diferentes frações, e a fração F1, foi a mais tóxica, por este motivo a fração F1 foi escolhida como objeto de estudo neste trabalho.

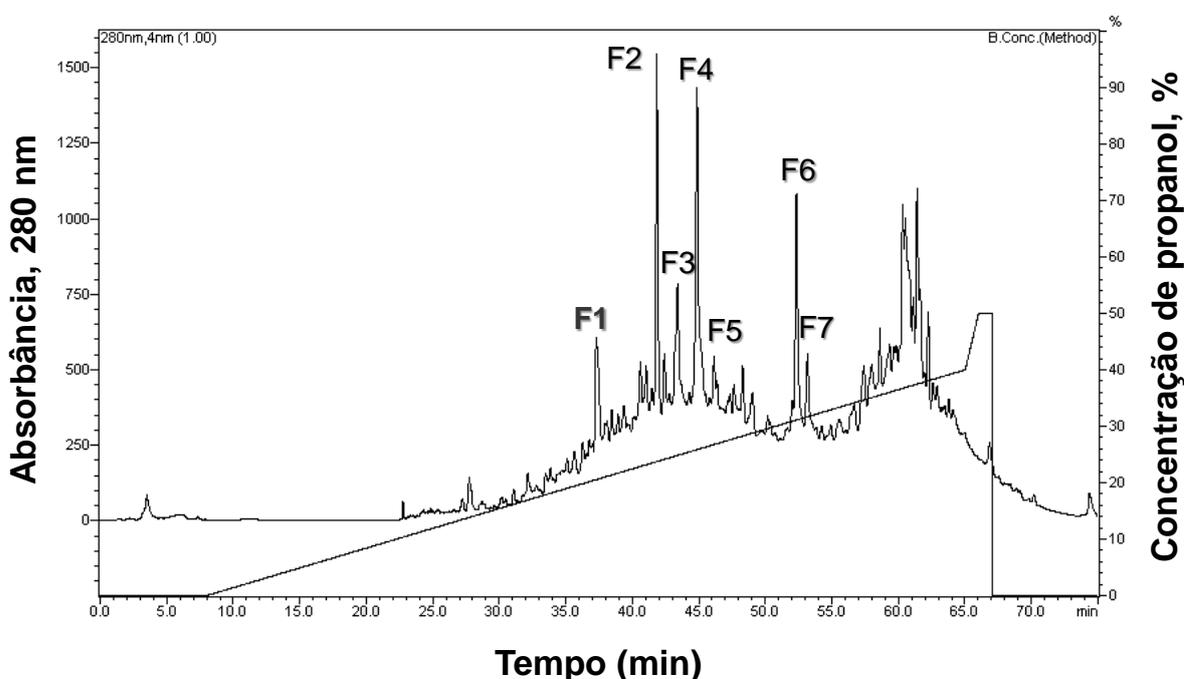


Figura 6: Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 da fração F/0-70 obtida dos frutos maduros de *C. annuum*. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida realizada com 0,1% de TFA (Solvente A) e a amostra eluída usando um gradiente de propanol. O fluxo utilizado foi de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. F1 a F7, picos retidos na coluna e eluídos em gradiente de propanol.

I.4.3. Perfil Eletroforético da Fração F1

A figura 7 mostra o perfil eletroforético obtido a partir da fração F1 proveniente da cromatografia de fase reversa em HPLC (C2/C18). Observamos que a fração F1 apresenta um único peptídeo de massa molecular próxima de 7 kDa.

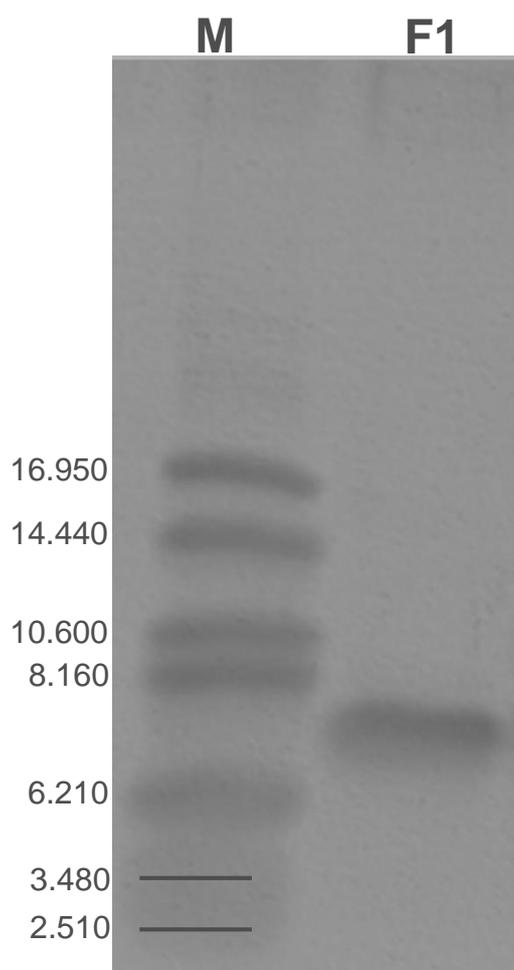


Figura 7: Visualização eletroforética por gel de tricina, na presença de SDS, da fração F1 tratada com β -mercaptoetanol, obtida através do fracionamento da fração F/0-70, de *C. annuum* por cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna C2/C18. (M) marcador de massa molecular (Da). (F1) fração F1, pico retido e eluídos em gradiente de propanol proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em HPLC.

I.4.4. Análise da Sequência de Aminoácidos da Fração F1

A análise da sequência parcial de aminoácidos da região N-terminal do peptídeo de 7 kDa da fração F1 revelou 42%, 67% e 67% de identidade com os peptídeos similares à tionina de *C. annuum thionin-like peptide* (1) (gi:164698852), *C. annuum thionin-like peptide* (2) (gi:6552502) e *C. annuum γ -thionin 1* (gi:6601331), respectivamente (Figura 8). Este alinhamento revelou também que quatro resíduos de cisteína são conservados. Na sequência parcial de 33 resíduos de aminoácidos são observadas algumas dissimilaridades em relação aos peptídeos pertencentes à família das tioninas. Entre estas diferenças estão a substituição de I₃ por um G, C₅ por um Y, D₁₇ por um S, L₂₂ por um D, ausência da E₃₀. Adicionalmente este peptídeo apresenta algumas similaridades, como a presença de quatro resíduos de cisteínas conservados (C₃, C₁₄, C₂₀ e C₂₄), e também os resíduos K6, T9, P11, P18, K27, Y30 e o tripeptídeo D₃₁GH₃₃. A partir desta análise este peptídeo passou a ser denominado **CaThi** (*Capsicum annuum thionin-like peptide*).

Peptídeos				10				20				30																										
Peptídeo de 7 kDa da Fração F 1 (N-terminal)	1	A	E	G	C	Y	K	E	L	T	K	P	V	K	C	S	S	S	P	R	C	L	Y	D	C	I	A	K	T	K	Y	-	D	G	H	33	I%	P%
<i>Thionin-like peptide (1)</i>	26	K	E	I	C	C	K	V	P	T	T	P	F	L	C	T	N	D	P	Q	C	K	T	L	C	-	S	K	V	N	Y	E	D	G	H	59	42%	57%
<i>Thionin-like peptide (2)</i>	26	K	E	I	C	C	K	E	L	T	K	P	V	K	C	S	S	D	P	L	C	Q	K	L	C	M	E	K	E	K	Y	E	D	G	H	59	67%	73%
<i>γ-thionin 1</i>	26	K	E	I	C	C	K	E	L	T	K	P	V	K	C	S	S	D	P	L	C	Q	K	L	C	M	E	K	E	K	Y	E	D	G	H	59	67%	73%

Figura 8: Alinhamento dos 33 resíduos de aminoácidos obtidos do peptídeo de 7 kDa da fração F1 com as seguintes sequências de peptídeos similares às tioninas: *C. annuum thionin-like peptide (1)* (gi: 164698852); *C. annuum thionin-like peptide (2)* (gi: 6552502); *C. annuum γ-thionin 1* (gi: 6601331). Os resíduos de Cys conservados estão destacados dentro de caixas. 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. A partir deste resultado o peptídeo de 7 kD será denominado de CaThi (do inglês *Capsicum annuum thionin-like peptide*).

PARTE II: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA CaThi SOBRE LEVEDURAS

II.4.1. Ensaio de Inibição do Crescimento contra Leveduras na Presença da CaThi

Inicialmente, a atividade antimicrobiana de CaThi foi testada sobre as espécies de leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, utilizando-se a concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 9). Os resultados obtidos mostram que CaThi foi capaz de causar uma inibição de 98, 96 e 100% do crescimento de *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente.

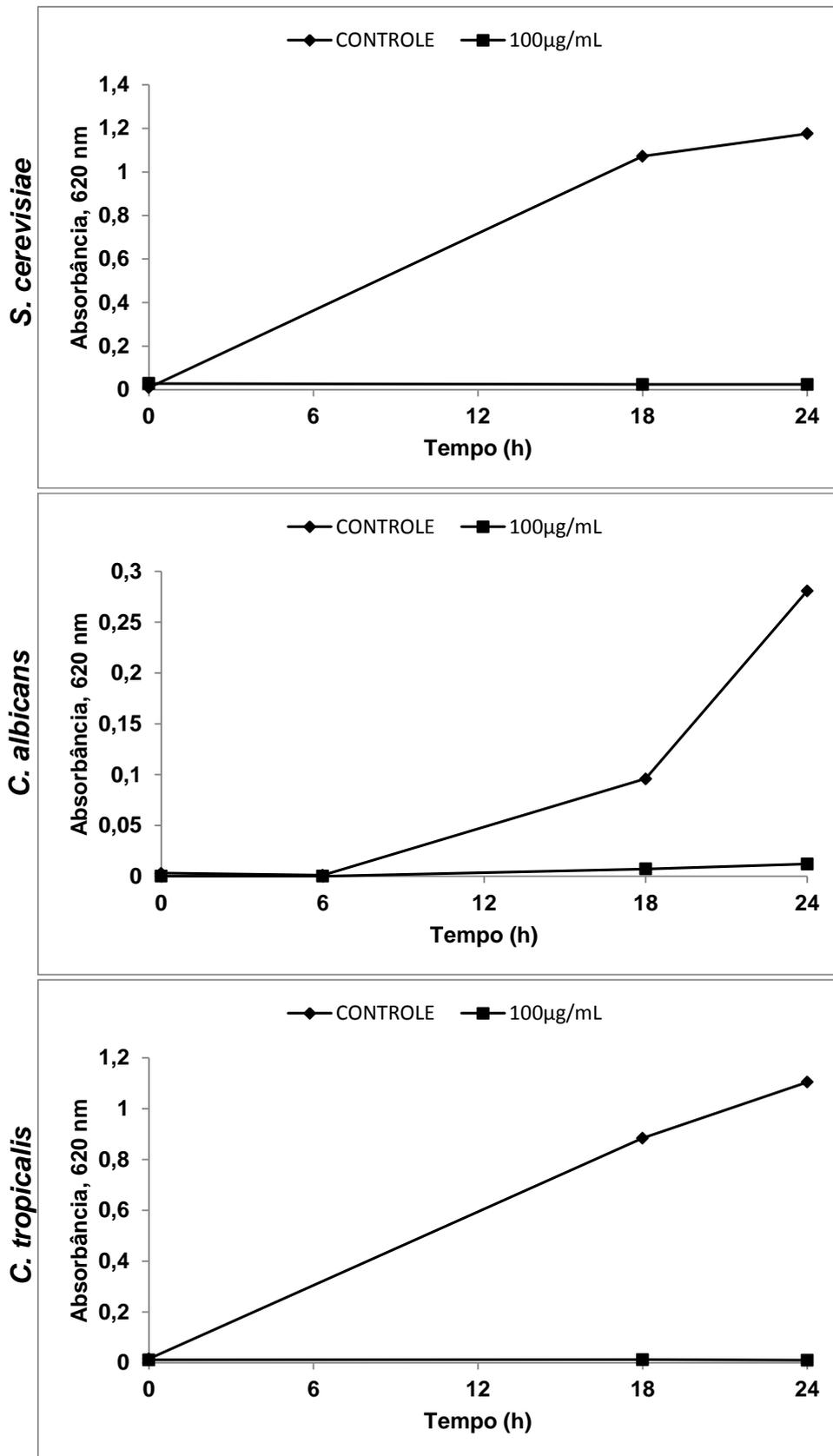


Figura 9: Inibição do crescimento das células das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis* na ausência de CaThi (controle) e na presença de 100 µg.mL⁻¹ de CaThi.

II.4.2. Efeito da CaThi sobre a Permeabilização de Membranas de Leveduras

Vista a forte atividade inibitória no crescimento das três leveduras testadas, as células de *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, e *C. albicans* foram usadas para a análise da permeabilidade da membrana através da utilização de corante Sytox green após 24 h de incubação, agora com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi. Na figura 10, foram observadas células fluorescentes em todas as leveduras testadas, sugerindo que a CaThi foi capaz de permitir a entrada e a marcação da sonda, sugerindo a permeabilização destas membranas.

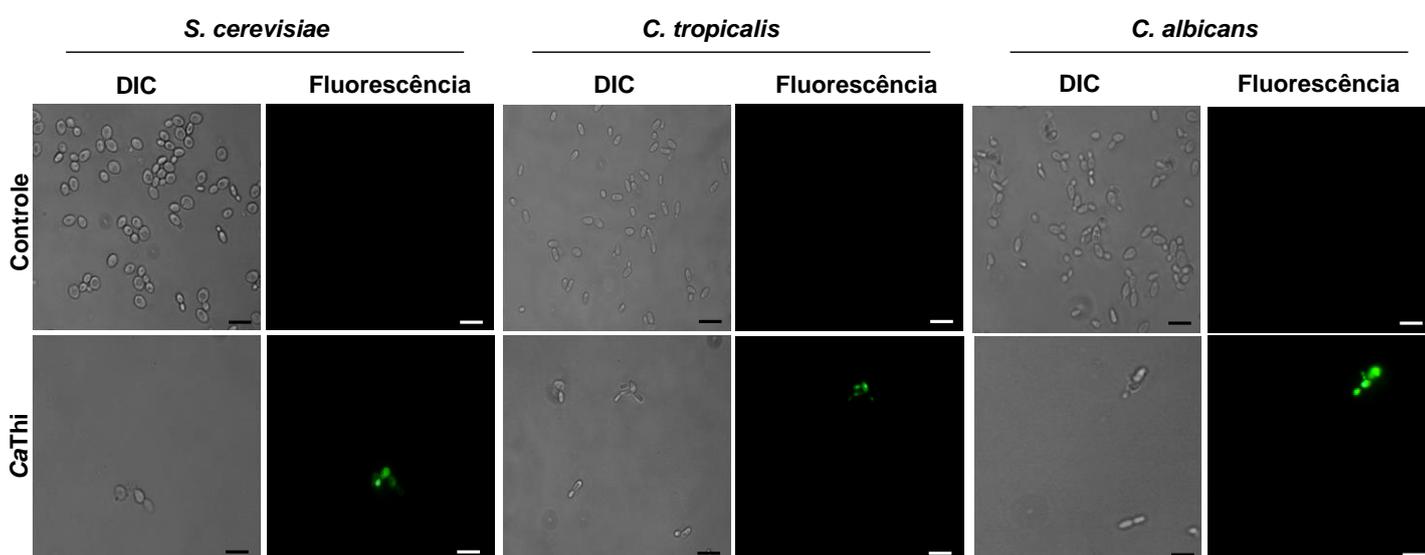


Figura 10: Diferentes células de leveduras, após ensaio de permeabilização da membrana, visualizadas por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente Sytox green. As células foram tratadas com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi durante 24 h e em seguida, analisadas quanto a permeabilização da membrana. As células-controle foram tratadas apenas com sonda Sytox green. Barras de $10 \mu\text{m}$.

A partir da obtenção destes dois últimos resultados descritos, decidimos trabalhar com as leveduras de importância médica como as do gênero *Candida*. Portanto, além das espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* já utilizadas, mais quatro espécies foram adicionadas neste estudo, são elas: *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis* e *C. mogii*.

II.4.3. Determinação do IC₅₀ de CaThi sobre Leveduras

Foram realizados ensaios de inibição de crescimento das seis espécies de leveduras do gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis* e *C. mogii*, utilizando diferentes concentrações de CaThi, a fim de se determinar o seu IC₅₀ (Figura 11). A partir destes resultados de inibição foi calculado a IC₅₀, e para maior clareza, apenas os valores correspondentes à IC₅₀ de CaThi foram reorganizados em forma de tabela (Tabela 2). CaThi na concentração de 10 µg.mL⁻¹ foi suficiente para causar 50% de inibição do crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. buinensis*, mas 40 µg.mL⁻¹ foi necessário para alcançar o IC₅₀ para *C. pelliculosa*. Assim, *C. pelliculosa* parece ser a menos susceptível para CaThi, sendo necessárias as concentrações mais elevadas para inibir seu crescimento em 50%.

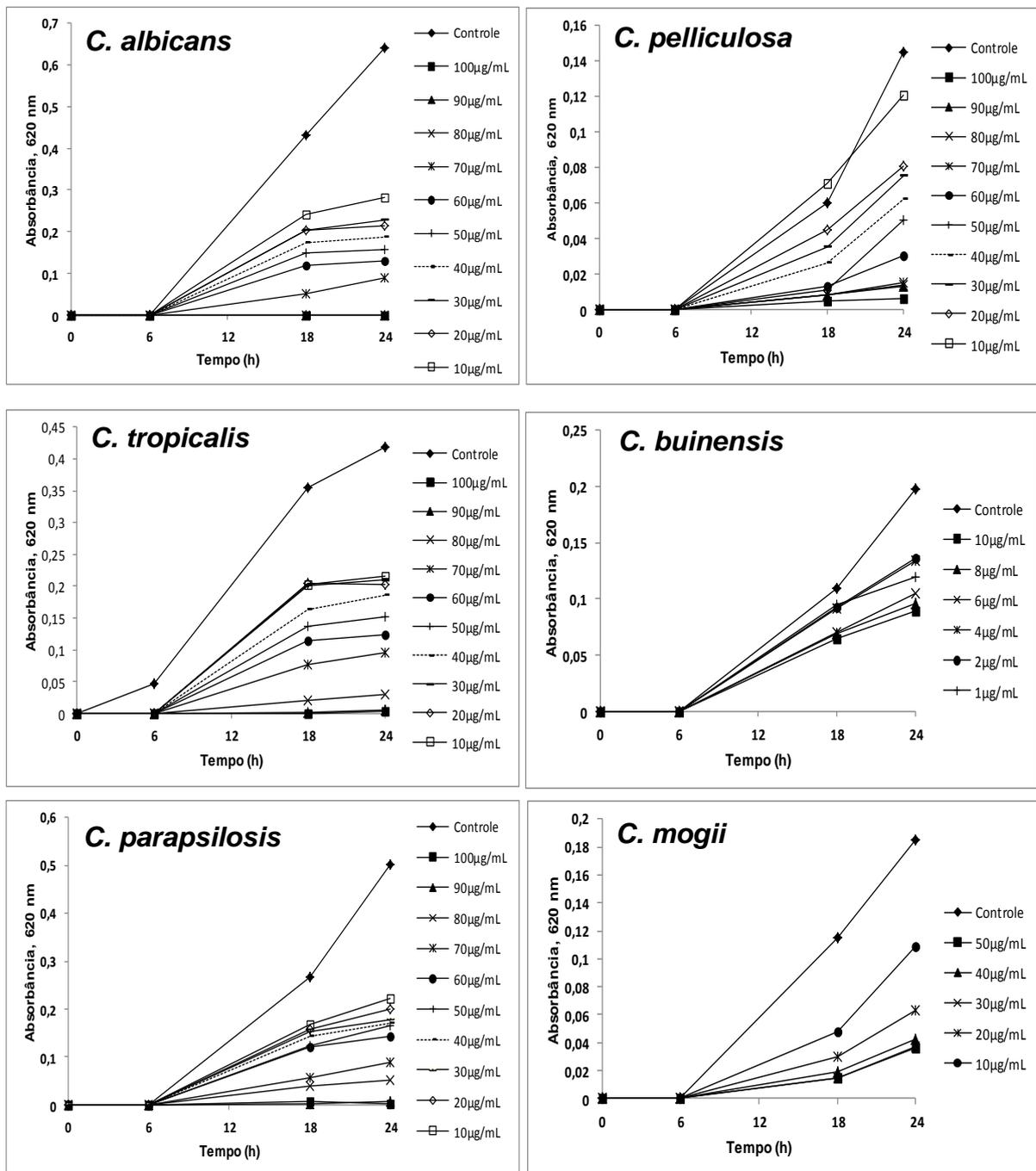


Figura 11: Inibição do crescimento das células das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis* e *C. mogii* na ausência de CaThi (controle) e na presença de diferentes concentrações de CaThi ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A partir destes dados de inibição do crescimento em função da concentração da substância usada, foram determinadas as IC_{50} para cada levedura.

Tabela 2. IC₅₀* (µg.mL⁻¹) do CaThi sobre diferentes espécies de *Candida*.

Leveduras	CaThi
<i>Candida albicans</i> (CE022)	10,0
<i>Candida tropicalis</i> (CE017)	10,0
<i>Candida parapsilosis</i> (CE002)	10,0
<i>Candida pelliculosa</i> (3974)	40,0
<i>Candida buinensis</i> (3982)	10,0
<i>Candida mogii</i> (4674)	20,0

* representa a concentração da droga necessária para se obter 50% de inibição do crescimento da levedura, *in vitro*.

II.4.4. Efeito da CaThi sobre a Viabilidade Celular de Leveduras

Com base na atividade antimicrobiana da CaThi realizamos um ensaio de viabilidade celular utilizando as respectivas IC₅₀ de CaThi para cada levedura testada. Observamos que CaThi foi capaz de causar a morte celular em todas as células de leveduras (Figura 12). As espécies mais susceptíveis à CaThi foram *C. buinensis*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* com 99,2, 98,9 e 80,3% de morte respectivamente, e a menos suscetível foi *C. tropicalis* com 47,9% de perda de viabilidade. Estes resultados indicam que o efeito inibitório de CaThi foi fungicida contra todas as espécies testadas.

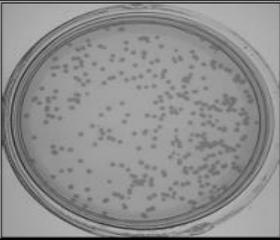
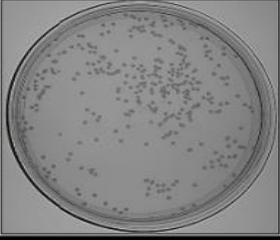
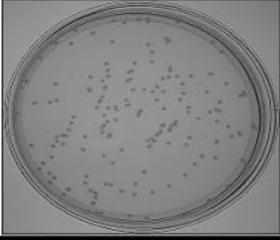
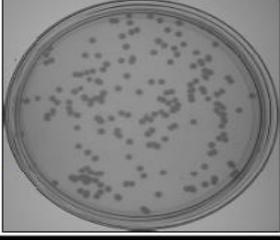
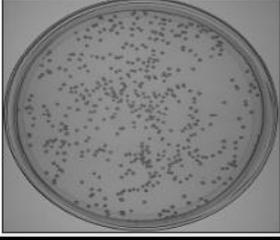
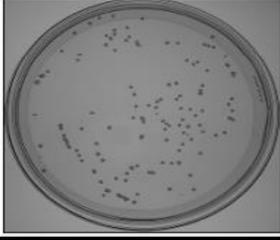
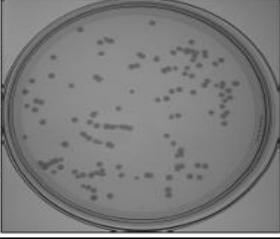
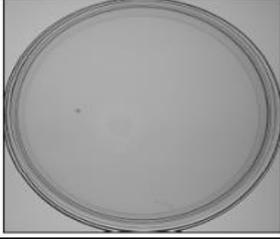
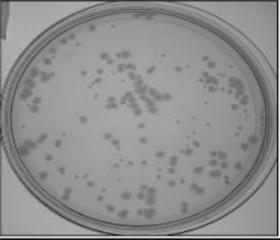
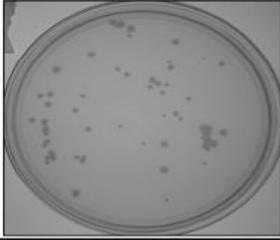
	A		B Amostra	Número de células*	% de morte celular
	Controle	CaThi			
<i>C. albicans</i>			controle	395.3±20.7	0
			CaThi	77.6±3.7	80.3
<i>C. tropicalis</i>			controle	344.3±28.9	0
			CaThi	179.3±5.5	47.9
<i>C. parapsilosis</i>			controle	190.6±9.9	0
			CaThi	2.0±2.1	98.9
<i>C. pelliculosa</i>			controle	439.3±33.3	0
			CaThi	130.3±9.2	70.2
<i>C. buinensis</i>			controle	131.6±8.9	0
			CaThi	1.0±0.8	99.2
<i>C. mogii</i>			controle	158.3±18.4	0
			CaThi	61.3±4.4	61.6

Figura 12: (A) Crescimento de colônias na condição controle e após o tratamento com CaThi na sua IC₅₀ durante 24 h, a partir das quais foram calculadas a viabilidade das células de leveduras. (B) Quantificação de células e de porcentagem de morte celular das leveduras, na condição controle e após o tratamento com a IC₅₀ da CaThi durante 24 h. (*) Indica a significância pelo teste T (P <0,05). Os experimentos foram realizados em triplicata.

II.4.5. Efeito de CaThi sobre a Permeabilização de Membranas de Leveduras

Todas as seis espécies de *Candida* quando cultivadas durante 24 h na presença de CaThi nas suas IC₅₀ mostraram marcação pelo corante Sytox green (Figura 13). As células deste ensaio foram contadas e observamos uma porcentagem maior de células de *C. albicans* e *C. pelliculosa* apresentando a fluorescência do Sytox green, em torno de 83 e 91,6%, respectivamente. Este resultado sugere que CaThi é mais eficaz na permeabilização da membrana destas células do que nas outras espécies de *Candida* analisadas (Tabela 3).

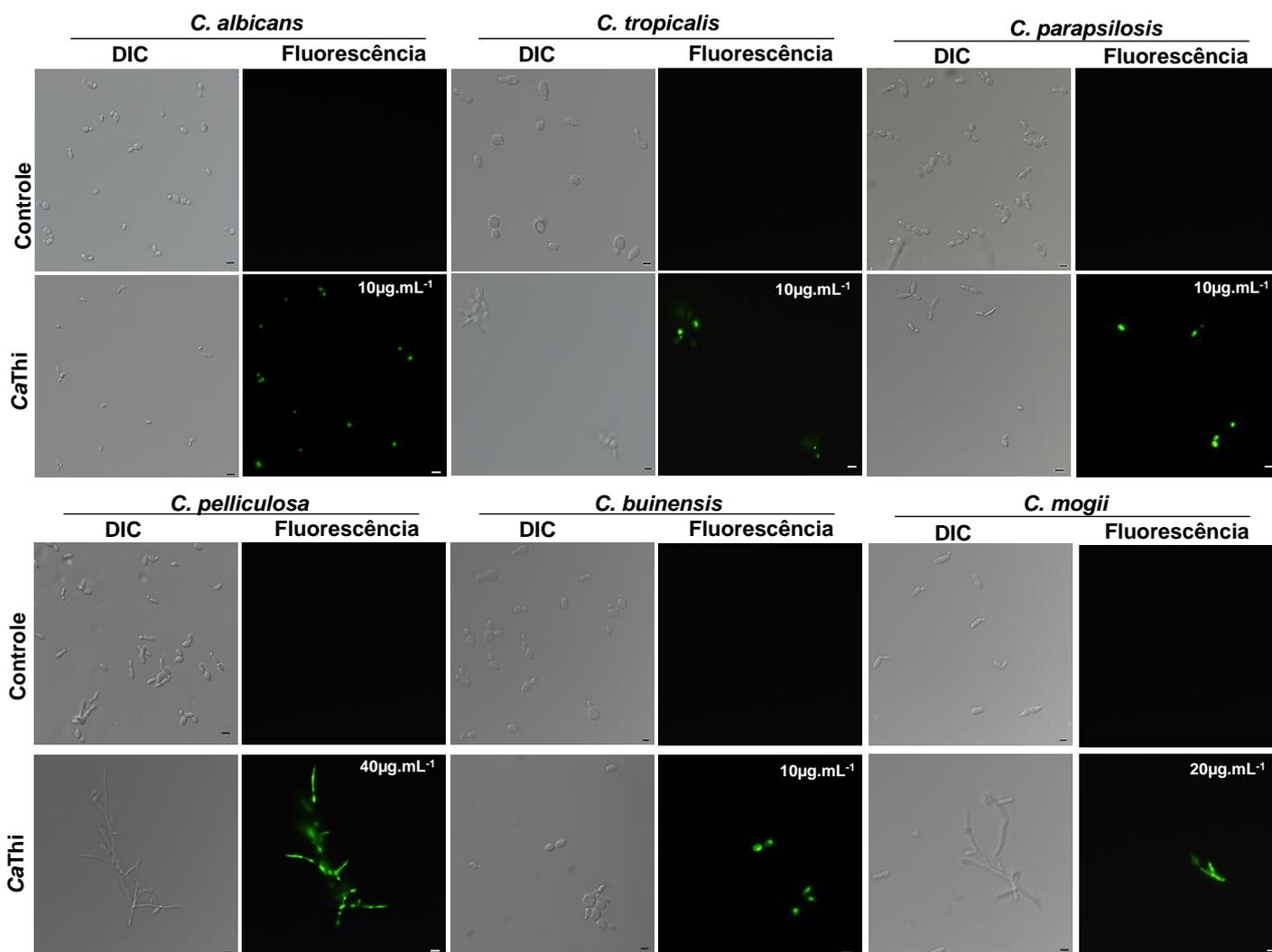


Figura 13: Diferentes células de leveduras após ensaio de permeabilização da membrana, visualizadas por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente Sytox green. As células foram tratadas com CaThi nas suas IC₅₀ durante 24 h e em seguida, analisadas quanto a permeabilização da membrana. As células-controle foram tratadas apenas com sonda Sytox green. Barras de 5 µm.

Tabela 3. Porcentagem de células de leveduras fluorescentes após tratamento com CaThi^a.

Leveduras	Amostra	Número de células visualizadas em DIC	Número de células visualizadas em fluorescência	% de células fluorescentes*
<i>C. albicans</i>	controle	62,0±9,3	0,6±0,8	0,9
	CaThi	20,0±5,0	16,6±5,3	83,0
<i>C. tropicalis</i>	controle	41,2±4,2	0,8±1,3	1,9
	CaThi	9,8±4,9	4,8±4,6	48,9
<i>C. parapsilosis</i>	controle	79,2±12,1	0	0
	CaThi	18,2±5,4	6,2±1,4	34,0
<i>C. pelliculosa</i>	controle	23,8±3,5	0	0
	CaThi	7,2±1,9	6,6±2,3	91,6
<i>C. buinensis</i>	controle	43,6±9,0	0,8±1,3	1,8
	CaThi	13,6±6,2	6,2±1,3	45,5
<i>C. mogii</i>	controle	18,6±3,2	0,6±0,8	3,2
	CaThi	8,6±2,0	4,4±2,7	51,1

^a Determinação do número de células visualizadas em cinco campos aleatórios por DIC e fluorescência das amostras obtidas a partir do ensaio de permeabilização de membranas. O número total de células visualizadas por DIC para cada levedura (no controle e teste) foi assumido como 100%. (*) Indica a significância pelo teste T ($P < 0,05$) entre todos os testes e seus respectivos controles. Os experimentos foram realizados em triplicata.

II.4.6. Efeito da CaThi sobre o Aumento da Produção Endógena de ROS em Leveduras

A produção endógena de ROS foi analisada incubando as leveduras durante 24 h com CaThi nas suas IC₅₀ respectivas para cada levedura. A figura 14 mostra o aumento da produção de ROS apenas em *C. tropicalis*, sugerindo que o aumento de estresse oxidativo induzido por Cathi, pode ser a base do efeito inibidor do crescimento deste AMP nesta levedura. No entanto, nas concentrações testadas de CaThi, nas demais espécies de *Candida*, o estresse oxidativo não foi detectado.

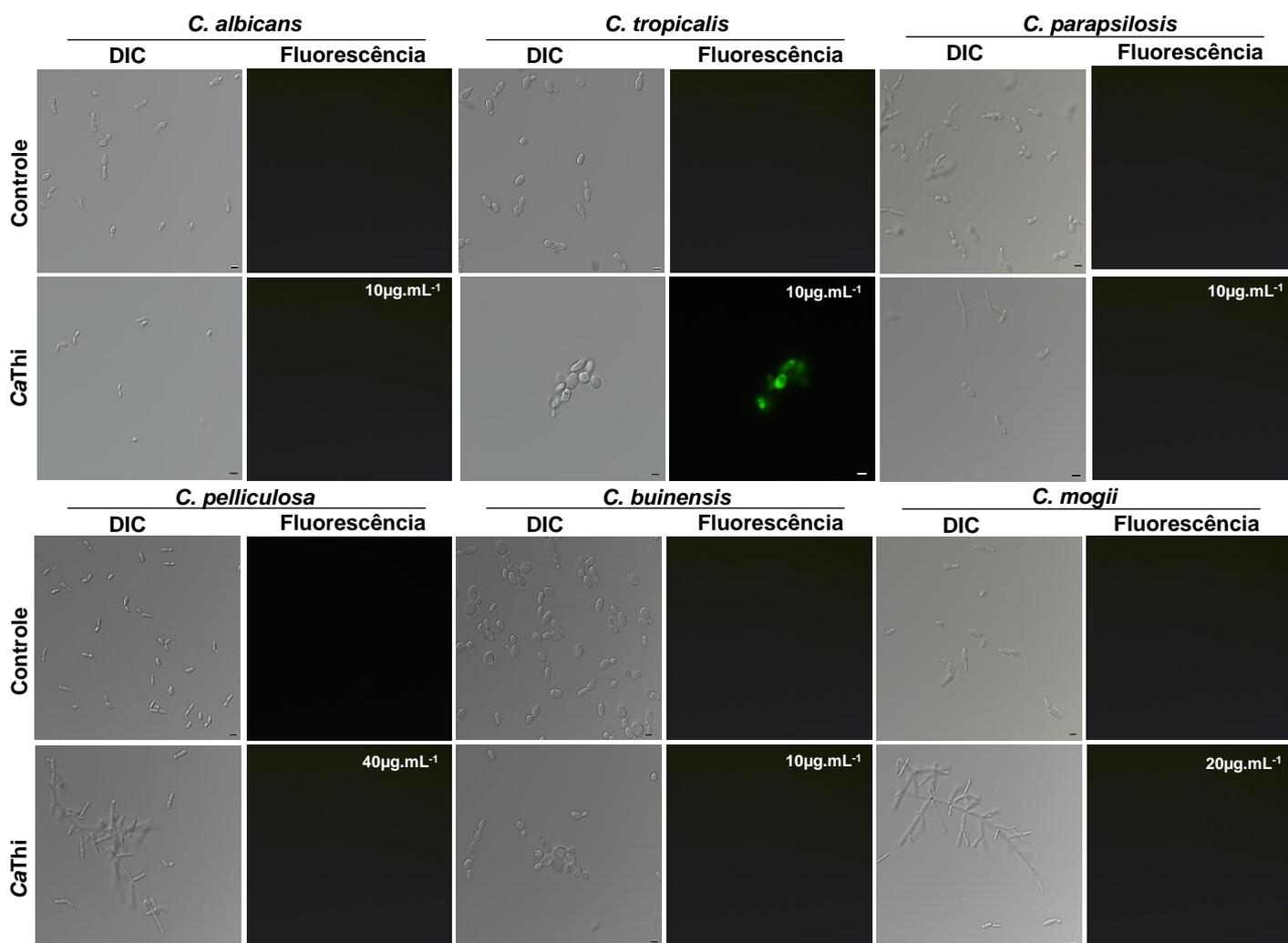


Figura 14: Diferentes células de leveduras após a ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente 2', 7' diacetato diclorofluoresceína (H₂DCFDA). As células foram tratadas com CaThi nas suas IC₅₀ durante 24 h e em seguida, analisadas para detecção de ROS. As células controle foram tratadas apenas com sonda H₂DCFDA. Barras de 5 µm.

