

