II.4.7. Análise da Funcionalidade Mitocondrial em Células da Levedura *S. cerevisiae* Tratada com CaThi

Das leveduras testadas para os ensaios de permeabilização e ROS, apenas a levedura *C. tropicalis* apresentou sinal positivo para os dois ensaios por este motivo, os testes seguintes foram feitos com esta levedura. As células de *C. tropicalis*, após 24 h de tratamento com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da CaThi, apresentam atividade mitocondrial muito diminuída como observado pela fraca fluorescência do corante Rodamina 123. Para as células-controle que possuem mitocôndrias funcionais, é visualizado forte sinal de fluorescência da Rodamina 123 (Figura 15).

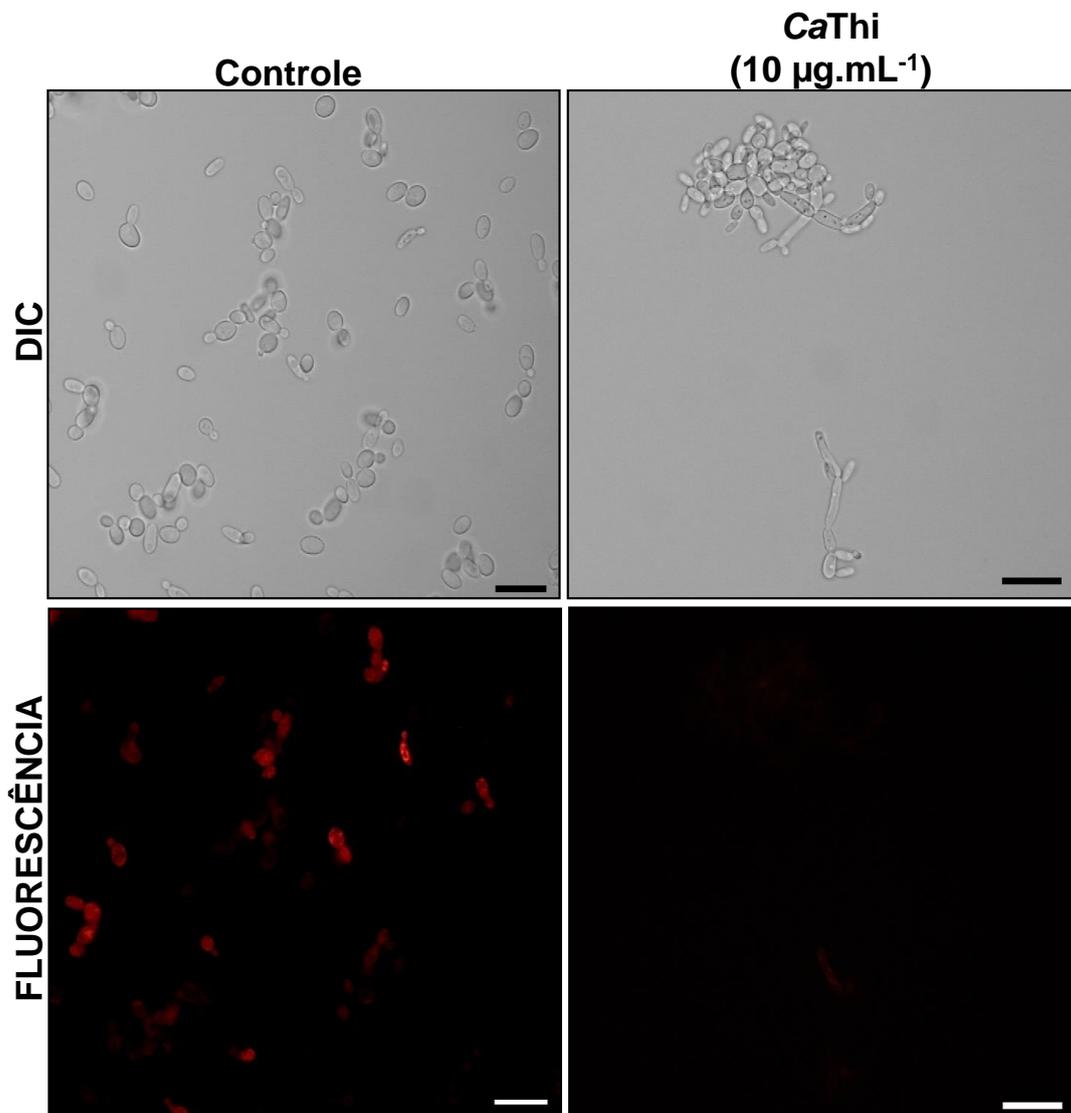


Figura 15: Células de *C. tropicalis* após ensaio de funcionalidade mitocondrial, visualizadas por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente Rodamina 123. As células foram tratadas com 10 µg.mL⁻¹ de CaThi durante 24 h e em seguida, analisadas quanto a funcionalidade mitocondrial. As células controle foram tratadas apenas com sonda Rodamina 123. Barras de 10 µm.

II.4.8. Detecção da Atividade de Caspases Induzida por CaThi em Células de *C. tropicalis*

Para se verificar se há ocorrência de eventos apoptóticos induzidos pela presença de CaThi no meio de crescimento, de *C. tropicalis*, a atividade de enzimas do tipo caspases foi investigada. Nossos resultados mostram que a exposição das células de *C. tropicalis* à CaThi resultou na indução de atividade de caspases, o que sugere que o processo de morte, pelo menos para estas células, possa ser do tipo apoptótica (Figura 16).

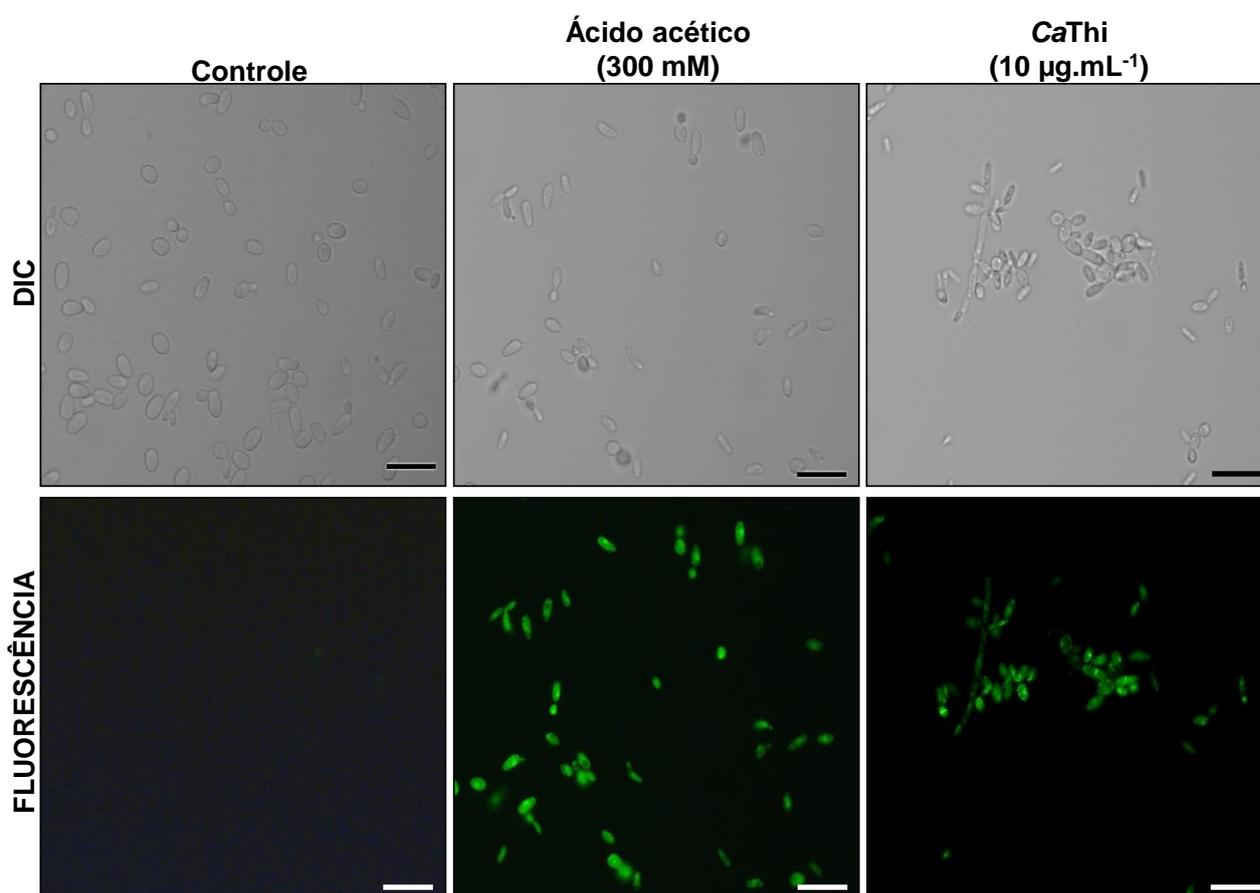


Figura 16: Atividade de caspase em células de *C. tropicalis* após 24 h de incubação com 10 µg.mL⁻¹ de CaThi. As células-controle e as células tratadas com CaThi foram incubadas com a sonda FITC-VAD-FMK e analisadas por microscopia de fluorescência. A fluorescência verde indica coloração positiva para a atividade da caspase. Barras de 10 µm.

II.4.9. Verificação do Translocação da Fosfatidilserina Induzida em Células da Levedura *S. cerevisiae* pela CaThi

A translocação da PS para o folheto externo da membrana plasmática dos esferoplastos de *S. cerevisiae* deu marcação positiva. Este resultado indica que CaThi pode causar um efeito apoptótico nas células de *S. cerevisiae*, observado pela exposição de PS. Efeito semelhante foi verificado no controle positivo, onde as foram células incubadas com peróxido de hidrogênio, e nenhuma marcação foi observada no controle negativo, sem tratamento (Figura 17).

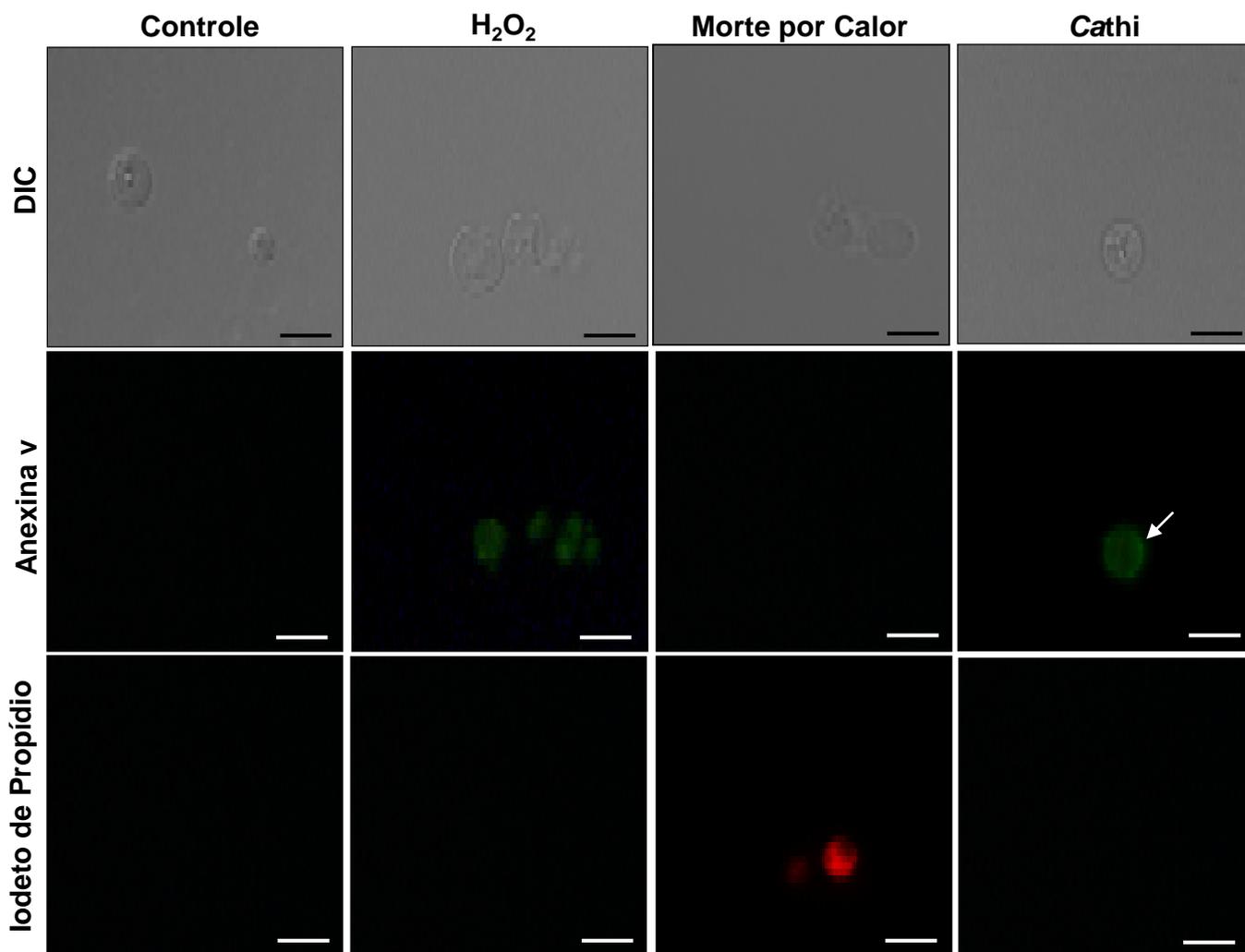


Figura 17: Esferoplastos de *S. cerevisiae* incubados durante 2 h com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ CaThi e depois tratados com anexina V (AnnV) e iodeto de propídio (PI), mostrando a exposição de fosfatidilserina para a monocamada externa (fluorescência verde). Controle (esferoplastos em meio de ensaio) é AnnV⁻ e PI⁻, H₂O₂ (esferoplastos tratados com H₂O₂) são AnnV⁺ e PI⁻, células mortas por calor (esferoplastos tratados a 100 °C) são AnnV⁻ e PI⁺ (fluorescência vermelha). Barras de 5 μm .

II.4.10. Localização de CaThi nas Células de Leveduras

Neste trabalho foi investigado também se CaThi apresenta um alvo intercelular e se é internalizada em células de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Estas leveduras foram escolhidas por serem conhecidas como os maiores patógenos oportunistas das espécies de *Candida* aqui testadas, bem como porque *C. tropicalis* foi a única levedura que teve a permeabilização de membrana e a indução de ROS na presença de CaThi. Para isso, foram utilizados $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi acoplada ao FITC para verificar a ocorrência de sinal de fluorescência intracelular e as células também foram tratadas com DAPI para a marcação dos núcleos. A fluorescência intracelular de CaThi-FITC foi observada em ambas as espécies de *Candida*. No entanto, apenas contra as células de *C. tropicalis* a CaThi-FITC produziu um spot de fluorescência específico e intenso dentro das células. Já para as células de *C. albicans* a fluorescência foi difusa. A sobreposição das imagens de CaThi-FITC com DAPI indicou uma co-localização destes sinais fluorescentes em *C. tropicalis*, mas não em células de *C. albicans* (Figura 18). Estes dados sugerem que, pelo menos para *C. albicans* e *C. tropicalis*, CaThi pode ter um alvo intracelular, e que para *C. tropicalis* o alvo possivelmente está localizado no núcleo.

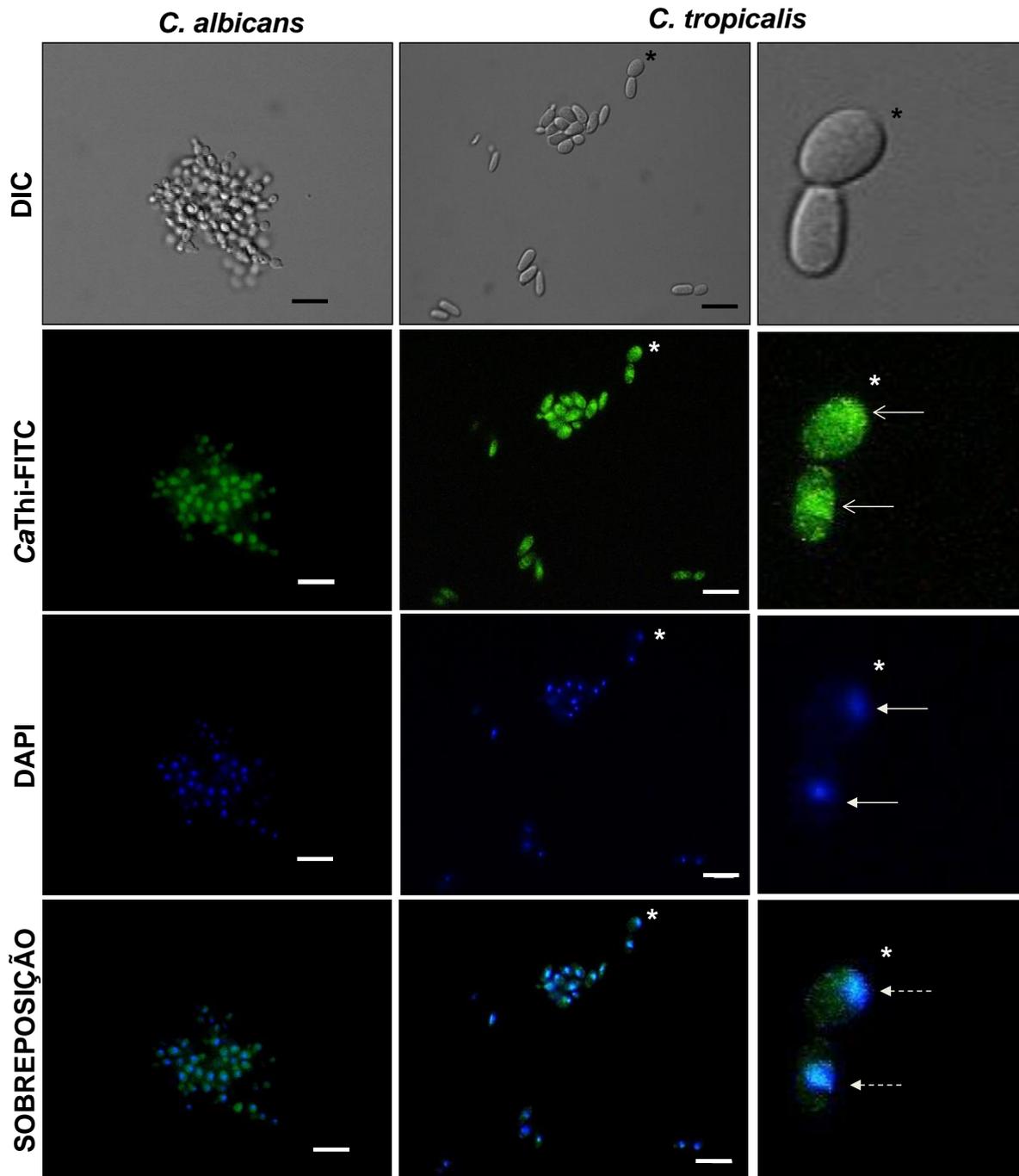


Figura 18: Células de *C. albicans* e *C. tropicalis* incubadas por 24 h com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ CaThi-FITC (setas abertas) visualizadas por microscopia de fluorescência. Os núcleos foram marcados por DAPI (setas cheias), após o período de incubação com CaThi-FITC. Sobreposição das imagens de marcações com DAPI e FITC (note a sobreposição da marcação verde [CaThi-FITC] e azul [DAPI] setas pontilhadas) indicam a localização nuclear de CaThi-FITC. Barras de $20 \mu\text{m}$. (*) Indica a posição do aumento digital.

II.4.11. Ensaio de Verificação da Mudança de Mobilidade Eletroforética do DNA

A partir do resultado descrito no tópico anterior que demonstra que *CaThi* é capaz de internalizar-se e ter como alvo o núcleo em células de *C. tropicalis*, levantou-se a hipótese de que o peptídeo pudesse interagir com o DNA destas células. Portanto, nós analisamos a ocorrência desta ligação através da verificação de uma eventual alteração da mobilidade do DNA. Nosso resultado indica que $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *CaThi* foi capaz de se ligar a molécula de DNA e esta ligação resulta em um complexo que tem uma mobilidade eletroforética diferente do DNA livre, impedindo sua entrada na malha do gel de agarose, como pode ser observado no teste (segunda raia) e no controle positivo quando utilizamos poli L-lisina. Esse resultado é corroborado quando visualizamos o controle negativo apenas na presença de água onde se observa a mobilidade eletroforética normal da molécula de DNA (Figura 19).

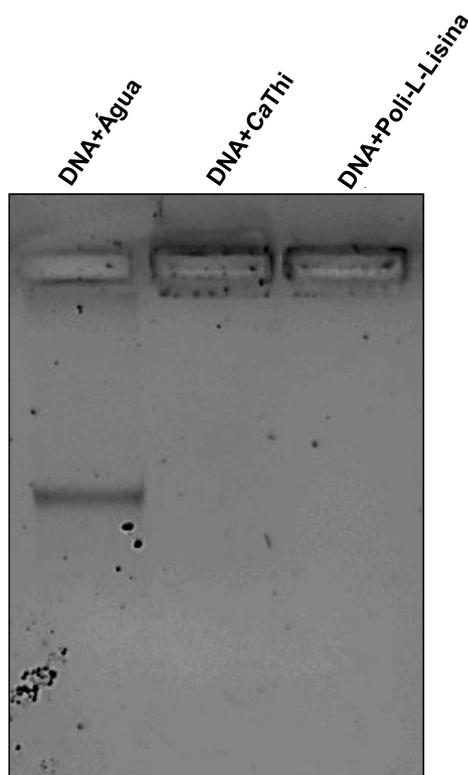


Figura 19: Visualização eletroforética da mobilidade do DNA extraído de *S. cerevisiae* na presença de *CaThi* em gel de agarose 0,8%. Primeira raia, controle, mobilidade de 100 ng de DNA; Segunda raia, mobilidade de 100 ng DNA incubados com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *CaThi*; Terceira raia, controle positivo, mobilidade de 100 ng de DNA incubados $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de poli-L-lisina.

II.4.12. Análise de Fluxo de H⁺ Utilizando o Sistema de Eletrodos Vibráteis Íons-Seletivos

A diferença de voltagem extracelular, fluxos de prótons e pH da superfície foram avaliados na levedura *C. tropicalis* utilizando uma sonda vibrátil H⁺ seletiva. O ensaio de dose-resposta mostrou uma inibição significativa de efluxo de H⁺ nas células da levedura após o tratamento com a CaThi (Figura 20). A diferença de voltagem foi registrada na presença ou ausência de CaThi (Figura 21A). Antes da exposição a 40 µg.mL⁻¹ de CaThi, as células da levedura mostraram uma atividade de efluxo H⁺ extracelular estacionária de 4,61 ± 0,62 pmol cm⁻² min⁻¹, no entanto, após o tratamento com o peptídeo, o efluxo de H⁺ teve uma inibição significativa de aproximadamente 90,04% e uma taxa de efluxos de aproximadamente 0,45 ± 0,28 pmol cm⁻² min⁻¹ (p≤0.0001, teste-T) (Figura 21B). Consequentemente, o pH da superfície teve um aumento significativo quando as células da levedura foram expostas ao peptídeo CaThi (Figura 21C). No entanto, após 10 min da retirada de CaThi do meio, o efluxo de H⁺ basal e o pH da superfície, retornaram para o nível normal, sugerindo que a inibição é dependente de CaThi (dados não-mostrados).

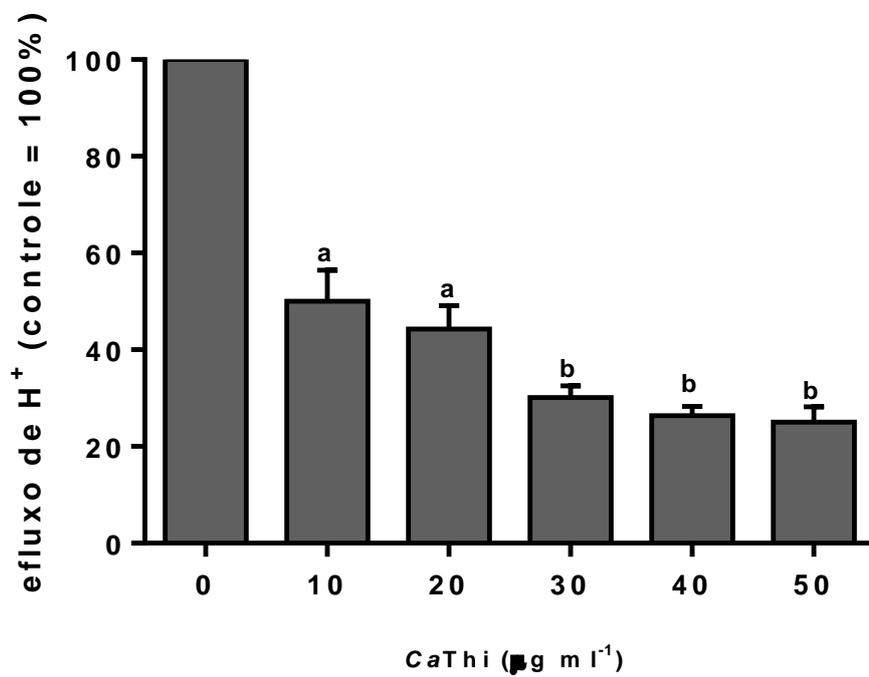


Figura 20: Efeito dose-resposta de CaThi sobre a taxa de efluxo de H^+ extracelular na levedura *C. tropicalis*. Os dados foram analisados por One-Way ANOVA combinado com teste Tukey's. As médias com a mesma letra não possuem diferenças significantes pelo teste Tukey's ($p \leq 0.05$).

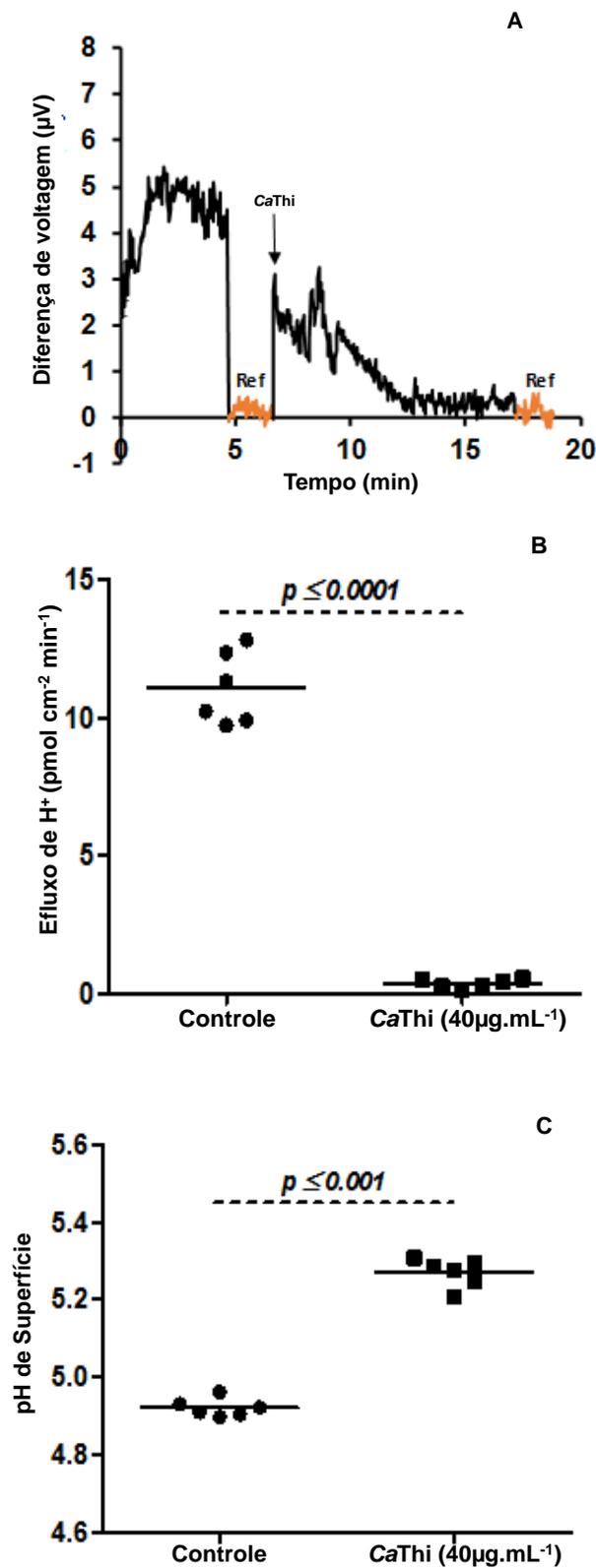


Figura 21: Diferença de voltagem (A), taxa de efluxo de H^+ (B) e pH da superfície (C) nas células de levedura *C. tropicalis* tratados ou não (controle) com $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi. Para os dados de efluxo de H^+ e pH da superfície, as médias são significativamente diferentes pelo Student T-test ($p \leq 0.01$). Ref representa o *background* de referência.

II.4.13. Atividade Sinérgica da Combinação do FLC com CaThi Sobre Diferentes Células de Levedura do Gênero *Candida* .

Foram feitos ensaios de inibição de crescimento para as leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis* e *C. mogii*, utilizando diferentes concentrações de FLC, a fim de se determinar o seu IC₅₀ (Figura 22). Para maior clareza, apenas os valores correspondentes à IC₅₀ de FLC foram reorganizados em forma de tabela. O menor IC₅₀ para FLC foi encontrado para *C. buinensis* (0,125 µg.mL⁻¹) e a maior para *C. pelliculosa* (5 µg.mL⁻¹) (Tabela 4).

A combinação de FLC e CaThi mostrou um aumento da atividade inibitória para todas as espécies de *Candida* testadas, sugerindo uma atividade sinérgica (Tabela 5). Curiosamente, a levedura *C. pelliculosa* apresentou o maior IC₅₀ para ambas as substâncias (5 µg.mL⁻¹ para FLC e 40 µg.mL⁻¹ para CaThi), mas quando combinado com o FLC numa concentração uma vez abaixo do seu IC₅₀ e CaThi três vezes abaixo do seu IC₅₀, observamos um aumento de 57% na inibição do crescimento desta levedura. Do mesmo modo, contra células de *C. parapsilosis* utilizando o IC₅₀ do FLC mais CaThi com uma concentração três vezes menor ao seu IC₅₀, obtivemos 100% de inibição do crescimento desta levedura. A utilização da combinação de FLC e CaThi também inibiu fortemente (96%) as células de *C. tropicalis*, embora quando utilizadas separadamente a inibição obtida com estas substâncias não atingiu 12%. Em conjunto, estes dados sugerem que a combinação destas substâncias pode ser muito eficaz contra espécies de *Candida*.

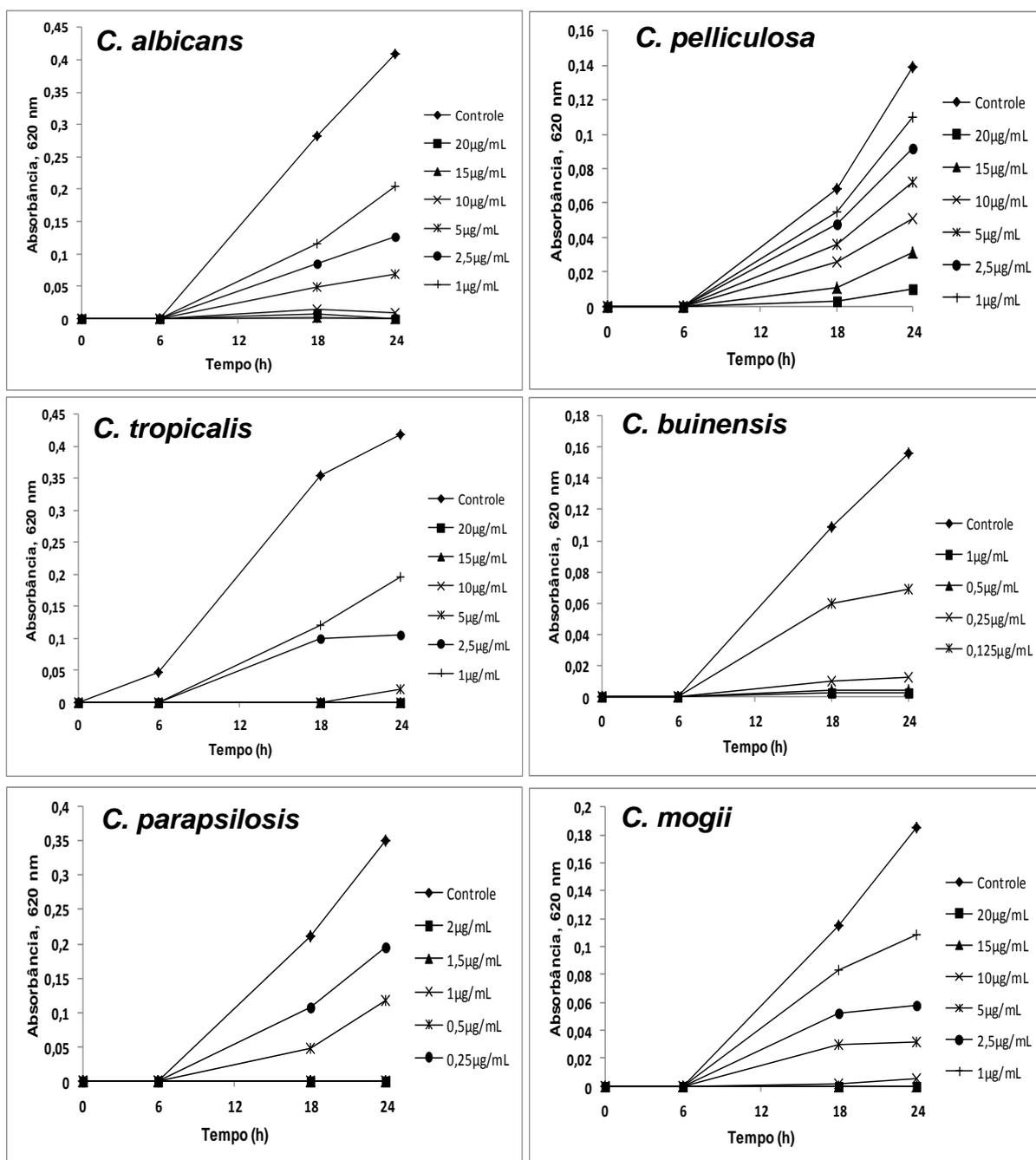


Figura 22: Inibição do crescimento das células das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis* e *C. mogii* na ausência de FLC (controle) e na presença de diferentes concentrações de FLC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A partir destes dados de inibição do crescimento em função da concentração da substância usada, foram determinadas as IC_{50} para cada levedura.

Tabela 4. IC₅₀* (µg.mL⁻¹) do FLC sobre diferentes espécies de *Candida*.

Leveduras	FLC
<i>Candida albicans</i> (CE022)	1,0
<i>Candida tropicalis</i> (CE017)	1,0
<i>Candida parapsilosis</i> (CE002)	0,5
<i>Candida pelliculosa</i> (3974)	5,0
<i>Candida buinensis</i> (3982)	0,125
<i>Candida mogii</i> (4674)	2,5

* representa a concentração da droga necessária para se obter 50% de inibição do crescimento da levedura, *in vitro*.

Tabela 5. Porcentagem de inibição da CaThi e FLC sozinhos e em combinação mostrando o efeito sinérgico contra células de leveduras *in vitro*.

Leveduras	Amostra	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) ^a	Inibição (%)	Efeito da combinação (%) (CaThi+FLC) *
<i>C. albicans</i>	CaThi	3,5	2,93	77,5
	FLC	0,5	24,48	
<i>C. tropicalis</i>	CaThi	3,5	0	96,26
	FLC	0,5	11,55	
<i>C. parapsilosis</i>	CaThi	3,5	4,0	100,0
	FLC	0,5	50,0	
<i>C. pelliculosa</i>	CaThi	15,0	2,63	57,45
	FLC	2,5	7,8	
<i>C. buinensis</i>	CaThi	5,0	19,0	67,01
	FLC	0,06	5,45	
<i>C. mogii</i>	CaThi	10,0	17,19	61,05
	FLC	1,0	22,80	

^a As concentrações de CaThi variaram de 1,3 a 4,0 vezes abaixo de seu IC₅₀ e as concentrações de FLC foram 2,0 vezes abaixo do seu IC₅₀ ou o seu IC₅₀.

* Indica significância pelo teste T (P <0,05)

II.4.14. Alterações Morfológicas do FLC, CaThi e FLC + CaThi no Crescimento das Leveduras do Gênero *Candida*

Investigamos as possíveis alterações morfológicas das células de leveduras cultivadas na presença de FLC, CaThi, e da combinação de ambas as substâncias após os ensaios de inibição do crescimento (Figuras 23 e 24).

A análise por microscopia óptica revelou que FLC, CaThi e o tratamento com a combinação das substâncias, causaram alterações na morfologia de todas as células das espécies de *Candida*. As leveduras *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* e *C. mogii* exibiram uma aparente dificuldade na liberação de brotos, levando assim à formação de pseudohifas quando cultivadas na presença de CaThi. Além disso, na presença de ambas as substâncias, as células de *C. tropicalis* apresentaram uma hiper-ramificação das pseudohifas. Para *C. albicans* e *C. buinensis* observou-se uma intensa aglomeração celular em todos os tratamentos. Além disso, a combinação de FLC e CaThi causou um aspecto de constrição às células de *C. albicans* (Figura 23).

A visualização por microscopia eletrônica de varredura de *C. pelliculosa* mostra mais uma vez aglomeração celular e a formação de pseudohifas em todos os tratamentos. No entanto, para o tratamento com *C. buinensis* as substâncias individuais apresentaram aglomeração celular, mas não a formação de pseudohifas. Já o tratamento com a combinação das substâncias revelou o mesmo fenótipo, além de uma dificuldade aparente na liberação do broto (Figura 24).

Estes resultados mostram que CaThi é capaz de causar alterações morfológicas semelhantes ao FLC, um fármaco comercial comumente utilizado no tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida*. É importante salientar que a combinação destas substâncias mostra uma potencialização das alterações morfológicas contra estas espécies oportunistas de *Candida*.

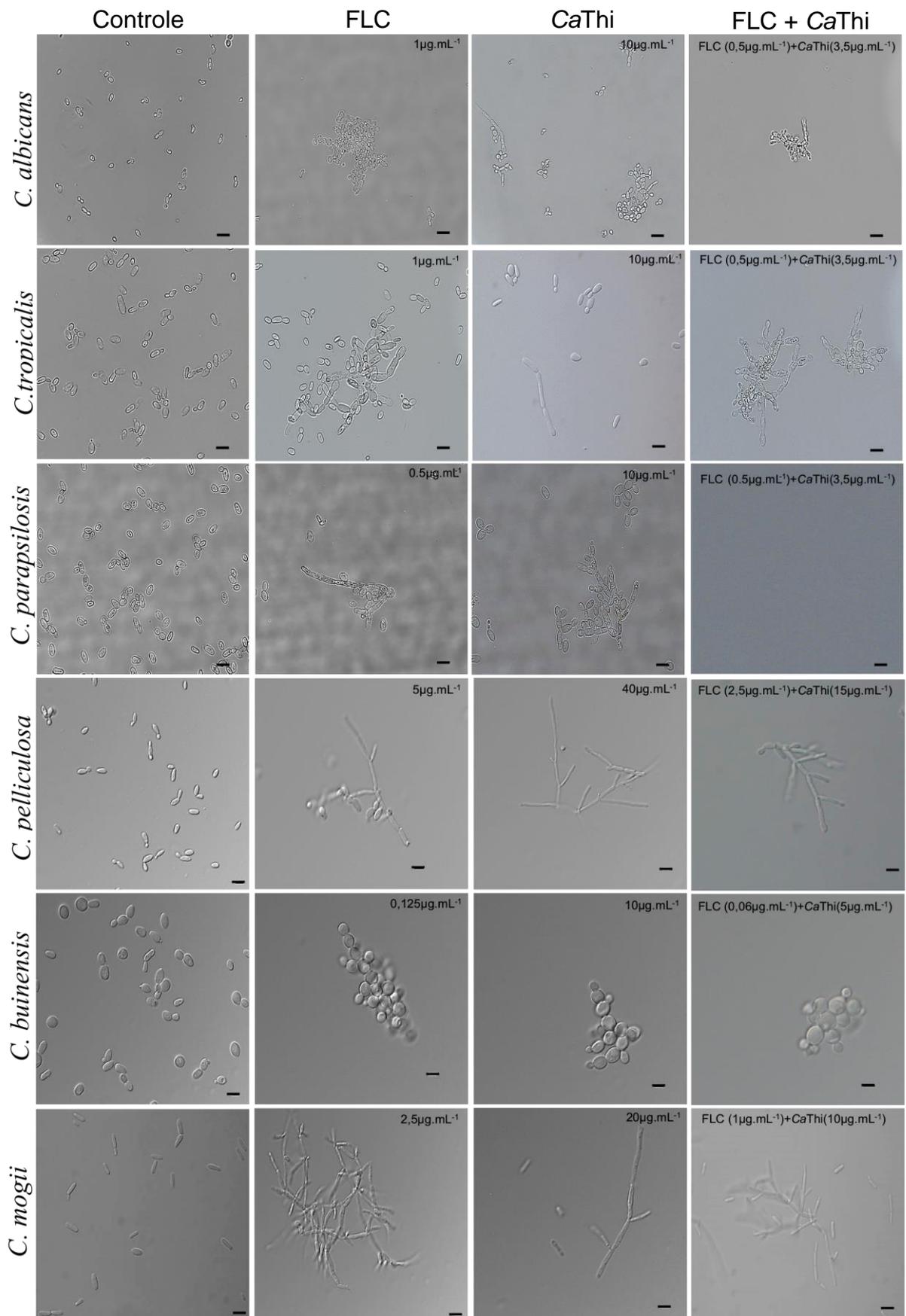


Figura 23: Células das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis* e *C. mogii* por DIC após o ensaio de inibição de crescimento na presença de FLC, CaThi e FLC + CaThi. Barras de 5 µm.

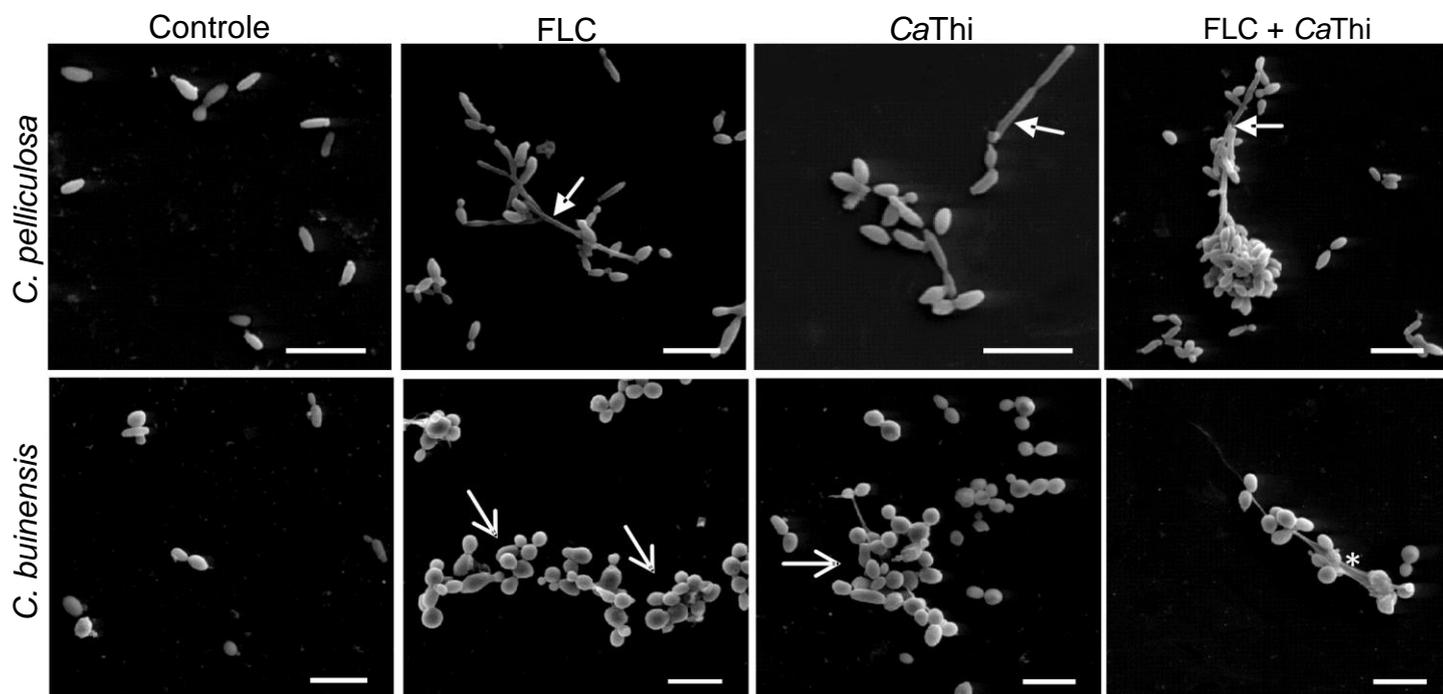


Figura 24: Células das leveduras *C. pelliculosa* e *C. buinensis* visualizadas por microscopia eletrônica de varredura após o ensaio de inibição de crescimento. Seta cheia (formação de pseudohifas); seta aberta (aglomeração de células); asterisco (material amorfo). Barras de 10 μm.

PARTE III: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA CaThi SOBRE O FUNGO *Fusarium solani*

III.4.1. Análise da Atividade Antimicrobiana da CaThi contra Células de *Fusarium solani*

Neste ensaio, observamos que CaThi na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de inibir 83% do desenvolvimento do fungo *F. solani* (Figura 25). Nas imagens observamos que nos esporos-controle para os tempos de 12, 24 e 48 h de incubação, há a formação de hifas a partir do tubo germinativo, e no tempo final de 60 h não observamos mais a presença de esporos, indicando que estes germinaram formando as hifas do fungo. Por outro lado, nos esporos tratados não observamos o desenvolvimento de hifas até 48 h, indicando que a CaThi na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ é capaz de inibir a germinação dos esporos e consequentemente impedir a formação de hifas. No tempo de 60 h observamos que os esporos começam a germinar, mas essa germinação é menor em relação ao seu respectivo controle (Figura 26).

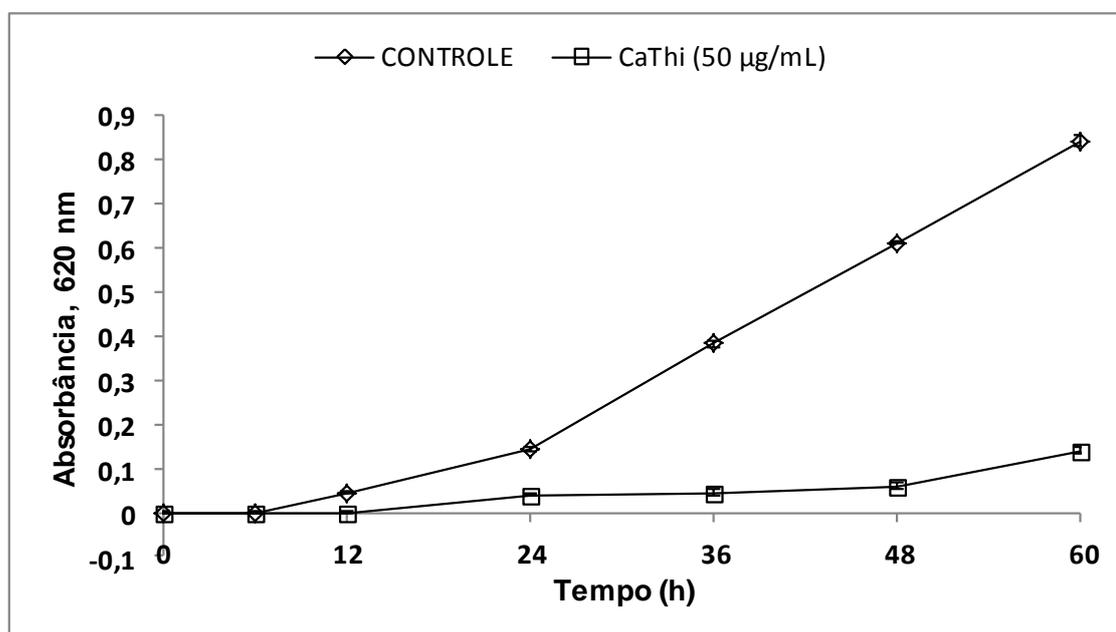


Figura 25: Inibição do crescimento do fungo *F. solani* tratado com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi durante 60 h de incubação. Controle - células crescidas na ausência de CaThi.

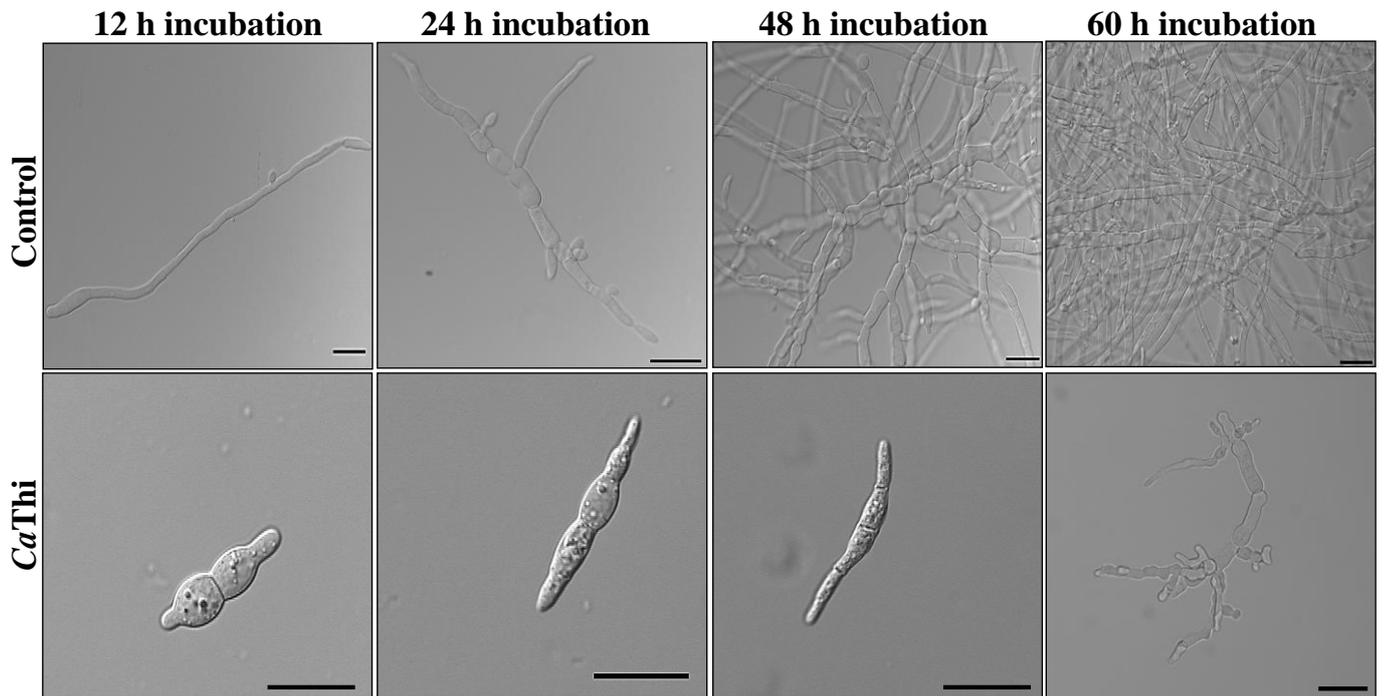


Figura 26: Células de *F. solani* visualizadas por microscopia de campo claro após 12, 24, 48 e 60 h de incubação com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi. Barras de $20 \mu\text{m}$.

III.4.2. Efeito da CaThi sobre a Permeabilização de Membranas de *F. solani*

Na figura 27 é observado que, com 12 h de incubação na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da CaThi, ocorrem alterações estruturais na membrana plasmática dos esporos fúngicos resultando na permeabilização das mesmas e permitindo a entrada e a marcação pelo corante. Este resultado se repetiu com 24, 48 e 60 h de incubação e observamos que neste tempo, todos os esporos estavam permeabilizados. Com este resultado podemos sugerir que a inibição da germinação dos esporos pode ser consequência da permeabilização dos mesmos na presença de CaThi.

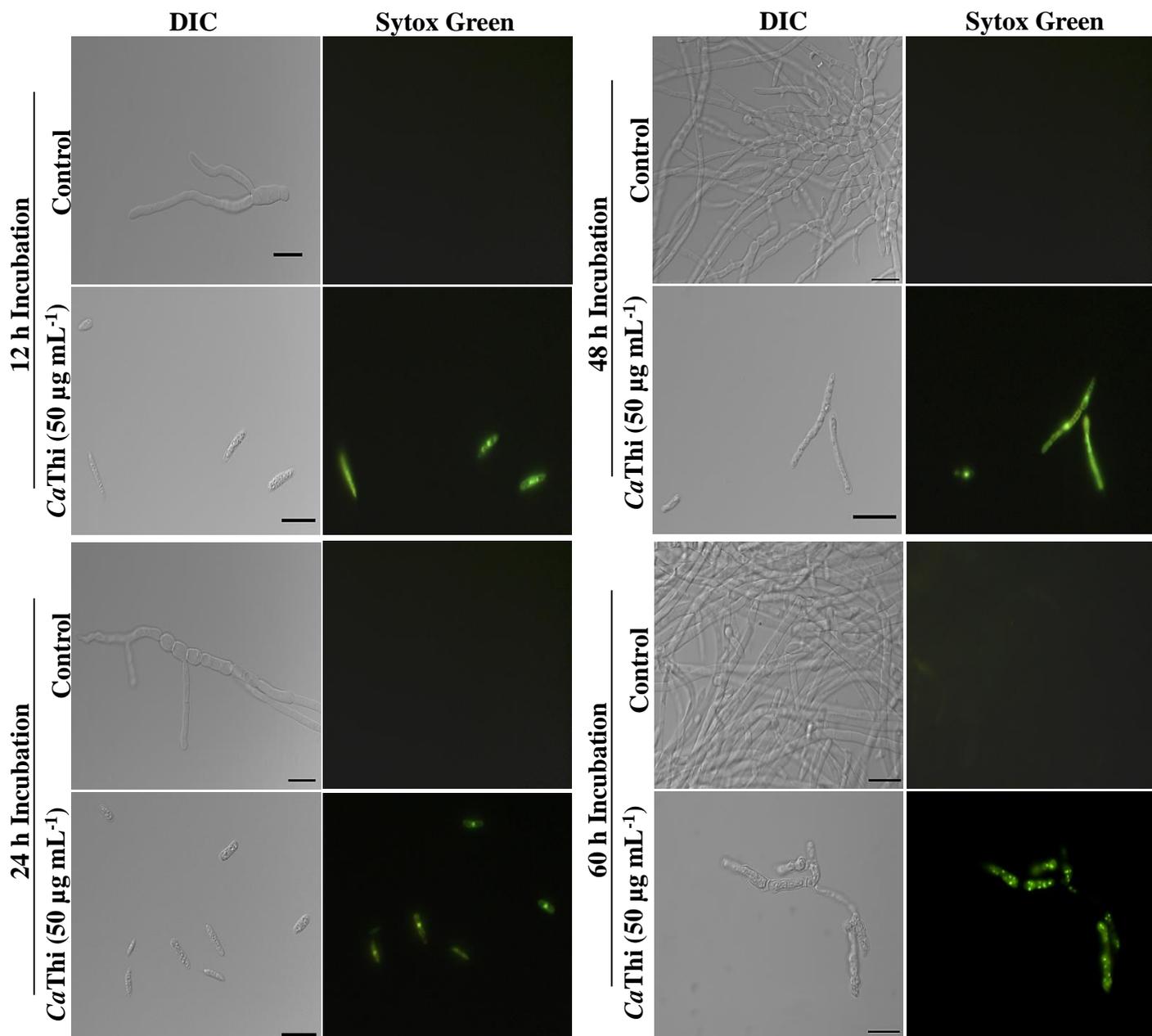


Figura 27: Células de *F. solani* após ensaio de permeabilização da membrana, visualizadas por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente Sytox green. As células foram tratadas com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com CaThi por 12, 24, 48 e 60 h de incubação e em seguida, analisadas quanto à permeabilização da membrana. Barras de 20 μm .

III.4.3. Detecção da Indução de H₂O₂ em Esporos de *F. solani* após Tratamento com CaThi

Neste ensaio, investigamos se a CaThi é capaz de induzir a produção endógena de H₂O₂ pela análise da polimerização por DAB. Os dados obtidos mostraram que nos primeiros 10 min de incubação, há a indução desta espécie reativa de oxigênio, visualizada pela formação do precipitado marrom nos esporos. A partir de 20 min é observado um aumento da coloração desse precipitado, bem como a sua localização majoritariamente nas extremidades dos esporos (Figura 28).

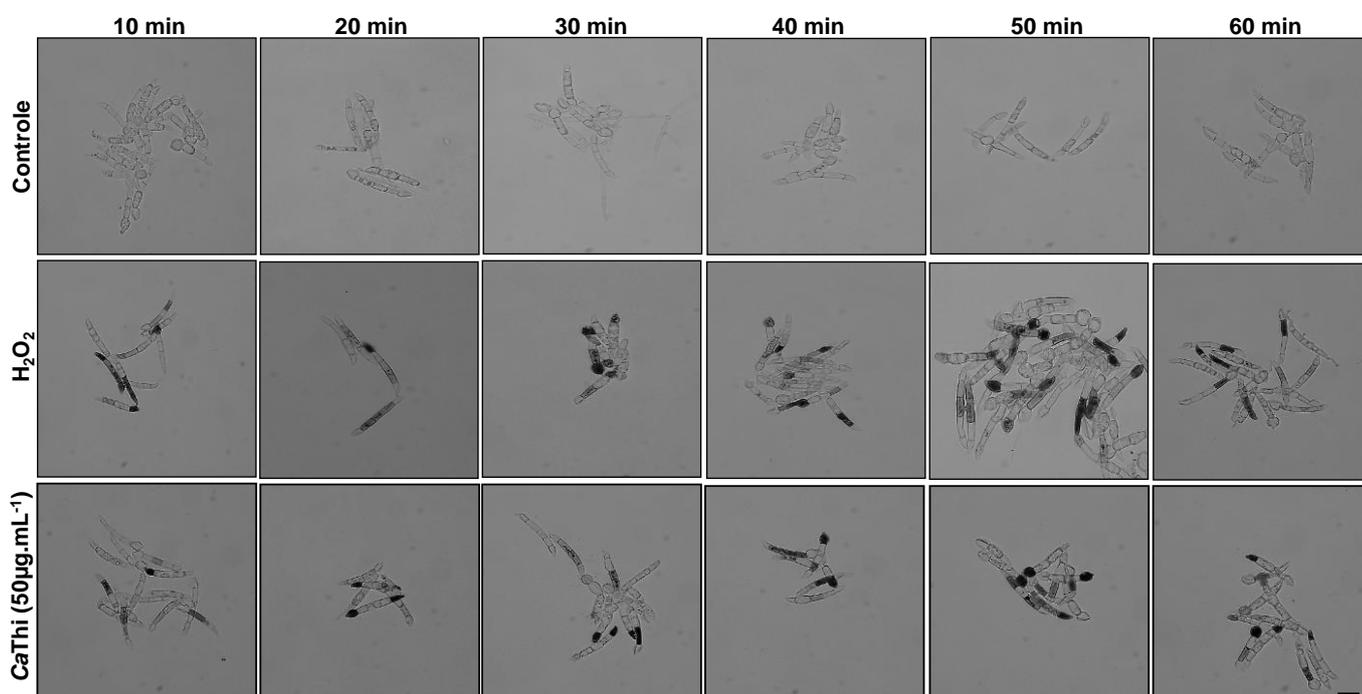


Figura 28: Produção endógena de H₂O₂ dos esporos de *F. solani* através da análise de precipitação com DAB que precipitou no local da produção de H₂O₂ formando uma área escura nos esporos. Esporos tratados com 50 µg.mL⁻¹ de CaThi em diferentes tempos de incubação (10, 20, 30, 40, 50 e 60 min). H₂O₂ foi utilizado como controle positivo e água como controle negativo. Barras de 10 µm.

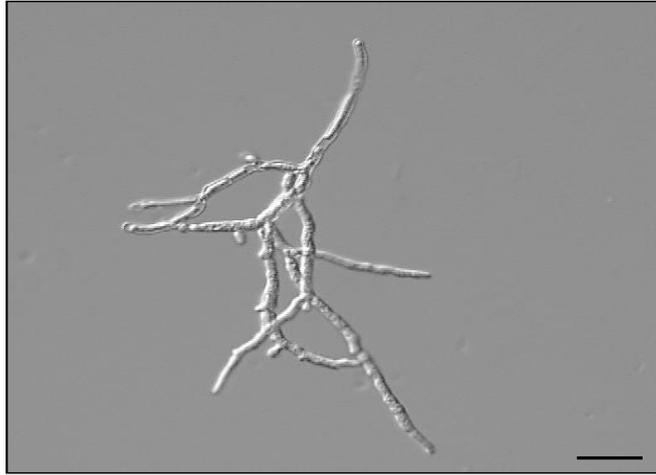
III.4.4. Localização de CaThi nas Células de *F. solani*

Em seguida, nós também investigamos se CaThi é internalizada em células de *F. solani*. Para isso, foram utilizados $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi-FITC para verificar um eventual aparecimento sinal de fluorescência e as células também foram tratadas com DAPI para a marcação dos núcleos. A fluorescência intracelular de CaThi-FITC foi observada nas células do fungo filamentoso. No entanto, não é possível observar nenhuma marcação pontual no interior da célula, e aparentemente a CaThi-FITC está dispersa em todo o citoplasma. A sobreposição das imagens de CaThi-FITC com DAPI também não indicaram a co-localização de sinais de fluorescência (Figura 29). No entanto, estes dados nos permitem sugerir que CaThi pode ter um alvo intracelular também para *F. solani*.

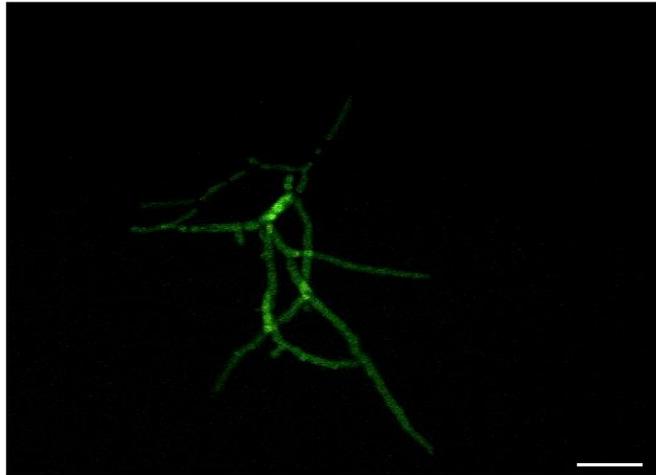
Figura 29: Células de *F. solani* incubadas por 60 h com $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi-FITC por microscopia de fluorescência. Os núcleos foram marcados DAPI, após o período de incubação com CaThi-FITC. Barras de $50 \mu\text{m}$.

F. solani

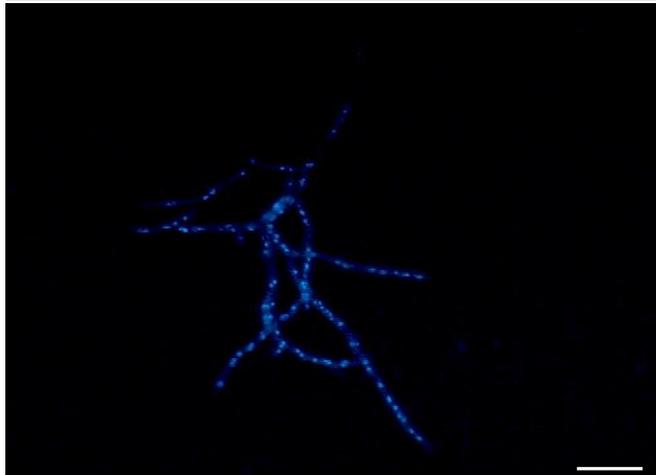
DIC



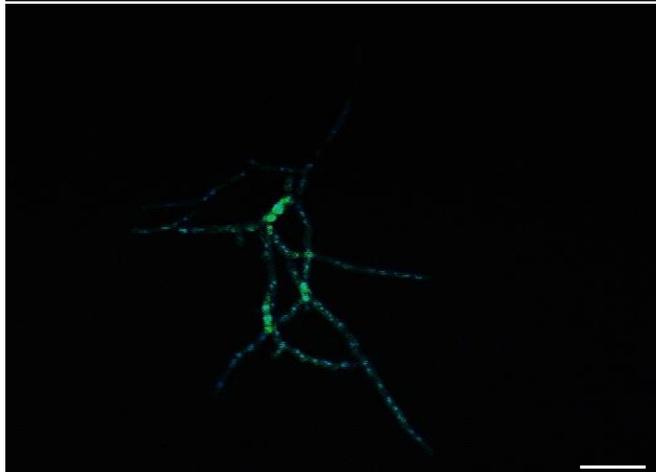
CaThi-FITC



DAPI



SOBREPOSIÇÃO



III.4.5. Atividade Sinérgica da Combinação do FLC com CaThi contra Células de *F. solani*

Assim como para as leveduras, o ensaio de combinação do FLC e CaThi mostrou uma ampliação da atividade inibitória contra as células de *F. solani*, sugerindo um efeito de sinergismo (Figura 30). No gráfico de inibição é observado que as concentrações utilizadas para as substâncias separadamente, FLC (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e CaThi (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) não foram capazes de inibir de forma significativa o crescimento do fungo. Por outro lado, quando as substâncias foram combinadas FLC (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + CaThi (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), o crescimento das células de *F. solani* foi completamente inibido.

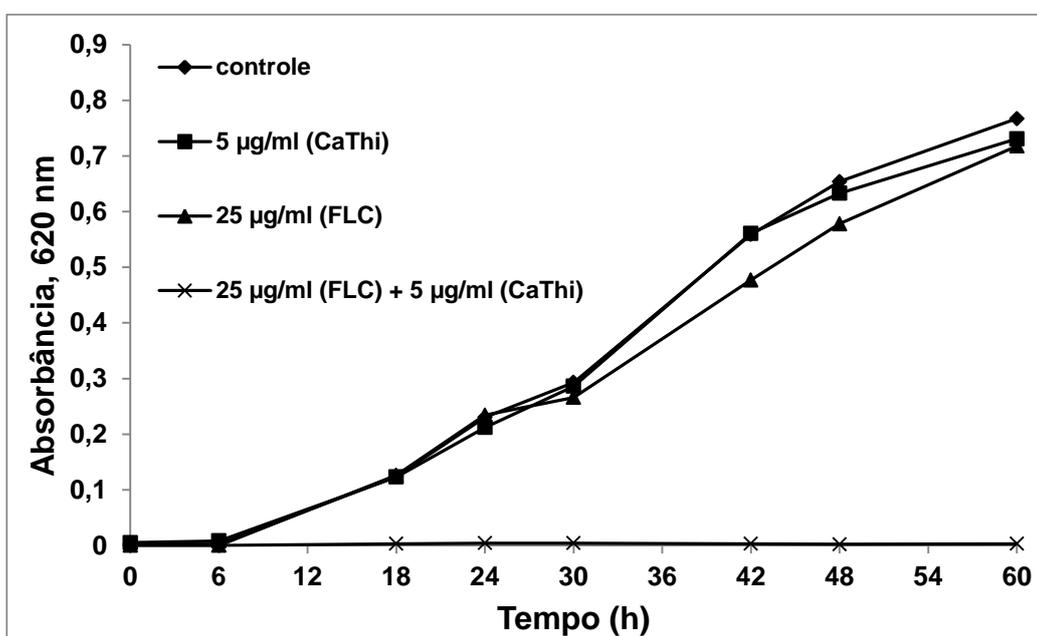


Figura 30: Inibição do crescimento das células de *F. solani* na presença de CaThi, FLC, e CaThi + FLC durante 60 h de incubação. Controle - células crescidas na ausência de FLC e CaThi.

III.4.6. Alterações Morfológicas e Teste da Viabilidade Celular do Fungo *F. solani* Proveniente do Ensaio de Sinergismo

Na figura 31A observamos que as células-controle e as células crescidas na presença apenas de CaThi ou FLC não apresentaram nenhuma redução no crescimento celular, corroborando com os resultados obtidos pela leitura de densidade óptica. Também não foi possível observar nenhuma alteração morfológica nas células. Porém na combinação das duas substâncias (CaThi mais FLC) quase não observamos crescimento celular e notamos claramente que o esporo do fungo não foi capaz de se desenvolver, além da aparente alteração na estrutura da célula. Na figura 31B observamos que as células crescidas na presença da combinação das substâncias perdem a viabilidade celular, e nenhum crescimento foi observado mesmo depois de 60 h de incubação em placas de Petri. Já as células controle mantiveram seu crescimento normal. Esses dados nos permitem sugerir que o efeito da combinação de CaThi e FLC é fungicida para este fungo.

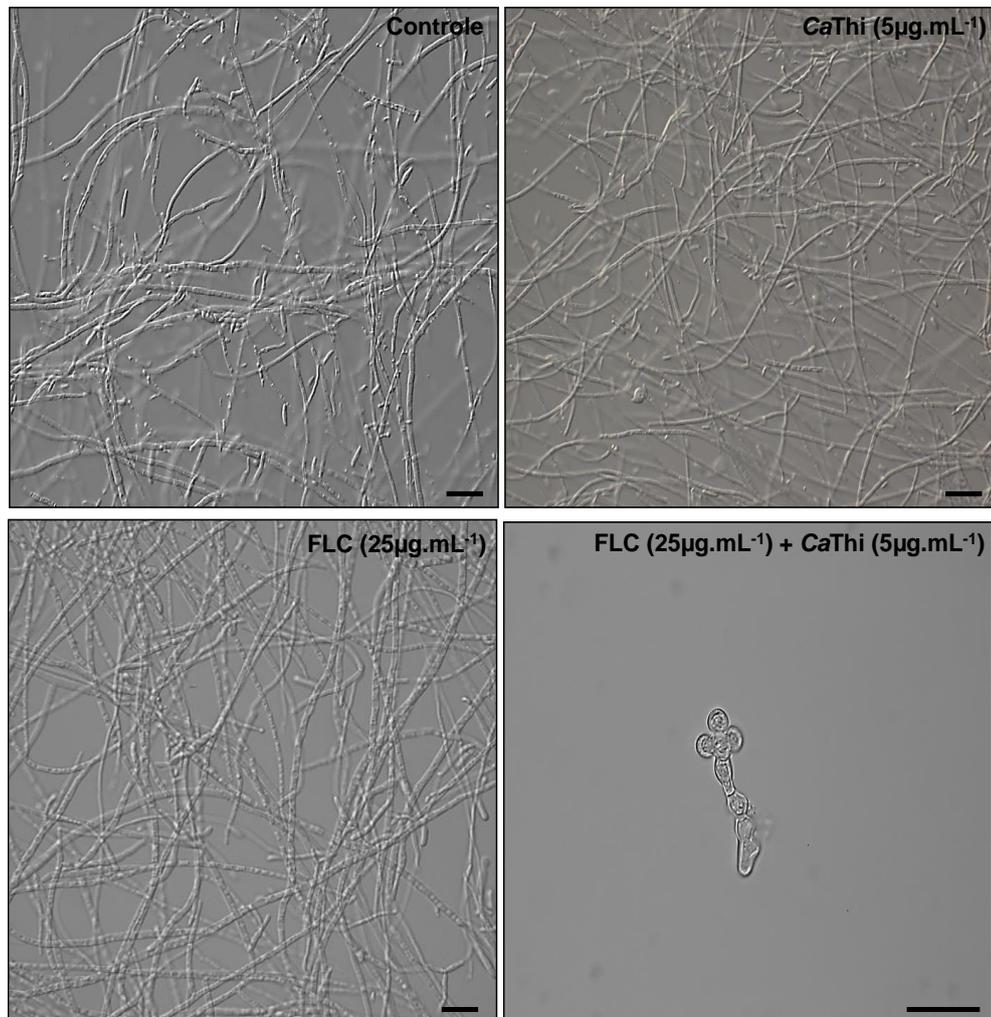
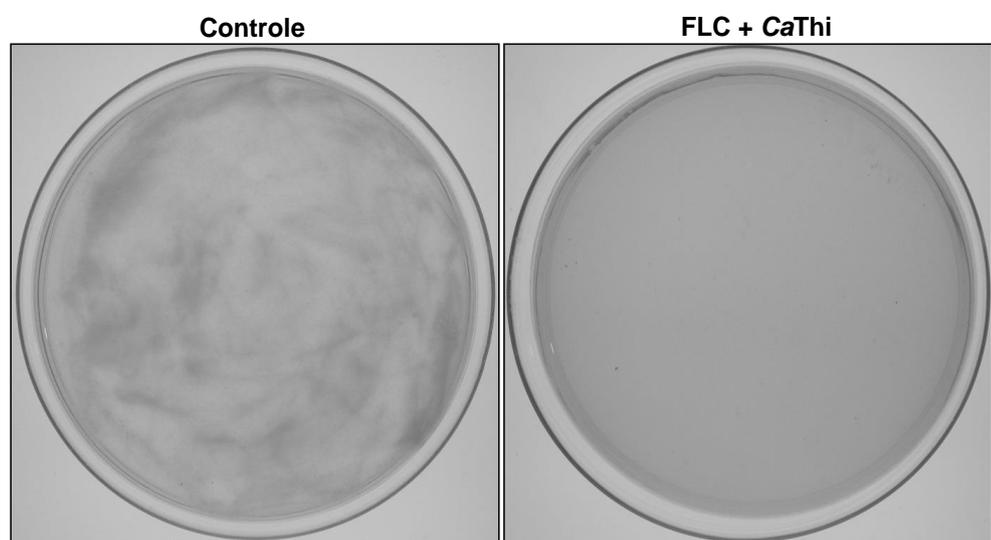
A**B**

Figura 31: (A) Células de *F. solani* visualizadas por microscopia de campo claro do fungo na presença de FLC e CaThi sozinhos e após o ensaio de sinergismo. Barra de 20 µm. (B) Viabilidade de células do fungo após o tratamento com FLC (25 µg.mL⁻¹) + CaThi (5 µg.mL⁻¹) durante 60 h. Controle - células crescidas na ausência de FLC e CaThi.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, um número crescente de peptídeos e proteínas com atividade antimicrobiana *in vitro* tem sido identificado a partir de plantas de pimenta. Dentre estes, podemos citar quitinases (Hong *et al.*, 2000), LTPs (Cruz *et al.*, 2010; Diz *et al.*, 2011), tioninas (Lee *et al.*, 2000), inibidores de proteases (Ribeiro *et al.*, 2012a) e albuminas 2S (Ribeiro *et al.*, 2012b). Alguns desses peptídeos foram extraídos e purificados principalmente a partir de sementes destas plantas (Diz *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012a, 2012b). Ressalta-se que na literatura não encontramos nenhum AMP que tenha sido purificado a partir de frutos de pimenta, motivando a realização deste trabalho, o qual teve, como material de estudo, este órgão da planta.

Alguns AMPs já foram identificados em frutos de diferentes espécies de plantas, como os cDNAs de Pp-LTP1 e Pp-LTP2, correspondentes a duas diferentes LTPs, sendo esses genes isolados de *Prunus persica* (pêssego) (Botton *et al.*, 2002), e em outras frutas da família Rosaceae, como *Prunus armeniaca* (damasco) (Pastorello *et al.*, 2000), *Prunus domestica* (ameixa) (Pastorello *et al.*, 2001) e *Prunus avium* (cereja) (Scheurer *et al.*, 2001). Inicialmente, foi realizada uma extração proteica a partir do fruto de *Capsicum annuum* para a obtenção de uma fração rica em peptídeos (F/0-70). Esta F/0-70 foi submetida à eletroforese em gel de tricina, onde observamos a presença de diversas bandas proteicas, mas algumas com massa molecular abaixo de 10 kDa, correspondentes aos peptídeos (Figura 5). A F/0-70 foi submetida à cromatografia de fase reversa em HPLC (Figura 6), técnica que é amplamente utilizada por pesquisadores para a purificação de peptídeos (Pelegriani *et al.*, 2006; Mandal *et al.*, 2009). A fração F1 destacou-se por apresentar uma única banda proteica com a massa molecular de aproximadamente 7 kDa (Figura 7), além de demonstrar toxicidade contra fungos e bactérias (Taveira, 2012). Este peptídeo foi então submetido ao sequenciamento N-terminal e através da análise do banco de dados, verificou-se que este possuía identidade de sequência com uma família de AMPs de planta, denominada tioninas. Na sequência parcial de 33 resíduos de aminoácidos foram observadas algumas dissimilitudes e similaridades em relação aos peptídeos pertencentes à família das tioninas (Figura 8). A partir deste resultado este peptídeo passou a ser denominado CaThi (*Capsicum annuum* thionin-like peptide).

As tioninas são pequenos grupos protéicos (~ 5 kDa), ricos em cisteína e com propriedades tóxicas e antimicrobianas. Possuem ampla toxicidade celular contra diversas linhagens celulares de organismos eucarióticos, embora algumas apresentem certa seletividade (Stec, 2006). As tioninas exibem efeitos tóxicos contra uma vasta gama de agentes patogênicos de plantas, incluindo bactérias, fungos e protozoários (Molina *et al.*, 1993; García-Olmedo *et al.*, 1998; Giudici *et al.*, 2004; Chandrashekhara *et al.*, 2010). No entanto, o mecanismo exato pelo qual as tioninas causam a morte de microrganismos ainda não foi completamente estabelecido. Além disso, existe uma lacuna em relação ao modo de ação das tioninas de plantas contra agentes patogênicos ao homem. Devido a estes fatores usamos duas abordagens neste trabalho. Em um primeiro momento, investigamos o potencial antimicrobiano de CaThi, contra seis espécies de levedura do gênero *Candida*, todas de interesse clínico: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis* e *C. mogii*, visto o aumento considerável na incidência de infecções causadas por leveduras deste gênero. E em um segundo momento, verificamos também a atividade antimicrobiana de CaThi contra um o fungo *F. solani*, um fungo saprofítico capaz de causar doenças em plantas, animais e humanos, e que na última década, tem causado um número cada vez maior de infecções (fusarioses) em pacientes imunocomprometidos (Nucci *et al.*, 2014; Litvinov *et al.*, 2015; Stempel *et al.*, 2015).

Os nossos ensaios de inibição de crescimento mostraram forte atividade antifúngica de CaThi contra todas as leveduras testadas (Figuras 9 e 11) e que este efeito inibitório sobre as seis leveduras testadas foi fungicida (Figura 12), e não fungistático como é reportado para o fluconazol (FLC), principal antifúngico no controle de candidíases (Cowen *et al.*, 2002; Ford *et al.*, 2015). O fato de CaThi exercer um efeito fungicida sobre as espécies de *Candida* é característica importante quando se pensa no desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas, visto que compostos fungistáticos podem contribuir para o desenvolvimento de microrganismos resistentes (Onyewu *et al.*, 2003; Kotaczekowska e Kotaczekowski, 2016). Thi 2.1, uma tionina obtida de *Arabidopsis thaliana*, causou 80% de inibição em *C. albicans* com $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Loeza-Ángeles *et al.*, 2008). Embora Thi 2.1 tenha mostrado uma atividade antimicrobiana mais forte que CaThi contra *C. albicans*, esses autores não testaram esta tionina contra outras espécies do gênero *Candida*, assim, não sabemos se a Thi 2.1 possui uma atividade similar em diferentes

espécies. Quando testamos CaThi na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra células de *F. solani* também verificamos uma atividade inibitória significativa, mostrando uma redução no crescimento micelial, além de inibição da germinação de esporos até 48 h de incubação (Figuras 25 e 26). A viscotoxina VtA₃ isolada de *Viscum album* (visco-branco), também da família das tioninas, foi capaz de inibir a germinação de esporos de *F. solani* utilizando a concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; entretanto, essa inibição foi analisada até 16 h de incubação. Já para o crescimento micelial, 7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de VtA₃ foram necessários para alcançar uma inibição de 50% e esta potente atividade foi igualmente verificada contra células do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Giudici *et al.*, 2004). Neste trabalho nós mostramos uma forte atividade antifúngica de CaThi que afeta a germinação de esporos e o crescimento das hifas do fungo *F. solani*. Nossos dados, em conjunto com outros já descritos na literatura, reforçam a noção de que as tioninas podem ser compostos ativos em plantas, atuando também na defesa contra fungos fitopatogênicos.

Após os testes de inibição começamos a investigar o mecanismo de ação responsável pela inibição do fungo. Inicialmente, usamos Sytox green, um corante que possui alta afinidade por ácidos nucleicos e penetra as células apenas quando sua membrana plasmática está comprometida. Neste trabalho todas as espécies de leveduras testadas mostraram fluorescência para Sytox green (Figuras 10 e 13), no entanto CaThi foi mais eficaz na permeabilização da membrana plasmática em *C. albicans* e *C. pelliculosa* (Tabela 3). A mesma permeabilização foi observada para os esporos de *F. solani*, em diferentes tempos de incubação com CaThi (Figura 27). Thevissen *et al.* (1996) mostraram que a atividade antimicrobiana contra o fungo *Neurospora crassa* por α -hordotionina (α -HT), isolada a partir de sementes de *Hordeum vulgare* (cevada), também ocorre através de um mecanismo que envolve a permeabilização da membrana, resultando num influxo de Ca^{2+} e efluxo de K^{+} e consequente colapso do potencial de membrana. Um ano depois, foi mostrado que outra tionina causava permeabilização nas células de *S. cerevisiae*, evidenciado pelo extravasamento no meio de cultura de diversos íons como K^{+} e PO_4^{3-} e também de alguns componentes celulares (Broekaert *et al.*, 1997). De forma semelhante, foi mostrado que a tionina viscotoxina A3 (VtA₃), interage com a membrana plasmática do fungo *F. solani*, causando sua permeabilização e inibindo assim o crescimento desse microrganismo (Giudici *et al.*, 2006). Estudos sugerem que a maior parte dos

efeitos biológicos das tioninas resulta da interação destes peptídeos com a membrana da célula-alvo. Três mecanismos foram propostos para a permeabilização de membranas pelas tioninas: formação de canais de íons seletivos; formação de balsas ou “tapete” de peptídeos; e a perda de fosfolipídeos de membrana (Stec, 2006). A precisa cascata de eventos que ocorre após a interação da tionina com a membrana dos microrganismos, conduzindo à morte da célula, não é totalmente compreendida, mas o evento de permeabilização da membrana parece ser um efeito primário.

AMPs demonstram desempenhar um papel direto na permeabilização da membrana, provocando uma perda do potencial de membrana (Dathe *et al.*, 2002). Como as células dependem do potencial de membrana para exercer as suas funções fisiológicas vitais, sua restauração é obrigatória e exige gasto de energia celular. Com isso, uma possível consequência desse processo é a geração de ROS pela ativação de mitocôndrias para a produção de ATP (Addabbo *et al.*, 2009). A partir desta visão, nós analisamos se este evento primário de permeabilização de membranas, tanto em leveduras como em fungo filamentosos, induzido por CaThi era seguido pelo estresse oxidativo. Curiosamente para as células de leveduras CaThi induziu um aumento na produção endógena de ROS apenas na espécie *C. tropicalis* (Figura 14). No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer esta relação. Quando analisamos se CaThi causaria a indução de peróxido de hidrogênio em esporos de *F. solani*, observamos que, com apenas 10 min de incubação, ocorreu um aumento na produção de peróxido de hidrogênio e esse efeito persistiu até 60 min de incubação, e curiosamente a marcação foi mais proeminente nas pontas dos esporos, onde ocorre o crescimento polarizado das hifas (Figura 28). Essa produção de peróxido de hidrogênio induzida por CaThi na região apical dos esporos pode ser a responsável pela inibição da germinação dos mesmos, visualizada durante o ensaio de inibição do crescimento. Estudos mostram que o aumento na produção de ROS nos organismos alvos é um modo de ação recorrentemente empregado pelas tioninas e outros AMPs (Giudici *et al.*, 2006; Aerts *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2011). Giudici *et al.* (2006) também observaram o aumento da produção de peróxido de hidrogênio, em *F. solani*, induzido por 50 µg.mL⁻¹ da VtA₃ com apenas 5 min e relacionaram o aumento de peróxido de hidrogênio com a morte do fungo. Apesar de alguns autores já terem relatado a indução de ROS por

tioninas, neste trabalho mostramos pela primeira vez o aumento da produção de ROS como parte do mecanismo antimicrobiano contra um patógeno humano, *C. tropicalis*. Esses resultados sugerem que CaThi possui um mecanismo sofisticado na inibição do crescimento da levedura *C. tropicalis* e do fungo *F. solani* que envolve não só a permeabilização de membranas, mas também a indução de estresse oxidativo.

Espécies reativas de oxigênio são moléculas que aparecem nos momentos iniciais do processo apoptótico. Estudos têm demonstrado que o aumento endógeno de ROS pode levar à destruição de vários tipos celulares através de vias apoptóticas (De Felice *et al.*, 2007; Maiese *et al.*, 2010). Trabalhos sugerem que as alterações mitocondriais têm um importante impacto funcional no processo de apoptose (Green e Reed, 1998). Durante a morte celular, ocorre o colapso do potencial de membranas mitocondriais, o que indica a abertura de um canal de grande condutância conhecida como poro de transição da permeabilidade mitocondrial. Como consequência, a transição de permeabilidade provoca a geração mitocondrial de ROS, tais como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}), e a rápida translocação de resíduos de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática (Green and Reed, 1998; Kowaltowski *et al.*, 2009).

Visto que CaThi foi capaz de induzir o aumento de ROS tanto nas células de levedura (*C. tropicalis*) quanto em fungo filamentoso (*F. solani*), nós realizamos um ensaio para verificação da externalização de fosfatidilserina (PS) usando como modelo protoplastos de *S. cerevisiae*. Utilizamos este modelo devido a técnica de obtenção de esferoplastos já estar padronizada para a levedura *S. cerevisiae* e do requerimento da ausência da parede celular para o experimento de detecção da externalização da fosfatidilserina. A translocação de PS da monocamada interna para a monocamada externa da membrana plasmática ocorre durante os estágios iniciais da apoptose e essa externalização da PS pode ser detectada pela marcação com anexina V que se liga a fosfolipídeos com carga negativa, mas com alta especificidade para a PS (Hwang *et al.*, 2011a). Quando os protoplastos foram analisados por microscopia de fluorescência, observamos apenas a marcação por anexina V (Figura 17), acusando então uma externalização de PS, o que nos sugere que a CaThi pode induzir a externalização de PS no folheto externo da membrana.

Este resultado indica que uma via de morte celular programada pode ter sido ativada nesta levedura. De modo similar, outros AMPs isolados de diferentes fontes, também são capazes de induzir apoptose em células de leveduras. Hwang *et al.* (2011a) viram que o peptídeo papiliocina, isolado de *Papilio xuthus* (borboleta), induzia o acúmulo de ROS e radicais livres que são importantes reguladores de apoptose em *C. albicans*. Essas células tratadas com a papiliocina mostraram uma série de mudanças, normalmente vistas em células que estão sofrendo processo inicial de apoptose, como a translocação da PS do lado interno para o lado externo da membrana plasmática. Lee *et al.* (2012) viram através de marcação com AnexinaV-FITC e ensaio TUNEL que o peptídeo coprisina 43, semelhante à defensina, isolado de *Copris tripartitus* (besouro), estava envolvido tanto nos estágios iniciais quanto nos estágios finais da apoptose, aumentando o nível intracelular de ROS e de radicais hidroxila livres, em células de *C. albicans*.

Após este evento de translocação de PS na presença de CaThi fomos verificar a presença de caspases ativas e a dissipação do potencial de membrana mitocondrial. As caspases são proteases aspartato específicas contendo cisteínas, são tipicamente ativadas nas etapas iniciais da apoptose e desempenham um papel central na rede de sinalização apoptótica (Zivna *et al.*, 2010). Nestes dois ensaios verificamos que CaThi foi capaz de causar o colapso do potencial de membrana mitocondrial, além de elevar o nível de atividade de caspases nas células de *C. tropicalis* (Figuras 15 e 16). O AMP papiliocina também mostrou esta mesma atividade, causando dissipação do potencial de membrana mitocondrial e a ativação de caspases. Alguns eventos tardios de apoptose também foram observados, como a fragmentação e condensação do DNA. Estes dados sugeriram que a papiliocina levou as células de *C. albicans* a sofrerem apoptose, através do acúmulo de ROS (Hwang *et al.*, 2011b). Outro AMP (da família das knotinas) denominado psacoteasina, isolado de larvas do besouro *Psacothaea hilaris*, foi capaz de provocar vários efeitos apoptóticos em *C. albicans* como, por exemplo, a externalização da PS, despolarização da membrana mitocondrial, e o aumento da atividade de metacaspase, além da fragmentação e condensação do DNA (Hwang *et al.*, 2011b). Em conjunto com os resultados já demonstrados para outros AMPs, nossos dados sugerem que CaThi pode possuir uma propriedade antifúngica via indução de apoptose como um segundo modo de ação, visto que a permeabilidade de

membrana parece ser um evento primário e que resulta na morte por necrose da célula, é descrita para as várias tioninas.

De forma bastante interessante é também mostrado que AMPs podem entrar na célula, após a interação inicial com a membrana celular dos microrganismos (Brogden, 2005; Nicolas, 2009). Nos últimos anos, há um número cada vez maior de evidências que indicam que estes AMPs têm alvos intracelulares. Com base nessas informações, nosso próximo experimento foi desenhado para analisar se CaThi seria capaz de penetrar e buscar um alvo intracelular em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *F. solani* (Figuras 18 e 29). Resultados obtidos mostraram que CaThi foi capaz de internalizar-se nas três células testadas, sugerindo, sim, a existência de um possível alvo intracelular e, que para as células de *C. tropicalis*, esse alvo foi sugerido como nuclear. Giudici *et al.* (2006) mostraram que a tionina VtA₃ foi internalizada e se acumulou no citoplasma no fungo *F. solani*. Estes autores também demonstraram que a entrada desta toxina pode estar relacionada com a composição de esfingolipídios da membrana plasmática e com o potencial de membrana estabelecido entre os dois lados da bicamada lipídica deste fungo. Peptídeos pertencentes a outras famílias de AMPs também já demonstraram essa capacidade de entrar nas células de microrganismos. A NaD1, uma defensina de *Nicotiana glauca*, mostrou-se capaz de entrar nas hifas do fungo filamentosso *F. oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*. Mas, não foi observada sua presença nos núcleos (van der Weerden *et al.*, 2008). Em contraste, Lobo *et al.* (2007) trataram o fungo *N. crassa* com a defensina Psd1, isolada de *P. sativum*, conjugada com FITC e após tratamento deste fungo com DAPI mostraram a colocalização, *in vivo*, da defensina, no núcleo. Nosso estudo é o primeiro a mostrar a entrada de uma tionina em microrganismos patogênicos ao homem (*C. albicans* e *C. tropicalis*) (Figura 18) e a sugerir a existência de um alvo intracelular. Esse trabalho abre novas perspectivas sobre o mecanismo de ação de tioninas, sugerindo que a toxicidade destes peptídeos não se restringe apenas à membrana plasmática.

A partir da sugestão que CaThi tinha uma localização nuclear em células de *C. tropicalis*, foi realizado o ensaio de ligação de CaThi ao DNA de *S. cerevisiae*. Os resultados demonstraram que CaThi se liga ao DNA de *S. cerevisiae*, reforçando nossa sugestão de um possível alvo intracelular e nuclear (Figura 19). Estudos mostram que uma vez no citoplasma, os AMPs podem induzir danos celulares, tais

como a inibição de DNA, RNA, inibição da síntese de proteínas, inibição da síntese da parede celular e inibição da atividade enzimática (Cudic e Otvos, 2002; Li *et al.*, 2002; Brogden, 2005; Castro e Fontes, 2005; Nicolas, 2009). AMPs como a indolicitina e buforina-II também demonstraram a habilidade de se ligar diretamente ao DNA (Subbalakshmi, 1998; Park *et al.*, 1998). Também já foi mostrado que a purotionina de sementes de trigo é capaz de bloquear a síntese DNA *in vitro* através da inibição da enzima ribonucleotídeo redutase. Tem sido proposto que a inibição da síntese do DNA pode ser a razão para o efeito tóxico que as tioninas possuem contra células de mamíferos (Nakanishi *et al.*, 1979). Por outro lado, foi mostrado que a interação de viscotoxinas com DNA *in vitro* leva a uma proteção do DNA de contra a desnaturação térmica (Woynarowski e Konopa, 1980). No entanto, se estas observações *in vitro* têm qualquer significado para a situação *in vivo*, em que a compartimentalização subcelular da célula impede a interação de compostos, que podem facilmente ser reunidos *in vitro*, não é conhecido.

Thevissen *et al.* (1999) demonstraram um aumento no fluxo de íons através da membrana, quando os fungos *Neurospora crassa* e *Fusarium culmorum* foram tratados com defensinas de planta Rs-AFP2 e Dm-AMP1 isoladas de *Raphanus sativus* e *Dahlia merckii*, respectivamente. O fluxo de H⁺ através da membrana plasmática exerce funções essenciais na fisiologia da célula fúngica. O fluxo de H⁺ normalmente é mediado pela bomba H⁺-ATPase e a interferência neste fluxo pode levar a morte celular. Estes efeitos foram monitorados, medindo fluxo de prótons em células de *C. tropicalis*. Resultados aqui apresentados mostraram que após o tratamento com CaThi o efluxo de H⁺ teve uma inibição significativa de aproximadamente 90%, demonstrando claramente que este peptídeo é capaz de causar um desequilíbrio na homeostase de H⁺ (Figura 20 e 21). Diz *et al.*, (2006) e Ribeiro *et al.* (2007) demonstraram que peptídeos presentes em fração obtida de sementes de *C. annuum* (pimenta) também inibiram 100% o efluxo de H⁺ em *S. cerevisiae* na concentração de 160 µg.mL⁻¹. Em contraste, uma LTP extraída de café (*Coffea canephora*) denominada Cc-LTP₁, aumentou a acidificação do meio, ou seja, provocou um aumento do efluxo de H⁺, em células de *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* (Zottich *et al.*, 2011).

Estudos mais recentes vêm demonstrando que não só a permeabilização de membranas, na presença de um AMP, é a causa da morte de um microrganismo em

particular, uma vez que os AMPs podem ter vários alvos (Franco, 2011). Após a interação com a membrana, os AMPs podem desencadear a indução de ROS (Carvalho e Gomes, 2009; Mello *et al.*, 2011); inibição da síntese de proteínas (Yonezawa *et al.*, 1992; Boman *et al.*, 1993); inibição da atividade mitocondrial (Helmerhorst *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2015), e também podem disparar cascatas de sinalização que conduzem à apoptose (Aerts *et al.*, 2009; Kulkarni *et al.*, 2009). Torna-se tecnicamente desafiador identificar o fator mais importante para o efeito fungicida de CaThi e caracterizar as etapas que conduzem à morte celular dos microrganismos alvo. No entanto, evidências suportam que todos os eventos descritos neste trabalho podem ter um papel crucial na morte de todos os fungos testados.

O contínuo surgimento de espécies fúngicas resistentes aos antibióticos e antifúngicos convencionais, especialmente espécies de *Candida*, tornou-se um problema médico importante e tem estimulado a procura de novas alternativas terapêuticas. Essa preocupação nos levou a investigar se o fluconazol (FLC) e CaThi poderiam agir sinergicamente sobre espécies do gênero *Candida*. O modo de ação dos azóis ocorre através da inibição da enzima lanosterol 14- α -esterol demetilase, impedindo a incorporação de ergosterol e levando ao acúmulo de esteróis intermediários. Estes esteróis intermediários não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e seu acúmulo na membrana plasmática do fungo acarreta a formação da membrana plasmática com propriedades alteradas, trazendo, como consequências, alterações na fluidez e permeabilidade, e decorrentes prejuízos à captação de nutrientes (Lupetti *et al.*, 2002; Cowen, 2008). Aqui mostramos que a combinação destas duas substâncias (FLC + CaThi) foi eficaz contra todas as espécies de *Candida* testadas (Tabela 5), causando mudanças morfológicas drásticas nestas células (Figuras 23 e 24). Curiosamente, observamos que o efeito desta combinação foi mais eficaz para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, que estão entre as principais espécies de leveduras encontradas em infecções de pacientes imunocomprometidos (Sanglard, 2002). Nós também avaliamos o efeito da combinação de FLC e CaThi contra o fungo *F. solani* e, de forma similar, esta combinação também teve um efeito amplificador sobre a atividade inibitória, sugerindo que as substâncias atuaram em sinergismo (Figura 30). Observamos também que, em combinação com o FLC, a CaThi impede o

desenvolvimento dos esporos em hifas (Figura 31A) e torna as células deste fungo completamente inviáveis (Figura 31B). O mais interessante desses dados, é que os fungos do gênero *Fusarium* apresentam altas concentrações inibitórias mínimas para os agentes antifúngicos disponíveis, incluindo os azóis de amplo espectro, onde mesmo utilizando doses elevadas destes antifúngicos, estes microrganismos continuam se desenvolvendo normalmente (Nucci *et al.*, 2014; Stempel *et al.*, 2015). Os dados obtidos nos sugerem que esta é uma abordagem interessante para o desenvolvimento de novos defensivos agrícolas, bem como para o desenvolvimento de terapias alternativas e mais eficientes para o tratamento de infecções fúngicas principalmente pacientes imunocomprometidos. Tem sido levantado o potencial uso de AMPs como novas substâncias terapêuticas (Silva *et al.*, 2011) e especialmente no caso de patógenos que já apresentam resistência aos antibióticos disponíveis comercialmente, o uso combinado de AMPs com estas substâncias têm melhorado a eficiência e adicionalmente diminuído a concentração do AMP necessária para se ter o efeito antimicrobiano sem os efeitos tóxicos para as células de mamíferos (Park *et al.*, 2006). No que diz respeito ao efeito sinérgico de FLC e CaThi, sugerimos que a permeabilização é primeiramente causada por CaThi, facilitando a entrada do FLC no citoplasma da célula; isto provocaria alterações estruturais na membrana plasmática, devido às alterações provocadas pela inibição da síntese de ergosterol, e causaria uma retroalimentação positiva com entrada de mais CaThi e FLC. Esta entrada cria efeitos tóxicos potencializados, que foram experimentalmente observados com a diminuição significativa da concentração de ambas as substâncias usadas no tratamento em combinação. No entanto, mais estudos são necessários para desvendar claramente o mecanismo antimicrobiano de CaThi contra fungos, bem como o mecanismo de sinergia entre CaThi e FLC.

Em conclusão, investigar o(s) mecanismo(s) ação de CaThi contra fungos, mais especificamente usando leveduras que causam infecções em humanos, é relevante e oportuno, visto que a maioria dos estudos que envolvem tioninas concentram os seus efeitos apenas contra microrganismos fitopatogênicos como modelos experimentais. Neste trabalho, nós demonstramos que CaThi tem forte atividade fungicida sobre seis espécies de *Candida* patogênicas, e também atividade inibitória contra fungo *F. solani*, causando a permeabilização da membrana, indução de ROS, translocação de PS, dissipação do potencial de membrana mitocondrial,

ativação de caspases, alteração no fluxo de H⁺, e a internalização de CaThi, o que sugere um alvo intracelular. Um modelo mostrando o resultado da interação da CaThi com as células fúngicas e resumindo os principais resultados deste trabalho é mostrado na Figura 32.

Finalmente nossos resultados mostram que o FLC e CaThi quando combinados foram eficazes contra todos os fungos testados, causando drásticas alterações morfológicas nos mesmos. O tratamento combinado de CaThi e FLC é um forte candidato para possibilidades de testes clínicos com o objetivo de melhorar os resultados terapêuticos sobre diferentes espécies de *Candida*, bem como infecções causadas por *F. solani*. Os estudos que envolvem combinações de drogas devem ser estimulados devido à possibilidade de efeitos sinérgicos que aumentam o efeito tóxico das drogas combinadas quando comparado com a monoterapia. Além disso, combinações de drogas podem ampliar o espectro de atividade antimicrobiana, minimizando a seleção de microrganismos resistentes, aumentando a segurança e tolerância, usando baixas doses de drogas.

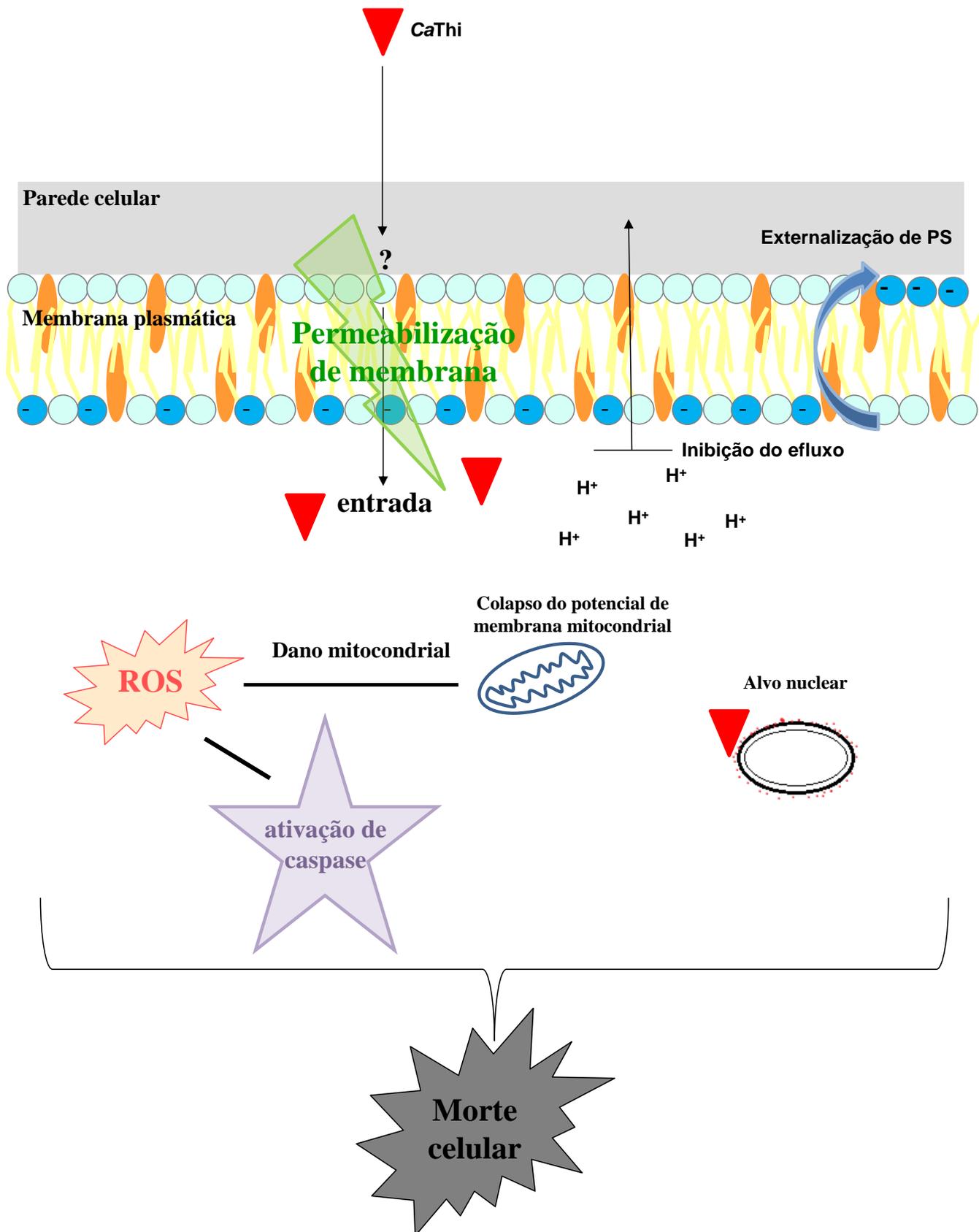


Figura 32: Representação esquemática dos principais resultados acerca do mecanismo de ação de CaThi com células de fungos, levando o microrganismo à morte. (→, entrada), (⊣, bloqueio), (—, associado com), (↪, externalização de PS) (⏟, conjunto de eventos que levam à morte celular), PS, fosfatidilserina, ROS, espécies reativas de oxigênio, H⁺, prótons.

6. CONCLUSÕES

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

- Foi isolado um peptídeo antimicrobiano de frutos de *C. annuum* apresentando massa molecular de aproximadamente 7 kDa. Este apresentou similaridade a nível da estrutura primária, à família das tioninas de planta e por isso foi nomeado de *Capsicum annuum Thionin-like peptide* (CaThi);
- CaThi possui atividade antifúngica sobre as leveduras testadas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis* e *C. mogii* e também sobre o fungo filamentoso *F. solani*;
- Sobre as células de leveduras o efeito inibitório de CaThi foi fungicida;
- CaThi induziu o aumento endógeno da produção de ROS em células de *C. tropicalis* e *F. solani*;
- CaThi induziu a translocação de fosfatidilserina em células de *S. cerevisiae*;
- CaThi causou um colapso no potencial de membrana mitocondrial em *C. tropicalis*;
- CaThi induziu aumento na atividade de caspases, proteínas reguladoras do processo de apoptose em *C. tropicalis*;
- CaThi mostrou ser internalizada em células dos fungos *C. albicans*, *C. tropicalis* e *F. solani*. Para a levedura *C. tropicalis* a localização foi nuclear, sugerindo que CaThi pode ter alvos intracelulares entre estes nucleares;
- CaThi foi capaz de interagir com o DNA genômico;
- CaThi inibiu o efluxo de H⁺ nas células de *C. tropicalis*;
- A combinação de CaThi com Fluconazol teve um efeito sinérgico sobre todas as leveduras testadas e sobre o fungo filamentoso *F. solani*;
- CaThi e a combinação desta com FLC causaram alterações morfológicas nas leveduras, destacando-se: aglomeração celular, formação de pseudohifas e dificuldade de liberação de brotos, e contra o fungo filamentoso impediu o desenvolvimento dos esporos em hifas.

7. REFERÊNCIAS

- Addabbo F, Montagnani M, Goligorsky MS. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension*. 2009;53:885-92.
- Aerts AM, François IEJA, Meert, EMK, Li QT, Cammue BPA, Thevissen K. The antifungal activity of Rs-AFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2007;13:243-47.
- Aerts AM, François IE, Cammue BP, Thevissen K. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol. Life Sci*. 2008;65:2069-79.
- Aerts AM, Carmona-Gutierrez D, Lefevre S, Govaert G, Francois IE, Madeo F, Santos R, Cammue BP, Thevissen K. The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Lett*. 2009;583:2513-16.
- Allen G. (1989). Sequencing of proteins and peptides. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevire, Bundon, R. H. e Knipperg, P. H., editors, 2^o edition
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403-10.
- Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*. 2010;16:445-52.
- Balls AK, Hale WS, Harris TH. A crystalline protein obtained from lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem*. 1942;19:279-81.
- Bard GCV, Nascimento VV, Oliveira AE, Rodrigues R, Da Cunha M, Dias GB, Vasconcelos IM, Carvalho AO, Gomes VM. Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are α -amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology. *Biopolymers*. 2014;102(4):335-43.

- Bard GCV, Nascimento VV, Ribeiro SFF, Rodrigues R, Perales J, Teixeira-Ferreira A, Carvalho AO, Fernandes KVS, Gomes VM. Characterization of peptides from *Capsicum annuum* hybrid seeds with inhibitory activity against α -amylase, serine proteinases and fungi. *Protein J.* 2015;34:222-9.
- Benko-Iseppon AM, Galdino SL, Calsa TJr, Kido EA, Tossi A, Belarmino LC, Crovella S. Overview on plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sc.* 2010;11:181-8.
- Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, López G, García-Olmedo F, Molina A. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol.* 2002;128:951-61.
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Rodríguez-Palenzuela P, García-Olmedo F, Rivas L. *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Exp Parasitol.* 2009;122:247-49.
- Blochet JE, Chevalier C, Forest E, Pebay-Peyroula E, Gautier MF, Joudrier P, Pézolet M, Marion D. 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 Lett.* 1993;329:336-40.
- Bohlmann H, Apel K. Thionins. *Rev Plant Physiol.* 1991;42:227-40.
- Boman HG, Agerberth B, Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin-P1 and PR-39, 2 antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun.* 1993;61:2978-84.
- Bosland PW. (1996). *Capsicums: Innovative uses of an ancient crop.* Arlington, VA: ASHS Press. p. 479-487.
- Botton A, Begheldo M, Rasori A, Bonghi C, Tonutti. Differential expression of two lipid transfer protein genes in reproductive organs of peach (*Prunus persica* L. Batsch) *Plant Sci.* 2002;163:993-1000.

- Bowdish DME, Davidson DJ, Hancock REWH. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci.* 2005;6:35-51.
- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Vanderleyden J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol.* 1990;69:55-60.
- Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MFC, Thevissen K, De Samblanx G, Osborn RW. Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci.* 1997;16(3):297-323.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:238-50.
- Brown DW, Butchko RA, Proctor RH. *Fusarium* genomic resources: Tools to limit crop diseases and mycotoxin contamination. *Mycopathologia.* 2006;162:191-9.
- Brown KL, Hancock REW. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:24-30.
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med.* 2012;4(165):165rv13.
- Burgess LW, Dodman RL, Pont W, Mayers P. *Fusarium* diseases of wheat, maize, and grain sorghum in Eastern Australia. Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ. (eds). The Pennsylvania State University Press. University Park, PA, IN: *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy.* 1981:64-76.
- Caaveiro JM, Molina A, González-Mañas JM, Rodríguez-Palenzuela P, Garcia-Olmedo F, Goñi FM. Differential effects of five types of antipathogenic plant peptides on model membranes. *FEBS Lett.* 1997;410:338-42.
- Cammue BP, De Bolle MF, Terras FR, Proost P, Van Damme J, Rees SB, Vanderleyden J, Broekaert WF. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J Biol Chem.* 1992;267:2228-33.
- Cammue BP, Thevissen K, Hendriks M, Eggermont K, Goderis IJ, Proost P, Van Damme J, Osborn RW, Guerbet F, Kader JC, Broekaert WF. A potent

antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* 1995;109:445-55.

Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):291-321.

Carvalho AO, Machado OLT, Da Cunha M, Santos IS, Gomes VM. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol Biochem.* 2001;39:137-46.

Carvalho AO, Gomes VM. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology - a concise review. *Peptides.* 2007;28:1144-53.

Carvalho AO, Gomes VM. Plant defensins - prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides.* 2009;30:1007-20.

Casalinuovo IA, DI Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2004;8:69-77.

Castro MS, Fontes W. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett.* 2005;12(1):13-8.

Chandrashekhara NRS, Deepak S, Manjunath G, Shetty SH. Thionins (PR protein-13) mediate pearl millet downy mildew disease resistance. *Arch Phytopathol Plant Protect.* 2010;48(14):1356-66.

Chapman RL. Prevention and Treatment of *Candida* Infections in Neonates. *Semin Perinatol.* 2007;31:39-46.

Colilla FJ, Rocher A, Mendez E. Gamma-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett.* 1990;270:191-4.

Colombo AL, Guimarães T, Silva LRBF, Monfardini LPA, Cunha, AKB, Rady P, Alves T, Rosas R. Prospective observational study of candidemia in São Paulo,

- Brazil: Incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2007;28:570-6.
- Cowen LE, Anderson JB, Kohn LM. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:139-65.
- Cowen LE. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6:187-98.
- Cudic M, Otvos L. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr Drug Targets.* 2002;3:101-6.
- Cruz LP, Ribeiro SFF, Carvalho AO, Vasconcelos IM, Rodrigues R, Da Cunha M, Gomes VM. Isolation and partial characterization of a novel lipid transfer protein (LTP) and antifungal activity of peptides from chilli pepper seeds. *Protein Pept Lett.* 2010;17:311-8.
- Dalyan Cilo B, Al-Hatmi AM, Seyedmousavi S, Rijs AJ, Verweij PE, Ener B, de Hoog GS, van Diepeningen AD. Emergence of fusarioses in a university hospital in Turkey during a 20-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34:1683-91.
- Dathe, M. Meyer J, Beyermann M, Maul B, Hoischen C, Bienert M. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1558:171-86.
- De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein, WL. A beta oligomers induce neuronal oxidative stress through a N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem.* 2007;282:11590-601.
- De Lucca AJ, Cleveland TE, Wedge DE. Plant-derived antifungal proteins and peptides. *Can J Microbiol.* 2005;51:1001-14.

- Dhatwalia VK, Sati OP, Tripathi MK, Kumar A. Isolation, characterization and antimicrobial activity at diverse dilution of wheat puroindoline protein. *World J Agric Sci.* 2009;5:297-300.
- Dias GB, Gomes VM, Zottich UP, Ribeiro SFF, Carvalho AO, Rodrigues R, Machado OLT, Fernandes KVS, Teixeira-Ferreira A, Perales J, Da Cunha M. Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. Seeds. *Protein J.* 2013;32:15-26.
- Di Maro A, Terracciano I, Sticco L, Fiandra L, Ruocco M, Corrado G, Parente A, Rao R. Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco. *J Biotechnology,* 2010;147:1-6.
- Diz MSS, Carvalho AO, Rodrigues R, Neves-Ferreira AGC, Da Cunha M, Alves EW, Okorokova-Façanha AL, Oliveira MA, Perales J, Machado OLT, Gomes VM. Antimicrobial peptides from chili pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochem Biophys Acta.* 2006;1760:1323-32.
- Diz MS, Carvalho AO, Ribeiro SFF, Da Cunha M, Beltramini L, Rodrigues R, Nascimento VV, Machado OLT, Gomes VM. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chilli pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. *Physiol Plantarum.* 2011;142:233-46.
- Duvick JP, Rood T, Rao AG, Marshak DR. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J Biol Chem.* 1992;267:18814-20.
- Egorov TA, Odintsova TI, Pukhalsky VA, Grishin EV. Diversity of wheat antimicrobial peptides. *Peptides.* 2005;26:2064-73.
- Egorov TsA, Odintsova TI. Defense peptides of plant immunity. *Russian J of Bioorganic Chem.* 2012;38:1-9.

- Epple P, Apel K, Bohlmann H. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*. 1997;9:509-20.
- Feijó JA, Sainhas J, Hackett GR, Kunkel JG, Hepler PK. Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *J Cell Biol*. 1999;144:483-96.
- Franco OL. Peptide promiscuity: An evolutionary concept for plant defense. *FEBS Letters*. 2011;585:995-1000.
- Ford CB, Funt JM, Abbey D, Issi L, Guiducci C, Martinez DA, Delorey T, Li B, White TC, Cuomo C, Rao RP, Berman J, Thompson DA, Regev A. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *eLife*. 2015;4:e00662.
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo J.M, Rodríguez-Palenzuela P. Plant defense peptides. *Pept Sci*. 1998;47:479-91.
- García-Olmedo F, Rodríguez-Palenzuela P, Molina A, Alamillo JM, Lopez-Solanilla E, Berrocal-Lobo M, Poza-Carrion C. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxy-nitrite in plant defence. *FEBS Lett*. 2001;498:219-22.
- Gautier MF, Aleman ME, Guirao A, Marion D, Joudrier, P. *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Mol Biol*. 1994;25:43-57.
- Giudici AM, Regente MC, Villalaín J, Pfüller K, Pfüller U, De La Canal L. Mistletoe viscotoxins induce membrane permeabilization and spore death in phytopathogenic fungi. *Physiol Plantarum*. 2004;121:2-7.
- Giudici M, Poveda JA, Molina ML, De La Canal L, González-Ros JM. Antifungal effects and mechanism of action of viscotoxin A3. *FEBS Journal*. 2006;273:72-83.
- Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol*. 2007;2:1-33.

- Gravina GA, Martins-Filho S, Sigueyuki C, Cruz SCD. Parâmetros genéticos da resistência da soja a *Cercospora sojina* *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2004;39:653-9.
- Green DR; Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309-12.
- Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32:1491-500.
- Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*. 2003;37:1172-7.
- Guzmán-Rodríguez JJ, Ochoa-Zarzosa A, López-Gómez R, López-Meza JE. Plant Antimicrobial peptides as potential anticancer agents. *Biomed Res Int*. 2015:1-11.
- Hammami R, Ben Hamida J, Vergoten G, Fliss I. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Res*, 2009;37:D963–D968.
- Hancock RE, Brown KL, Mookherjee N. Host defence peptides from invertebrates emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology*. 2006;211:315-22.
- Hegedüs N, Marx F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biol Rev*. 2013;4:132-45.
- Helmerhorst EJ, Breeuwer P, Hof W van 't, Walgreen-Weterings E, Oomeni LCJM, Veerman ECI, Amerongen AV, Abee T. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem*. 1999;274(11):7286-91.
- Hong JK, Jung HW, Kim YJ, Hwang BK. Pepper gene encoding a basic class II chitinase is inducible by pathogen and ethephon. *Plant Sci*. 2000;159:39-49.
- Hughes P, Dennis E, Whitecross M, Llewellyn D, Gage P. The cytotoxic plant protein, beta-purothionin, forms ion channels in lipid membranes. *J Biol Chem*. 2000;275: 823-7.

- Hwang B, Hwang JS, Lee J, Lee DG. The antimicrobial peptide, psacothecin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011a;405:267-71.
- Hwang B, Hwang JS, Lee J, Kim JK, Kim SR, Kim Y, Lee DG. Induction of yeast apoptosis by an antimicrobial peptide, Papiliocin. *Biochem Biophys Res Commun* 2011b;408:89-93.
- Ince AG, Karaca M, Onus AN. Genetic relationships within and between *Capsicum* species. *Biochem Genet*. 2010;48:83-95.
- Iwazaki RS, Endo EH, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Garcia LB, Filho BP. In vitro antifungal activity of the berberine and its synergism with fluconazole. *A Van Leeuw*. 2010;97:201-5.
- Jennings C, West J, Waine C, Craik D, Anderson M. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2001;98:10614-10619.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Ver*. 2006;19:491-511.
- Jones JB, Stall RE, Bouzar H. Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annu Rev Phytopathol*. 1998;36:41-58.
- Kalpna K, Maruthasalam S, Rajesh T, Poovannan K, Kumar KK, Kokiladevi E, Raja JAJ, Sudhakar D, Velazhahan R, Samiyappan R, Balasubramanian P. Engineering sheath blight resistance in elite indica rice cultivars using genes encoding defense proteins. *Plant Science*. 2005;170:203-15.
- Kamimori H, Halla K, Craik DJ, Aguilar MI. Studies on the membrane interactions of the cyclotides kalata B1 and kalata B6 on model membrane systems by surface plasmon resonance. *Anal Biochem*. 2005;337:149-53.
- Kido EA, Pandolfi V, Houllou-Kido LM, Andrade PP, Marcelino FC, Nepomuceno AL, Abdelnoor RV, Burnquist WL, Benko-Iseppon AM. Plant antimicrobial peptides:

an overview of superSAGE transcriptional profile and a functional review. *Curr Protein Pept Sci.* 2010;11:220-30.

Kotaczowska A, Kotaczowski M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans Candida* species. *J Antimicrob Chemother.* 2016;doi:10.1093/jac/dkv445.

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:333-43.

Krcmery V, Barner AJ. Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002;4:243-60.

Kulkarni MM, McMaster RW, Kamysz W, McGwire BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *J Biol Chem.* 2009;284(23):15496-504.

Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009;3:131-41.

Lapin D, Van den Ackerveken G. Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. *Trends Plant Sci.* 2013;18(10):546-54.

Lee SC Hong, JK, Kim YJ, Hwang BK. Pepper gene encoding thionin is differentially induced by pathogens, ethylene and methyl jasmonete. *Phisiol Mol Plant Pathol.* 2000;56:207-16.

Lee J, Hwang JS, Hwang IS, Cho J, Lee E, Kim Y, Lee DG. Coprisin-induced antifungal effects in *Candida albicans* correlate with apoptotic mechanisms. *Free Radical Biol. Med.* 2012;52:2302-11.

Lipkin A, Anisimova V, Nikonorova A, Babakov A, Krause E, Bienert M, Grishin E, Egorov T. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry*, 2005;66:2426-31.

Li SS, Gullbo J, Lindholm P, Larsson R, Thunberg E, Samuelsson G, Bohlin L, Claeson P. Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turn-helix

DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*. *Biochem J.* 2002;366:405-13.

Litvinov N, Silva MTN, van der Heijden IM, Graça MG, Oliveira LM, Fu L, Giudice M, Aquino MZ, Odone-Filho V, Marques HH, Costa SF., Levin AS. An outbreak of invasive fusariosis in a children's cancer hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:268.e1-268.e7.

Liu Z, Zhang Z, Faris JD, Oliver RP, Syme R, McDonald MC, McDonald BA, Solomon PS, Lu S, Shelver WL, Xu S, Friesen TL. The cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring Snn1. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002467.

Lobo DS, Pereira IB, Fragel-Madeira L, Medeiros LN, Cabral LM, Faria J, Bellio M, Campos RC, Linden R, Kurtenbach E. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry.* 2007;46:987-96.

Loeza-Ángeles H, Sagrero-Cisneros E, Lara-Zárate L, Villagómez-Gómez E, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotechnol Lett.* 2008;30:1713-19.

Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med.* 2002;8:76-81.

Mahlo SM, McGaw LJ, Eloff JN. *Breonadia salicina* (Rubiaceae) extracts are as effective as a commercial fungicide in post harvest protection of oranges against *Penicillium* infections. *Crop Prot.* 2010;29:1529-33.

Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. Oxidative stress: biomarkers and novel therapeutic pathways. *Exp Geront.* 2010;45:217-34.

Mandal SM, Dey S, Mandal M, Sarkar S, Maria-Neto S, Franco LO. Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from Green coconut water. *Peptides*, 2009;30:633-7.

- Marcus JP, Goulter KC, Green JL, Harrison SJ, Manners JM. Purification, characterization and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. Eur J Biochem. 1997;244:743-9.
- McManus AM, Nielsen KJ, Marcus JP, Harrison SJ, Green JL, Manners JM, Craik D. J. MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a Greek key beta-barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins. J Mol Biol. 1999;293:629-38.
- Mello EO, Ribeiro SFF, Carvalho AO, Santos IS, Da Cunha M, Santa Catarina C, Gomes VM. The antifungal activity of PvD1, a plant seed defensin of *Phaseolus vulgaris*, involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification and induction of reactive oxygen species in yeast cells. Curr Microbiol. 2011;62:1209-17.
- Menzin J, Meyers JL, Friedman M, Korn JR, Perfect JR, Langston AA, Danna RP, Papadopoulos G. The economic costs to United States hospitals of invasive fungal infections in transplant patients. Am J Infect Control. 2011;39:15-20.
- Milbradt AG, Kerek F, Moroder L, Renner C. Structural characterization of hellethionins from *Helleborus purpurascens*. Biochemistry 2003;42:2404-11.
- Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T, Michel-Briand Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. J Clin Microbiol. 1994;32:1115-8.
- Mithöfer A, Boland W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. Annu. Rev. Plant Biol. 2012;63:431-50.
- Molina A, Ahi Goy P, Fraile A, Sfinchez-Monge R, Garcia-Olmedo F. Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II. Plant Sci. 1993;92:169-77.

- Morschhäuser J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* – an example of microevolution of a fungal pathogen. *J Microbiol.* 2016;54:192-201.
- Moscone EA, Scaldaferrero MA, Grabielle M, Cecchini NM, Sánchez García Y, Jarret R, Daviña JR, Ducasse DA, Barboza GE, Ehrendorfer F. The evolution of chili peppers (*Capsicum* - Solanaceae): a cytogenetic perspective. VI International Solanaceae Conference: Genomics Meets Biodiversity. *Acta Hort.* 2007;745:137-70.
- Nakanishi T, Yoshizumi H, Tahara S, Hakura A, Toyoshima K. Cytotoxicity of purothionin-A on various animal cells. *Gann* 1979;70:323-6.
- Nawrot R, Barylski J, Nowicki G, Broniarczyk J, Buchwald W, Goździcka-Józefiak A. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol.* 2014;59:181-96.
- Neoh CF, Slavin M, Chen SC, Stewart K, Kong DC. Echinocandins in the treatment of candidaemia and invasive candidiasis: clinical and economic perspectives. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43:207-14.
- Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial. *FEBS J.* 2009;276:6483-96.
- Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 2011;29:464-72.
- Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:695-704.
- Nucci M, Marr KA, Vehreschild MJGT, Souza CA, Velasco E, Cappellano P, Carlesse F, Queiroz-Telles F, Sheppard DC, Kindo A, Cesaro S, Hamerschlak N, Solza C, Heinz WJ, Schaller M, Atalla A, Arikian-Akdagli S, Bertz H, Castro CG Jr, Herbrecht R., Hoenigl M, Hearter G., Hermansen NEU, Josting A, Pagano L, Salles MJC, Mossad SB, Ogunc D, Pasqualotto AC, Araujo V, Troke PF, Lortholary O, Cornely OA, Anaissie E. Improvement in the outcome of invasive fusariosis in the last decade. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:580-5.

- O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, Zhang N, Geiser DM. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. J Clin Microbiol. 2008;46:2477–90.
- O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, Riley R, Zitomer NC, Colyer P, Waalwijk C, Lee T, Moretti A, Kang S, Kim HS, Geiser DM, Juba JH, Baayen RP, Cromey MG, Bithell S, Sutton DA, Skovgaard K, Ploetz R, Corby Kistler H, Elliott M, Davis M, Sarver BA. A two locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Genet Biol. 2009;46:936-48.
- Ohtani S, Okada T, Yoshizumi H, Kagamiyama H. Complete primary structures of two subunits of purothionin A, a lethal protein for brewer's yeast from wheat flour. J Biochem. 1977;82:753-67.
- Okorokov LA, Lehle L. Ca(2+)-ATPases of *Saccharomyces cerevisiae* : diversity and possible role in protein sorting. FEMS Microbiol Lett. 1998;162:83-91.
- Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:956-64.
- Pacifici GM. Clinical Pharmacology of fluconazole in neonates: effects and pharmacokinetics. Int J Pediatr. 2016;4:1475-89.
- Pane C, Piccolo A, Spaccini R, Celano G, Villecco D, Zaccardelli M. Agricultural waste-based composts exhibiting suppressivity to diseases caused by the phytopathogenic soil-borne fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. Appl Soil Ecol. 2013;65:43-51.
- Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Dismukes WE. 2003. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. Clin Infect Dis. 37:634–43.

- Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006;20:485-506.
- Pappas PG. The role of azoles in the treatment of invasive mycoses: review of the Infectious Diseases Society of America guidelines. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24 Suppl 2: S1-S13.
- Park CB, Kim HS, Kim SC.. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;244:253-7.
- Park Y, Park SN, Park SC, Shin SO, Kim JY, Kang SJ, Kim MH, Jeong CY, Hahm KS. Synergism of Leu-Lys rich antimicrobial peptides and chloramphenicol against bacterial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1764(1):24-32.
- Park SC, Lee JR, Shin SO, Jung Y, Lee JM, Son H, Park Y, Lee SY, Hahm KS. Purification and Characterization of an Antifungal Protein, C-FKBP, from Chinese Cabbage. *J Agr Food Chem*. 2007;55:5277-81.
- Pastorello EA, D'Ambrosio FP, Pravettoni V, Farioli L, Giuffrida MG, Monza M, Ansaloni R, Fortunato D, Scibola E, Rivolta F, Incorvaia C, Bengtsson A, Conti A, Ortolani C. Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:371-7.
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Giuffrida MG, Ortolani C, Fortunato D, Trambaioli C, Scibola E, Calamari AM, Robino AM, Conti A. Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. *J Chromatogr B* 2001;756:95-103.
- Patel SU, Osborn R, Rees S, Thornton JM. Structural studies of *Impatiens balsamina* antimicrobial protein (Ib-AMP1). *Biochemistry*. 1998;37:983-90.
- Pelegri PB, Murad AM, Silva LP, dos Santos RCP, Costa FT, Tagliari PD. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. *Peptides*. 2006;29:1271-9.

- Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat.* 2007;10:121-30 .
- Perlin DS, Shor E, Zhao Y. Update on Antifungal Drug Resistance. *Curr Clin Micro.* 2015;2:84-95.
- Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5425-7.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5- year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1366-77.
- Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in intensive care unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:65-9.
- Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* 2012;125:S3-13.
- Pokorny A, Birkbeck TH, Almeida PFF. Mechanism and kinetics of d-lysine interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry.* 2002;41:11044-56.
- Porto WF, Silva ON, Franco OL. Prediction and rational design of Antimicrobial Peptides. *Protein Structure.* 2012;377-96.
- Pozzobon MT, Schifino-Wittmann MT, Bianchetti LB. Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do $x = 12$ and $x = 13$ represent two evolutionary lines? *Biol J Linn Soc.* 2006;151:259-69.

- Ramos AC, Façanha AR, Feijó JA. Proton (H⁺) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 2008;178:177-88.
- Regente MC, Giudici AM, Villalaín J, De La Canal L. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Lett Appl Microbiol.* 2005;40:183-9.
- Reyes-Escogido ML, Gonzalez-Mondragon EG, Vazquez-Tzompantzi E. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules.* 2011;16:1253-70.
- Ribeiro SFF, Carvalho AO, Da Cunha M, Rodrigues R, Cruz LP, Melo VMM, Vasconcelos IM, Melo ETJ, Gomes VM. Isolation and characterization of a novel peptide from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon.* 2007;50:600-11.
- Ribeiro CSC, Lopes CA, Carvalho SIC, Henz GP, Reifschneider FJB. *Pimentas - Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças. 2008:11-14.
- Ribeiro SFF, Silva MS, Cunha M, Carvalho AO, Dias GB, Rabelo G, Mello EO, Santa-Catarina C, Rodrigues R, Gomes VM. *Capsicum annuum* L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. *A Van Leeuw (Gedrukt)*. 2012a;101:657-70.
- Ribeiro SFF, Taveira GB, Carvalho AO, Dias GB, Da Cunha M, Santa-Catarina C, Rodrigues R, Gomes VM. Antifungal and others biological activities of two 2S albumin-homologous protein against pathogenic fungi. *Protein Journal.* 2012b;31:59-67.
- Ribeiro SFF, Fernandes KVS, Santos SS, Taveira GB, Carvalho AO, Beltramini LM, Rodrigues R, Vasconcelos IM, Da Cunha M, Gomes VM. New small proteinase inhibitors from *Capsicum annuum*. seeds: Characterization, stability, spectroscopic analysis and a cDNA cloning. *Peptide Science* 2013;100:132-40.
- Richard JA, Kelly I, Marion D, Pezolet M, Auger M. Interaction between beta-purothionin and dimyristoylphosphatidylglycerol: a (31)P-NMR and infrared spectroscopic study. *Biophys J.* 2002;83:2074-83.

- Ristaino JB, Stephen AJ Ecologically based approaches to management of Phytophthora blight on bell pepper. Plant Dis. 1999;83:1080-9.
- Rodríguez-Burruezo A, Gonzalez-Mas MC, Nuez F. Carotenoid composition and vitamin A value in ají (*Capsicum baccatum* L.) and rocoto (*C. pubescens* R. & P.), 2 pepper species from the Andean region. J Food Sci. 2010;75:S446-S453.
- Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. Clin Infect Dis. 2011;52:1138-43.
- Sando L, Henriques ST, Foley F, Simonsen SM, Daly NL, Hall KN, Gustafson KR, Aguilar MI, Craik DJ. A Synthetic mirror image of kalata B1 reveals that cyclotide activity is independent of a protein receptor. Chembiochem. 2011;12(16):2456-62.
- Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:2378-86.
- Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. Curr Opin Microbiol. 2002;5:379-85.
- Sanglard D, Odds FC Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis. 2002;2:73-85.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. Mycoses; 2015;58(Suppl. 2): 2-13.
- Scheurer S, Pastorello EA, Wangorsch A, Kastner M, Hausteiner D, Vieths S. Recombinant allergens Pru av 1 and Pru av 4 and a newly identified lipid transfer protein in the in vitro diagnosis of cherry allergy. J Allergy Clin Immunol 2001;107:724-31.
- Schägger H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochemistry. 1987;166:368-79.

- 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*. 1994;245:380-9.
- Segura A, Moreno M, Madueño F, Molina A, García-Olmedo F. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact*. 1999;12:16-23.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem*. 2008;46:941-50.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011;7:539.
- Silva FP, Machado MCC. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*. 2012;36:308-14.
- Silva ON, Mulder KC, Barbosa AA, Otero-Gonzalez A.J, López-Abarrategui C, Dias S C, Rezende TM, Franco OL. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Front Microbiol*. 2011;2:232.
- Simonne AH, Simonne EH, Eitenmiller RR, Mills HA, Green NR. Ascorbic acid and provitamin A contents in unusually colored bell peppers (*Capsicum annum*L.). *J Food Compos Anal*. 1997;10:299-311.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Maallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Osion BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76-85.
- Stec B, Markman O, Rao U, Heffron G, Henderson S, Vernon LP, Brumfeld V, Teeter MM. Proposal for molecular mechanism of thionins deduced from physico-chemical studies of plant toxins. *J Pept Res*. 2004;64:210-24.

- Stec B. Plant thionins – the structural perspective. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:1370-85.
- Stempel JM, Hammond SP, Sutton DA, Weiser LM, Marty FM. Invasive Fusariosis in the Voriconazole Era: Single-Center 13-Year Experience. *Open Forum Infect Dis.* 2015;2(3):ofv099.
- Stephens H, Reig S, Wiedemann I, Kalbacher H, Deeg M, Sahl HG, Peschel A, Götz, F, Garbe C, Schittek B. Naturally processed dermicidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2608-20.
- Subbalakshmi C. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett* 1998;160:91-6.
- Sudré CP, Gonçalves LSA, Rodrigues R, do Amaral Júnior AT, Riva-Souza EM, dos S. Bento C. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genet Mol Res.* 2010;9:283-94.
- Summerell BA, Laurence MH, Liew ECY, Leslie JF. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Divers.* 2010;44:3–13.
- Taylor RH, Acland DP, Attenborough S, Cammue BP, Evans IJ, Osborn RW, Ray JA, Rees SB, Broekaert WF. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J Biol Chem.* 1997;272:24480-87.
- Tavares LS, Santos MO, Viccini LF, Moreira JS, Miller RNG, Franco OL. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides.* 2008;29:1842-51.
- Taveira GB. (2012) Purificação, Caracterização e Atividade Biológica de Peptídeos Antimicrobianos de Frutos de Duas Espécies do Gênero *Capsicum* L. Dissertação de mestrado. (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) Campos

dos Goytacazes, RJ, - Centro de Biociências e Biotecnologia – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF; 44-52p.

Taveira GB, Mathias LS, Vieira-da-Motta O, Machado OLT, Rodrigues R, Carvalho AO, Ferreira AT, Perales J, Vasconcelos IM, Gomes VM. Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Biopolymers*. 2014;102:30-9.

Teixeira V, Feio MJ, Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog in Lipid Research*. 2012;51:149-77.

Terras FRG, Schoofs HME, De Bolle MFC, Van Leuven F, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem*. 1992;267:15301-9.

Terras FRG, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*. 1995;7:573-88.

Thevissen K, Ghazi A, De Samblanx GW, Brownlee C, Osborn RW, Broekaert WF. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J Biol Chem*. 1996;271:15018-25.

Thevissen K, Terras FRG, Broekaert WF. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:5451-58.

Thevissen K, Ferket KKA, François IEJA, Cammue BPA. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides*. 2003a;24:1705-12.

Thevissen K, François IEJA, Takemoto JY, Ferket KKA, Meert EMK, Cammue BPA. DmAPM1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003b;226:169-73.

- Thevissen K, Warnecke DC, François IEJA, Leipelt M, Heinz E, Ott C, Zähringer U, Thomma BPHJ, Ferket KKA, Cammue BPA. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J Biol Chem*. 2004;279(6):3900-5.
- Thevissen K, François IEJA, Sijtsma L, van Amerongen A, Schaaper WMM, Meloen R, Posthuma-Trumpie T, Broekaert WF, Cammue BPA. Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*. 2005;26:1113-9.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673-80.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction, *Plant J*. 1997;11:1187-94.
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelluloses sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 1979;76:4350-4.
- Tulasi RB, Nadimpalli SK. Purification of α -mannosidase activity from Indian lablab beans. *Biochem Mol Biol Int*. 1997;41:925-31.
- van der Lee T, Zhang H, van Diepeningen A, Waalwijk C. Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2015;32:453-60.
- van der Weerden NL, Lay FT, Anderson M. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium Oxysporum* hyphae. *J Biol Chem*. 2008;283:14445-52.
- van Diepeningen AD, Hoog GS. Challenges in *Fusarium*, a Trans-Kingdom Pathogen. *Mycopathologia*. 2016;181:161-3.
- Van't Hof W, Veerman ECI, Helmerhorst EJ, Nieuw Amerongen, AV. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem*. 2001;382:597-619.

- Vermelho AB, Pereira AF, Coelho RRR, Souto-Padrón T. (2006). Práticas de microbiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 239p.
- Vernon L. P. Pyrularia thionin: physical properties, biological response and comparison to other thionins and cardiotoxin. J Toxicol. 1992;11:169-91.
- Vieira MEB, Vasconcelos IM, Machado OLT, Gomes VM, Carvalho AO. Isolation, characterization and mechanism of action of an antimicrobial peptide from *Lecythis pisonis* seeds with inhibitory activity against *Candida albicans*. Acta Biochim Biophys Sin. 2015;47(9):716-29.
- Viñals FN; Ortega RG, Garcia JC. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. (1996). Madrid: Mundi-Prensa, 607p.
- Wang S, Rao P, Ye X. Isolation and biochemical characterization of a novel leguminous defense peptide with antifungal and antiproliferative potency. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;82:79-86.
- Wittstock U, Gershenzon J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. Curr Opin Plant Biol. 2002;5:1-8.
- Wojnarowski JM, Konopa J. Interaction between DNA and viscotoxins. Cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. Hoppe-Seyler Z. Physiol Chem. 1980;361:1535-45.
- Wu G, Wu H, Li L, Fan X, Ding J, Li X, Xi T, Shen Z. Membrane aggregation and perturbation induced by antimicrobial peptide of S-thanatin. Biochem Biophys Res Commun. 2010;395:31-5.
- Xuan TD, Yuichi O, Junko C, Eiji T, Hiroyuki T, Mitsuhiro M, Dang KT, Hong NH. Kava root (*Piper methysticum* L.) as a potential natural herbicide and fungicide. Crop Prot, 2003;22:873-81.
- Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol Ther. 2003;55:27-55.

- Yonezawa A, Kuwahara J, Fujii N, Sugiura Y. Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action. *Biochemistry*. 1992;31:2998-3004.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415:389-95.
- Zivna L, Krocova Z, Härtlova A, Kubelkova K, Zakova J, Rudolf E, Hrstka R, Macela A, Stulik J. Activation of B cell apoptotic pathways in the course of *Francisella tularensis* infection. *Microb Pathog*. 2010;49:226-36.
- Zottich U, Da Cunha M, Carvalho AO, Dias GB, Silva NCM, Santos IS, Nascimento VV, Miguel EC, Machado OLT, Gomes MG. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochim Biophys Acta*. 2011;810:375-83.

Thionin-like Peptides From *Capsicum annuum* Fruits With High Activity Against Human Pathogenic Bacteria and Yeasts

Gabriel B. Taveira,¹ Luciana S. Mathias,² Olney V. da Motta,² Olga L. T. Machado,¹ Rosana Rodrigues,² André O. Carvalho,¹ André Teixeira-Ferreira,³ Jonas Perales,³ Ilka M. Vasconcelos,⁴ Valdirene M. Gomes¹

¹Center equivalent to department, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

²Center equivalent to department, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

³Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Laboratório de Toxinologia, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Toxinas Vegetais, Fortaleza, Brazil

Received 20 February 2013; revised 10 June 2013; accepted 27 June 2013

Published online 29 July 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/bip.22351

ABSTRACT:

Plants defend themselves against pathogens with production of antimicrobial peptides (AMPs). Herein we describe the discovery of a new antifungal and antibacterial peptide from fruits of *Capsicum annuum* that showed similarity to an already well characterized family of plant AMPs, thionins. Other fraction composed of two peptides, in which the major peptide also showed similarity to thionins. Among the obtained fractions, fraction 1, which is composed of a single peptide of 7 kDa, was sequenced by Edman method and its comparative sequence analysis in database (*nr*) showed similarity to thionin-like peptides. Tests against microorganisms, fraction 1 presented inhibitory activity to the cells of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and *Candida tropicalis* and caused growth reduction to the bacteria species *Escherichia coli*

and *Pseudomonas aeruginosa*. Fraction 3 caused inhibitory activity only for *C. albicans* and *C. tropicalis*. This fraction was composed of two peptides of ~7 and 10 kDa, and the main protein band correspondent to the 7 kDa peptide, also showed similarity to thionins. This plasma membrane permeabilization assay demonstrates that the peptides present in the fractions 1 and 3 induced changes in the membranes of all yeast strains, leading to their permeabilization. Fraction 1 was capable of inhibiting acidification of the medium of glucose-induced *S. cerevisiae* cells 78% after an incubation time of 30 min, and opposite result was obtained for *C. albicans*. Experiments demonstrate that the fraction 1 and 3 were toxic and induced changes in the membranes of all yeast strains, leading to their permeabilization. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Biopolymers (Pept Sci) 102: 30–39, 2014.

Keywords: pathogenic microorganisms; *Capsicum annuum*; antimicrobial peptides; thionins

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Correspondence to: Valdirene M. Gomes, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil; e-mail: valmg@uenf.br

Contract grant sponsor: CAPES

Contract grant number: 063/2010

Contract grant sponsor: CNPq, FAPERJ

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

This article was originally published online as an accepted preprint. The “Published Online” date corresponds to the preprint version. You can request a copy of the preprint by emailing the *Biopolymers* editorial office at biopolymers@wiley.com

INTRODUCTION

The antimicrobial peptides (AMPs) are part of the chemical arsenal used by plants to defend themselves against pathogens. They are important components of the innate immunity of living organisms, constituting an ancient immune defense mechanism that is found in a wide variety of eukaryotic organisms such as mammals, plants and insects and even in prokaryotes.^{1–3} These peptides share some common characteristics, such as small size, consisting of ~100 amino acid residues, amphipathicity and net positive charge at physiological pH.^{4,5} They are characterized by the presence of a large numbers of cysteines (4, 6, or 8), which are interconnected in pairs, forming disulfide bonds that confer high stability to these peptides.^{6,7}

These molecules are constitutively expressed or induced by pathogen invasion and are termed antimicrobial because they have a broad activity spectrum against Gram negative and positive bacteria, fungi, parasites⁸ and even viruses that have envelope membranes, such as the human immunodeficiency virus and *Herpes simplex*.⁹ These characteristics have attracted the attention of many researchers who are isolating these components from different plant species and from different organs such as flowers, leaves, fruits, tubers, roots, and especially seeds.^{6,10,11}

Among plant AMPs, there are a few that are better characterized as defensins, lipid transfer proteins (LTPs) and thionins.^{12–14} Thionins constitute a family of basic peptides with a low molecular weight^{15,16} and with a primary structure composed of 45 to 47 amino acid residues.⁶ Thionins have been isolated from a wide range of plant species, including monocotyledonous and dicotyledonous plants.⁶ The main feature of thionins is their toxic effect on biological systems, including many pathogenic fungi and bacteria.^{16,17}

Because of the great diversity of AMPs and their unique biochemical and biological activities, there has been an increase in the attention paid to these molecules, as they have been recognized as new and untapped sources of potential therapeutic agents.^{1,18,19}

Recently, peptides have been isolated and identified from *C. annuum* seeds and have been found to have antifungal activity *in vitro*, as demonstrated by the inhibition of the growth of fungi.^{20–23} In this study, we investigate antimicrobial and other biological activities of peptides from *C. annuum* fruits against yeast and pathogenic bacteria. Ours results indicate that antimicrobial plant proteins, such as thionins, possess ability to induce microbial inhibition and may, therefore, be targets for the design of new antifungal drugs.

EXPERIMENTAL SECTION

Biological Materials

Capsicum annuum L. fruits (accession UENF1381) were provided by the Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brazil.

The yeasts *Candida tropicalis* (CE017), *Candida albicans* (CE022) and *Saccharomyces cerevisiae* (1038) were obtained from the Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil. Yeasts were maintained on Sabouraud agar (1% peptone, 2% glucose, and 1.7% agar-agar) (Merck).

The bacterial clinical strains *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* were provided by the Laboratório Sanidade Animal (LSA), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. All strains were maintained and stored in the LSA.

Extraction and Fractionation of Peptides From Fruits of *C. annuum*

The peptide extraction and fractionation from *C. annuum* fruit was performed as described by Agizzio *et al.*,²⁴ Fruit (without seeds) flour (80 g) was extracted for 2 h (at 4°C) with 400 mL of extraction buffer (10 mM Na₂HPO₄, 15 mM NaH₂PO₄, 100 mM KCl, 1.5% EDTA, pH 5.4) (Sigma). Precipitate formed between 0 and 70% relative ammonium sulfate (Merck) saturation and was re-dissolved in distilled water and heated at 80°C for 15 min. The resulting suspension was clarified by centrifugation and the supernatant was extensively dialyzed against distilled water. The dialyzed solutions were recovered by freeze-drying (crude extract) and submitted to further fractionation by the chromatographic method. A reversed-phase chromatography column μ RPC C2/C18 (ST 4.6/100) (GE Healthcare) was employed for further separation of proteins from the crude extract. The column was equilibrated and run with solvent A (0.1% TFA) (Sigma) for the first 8 min followed by a gradient of solvent B (100% propanol (Sigma) in 0.1% TFA). From 8 to 65 min, the solvent B concentration rose to 40%, from 65 to 66 min, solvent B concentration rose to 50% and was kept at this concentration for 1 min. Next, solvent B concentration was reduced to 0% and was kept at this concentration until the end of the run at 75 min. The flow used was 0.5 mL min⁻¹.

SDS-Tricine-Gel Electrophoresis

SDS-tricine-gel electrophoresis was performed according to the method described by Schägger and Von Jagow.²⁵

Amino Acid Sequence Analysis

Amino acid sequence analysis was performed on peptides isolated from fraction 1 and fraction 3. This fraction was resuspended in sample buffer (0.125M Tris; 2.5% SDS; 0.25% Bromophenol blue, 5% β -mercaptoethanol; 15% Saccharose; pH 8.0) (Sigma) and treated with 5 mM β -mercaptoethanol (Sigma) and 5% vinylpyridine (Sigma) and was subsequently heated for 30 min at 37°C and 15 min at 60°C. After this treatment, the sample was separated by SDS-tricine-gel, transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF, Millipore) membrane and stained with 0.1% Ponceau-S (GE HealthCare).²⁶ The single band from the fraction 1 and the band corresponding to ~7 kDa from fraction 3 was excised from the membrane, briefly washed three times in water and air-dried. N-terminal amino acid sequences of peptides blotted onto PVDF were determined by Edman degradation carried out in a Shimadzu PSQ-23A protein sequencer (Shimadzu). Searches for sequence homology were performed using BLASTp,²⁷ with the database “nonredundant protein sequences (nr), and selected sequences were aligned with ClustalW.²⁸

The internal sequence of the ~7 kDa peptide from fraction 3 was also determined by proteolytic digestion with trypsin, followed by sequencing. The peptide was dissolved in 100 mM Tris-HCl, pH 7.8, and the Cys residues in the peptide fragments were reduced and carboxymethylated with DTT and iodoacetamide (Sigma), respectively. After this treatment, the trypsin (Sigma) was added at a 1:50 ratio (endoproteinase: fraction 3 sample), and the solution was incubated at 37°C for 2 h. Tryptic peptides were cocrystallized with an excess of the matrix alpha cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma) and further analyzed by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The instrument used was an AB SCIEX TOF/TOFTM 5800 System spectrometer (AB SCIEX) in the linear mode. Searches for sequence homology were performed as before.

Preparation of Yeast Cells and Effect of Fractions on Yeast Growth

For the preparation of yeast cell cultures, an inoculum from each stock was transferred to Petri dishes containing Sabouraud agar and allowed to grow at 28°C for 2 days. After this period, the cells were transferred to a sterile culture medium (10 mL). Yeast cells were quantified in a Neubauer chamber (Optik Labor) for further calculation of appropriate dilutions. A quantitative assay for fungal growth inhibition was performed following the protocol developed by Broekaert et al.,²⁹ with some modifications. To assay the effect of each fraction on the yeast growth, 10,000 cells mL⁻¹, in culture medium, and 100 μ g mL⁻¹ of each frac-

tion were incubated at 28°C in 200 μ L (microplates, Nunc). Optical readings at 670 nm were taken at zero hour and at every 6 h for the following 24 h. Cell growth controls without addition of fractions were also determined. The optical densities were plotted as a function of the incubation time to each fraction. Experiments were performed in triplicate and the standard errors (coefficients of variation that were less than 20%) were omitted for clarity.

Preparation of Bacterial Cells and the Effect of Fractions on Bacterial Growth

For the preparation of bacterial cell cultures, an inoculum from each stock was transferred to Petri dishes containing Mueller-Hinton agar (2.0 g L⁻¹ beef infusion solids; 1.5 g L⁻¹ starch; 17.5 g L⁻¹ casein hydrolysate; 1.7 g L⁻¹ agar; pH 7.3) (Fluka) and allowed to grow for 24 h at 37°C; after growth, the cells were transferred to 10 mL of BHI broth (5 g L⁻¹ beef heart; 12.5 g L⁻¹ calf brains; 2.5 g L⁻¹ disodium hydrogen phosphate; 2 g L⁻¹ glucose; 10 g L⁻¹ peptone; pH 7.4) (Fluka) until they reached optical density of 0.5 McFarland scale (equivalent to 10⁸ cells mL⁻¹) (Densimat, Biomerieux). A quantitative assay for fungal growth inhibition was performed following the protocol developed by Araújo et al.,³⁰ with some modifications. The different bacterial inocula (1 \times 10⁸ cells mL⁻¹) were incubated in BHI broth at 37°C in 200 μ L microplates in the presence of different concentrations of each fraction. Optical readings at 550 nm (Plate Chamaleon V, Hidex) were taken at zero hour and at every 1 h for the following 10 h. Cell growth controls without the addition of fractions were also determined. The optical densities were plotted as a function of the incubation time of fraction 1. Experiments were performed in triplicate and the standard errors (coefficients of variation that were less than 20%) were omitted for clarity.

SYTOX Green Uptake Assay

Plasma membrane permeabilization was measured by SYTOX Green (Molecular Probes Invitrogen) uptake, as described previously by Thevissen et al.,³¹ with some modifications. The different yeast species (1 \times 10⁴) were incubated in the presence of 50 μ g mL⁻¹ for 24 h fractions 1 and 3, at the concentration of 100- μ L aliquots of the yeast cell suspension were incubated with 0.2 μ M SYTOX Green in 1.5 mL microcentrifuge tubes for 2 h at 25°C with periodic agitation. The cells were observed in a DIC microscope (Axiophoto, Zeiss) equipped with a fluorescence filter set for fluorescein detection (excitation wavelengths, 450–490 nm; emission wavelength, 500 nm).

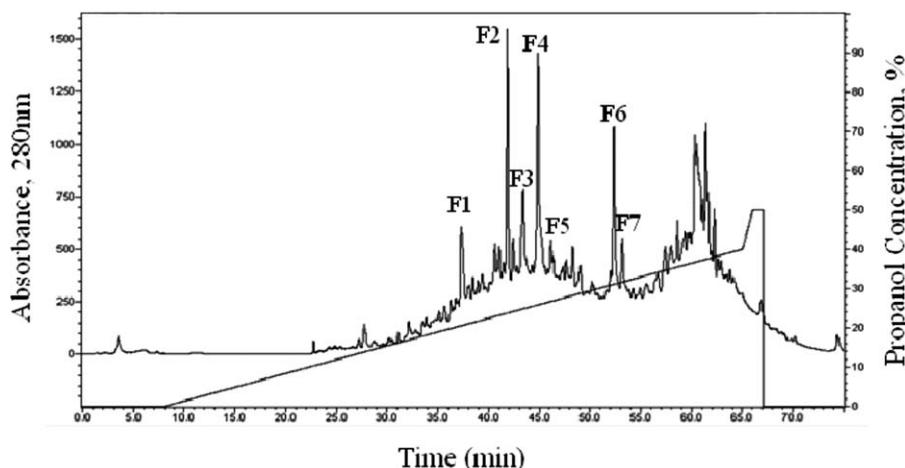


FIGURE 1 Chromatogram of the crude extract (CE) from fruits of *C. annuum* in reversed-phase C2/C18 column. The column was equilibrated and run with 0.1% TFA (Solvent A) and eluted using a linear gradient of 100% propanol in 0.1% TFA (Solvent B). The flow used was 0.5 mL min^{-1} .

Inhibition of the Glucose-Stimulated Acidification of the Medium by Yeast Cells

The Sabouraud broth (100 mL) (Merck) containing the *S. cerevisiae* or *C. albicans* culture was shaken for 16 h at 30°C with good aeration. The cells ($A_{660} = 0.2$) were pelleted by centrifugation at $3000g$ (5 min, 4°C), followed by two water-washing steps. The effect of fraction 1 on yeast metabolism was determined by the incubation of yeast cells (1×10^7) with 1 mL of 10 mM Tris-HCl, pH 6.0. Fraction 1 was added to the final concentrations of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *S. cerevisiae* and *C. albicans*. After an incubation time of 30 min, a 0.5M glucose (Sigma) solution was added to a final concentration of 0.1M. Next, pH measurements were taken at each subsequent minute for the next 30 min. Controls, without the addition of fraction 1, were run in order to evaluate the influence of this fraction on H^+ extrusion by yeast cells (Quimis). The extent of H^+ extrusion was calculated as the difference (ΔpH) between the initial ($T = 0$) and final ($T = 30 \text{ min}$) pH, and the resultant values were input into the equation $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$.³²

RESULTS

Extraction and Fractionation of Peptides From *C. annuum* Fruits

The electrophoretic profile of the crude extract (CE) was obtained after the extraction of proteins from pepper fruits of *C. annuum* and several proteins with a molecular weight above 16.9 kDa were observed. However, it was predominantly com-

posed of peptides with a lower molecular weight range—between 6 and 14 kDa (data not shown). The CE was separated by reversed-phase chromatography into seven fractions referred to as F1, F2, F3, F4, F5, F6, and F7 (Figure 1).

The analysis of each of the seven fractions obtained from reversed-phase chromatography showed the presence of different bands in SDS-Tricine-gel electrophoresis after treatment with β -mercaptoethanol. The fraction 1 showed a single band with a molecular mass ~ 7 kDa. The fractions 2 and 3 showed a profile with two bands each, the lighter with a molecular mass of ~ 7 kDa and the heavier with a molecular mass of 10 kDa. The fractions 4 and 5 showed three bands each, the two lighter bands had a mass of ~ 6 and 7 kDa and the heavier band had a mass of ~ 13 kDa. The fractions 6 and 7 each showed the presence of a single band with a molecular mass of ~ 6 kDa (Figure 2).

Amino Acid Sequence Analysis

The analysis of the N-terminal amino acid sequence of the 7 kDa peptide from fraction 1 revealed 67, 67, and 67% identity with thionin-like peptides from *C. annuum* thionin-like peptide (1) (gi: 164698852), *C. annuum* thionin-like peptide (2) (gi: 6552502) and *C. annuum* γ -thionin 1 (gi: 6601331), respectively (Figure 3A). This alignment also revealed that the four cysteine residues are conserved (Figure 3A).

The fraction 3, which presented high antimicrobial activity, was also selected for sequencing. The band corresponding to ~ 7 kDa had its first 16 amino acid residues obtained (Figure 3B), fraction 3 (N-terminal) (shown in grey). Another result of

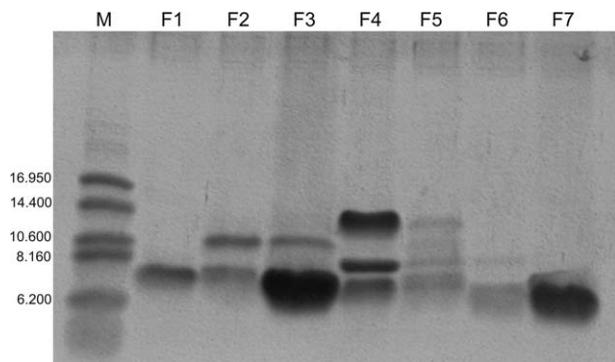


FIGURE 2 Electrophoretic visualization in a SDS-Tricine-gel of peptides enriched fractions obtained by the fractionation of the crude extract of *C. annuum* fruit by reversed-phase C2/C18 column in HPLC. (F1) fraction 1, (F2) fraction 2, (F3) fraction 3, (F4) fraction 4, (F5) fraction 5, (F6) and fraction 6 (F7) fraction 7. (M) refers to molecular mass markers in Da.

this same peptide was obtained after its partial cleavage by trypsin, followed by sequencing with mass spectrometry that resulted in a sequence of 34 amino acid residues identified as

fraction 3 (mass spectrometry) (marked in black) (Figure 3B). By comparing the two partial sequences, a more complete sequence was deduced based on the superposition of the two sequences and the known cleavage site of trypsin. The last 10 residues of the fraction 3 (N-terminal) were superimposed with the 10 first residues of the fraction 3 (mass spectrometry) (the trypsin cleavage site is the sixth residue, which is a lysine). The result of this analysis was a peptide of 40 amino acid residues identified as fraction 3 (N-terminal + mass spectrometry) (Figure 3B).

The deduced sequence of the 7 kDa band from fraction 3 was compared with protein databases (nr), and it showed 100, 63, and 63% identity with the primary structure of plant AMPs belonging to the thionin-like peptides, *C. annuum* thionin-like peptide (1) (gi: 164698852), *C. annuum* thionin-like peptide (2) (gi: 6552502) and *C. annuum* γ -thionin 1 (gi: 6601331), respectively (Figure 3C). This alignment also revealed that the six cysteine residues are conserved (Figure 3C). The two peptides from fraction 1 (of 7 kDa) and 3 (of 7 kDa), present identity of 42% with each other (Figure 3D).

A	10	20	30		
Fraction 1 (N-terminal)	1	A E G C Y K E L T K P V K C S S S P R C L Y D C I A K T K Y - D G H - - - - -	30	I ₄	P ₄
Thionin-like peptide (1)	26	K E I C C K V P T T P F L C T N D P Q C K T L C - S K V N Y E D G H C F D I L S K	65	67%	69%
Thionin-like peptide (2)	26	K E I C C K E L T K P V K C S S D P L C Q K L C H E K E K Y E D G H C F T I L S K	66	67%	69%
γ -thionin 1	26	K E I C C K E L T K P V K C S S D P L C Q K L C H E K E K Y E D G H C F T I L S K	66	67%	69%
B					
Fraction 3 (N-terminal)		K E I C C K V P T T P F L C T H - - - - -			
Fraction 3 (mass spectrometry)		- - - - - V P T T P F L C T N D P Q C K T L C S K V N Y E D G H C F D I L S K			
Fraction 3 (N-terminal + mass spectrometry)		K E I C C K <i>V</i> P T T P F L C T N D P Q C K T L C S K V N Y E D G H C F D I L S K			
C	10	20	30		
Fraction 3 (N-terminal + mass spectrometry)	1	K E I C C K V P T T P F L C T N D P Q C K T L C - S K V N Y E D G H C F D I L S K	40	I ₄	P ₄
Thionin-like peptide (1)	26	K E I C C K V P T T P F L C T N D P Q C K T L C - S K V N Y E D G H C F D I L S K	65	100	100
Thionin-like peptide (2)	26	K E I C C K E L T K P V K C S S D P L C Q K L C H E K E K Y E D G H C F T I L S K	66	63	71
γ -thionin 1	26	K E I C C K E L T K P V K C S S D P L C Q K L C H E K E K Y E D G H C F T I L S K	66	63	71
D					
Fraction 1 (N-terminal)	1	A E G C Y K E L T K P V K C S S S P R C L Y D C I A K T K Y - D G H - - - - -	30	I ₄	P ₄
Fraction 3 (N-terminal + mass spectrometry)	1	K E I C C K V P T T P F L C T N D P Q C K T L C - S K V N Y E D G H C F D I L S K	40	42%	48%

FIGURE 3 (A) Alignment of the amino acids residues from peptide of 7 kDa of fraction 1 with the sequences of the thionins as follows: *C. annuum* thionin-like peptide (1) (gi: 164698852); *C. annuum* thionin-like peptide (2) (gi: 6552502); *C. annuum* γ -thionin 1 (gi: 6601331). (B) N-terminal amino acid sequence of the 7 kDa peptide from the fraction 3. Fraction 3 (N-terminal) sequence obtained from Edman degradation; fraction 3 (mass spectrometry) internal sequence obtained by mass spectrometry after partial trypsin cleavage, the Lys indicated by an asterisk and written in bold and italics indicates the cleavage point; fraction 3 (N-terminal + mass spectrometry) deduced sequence by superimposition. (C) Alignment of the deduced amino acids residues of the 7 kDa peptide from fraction 3 with the sequences of the thionins as follows: *C. annuum* thionin-like peptide (1) (gi: 164698852); *C. annuum* thionin-like peptide (2) (gi: 6552502); *C. annuum* γ -thionin 1 (gi: 6601331). (D) Alignment of the amino acids residues of peptide from fraction 1 with the sequence of the peptide of 7 kDa from fraction 3. Cys residues conserved among the sequences are boxed. % indicates the percentage of identical residues (Cys residues included) and are written in bold. Gaps (-) were introduced for better alignment. P% indicates the percentage of positive residues (that present the same physic-biochemical features) and are written in gray.

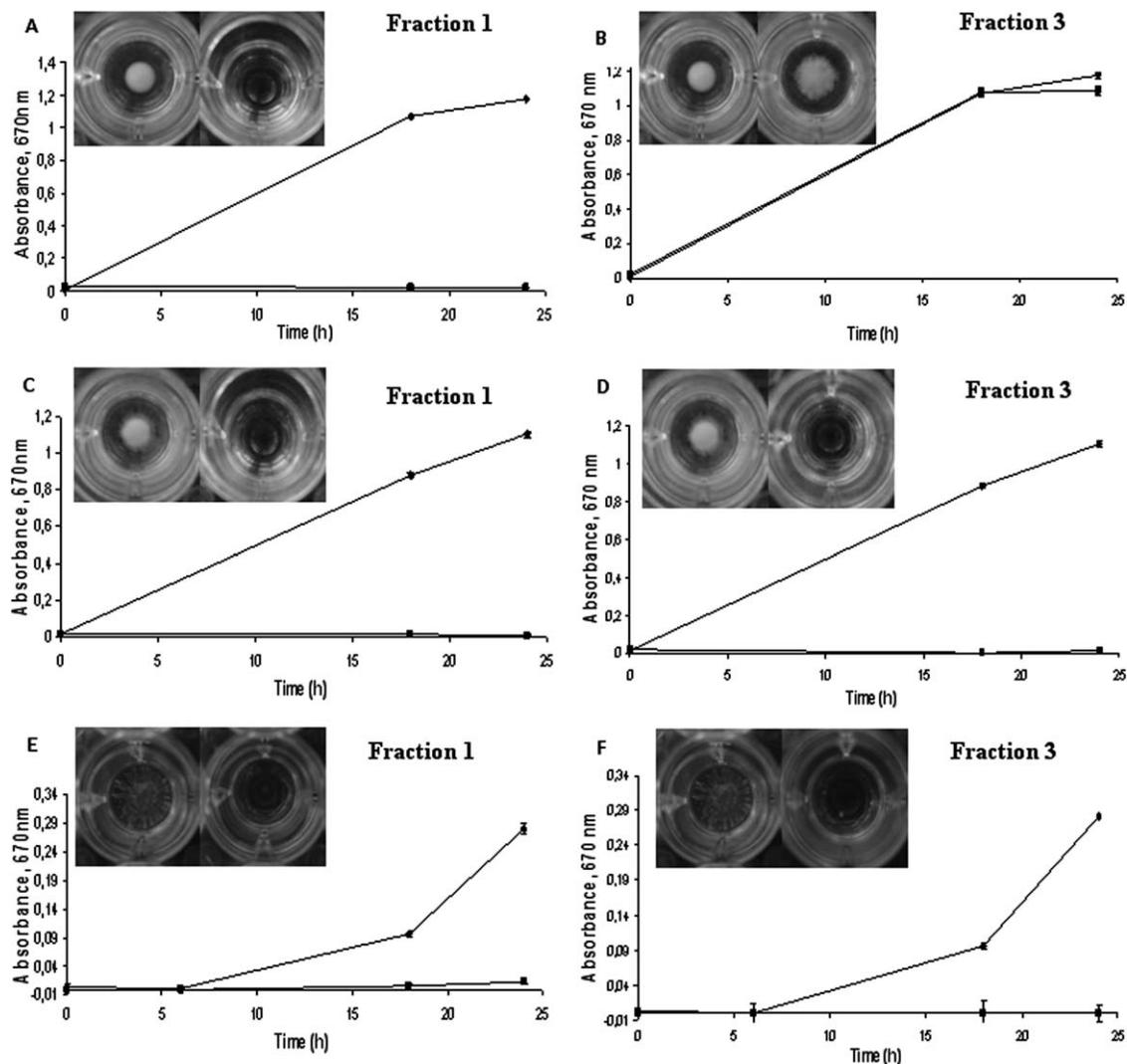


FIGURE 4 The effect of fractions 1 (a, c, and e) and 3 (b, d and f) on the growth of the yeasts *S. cerevisiae* (a, b), *C. tropicalis* (c, d) and *C. albicans* (e, f). (\diamond) control; (\blacksquare) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of each fraction. Experiments were performed in triplicate, and the values are the average of them. (Insert): photographs of the microplate wells at the end of the growth inhibition assay in the presence (right) ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) and absence (left) of fractions 1 and 3.

Numerous attempts were made at sequencing the band ~ 10 kDa of fraction 3, but thus far, no sequences was obtained for this peptide.

Inhibitory Activity Against Yeasts

The different fractions obtained after reversed-phase chromatography in HPLC were tested against three different species of yeast, namely *S. cerevisiae*, *C. tropicalis* and *C. albicans*. Against cells of *S. cerevisiae*, the purified fraction 1 showed the highest activity, causing a 98% inhibition of growth of this yeast at a

concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figure 4A). The fractions F2, F4, and F5 caused a less inhibitory effect, $\sim 16\%$ (data not shown). Fraction 3 was not able to inhibit growth of this yeast at a concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figure 4B). When tested in the presence of the yeast *C. tropicalis* at the concentration of 100mg mL^{-1} , the fractions 1 and 3 showed strong activities, being able to inhibit 100% of the growth of this yeast (Figures 4C and 4D). The F2, F4, and F5 fractions were able to inhibit the growth at 14, 60, and 44%, respectively, using $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of each fraction (data not shown). The fractions 1 and 3 were also able to inhibit the growth of *C. albicans* at

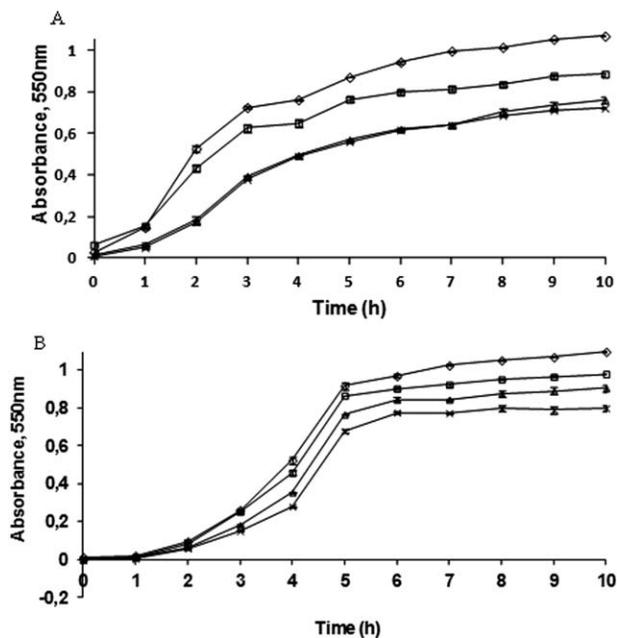


FIGURE 5 The effect of fraction 1 on the growth of the bacteria *E. coli* (A) and *P. aeruginosa* (B). (\diamond) control; (\square) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; (Δ) $200 \mu\text{g mL}^{-1}$; (\times) $300 \mu\text{g mL}^{-1}$. Experiments were performed in triplicate, and the values are the average of them.

96 and 100%, respectively (Figures 4E and 4F). The fractions F2, F4, and F5 caused a growth reduction of 14, 18, and 80%, respectively (data not shown). The inserts in Figure 4 show the photographs of the microplate wells at the end of the growth inhibition assay of the yeasts *S. cerevisiae*, *C. albicans*, and *C. tropicalis*. The growth pattern observed in the bottom of the wells corroborates the data presented in graphs. The control wells (left wells) in the absence of fractions 1 and 3 present an even and homogeneous growth, however the photographs on the right show that in the presence of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of fractions 1 and 3, the yeasts growth are inhibited by the peptides. The only exception was the fraction 3 in which the yeast growth present irregular edges and heterogeneous growth pattern.

Inhibitory Activity Against Bacteria

We also analyzed the inhibitory effect of all fractions against *E. coli* bacterium. Only the fraction 1 was able to cause a reduction of the growth of 18, 34, and 34% at the concentrations of 100, 200, and $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (Figure 5A). The other fractions did not demonstrate inhibition of cell growth of *E. coli* (Supporting Information).

The fraction 1 was also tested against cells of *P. aeruginosa* at concentrations of 100, 200, and $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ and caused a reduction of 10, 18, and 27%, respectively, of the growth of this bacterium (Figure 5B).

Ability to Permeabilize Yeast Membranes

Cells of the yeast *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, and *C. albicans* (Figure 6) were used to test for membrane permeabilization through the use of dye Sytox Green at incubation time of 24 h with the fractions. Figure 6 shows the fluorescence of the three yeast cells when grown in the presence of the fractions 1 and 3 at a concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. This result suggests that they have acted on the plasma membrane of these yeasts, allowing the dye labeling, which indicates membrane permeabilization.

Inhibition of Glucose-Stimulated Acidification of the Medium by Yeast

In this study, we also investigated whether the fraction 1 interferes with fungal metabolism. For this assay, we monitored the glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *S. cerevisiae* and *C. albicans* cells in the presence of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ fraction 1. The fraction 1 was able to inhibit acidification in *S. cerevisiae* by 78% when pre-incubated for 30 min. Interestingly, when we monitored the glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *C. albicans* cells in the presence of the fraction 1, a stimulus of the acidification was observed. At $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the fraction 1, a 50% increase in medium acidification was measured, suggesting an increase in extrusion of H^+ by the cells.

DISCUSSION

In recent years, an increasing number of AMPs have been isolated from plants. Some peptides were purified from pepper seeds and presented broad biological activity.^{21,23} However, as far as we know, any antimicrobial peptides have been purified from the fruits of pepper and for this reason we have studied the fruit of this plant.

Initially, we performed a protein extraction from the fruit of *C. annuum*. This crude extract was subjected to SDS-Tricine-gel electrophoresis, where we noted the presence of peptides in *C. annuum* fruit (data not shown). In the fruit of various plant species, other AMPs have been found, such as the cDNAs of Pp-LTP1 and Pp-LTP2, corresponding to different lipid transfer protein (LTP) genes that have been isolated from *Prunus persica* (peach) epicarp and ovary, respectively,³³ and in other fruits of the Rosaceae family, such as *Prunus armeniaca* (apricot),³⁴ *Prunus domestica* (plum),³⁵ and *Prunus avium* (cherry).³⁶ The crude extract was separated by reversed-phase chromatography on HPLC into seven fractions (Figure 1). Two fractions showed greater toxicity against microorganisms, the fractions 1 and 3. Reversed-phase chromatography is widely used by researchers for purification of proteins^{37,38} the

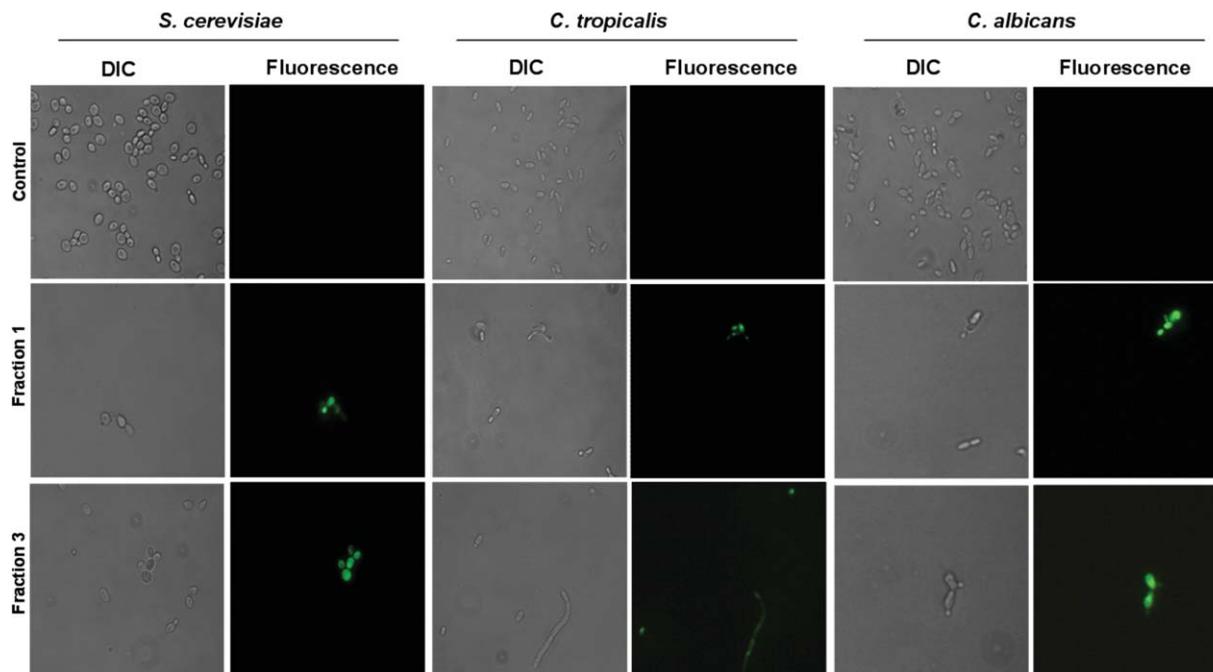


FIGURE 6 Membrane permeabilization assay performed with fluorescence microscopy of different yeast cells treated with SYTOX Green. Control cells (without peptides), treated cells with fractions 1 or 3 ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Magnification $\times 400$.

sequence of 7 kDa peptides present in the fraction 1 and 3 were obtained. Through database analysis, it was found that these peptides have sequence similarity to a family of plant thionins-like peptides from *C. annuum* (Figure 3). Thionins are small (~ 5 kDa), cysteine-rich peptides with toxic and antimicrobial properties. They show a broad cellular toxicity against wide range of organisms and eukaryotic cell lines; while possessing some selectivity.³⁹ Plant thionins are also known for broad-spectrum antimicrobial activities, having inhibitory activity against bacteria, fungi, eukaryotic cells and leishmanicidal activity.^{15,40}

To further evaluate the ability of the fractions 1 and 3 obtained after reversed-phase chromatography on HPLC to inhibit microorganism growth, antifungal and antibacterial assays were performed. *S. cerevisiae*, *C. albicans*, and *C. tropicalis* yeast were used for these assays. The fraction 1 inhibited the growth of the three yeast species tested at a concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Fraction 3 completely inhibited the growth of *C. albicans* and *C. tropicalis* (Figure 4). Other peptides that were isolated from pepper plants, however from seeds and not from fruits, showed some antimicrobial activity *in vitro*. Among these, we can cite the LTPs and protease inhibitors.^{21,23,41}

Many antimicrobial peptides, such as thionins, have activity against bacteria.^{16,42} The thionin present in fraction 1 was also able to cause a reduction in the growth of two bacteria species

at different concentrations (Figures 5A and 5B), showing this peptide has biological activities very similar to other thionins already described in the literature.

During this study we also demonstrated that when yeast membranes are treated with the fractions 1 and 3, they became structurally compromised, leading to permeabilization (Figure 6). The permeability of membranes of cells treated with AMPs has been well described for peptides such as thionins and defensins, which can cause changes in the permeability of the plasma membrane, resulting in the entry of Ca^{2+} and efflux of K^{+} , which induce changes in the membrane potential. These observations suggest the interaction of plant peptides with fungal membranes.^{31,43} An example of a well-characterized AMP related to the process of membrane permeabilization is the defensin Dm-AMP1, which causes changes in the plasma membrane of the fungus *Neurospora crassa*.³¹ PvD1, another defensin, also shows the potential to permeabilize yeast membranes.⁴⁴ Similar studies showed that a viscotoxina A3 (VtA3), a peptide from the thionin family, was also capable of altering the permeability of the plasma membrane because this peptide is internalized by fungus *F. solani* cells. This activity is related to the fungus growth reduction.⁴⁵ In regard to the mechanism of pore formation to the thionin family, they interact with membranes, as well documented by the membrane permeabilization assays.^{31,43,46} The outcome of the interaction can be

pore formation,⁴⁷ or interaction with specific domains of the membrane causing its unspecific permeabilization (carpet model).^{43,47} This primary effect of the interaction of thionins with membranes leads to secondary effects as well. They are described as ion leakage and membrane depolarization,⁴⁸ activation of phospholipase^{48,49} and interaction with internal targets such as DNA and RNA.⁵⁰ These effects are dependent on the thionin and cell type interaction and thus the complex outcome difficult the comprehension of the process as a whole.

The ability of the fraction 1 to alter the function of yeast metabolism was also evaluated. It was observed that for *S. cerevisiae* cells, the fraction 1 caused an inhibitory effect on the acidification of the medium. Diz et al.,²⁰ also showed that the fraction 1 from the seeds of *C. annuum*, containing an LTP, inhibited the acidification of the medium by *S. cerevisiae*. Ribeiro et al.,²² observed this same inhibitory effect on the acidification of the medium, where a 2S albumin isolated from passion fruit seeds, named Pf-Alb, inhibited 100% of the acidification of the medium by cells of *S. cerevisiae* and 96% by cells of *C. albicans*.

In the presence of *C. albicans* cells, the fraction 1 showed an opposite effect to that observed for *S. cerevisiae*, an increase in medium acidification was measured. The stimulating effect of acidification was also observed for LTP, called Cc-LTP1 isolated from coffee seeds, where 100 µg mL⁻¹ Cc-LTP1 was sufficient to stimulate 89% of the acidification of the medium containing *S. cerevisiae* cells. The same effect was observed for cells of *C. albicans*, with the addition that the effect was dose dependent. At 200 µg mL⁻¹, Cc-LTP1 induced a 222% increase in the acidification of the medium. It was suggested that Cc-LTP1 can bind not only the lipid components present in the plasma membrane but also to the proteins of eukaryotic cells, such as the H⁺-ATPase.⁵¹ According to these results, the fraction 1 may be involved in the ability to interact with components of the plasma membrane, causing changes in the H⁺ gradient. This difference between inhibition and stimulation for different cells may be related to differences in the composition of membrane proteins of different species of yeasts.

CONCLUSIONS

AMPs act against various microorganisms, and it is believed that they might be a viable alternative for the production of future drugs.^{8,52} Plant thionins are among the highest efficiency AMPs.³⁹ The results are quite interesting because this work and recent works related to thionin activity against different human pathogens^{39,40} open new therapeutic possibilities. The new thionin discovery from *Capsicum annuum* fruits showed high toxicity against microorganisms, such as *S. cerevisiae*, *C. albicans*, and *C. tropicalis* and caused growth reduction

in the species *E. coli* and *P. aeruginosa*. Experiments demonstrate that thionin from fraction 1 induced changes in the membranes of all yeast strains tested, leading to their permeabilization and may be able to interact with components of the plasma membrane, causing changes in the H⁺ gradient. In this scenario, thionins could be targets for the design of new drugs to treat human infectious diseases.

This study forms part of the MSc and DSc degree thesis of GBT, carried out at the Universidade Estadual do Norte Fluminense. The authors are grateful to L.C.D. Souza for technical assistance.

REFERENCES

- Zasloff, M. Nature 2002, 415, 389–395.
- Brogden, N. K.; Brogden, K. A. Int J Antimicrob Agents 2011, 38, 217–225.
- Rahnamaeian, M. Plant Signal Behav 2011, 6, 1325–1332.
- Wu, G.; Wu, H.; Li, L.; Fan, X.; Ding, J.; Li, X.; Xi, T.; Shen, Z. Biochem Biophys Res Commun 2010, 395, 31–35.
- Nakatsuji, T.; Gallo, R. L. J Invest Dermatol 2012, 132, 887–895.
- Broekaert, W. F.; Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C.; Thevissen, K.; De Samblanx, G.; Osborn, R. W. Crit Rev Plant Sci 1997, 16, 297–323.
- Benko-Iseppon, A. M.; Galdino, S. L.; Calsa, T., Jr.; Kido, E. A.; Tossi, A.; Belarmino, L. C.; Crovella, S. Curr Protein Pept Sci 2010, 11, 181–188.
- Guaní-Guerra, E.; Santos-Mendoza, T.; Lugo-Reyes, S. O.; Terán, L. M. Clin Immunol 2010, 135, 1–11.
- Hancock, R. E. W.; Diamond, G. Trends Microbiol 2000, 8, 402–410.
- Pelegri, P. B.; Murad, A. M.; Silva, L. P.; dos Santos, R. C. P.; Costa, F. T.; Tagliari, P. D. Peptides 2008, 29, 1271–1279.
- Tavares, L. S.; Santos, M. O.; Viccini, L. F.; Moreira, J. S.; Miller, R. N. G.; Franco, O. L. Peptides 2008, 29, 1842–1851.
- Egorov, T. A.; Odintsova, T. I.; Pukhalsky, V. A.; Grishin, E. V. Peptides 2005, 26, 2064–2073.
- Carvalho, A. O.; Gomes, V. M. Peptides 2007, 28, 1144–1153.
- Carvalho, O. A.; Gomes, M. V. Curr Pharma Des 2011, 17, 4270–4293.
- Castro, M. S.; Fontes, W. Protein Pept Lett 2005, 12, 13–18.
- Kido, E. A.; Pandolfi, V.; Houllou-Kido, L. M.; Andrade, P. P.; Marcelino, F. C.; Nepomuceno, A. L.; Abdelnoor, R. V.; Burnquist, W. L.; Benko-Iseppon, A. M. Curr Protein Pept Sci 2010, 11, 220–230.
- Lee, S. C.; Hong, J. K.; Kim, Y. J.; Hwang, B. K. Physiol Mol Plant Pathol 2000, 56, 207–216.
- Ajesh, K.; Sreejith, K. Peptides 2009, 30, 999–1006.
- Pinheiro da Silva, F.; Machado, M. C. Peptides 2012, 36, 308–314.
- Diz, M. S. S.; Carvalho, A. O.; Rodrigues, R.; Neves-Ferreira, A. G. C.; Da Cunha, M.; Alves, E. W.; Okorokova-Façanha, A. L.; Oliveira, M. A.; Perales, J.; Machado, O. L. T.; Gomes, V. M. Biochem Biophys Acta 2006, 1760, 1323–1332.
- Diz, M. S. S.; Carvalho, A. O.; Ribeiro, S. F. F.; Da Cunha, M.; Beltramini, L.; Rodrigues, R.; Nascimento, V. V.; Machado, O. L. T.; Gomes, V. M. Physiol Plantarum 2011, 142, 233–246.

22. Ribeiro, S. F. F.; Taveira, G. B.; Carvalho, A. O.; Dias, G. B.; Da Cunha, M.; Santa-Catarina, C.; Rodrigues, R.; Gomes, V. M. *Protein J* 2012, 31, 59–67.
23. Ribeiro, S. F. F.; Silva, S. M.; Da Cunha, M.; Carvalho, A. O.; Dias, G. B.; Rabelo, G.; Mello, E. O.; Santa-Catarina, C.; Rodrigues, R.; Gomes, V. M. *Anton Leeuw* 2012, 101, 657–670.
24. Agizzio, A. P.; Carvalho, A. O.; Ribeiro, S. F. F.; Machado, O. L. T.; Alves, E. W.; Okorokov, L. A.; Samarão, S. S.; Bloch, C., Jr.; Prates, M. V.; Gomes, V. M. *Arch Biochem Biophys* 2003, 416, 188–195.
25. Schägger, H.; Von Jagow, G. *Anal Biochem* 1987, 166, 368–379.
26. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76, 4350–4354.
27. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. *J Mol Biol* 1990, 215, 403–410.
28. Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. *Nucleic Acids Res* 1994, 22, 4673–4680.
29. Broekaert, W. F.; Lee, H. I.; Kush, A.; Chua, N. H.; Raikhel, N. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87, 7633–7637.
30. Araujo, R.; Rodrigues, A. G.; Pina-Vaz, C. *J Med Microbiol* 2004, 53, 783–786.
31. Thevissen, K.; Terras, F. R. G.; Broekaert, W. F. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65, 5451–5458.
32. Gomes, V. M.; Okorokov, L. A.; Rose, T. L.; Fernandes, K. V. S.; Xavier-Filho, J. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1379, 207–216.
33. Botton, A.; Begheldo, M.; Rasori, A.; Bonghi, C.; Tonutti, P. *Plant Sci* 2002, 163, 993–1000.
34. Pastorello, E. A.; D'Ambrosio, F. P.; Pravettoni, V.; Farioli, L.; Giuffrida, M. G.; Monza, M.; Ansaloni, R.; Fortunato, D.; Scibola, E.; Rivolta, F.; Incorvaia, C.; Bengtsson, A.; Conti, A.; Ortolani, C. *J Allergy Clin Immunol* 2000, 105, 371–377.
35. Pastorello, E. A.; Farioli, L.; Pravettoni, V.; Giuffrida, M. G.; Ortolani, C.; Fortunato, D.; Trambaioli, C.; Scibola, E.; Calamari, A. M.; Robino, A. M.; Conti, A. *J Chromatogr B* 2001, 756, 95–103.
36. Scheurer, S.; Pastorello, E. A.; Wangorsch, A.; Kastner, M.; Hausteiner, D.; Vieths, S. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107, 724–731.
37. Pelegrini, P. B.; Noronha, E. F.; Muniz, M. A. R.; Vasconcelos, I. M.; Chiarello, M. D.; Oliveira, J. T. A.; Franco, O. L. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1764, 1141–1146.
38. Mandal, S. M.; Dey, S.; Mandal, M.; Sarkar, S.; Maria-Neto, S.; Franco, L. O. *Peptides* 2009, 30, 633–637.
39. Stec, B. *Cell Mol Life Sci* 2006, 63, 1370–1385.
40. Berrocal-Lobo, M.; Molina, A.; Rodríguez-Palenzuela, P.; García-Olmedo F.; Rivas, L. *Exp Parasitol* 2009, 122, 247–249.
41. Cruz, L. P.; Ribeiro, S. F. F.; Carvalho, A. O.; Vasconcelos, I. M.; Rodrigues, R.; Da Cunha, M.; Gomes, V. M. *Protein Pept Lett* 2010, 17, 311–318.
42. Vila-Perelló, M.; Sánchez-Vallet, A.; García-Olmedo, F.; Molina, A.; Andreu, D. *FEBS Lett* 2003, 536, 215–219.
43. Thevissen, K.; Ghazi, A.; De Samblanx, G. W.; Brownlee, C.; Osborn, R. W.; Broekaert, W. F. *J Biol Chem* 1996, 271, 15018–15025.
44. Mello, E. O.; Ribeiro, S. F. F.; Carvalho, A. O.; Santos, I. S.; Da Cunha, M.; Santa-Catarina, C.; Gomes, V. M. *Curr Microbiol* 2011, 62, 1209–1217.
45. Giudici, M.; Poveda, J. A.; Molina, M. L.; De la Canal, L.; González-Ros, J. M.; Pfüller, K.; Pfüller, U.; Villalain, J. *FEBS J* 2006, 273, 72–83.
46. Hughes, P.; Dennis, E.; Whitecross, M.; Llewellyn, D.; Gage, P. *J Biol Chem* 2000, 275, 823–827.
47. Florack, D. E.; Stiekema, W. J. *Plant Mol Biol* 1994, 26, 25–37.
48. Evans, J. E.; Wang, Y.; Shaw, K. P.; Vernon, L. P. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86, 5849–5853.
49. Angerhofer, C. K.; Shier, W. T.; Vernon, L. P. *Toxicon* 1990, 28, 547–557.
50. Li, S. S.; Gullbo, J.; Lindholm, P.; Larsson, R.; Thunberg, E.; Samuelsson, G.; Bohlin, L.; Claeson, P. et al. *Biochem J* 2002, 366, 405–413.
51. Zottich, U.; Da Cunha, M.; Carvalho, A. O.; Dias, G. B.; Silva, N. C. M.; Santos, I. S.; Nascimento, V. V.; Miguel, E. C.; Machado, O. L. T.; Gomes, V. M. *Biochim Biophys Acta* 2011, 1810, 375–383.
52. Fjell, C. D.; Hiss, J. A.; Hancock, R. E.; Schneider, G. *Nat Rev Drug Discov* 2012, 11, 168.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species

Gabriel B. Taveira¹, André O. Carvalho¹, Rosana Rodrigues², Fernanda G. Trindade³, Maura Da Cunha³ and Valdirene M. Gomes^{1*}

Abstract

Background: Thionins are a family of plant antimicrobial peptides (AMPs), which participate in plant defense system against pathogens. Here we describe some aspects of the *Ca*Thi thionin-like action mechanism, previously isolated from *Capsicum annuum* fruits. Thionin-like peptide was submitted to antimicrobial activity assays against *Candida* species for IC₅₀ determination and synergism with fluconazole evaluation. Viability and plasma membrane permeabilization assays, induction of intracellular ROS production analysis and *Ca*Thi localization in yeast cells were also investigated.

Results: *Ca*Thi had strong antimicrobial activity against six tested pathogenic *Candida* species, with IC₅₀ ranging from 10 to 40 µg.mL⁻¹. *Ca*Thi antimicrobial activity on *Candida* species was candidacidal. Moreover, *Ca*Thi caused plasma membrane permeabilization in all yeasts tested and induces oxidative stresses only in *Candida tropicalis*. *Ca*Thi was intracellularly localized in *C. albicans* and *C. tropicalis*, however localized in nuclei in *C. tropicalis*, suggesting a possible nuclear target. *Ca*Thi performed synergistically with fluconazole inhibiting all tested yeasts, reaching 100 % inhibition in *C. parapsilosis*. The inhibiting concentrations for the synergic pair ranged from 1.3 to 4.0 times below *Ca*Thi IC₅₀ and from zero to 2.0 times below fluconazole IC₅₀.

Conclusion: The results reported herein may ultimately contribute to future efforts aiming to employ this plant-derived AMP as a new therapeutic substance against yeasts.

Keywords: Antimicrobial peptides, Thionin, Synergistic activity, Fluconazole, *Candida*

Background

Currently, a significant global public health threat is the emergence of pathogenic bacteria, fungi, and yeasts that are resistant to multiple antimicrobial agents. Indeed, few or no effective chemotherapies are available for infections caused by some of these resistant microorganisms [1, 2].

Alternatives to chemotherapies include antimicrobial peptides (AMPs), small molecules produced by all living organisms, which have gained considerable attention

because of their potent antimicrobial activity against a broad range of microbes, including viruses, bacteria, protozoa, and fungi [3, 4]. Moreover, some kill microorganisms rapidly, are able to synergize with other AMPs and clinical antibiotics, have low toxicity to mammalian cells, and exert their microbial inhibitory activity at low concentrations. These molecules have multiple targets in the plasma membrane and also in intracellular components, which is thought to make an increase in microbial resistance more difficult [2, 5].

Promising AMPs include plant-derived thionins, a family of basic, low molecular weight (~5 kDa), cysteine-rich peptides. Various family members have high sequence similarity and structure [6–8]. Many of them

* Correspondence: valmg@uef.br

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes 28013-602, RJ, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



are toxic against yeasts, pathogenic fungi, Gram-positive and Gram-negative bacteria, protozoa, and insects [7–10]. Like other AMPs, thionins' antimicrobial activity relies on their interaction with phospholipids to cause membrane instability [10].

Infections caused by *Candida* species have increased substantially over the last 30 years due to the rise of AIDS, ageing population, numbers of immunocompromised patients and the extensive use of indwelling prosthetic devices [1, 11]. *Candida albicans* is the main cause of candidiasis, however, other *Candida* species such as *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, and *C. glabrata* are now frequently identified as human pathogens [11–13]. Antifungals, especially fluconazole (FLC), have been used with some success for the treatment of *Candida* infections; however, there are numerous reports on the emergence of strains resistant to azoles that overexpress multidrug efflux transporters [14, 15].

In a previous report [8], our research team isolated a plant-derived thionin, named *CaThi*, with strong antimicrobial activity against two pathogenic *Candida* species, as well as *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. FLC in combination with AMPs resulting in promising therapeutic results against important human pathogens, such as *C. albicans* and *Cryptococcus neoformans*, has been demonstrated [16, 17]. In this work we investigated whether the AMP *CaThi* could act synergistically with FLC. This synergistic strategy could result in a more efficient response against six *Candida* strains of clinical importance, avoiding the cytotoxic effects commonly exhibited by thionins against mammalian cells [10] by using low concentrations of this AMP. We were also interested in understanding the mechanism by which plant-derived thionins affect *Candida* species, which remains partially unknown [10]. These questions are addressed in the present study.

The results reported herein may ultimately contribute to future efforts aiming to develop this plant-derived AMP as a new therapeutic substance against these pathogenic *Candida* species as well as other yeast infections.

Results

Determination of IC₅₀ for *CaThi* and FLC

Initially we performed growth inhibition assays of six *Candida* species using different concentrations of FLC and thionin *CaThi* to determine the IC₅₀ of these substances. The lowest IC₅₀ for FLC was found for *C. buinensis* (0.125 µg.mL⁻¹) and the highest for *C. pelliculosa* (5 µg.mL⁻¹). In the case of *CaThi*, 10 µg.mL⁻¹ was sufficient to cause 50 % inhibition of growth of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, and *C. buinensis* but 40 µg.mL⁻¹ was necessary to achieve IC₅₀ for *C. pelliculosa*. Thus, higher concentrations of both FLC and *CaThi* were needed to affect the growth of *C. pelliculosa*.

Moreover, although the antimicrobial activity of *CaThi* against *Candida* species is indeed relevant, our data showed it to be lower than that observed for FLC (Table 1).

Viability assay

CaThi induced viability loss in all yeasts cells tested (Fig. 1a). The most susceptible species to *CaThi* were *C. buinensis*, *C. parapsilosis* and *C. albicans* with 99.2, 98.9 and 80.3 % of viability loss, respectively, and the less susceptible was *C. tropicalis* with 47.9 % of viability loss (Fig. 1b). These results indicated that inhibitory effect of *CaThi* was candidicidal.

Plasma membrane permeabilization

Candida species cells were tested to determine the membrane permeabilization by Sytox green dye. All yeasts showed Sytox green fluorescence when grown for 24 h in the presence of *CaThi* IC₅₀. As with other AMPs, it is likely that *CaThi* acts on the plasma membrane of these *Candida* species, compromising it structurally and allowing the permeabilization of the labeling dye (Fig. 2). The membrane permeabilization percentage of the treated yeasts with *CaThi* was assessed (Table 2). A higher number of *C. albicans* and *C. pelliculosa* cells presented higher Sytox green fluorescence percentage, suggesting that *CaThi* is more effective at permeabilizing the membrane of these cells than the other *Candida* species analyzed.

ROS induction assay

Endogenous production of ROS was analyzed by incubating the yeasts for 24 h with *CaThi* IC₅₀. Increased ROS production was observed only in *C. tropicalis* (Fig. 3), suggesting that a *CaThi*-induced increase in oxidative stress may underlie the growth inhibitory effect on this yeast. Nevertheless, oxidative stresses were not detected for other *Candida* species, implicating that we could not associate the *CaThi* role and ROS production with growth inhibition of *Candida*, at least for the concentrations tested.

Table 1 IC₅₀^a (µg.mL⁻¹) of fluconazole and *CaThi* in different species of *Candida* respectively

Yeasts	Fluconazole	<i>CaThi</i>
<i>Candida albicans</i> (CE022)	1.0	10.0
<i>Candida tropicalis</i> (CE017)	1.0	10.0
<i>Candida parapsilosis</i> (CE002)	0.5	10.0
<i>Candida pelliculosa</i> (3974)	5.0	40.0
<i>Candida buinensis</i> (3982)	0.125	10.0
<i>Candida mogii</i> (4674)	2.5	20.0

^a represents the concentration of a drug that is required for 50 % inhibition *in vitro*

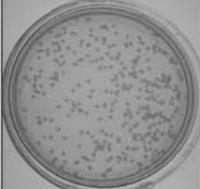
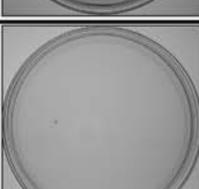
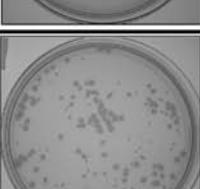
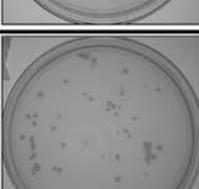
	A		B		
	Control	CaThi	Sample	CFU*	Viability loss (%)
<i>C. albicans</i>			control	395.3±20.7	0
			CaThi	77.6±3.7	80.3
<i>C. tropicalis</i>			control	344.3±28.9	0
			CaThi	179.3±5.5	47.9
<i>C. parapsilosis</i>			control	190.6±9.9	0
			CaThi	2.0±2.1	98.9
<i>C. pelliculosa</i>			control	439.3±33.3	0
			CaThi	130.3±9.2	70.2
<i>C. butinensis</i>			control	131.6±8.9	0
			CaThi	1.0±0.8	99.2
<i>C. mogii</i>			control	158.3±18.4	0
			CaThi	61.3±4.4	61.6

Fig. 1 Cell viability loss. **a** Photographs of the Petri dishes showing the viability of yeasts cells after the treatment with IC₅₀ CaThi for 24 h. **b** The table shows the percentage of viability loss of yeasts cells after the treatment with IC₅₀ CaThi for 24 h. CFU = Colony forming unit. (*) Indicates significance by the T test ($P < 0.05$) among the experiments and their respective controls. The experiments were carried out in triplicate

Localization of CaThi in yeast cells

We also investigated whether CaThi was actually internalized in *C. albicans* and *C. tropicalis* cells. These yeasts were chosen because they are known to be the most opportunistic pathogens among *Candida* species. Another important point is that *C. tropicalis* was the only yeast that presented membrane permeabilization and induction of ROS by CaThi in this work. To perform the test, we used 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of

FITC-tagged CaThi to search for intracellular signal fluorescence. We also treated the cells with DAPI for nuclei labeling. Intracellular signal fluorescence of CaThi-FITC was observed in both of these *Candida* species. However, while CaThi-FITC labeling of *C. tropicalis* produced a specific and intense spot of fluorescence inside the cells, *C. albicans* cells showed a more diffuse fluorescence. Overlapping of these CaThi-FITC images with DAPI nuclei labeling

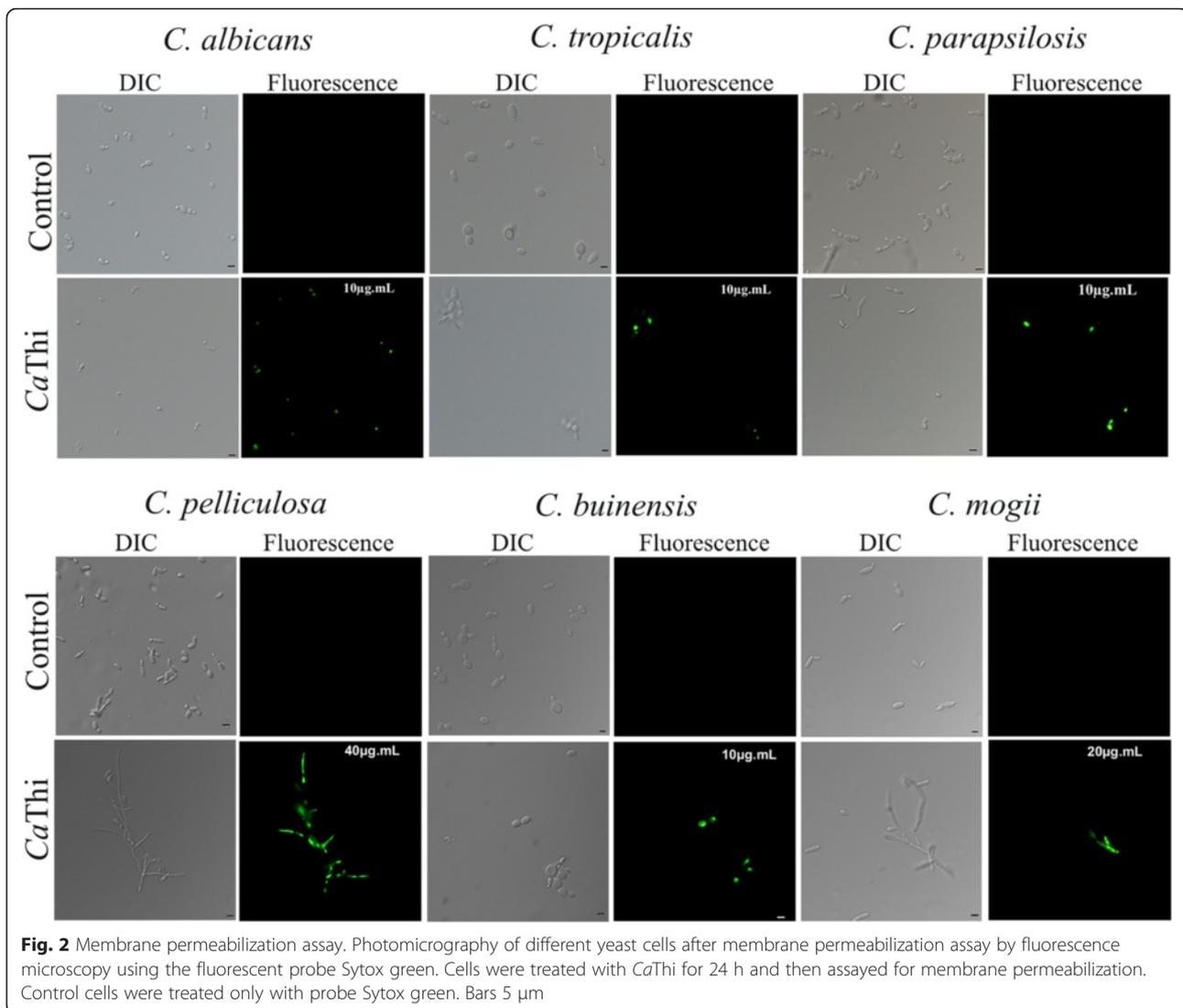


Fig. 2 Membrane permeabilization assay. Photomicrography of different yeast cells after membrane permeabilization assay by fluorescence microscopy using the fluorescent probe Sytox green. Cells were treated with *CaThi* for 24 h and then assayed for membrane permeabilization. Control cells were treated only with probe Sytox green. Bars 5 µm

indicated a co-localization of these fluorescent signals in *C. tropicalis* but not in *C. albicans* cells (Fig. 4). These data suggest that, at least for *C. tropicalis*, *CaThi* may have an intracellular target, possibly located in the nucleus.

Synergism assay

Given the increase in *Candida* infections, particularly among immunocompromised patients, searches for antifungal therapeutic alternatives are warranted. This concern and the aforementioned data prompted us to investigate whether FLC and *CaThi* could act synergistically to improve therapeutic results against *Candida* species. The combination of FLC and *CaThi* showed an increase in inhibitory activity of all of the *Candida* species tested, suggestive of synergistic activity (Table 3). Interestingly, although *C. pelliculosa* had the highest IC_{50} for both substances, when we combined FLC at one-fold

below its IC_{50} and *CaThi* at threefold below its IC_{50} , we observed 57 % increase in growth inhibition of this yeast. Similarly, in *C. parapsilosis* cells, when IC_{50} FLC was combined with *CaThi* threefold below its IC_{50} , we obtained 100 % growth inhibition of this yeast. Combined use of FLC and *CaThi* also strongly inhibited (96 %) *C. tropicalis*, although when used separately the inhibition achieved with these substances did not reach 12 %. Taken together, these data suggest that in combination FLC and *CaThi* could have an important synergistic action resulting in very effective control of *Candida* species.

Morphological alterations of *CaThi* and FLC plus *CaThi* on yeast growth

Investigation regarding the possible morphological alterations in yeast cells grown in the presence of FLC, *CaThi*, or a combination of both substances after the inhibition assays (Fig. 5a) was performed. Optical

Table 2 Fluorescent cell percentage of yeasts treated with CaThi^a

Yeasts species	Sample	Cell number viewed in DIC	Cell number viewed in fluorescence	% of fluorescence cells ^b
<i>C. albicans</i>	control	62.0 ± 9.3	0.6 ± 0.8	0.9
	CaThi	20.0 ± 5.0	16.6 ± 5.3	83.0
<i>C. tropicalis</i>	control	41.2 ± 4.2	0.8 ± 1.3	1.9
	CaThi	9.8 ± 4.9	4.8 ± 4.6	48.9
<i>C. parapsilosis</i>	control	79.2 ± 12.1	0	0
	CaThi	18.2 ± 5.4	6.2 ± 1.4	34.0
<i>C. pelliculosa</i>	control	23.8 ± 3.5	0	0
	CaThi	7.2 ± 1.9	6.6 ± 2.3	91.6
<i>C. buinensis</i>	control	43.6 ± 9.0	0.8 ± 1.3	1.8
	CaThi	13.6 ± 6.2	6.2 ± 1.3	45.5
<i>C. mogii</i>	control	18.6 ± 3.2	0.6 ± 0.8	3.2
	CaThi	8.6 ± 2.0	4.4 ± 2.7	51.1

^aCells number determination in five random fields of the DIC and fluorescence views of the samples obtained from Plasma membrane permeabilization assay. The total cell number in DIC of each yeast (in control and test) was assumed as 100 %

^bIndicates significance by the *T* test ($P < 0.05$) among the experiments and their respective controls

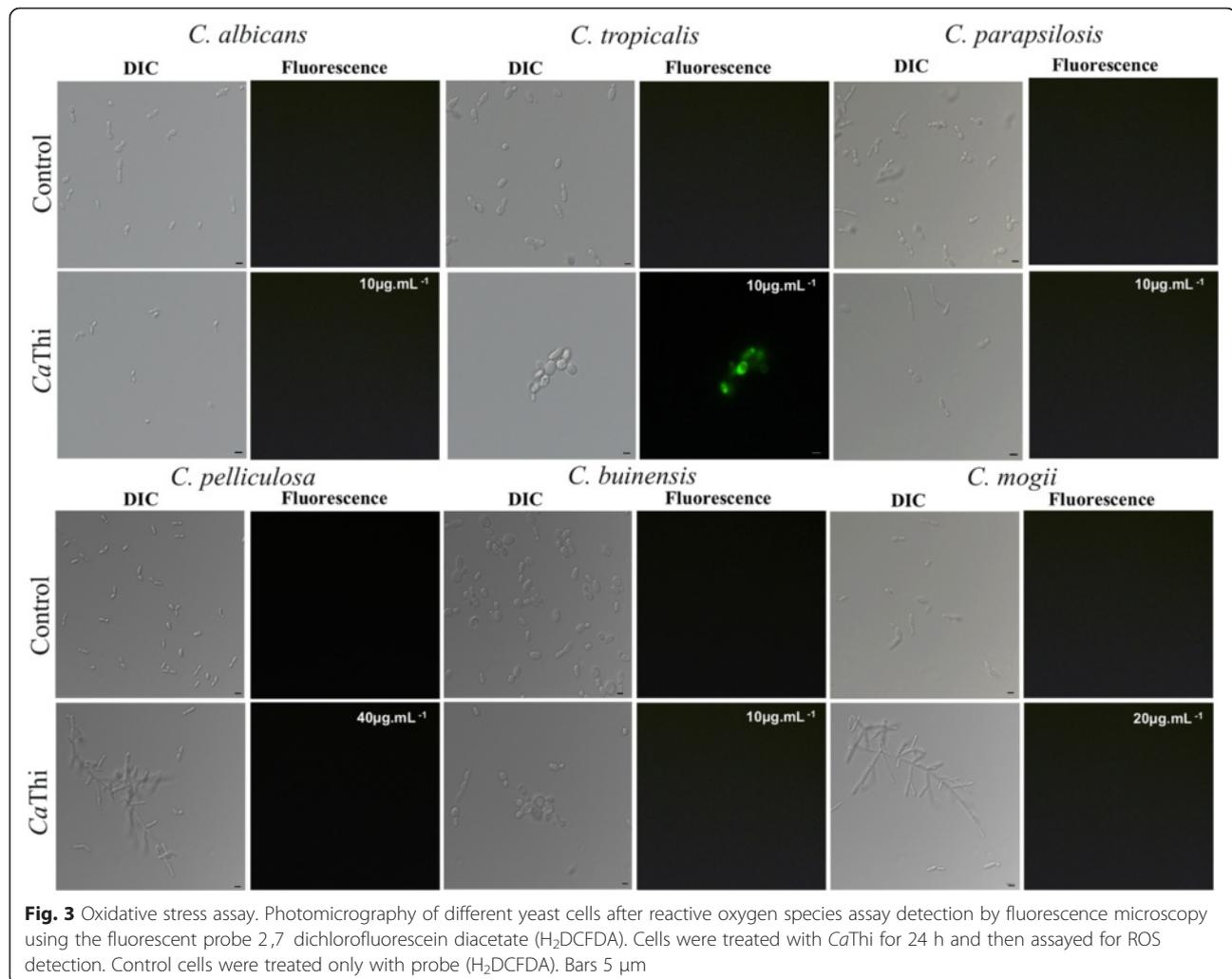


Fig. 3 Oxidative stress assay. Photomicrography of different yeast cells after reactive oxygen species assay detection by fluorescence microscopy using the fluorescent probe 2,7 dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA). Cells were treated with CaThi for 24 h and then assayed for ROS detection. Control cells were treated only with probe (H₂DCFDA). Bars 5 µm

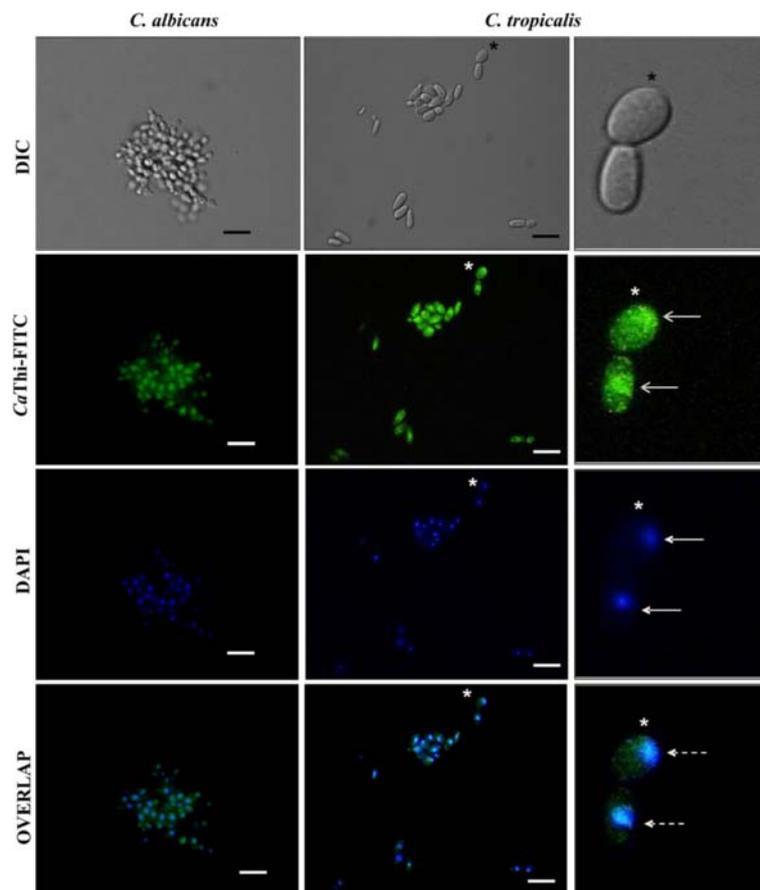


Fig. 4 Localization of *CaThi* in yeast cells. Photomicrography of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* cells incubated for 24 h with $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *CaThi*-FITC (green fluorescence, open arrows) by fluorescence microscopy. Nuclei were visualized by 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) after the *CaThi*-FITC incubation period (blue fluorescence, filled arrows). Overlap of the DAPI and FITC images (dotted arrows). Bars $20 \mu\text{m}$. (*) Indicates the position of digital enlargement

Table 3 Inhibition percentage of yeast species treated with *CaThi* and FLC alone and in combination showing synergism effect *in vitro*

Yeasts species	Sample	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ^a	Inhibition (%)	Combination inhibition (%) (<i>CaThi</i> + FLC) ^b
<i>C. albicans</i>	<i>CaThi</i>	3.5	2.93	77.5
	FLC	0.5	24.48	
<i>C. tropicalis</i>	<i>CaThi</i>	3.5	0	96.26
	FLC	0.5	11.55	
<i>C. parapsilosis</i>	<i>CaThi</i>	3.5	4.0	100.0
	FLC	0.5	50	
<i>C. pelliculosa</i>	<i>CaThi</i>	15.0	2.63	57.45
	FLC	2.5	7.8	
<i>C. buinensis</i>	<i>CaThi</i>	5.0	19.0	67.01
	FLC	0.06	5.45	
<i>C. mogii</i>	<i>CaThi</i>	10.0	17.19	61.05
	FLC	1.0	22.80	

^a*CaThi* concentrations ranging 1.3 to 4.0 times below its IC_{50} and FLC concentrations 2.0 times below its IC_{50} or at its IC_{50}

^bIndicates significance by the ANOVA test ($P < 0.05$) which were calculated by the absorbance values of synergism among the experiments and their respective controls

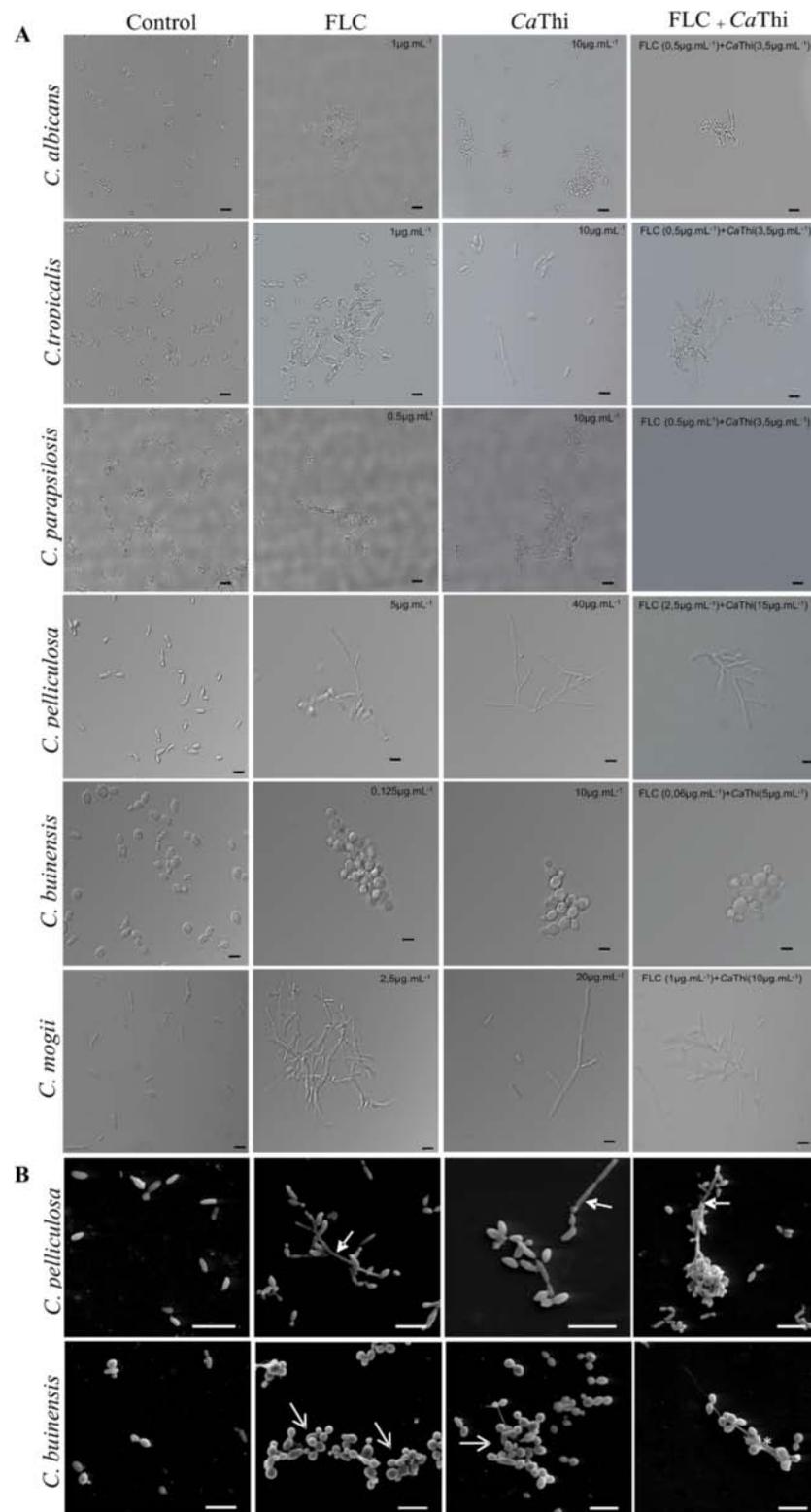


Fig. 5 Effect of CaThi, FLC, and CaThi plus FLC on yeast growth. **a** Photomicrography of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida buinensis*, and *Candida mogii* cells by light microscopy after the growth inhibition assay. Bars 5 μm . **b** Scanning electron microscopy of *Candida pelliculosa* and *Candida buinensis*. Filled arrow (formation of pseudohyphae); open arrow (cell agglomeration); asterisk (amorphous material). Bars 10 μm . Cells grown in the presence of Fluconazole (FLC), CaThi, and FLC plus CaThi

microscopy analysis revealed that FLC, CaThi, and the combined treatment caused changes in the morphology of cells of *Candida* species. *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, and *C. mogii* exhibited an apparent difficulty in releasing buds thus leading to the formation of pseudohyphae when grown in the presence of CaThi. Moreover, in the presence of either substance, *C. tropicalis* cells presented hyper branching of pseudohyphae. For *C. albicans* and *C. buinensis*, an intense cellular agglomeration in all treatments was observed. Further, the combination of CaThi and FLC caused a shrunken appearance in *C. albicans* cells.

Scanning Electronic Microscopy (SEM) of *C. pelliculosa* reinforces the optical microscopy observations, corresponding to intense cell agglomeration and pseudohyphae formation in all treatments. For *C. buinensis*, all treatments showed intense cellular agglomeration and apparent difficulty in bud release, but not in the formation of pseudohyphae. For this yeast an amorphous material among cells in all treatments was also observed (Fig. 5b). These results show that CaThi is capable of causing morphological changes similar to FLC, an azole antifungal agent, commonly used in treatment of infections caused by *Candida* species. Importantly, we were able to demonstrate that the combination of these substances potentiates the therapeutic effects against these opportunistic species of *Candida*.

Discussion

Plant-derived thionins exhibit toxic effects against a wide range of plant pathogens including bacteria and fungi [18–21]. However, there is a gap regarding the mode of action of plant-derived thionins against human pathogens. Prompted by the considerable increase in the incidence of human infections by *Candida* species, we investigated the potential of CaThi, a plant-derived thionin peptide, as a novel therapeutic drug against six *Candida* strains of clinical interest: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. buinensis*, and *C. mogii*.

The growth inhibition assay was not done with RPMI 1640 medium, which is generally indicated by Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines, because it has in its composition a large amount of inorganic salts and it is well known in the literature that the presence of salts, such as sodium chloride and magnesium sulfate, can decrease the inhibitory activity of antimicrobial peptides since it is necessary electrostatic approximation of the peptide with the membrane of microorganisms and the presence of salts disrupts this initial interaction [22–24]. Therefore, as explained above, our growth inhibition assay was done with Sabouraud broth which is a common used medium to growth of fungi, including *Candida albicans*.

Our growth inhibition assays of the six *Candida* species tested revealed that $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was IC_{50} for CaThi to inhibit the growth of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, and *C. buinensis* but $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was necessary to achieve IC_{50} for *C. pelliculosa* (Table 1), and this inhibitory effect was candidacidal inducing viability loss in all yeast cells tested (Fig. 1). Thi 2.1, a thionin from *Arabidopsis thaliana*, achieved 80 % inhibition of *C. albicans* with $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [25]. Although Thi 2.1 showed stronger antimicrobial activity against *C. albicans* than CaThi, these authors did not test it against non-*albicans* species. Thus, whether this thionin would affect other species with similar strength remains unknown.

Sytox green is a dye that only penetrates cells when the plasma membrane is structurally compromised. All yeast species tested showed Sytox green fluorescence (Fig. 2), however CaThi was more effective in plasma membrane permeabilization in *C. albicans* and *C. pelliculosa* (Table 2). Antimicrobial activity against the fungus *Neurospora crassa* by α -Hodothionin, isolated from barley seeds, also occurs via a mechanism involving membrane permeabilization, resulting in the inward flux of Ca^{2+} and K^{+} efflux and consequent potential membrane collapse [26]. Another plant-derived thionin isolated from *Viscum album*, named VtA₃, interacts with the plasma membrane of the fungus *Fusarium solani*, causing its permeabilization and thus inhibiting the growth of this microorganism [27]. Indeed, several studies suggest that most of the biological effects of thionins result from the interaction of these peptides with the target cell membrane. Three mechanisms have been proposed: formation of an ion-selective channel; formation of patches or carpets of peptides; and loss of membrane phospholipids [10].

AMPs have been demonstrated to play a direct role in membrane permeabilization, causing a loss of membrane potential [28]. As cells depend on membrane potential to fulfill their physiological functions, its restoration is mandatory and demands cellular energy. One possible consequence of this process is ROS generation by activated mitochondria [29]. Therefore, we analyzed whether this primary membrane-permeabilizing event in *Candida* species induced by CaThi was followed by oxidative stress. Interestingly, CaThi only induced production of ROS in *C. tropicalis* (Fig. 3). We speculate that CaThi binds to a specific domain of the *C. tropicalis* membrane, which triggers the increase in oxidative stress response through ROS production. However, further studies are needed to establish this. Reports show that increase in ROS production by the target organisms is a recurring mode of action employed by thionins and other AMPs [27, 30, 31]. Indeed, increased death of the fungus *Fusarium solani* subjected to VtA₃ was connected with boosted ROS production by these organisms

[27]. More recently, a peptide similar to thionin isolated from the beetle *Psacotheta hilaris* also provoked an increase in the levels of endogenous ROS in *C. albicans* [32]. Our study is the first to report an increase in ROS production by a plant-derived thionin as an antimicrobial mechanism against a human pathogen, *C. tropicalis*. Therefore, *CaThi* seems to employ a sophisticated mechanism to inhibit the growth of this opportunistic yeast involving not only membrane permeabilization but also induction of oxidative stress response.

Some AMPs are able to enter the cell, after the initial cell membrane interaction [33, 34]. Accordingly, the next experiments were designed to analyze whether *CaThi* was able to actively enter *C. albicans* and *C. tropicalis*. In the approach used, FITC-tagged *CaThi* was monitored by fluorescence microscopy. Because *CaThi* entered *C. albicans* and *C. tropicalis* cells, we suggest that a possible intracellular target for this thionin might be part of a complex mechanism responsible for the death of *Candida* species. FITC-tagged *CaThi* overlapped with DAPI staining, indicating that, in *C. tropicalis*, this target is nuclear (Fig. 4). Giudici et al. [27] showed that VtA₃ entered and accumulated in the fungus *F. solani*. These authors also demonstrated that this entry was related to the sphingolipid composition of the plasma membrane of this fungus. Our study is the first to show that a plant-derived thionin (*CaThi*) is able to enter human pathogens (*C. albicans* and *C. tropicalis*) and to suggest an intracellular target for it. Our work opens new perspectives regarding the antimicrobial mechanism of plant-derived thionins as it suggests that these peptides' toxicity may not be restricted to the plasma membrane.

The real mode of action of AMPs has not been fully elucidated, but much of the described AMPs to date target the plasma membrane of microorganisms causing pore formation and leading to imbalance in cellular homeostasis [33, 35]. However, some studies showed that not only is permeabilization the cause of a particular microorganism death, as they may have multiple targets [36] after the interaction with the membrane causing, for example, ROS induction [31, 37]; inhibition of protein synthesis [38, 39]; inhibition of mitochondrial activity [40, 41], and also may trigger signaling cascades that lead to apoptosis [42, 43]. Thus it is difficult to identify the most important factor for the candidicidal effect of *CaThi* and is technically challenging to characterize the steps leading up to cell death, however evidence supports that all events described in the manuscript may have a crucial role in the death of the tested yeasts.

The continuous emergence of resistance of fungal strains to conventional antibiotics and antifungals,

especially *Candida* species, has become an important medical issue and has spurred the demand for new therapeutic alternatives. This concern prompted us to investigate whether FLC and *CaThi* could act synergistically to improve therapeutic results against *Candida* species. Here we show that the combination of these two substances was effective against all *Candida* species tested (Table 3), causing drastic morphological changes in these cells (Fig. 5). Interestingly, we show that the inhibitory effect of this combination was more effective for *C. albicans*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis*, which are the major yeast species recovered from infections in immunocompromised patients [13]. The azoles mode of action occurs by inhibition of the enzyme lanosterol 14 α -demethylase, blocking ergosterol incorporation and leading to the accumulation of intermediate sterols. These intermediate sterols do not have the same configuration and physical properties of ergosterol, therefore they cause the plasma membrane to form with altered properties, changing in fluidity, permeability and impairing nutrient uptake, which ultimately lead to cell toxicity [44, 45]. In regard to the synergistic effect of FLC and *CaThi*, we hypothesize that permeabilization is firstly caused by *CaThi* (Fig. 2) facilitating the entrance of FLC into the cell cytoplasm, triggering structural alterations in the plasma membrane which feedback positively to the entrance of more *CaThi* and FLC. This entrance creates potential for toxic effects, which were experimentally observed in the lower IC₅₀ used for both substances in the combinatory treatment (Table 3). Additionally, secondary toxicity effects were demonstrated, such as the induction of ROS to *C. tropicalis*, the *CaThi* presence in *C. albicans* cell cytoplasm and in *C. tropicalis* nuclei. These localizations suggest that *CaThi* may have cytoplasmic targets, where interference could consolidate the inhibitory effect. However, more studies are necessary to clearly unravel the antimicrobial mechanism of *CaThi* against *Candida* species as well as the mechanism of synergy between *CaThi* and FLC.

Conclusions

Investigating a plant-derived thionin mode of action against opportunistic human pathogenic yeasts is relevant and advisable, whereas most studies involving plant-derived thionins focus their effects against plant pathogenic microorganisms as experimental models. In this report, we demonstrated that *CaThi* has strong candidicidal activity against six pathogenic *Candida* species, and it works by permeabilizing the membrane and inducing oxidative stress response in these yeasts. Additionally, we present evidence to suggest a nuclear intracellular target for *CaThi*. Finally, our results show that FLC and *CaThi* combined causes dramatic morphological changes in these yeasts, effective against all

Candida species tested. The combined treatment of *Ca*Thi and FLC is a strong candidate for clinical studies aiming to improve therapeutic results against resistant strains of *Candida* species. Studies involving drug combinations should be reinforced due to the possibility of synergistic effects that increase the toxic effect of the drugs combined when compared to monotherapy. Moreover, drug combinations can broaden the spectrum of antimicrobial activity, minimizing resistant microorganisms selection, increasing security and tolerance using lower drugs doses.

Methods

Biological materials

Capsicum annuum L. fruits (accession UENF1381) were provided by *Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal*, from *Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias*, *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro* (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil.

The yeasts *Candida albicans* (CE022), *Candida tropicalis* (CE017), and *Candida parapsilosis* (CE002) were obtained from *Departamento de Biologia*, *Universidade Federal do Ceará*, Fortaleza, Brazil. The yeasts *Candida pelliculosa* (3974), *Candida buinensis* (3982), and *Candida mogii* (4674) were obtained from *Micoteca URM* from *Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, Pernambuco, Brazil. Yeasts were maintained on Sabouraud agar (1 % peptone, 2 % glucose, and 1.7 % agar-agar) (Merck) in the *Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos*, from *Centro de Biociência e Biotecnologia*, UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil.

*Ca*Thi

Extraction and purification of the thionin *Ca*Thi from *Capsicum annuum* fruits by chromatographic methods were performed as described by Taveira et al. [8]. The retention time to recover the thionin *Ca*Thi during the reversed-phase chromatography in column μ RPC C2/C18 (ST 4.6/100) (GE Healthcare) was 37.87 min.

Preparation of yeast cells and determination of IC_{50} for *Ca*Thi and fluconazole

For the preparation of yeast cell cultures, an inoculum from each stock of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida buinensis*, and *Candida mogii* was transferred to Petri dishes containing Sabouraud agar and allowed to grow at 30 °C for 48 h. After this time, each cell aliquot was added to 10 mL sterile culture medium (Sabouraud broth, Merck). The cells were quantified in a Neubauer chamber (Optik Labor) with the aid of an optical microscope (Axiovision 4, Zeiss). The assay for checking the

growth inhibition of yeast cells was performed according to Broekaert et al. [46] with modifications. Initially yeast cells (1×10^4 cells mL⁻¹) were incubated in Sabouraud broth containing *Ca*Thi at concentrations ranging from 100 μ g.mL⁻¹ to 1 μ g.mL⁻¹ and fluconazole (FLC) at concentrations ranging from 20 μ g.mL⁻¹ to 0.125 μ g.mL⁻¹, with the final volume adjusted to 200 μ L. The assay was performed in 96-well microplates (Nunc) at 30 °C for 24 h. Optical readings at 620 nm were recorded at zero hour and every 6 h interval for 24 h. Control cells were grown in the absence of *Ca*Thi and FLC. The optical densities were plotted against the concentration of *Ca*Thi and FLC, and then the concentration of the drug (*Ca*Thi and FLC) required for 50 % inhibition (IC_{50}) *in vitro* of the tested yeasts was determined. Experiments were performed in triplicate.

Viability assay

To assay the effect of *Ca*Thi on the cell viability of yeasts, 1×10^4 cells mL⁻¹ in Sabouraud broth culture medium and at the corresponding IC_{50} of *Ca*Thi values for each yeast were incubated at 30 °C for 24 h in 96-well microplates (Nunc). To determine the control viability, the control cells (without *Ca*Thi) were washed once and diluted 1,000-fold in Sabouraud broth culture medium, and an aliquot of 100 μ L from this dilution was spread over the surface of a Sabouraud agar medium (contained in a Petri dish) with a Drigalski loop and grown at 30 °C for 48 h. At the end of this period, colonies forming units (CFU) were determined for each yeast species, and the Petri dishes were photographed. The same procedure was followed with yeasts treated with *Ca*Thi. The experiments were carried out in triplicate, and the results are shown assuming that the control represents 100 % viability. Calculations of the standard deviation and *T* test were performed with Prism software (version 5.0).

Plasma membrane permeabilization assay

The plasma membrane permeabilization of yeast cells was measured by Sytox green uptake, according to the methodology described by Thevissen et al. [47], with some modifications. Each of the different species of yeasts was incubated with *Ca*Thi at the concentration required to inhibit 50 % growth (IC_{50}) of the respective yeast cells for 24 h. After this time, a 100 μ L aliquot of each yeast cell suspension was incubated with 0.2 μ M of Sytox green in 1.5 mL microcentrifuge tubes for 30 min at 25 °C with constant agitation. Cells were analyzed by DIC optical microscope (Axiovision 4, Zeiss) equipped with a fluorescent filter set for detection of the fluorescein (excitation wavelength, 450–490 nm, emission wavelength 500 nm). To indicate membrane permeabilization, the percentage of fluorescent cells was determined by counting the DIC and fluorescent views

for each yeast ($n = 5$). The total cell number in DIC view of each yeast (in control and test) was assumed as 100 %. The experiments were carried out in triplicate. Calculations of T test were performed with Prism software (version 5.0).

Determining the induction of intracellular ROS in yeast cells

To evaluate whether the mechanism of action of *Ca*Thi involves induction of oxidative stress, the fluorescent probe 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA) was used to measure intracellular reactive oxygen species (ROS) according to the methodology described by Mello et al. [31]. Each of the different species of yeasts was incubated with the respective IC_{50} for *Ca*Thi in 96-well microplates for 24 h at 30 °C; after this incubation an aliquot of 50 μ L of each of yeast cell suspension was incubated with 200 μ M of H_2DCFDA in microcentrifuge tubes of 1.5 mL for 1 h at 25 °C with constant agitation at 500 rpm. Cells were analyzed by DIC optical microscope (Axiovision 4, Zeiss) equipped with a fluorescent filter set for detection of the fluorescein (excitation wavelength, 450–490 nm, emission wavelength 500 nm). The experiments were carried out in triplicate.

*Ca*Thi conjugated to FITC localization for optical microscopy

*Ca*Thi at 100 μ g was resuspended in 100 μ L of 750 mM sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer, pH 9.5 containing FITC at 50 μ g.mL⁻¹ (previously solubilized in DMSO). This solution was incubated with constant agitation at 500 rpm for 2 h at 30 °C. After this incubation, the sample was submitted to gel filtration chromatography on Sephadex G25 column (Sigma) for elimination of free FITC and recovery *Ca*Thi-FITC. The column was equilibrated and run with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 at flow rate of 0.3 mL.min⁻¹. After coupling, 10 μ g.mL⁻¹ of *Ca*Thi-FITC was incubated with cells of *C. albicans* and *C. tropicalis* for 24 h in 96-well microplates. After this time an aliquot of each cell suspension was removed and incubated with 50 μ g.mL⁻¹ of 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) for 10 min for nuclei stain. Cells were analyzed by DIC optical microscope (Axiovision 4, Zeiss) equipped with a fluorescent filter set for detection of the fluorescein (excitation wavelength, 450–490 nm, emission wavelength 500 nm). The entire assay was performed protected from light.

Synergism assay

To verify the synergistic activities, we combined FLC with *Ca*Thi. Initially yeast cells (1×10^4 cells mL⁻¹) were incubated in Sabouraud broth containing an IC_{50}

concentration or less than that for FLC and *Ca*Thi concentrations ranging from 1.3 to 4.0 times below the IC_{50} for the respective yeast and the final volume adjusted to 200 μ L *in vitro*. The assay was performed in 96-well microplates (Nunc) at 30 °C for 24 h. Optical readings at 620 nm were taken at zero hour and every 6 h for the following 24 h. Control cells were: 1) grown in the absence of *Ca*Thi and FLC; 2) grown in the presence of FLC; 3) grown in the presence of *Ca*Thi. The synergistic activity was deduced comparing optical densities of each control and combined drugs (FLC plus *Ca*Thi) considering each yeast strain tested. We define synergism as the combination action of the AMP with other substance that causes an enhanced decrease in the growth of the microorganism, compared with the growth inhibition of the single substances. After synergism, assay cells (controls and tests) were analyzed by DIC optical microscope (Axiovision 4, Zeiss). The data were obtained from experiments performed in triplicate. The data were evaluated using a one-way ANOVA. Mean differences at $p < 0.05$ were considered to be significant. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (version 5.0 for Windows).

Scanning electron microscopy

C. pelliculosa and *C. buinensis* cells were submitted to scanning electron microscopy (SEM) analysis. Yeast cells were grown for 24 h in Sabouraud broth in the presence of FLC (5 μ g.mL⁻¹ and 0.125 μ g.mL⁻¹, respectively), *Ca*Thi (40 μ g.mL⁻¹ and 10 μ g.mL⁻¹, respectively), and FLC plus *Ca*Thi (2.5 μ g.mL⁻¹ + 15 μ g.mL⁻¹, 0.06 μ g.mL⁻¹ + 5 μ g.mL⁻¹, respectively) or absence of these drugs, then were fixed for 30 min at 30 °C in a solution containing 2.5 % glutaraldehyde and 4.0 % formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.0. Subsequently, the cells were rinsed three times in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.0; post-fixed for 30 min at 30 °C with 1.0 % osmium tetroxide diluted in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.0; and rinsed again with this same buffer. The yeast cells were gradually dehydrated in alcohol solution (15, 30, 50, 70 to 90 % and finally 100 % alcohol), critical point dried in CO₂, covered with 20 nm gold and observed in a DSEM 962 Zeiss SEM.

Abbreviations

AMP: Antimicrobial peptide; FLC: Fluconazole; ROS: Reactive oxygen species; *Ca*Thi: *Capsicum annuum* Thionin; DIC: Differential interference contrast; FITC: Fluorescein isothiocyanate; SEM: Scanning Electron Microscopy.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: GBT, AOC, RR, FGT, MC and VMG. Performed the experiments: GBT and FGT. Analyzed the data: GBT, AOC, FGT, MC and VMG. Contributed reagents/materials/analysis tools: AOC, RR, MC

and VMG. Wrote the paper: GBT, AOC and VMG. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study forms part of the DSC degree thesis of GBT, carried out at the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. We acknowledge the financial support of the Brazilian agencies CNPq, FAPERJ, and CAPES through the CAPES/Toxinology project. We wish to thank L.C.D. Souza and V.M. Kokis for technical assistance.

Author details

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Centro de Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes 28013-602, RJ, Brazil. ²Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes 28013-602, RJ, Brazil. ³Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes 28013-602, RJ, Brazil.

Received: 8 July 2015 Accepted: 14 January 2016

References

- Pappas PG. The role of azoles in the treatment of invasive mycoses: review of the Infectious Diseases Society of America guidelines. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24 Suppl 2:S1–S13.
- Avent ML, Rogers BA, Cheng AC, Paterson DL. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. *Intern Med J.* 2001;41:441–9.
- Zaslouff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002;415:389–95.
- Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunol.* 2010;135:1–11.
- Carvalho AO, Gomes VM. Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Curr Pharm Des.* 2011;17(38):4270–93.
- Castro MS, Fontes W. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett.* 2005;12(1):13–8.
- Kido EA, Pandolfi V, Houllou-Kido LM, Andrade PP, Marcelino FC, Nepomuceno AL, et al. Plant Antimicrobial Peptides: An overview of superSAGE transcriptional profile and a functional review. *Curr Protein Pept Sci.* 2010;11:220–30.
- Taveira GB, Mathias LS, Vieira-da-Motta O, Machado OLT, Rodrigues R, Carvalho AO, et al. Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Biopolymers.* 2014;102:30–9.
- Lee SC, Hong JK, Kim YJ, Hwang BK. Pepper gene encoding thionin is differentially induced by pathogens, ethylene and methyl jasmonate. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2000;56:207–16.
- Stec B. Plant thionins – the structural perspective. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:1370–85.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Ver.* 2012;36:288–305.
- Krcmery V, Barner AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002;4:243–60.
- Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5:379–85.
- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):291–321.
- Iwazaki RS, Endo EH, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Garcia LB, Filho BP. In vitro antifungal activity of the berberine and its synergism with fluconazole. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2010;97:201–5.
- Barbosa FM, Daffre S, Maldonado RA, Miranda A, Nimrichter L, Rodrigues ML. Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;274(2):279–86.
- Rossi DC, Muñoz JE, Carvalho DD, Belmonte R, Faintuch B, Borelli P, et al. Therapeutic use of a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* in the control of experimental candidiasis. *BMC Microbiology.* 2012;12:28.
- Giudici AM, Regente MC, Villalain J, Pfüller K, Pfüller U, De La Canal L. Mistletoe viscotoxins induce membrane permeabilization and spore death in phytopathogenic fungi. *Physiol Plantarum.* 2004;121:2–7.
- Molina A, Ahl Goy P, Fraile A, Sfinchez-Monge R, Garcia-Olmedo F. Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II. *Plant Sci.* 1993;92:169–77.
- Chandrashekhara NRS, Deepak S, Manjunath G, Shetty SH. Thionins (PR protein-13) mediate pearl millet downy mildew disease resistance. *Arch Phytopathol Plant Protect.* 2010;48(14):1356–66.
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodríguez-Palenzuela P. Plant Defense Peptides. *Pept Sci.* 1998;47:479–91.
- Ganz T, Lehrer RI. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol Med Today.* 1999;5:292–7.
- Bera A, Singh S, Nagaraj R, Vaidya T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;127:23–35.
- Vylkova S, Nayyar N, Li W, Edgerton M. Human -Defensins Kill *Candida albicans* in an Energy-Dependent and Salt-Sensitive Manner without Causing Membrane Disruption. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):154–61.
- Loeza-Ángeles H, Sagrero-Cisneros E, Lara-Zárate L, Villagómez-Gómez E, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotechnol Lett.* 2008;30:1713–19.
- Thevissen K, Ghazi A, De Samblanx GW, Brownlee C, Osborn RW, Broekaert WF. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J Biol Chem.* 1996;271:15018–25.
- Giudici M, Poveda JA, Molina ML, De La Canal L, González-Ros JM. Antifungal effects and mechanism of action of viscotoxin A3. *FEBS Journal.* 2006;273:72–83.
- Dathe M, Meyer J, Beyermann M, Maul B, Hoischen C, Bienert M. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1558:171–86.
- Addabbo F, Montagnani M, Goligorsky MS. Mitochondria and Reactive Oxygen Species. *Hypertension.* 2009;53:885–92.
- Aerts AM, François IEJA, Meert EMK, Li QT, Cammue BPA, Thevissen K. The antifungal activity of Rs-AFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2007;13:243–47.
- Mello EO, Ribeiro SFF, Carvalho AO, Santos IS, Da Cunha M, Santa Catarina C, et al. The antifungal activity of PvD1, a plant seed defensin of *Phaseolus vulgaris*, involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification and induction of reactive oxygen species in yeast cells. *Curr Microbiol.* 2011;62:1209–17.
- Hwang B, Hwang J-S, Lee J, Lee DG. The antimicrobial peptide, psacotoheasin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;405:267–71.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:238–50.
- Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J.* 2009;276:6483–96.
- Matsuzaki K, Sugishita K, Harada M, Fujii N, Miyajima K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1327:119–30.
- Franco OL. Peptide promiscuity: An evolutionary concept for plant defense. *FEBS Letters.* 2011;585:995–1000.
- Carvalho AO, Gomes VM. Plant defensins - prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides.* 2009;30:1007–20.
- Yonezawa A, Kuwahara J, Fujii N, Sugijura Y. Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action. *Biochemistry.* 1992;31:2998–3004.
- Boman HG, Agerberth B, Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin-P1 and PR-39, 2 antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun.* 1993;61:2978–84.
- Helmerhorst EJ, Breeuwer P, van t Hof W, Walgreen-Weterings E, Oomeni LCJM, Veerman ECI, et al. The Cellular Target of Histatin 5 on *Candida albicans* Is the Energized Mitochondrion. *J Biol Chem.* 1999;274(11):7286–91.

41. Vieira MEB, Vasconcelos IM, Machado OLT, Gomes VM, Carvalho AO. Isolation, characterization and mechanism of action of an antimicrobial peptide from *Lecythis pisonis* seeds with inhibitory activity against *Candida albicans*. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2015;47(9):716–29.
42. Kulkarni MM, McMaster RW, Kamysz W, McGwire BS. Antimicrobial Peptide-induced Apoptotic Death of *Leishmania* Results from Calcium-dependent, Caspase-independent Mitochondrial Toxicity. *J Biol Chem*. 2009;284(23):15496–504.
43. Aerts AM, Carmona-Gutierrez D, Lefevre S, Govaert G, Francois IE, Madeo F, et al. The antifungal plant defensin *RsaAFP2* from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Lett*. 2009;583:2513–16.
44. Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med*. 2002;8:76–81.
45. Cowen LE. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:187–98.
46. Broekaert WF, Mariën W, Terras FR, De Bolle MF, Proost P, Van Damme J, et al. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*. 1992;31:4308–14.
47. Thevissen K, Terras FRG, Broekaert WF. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:5451–58.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

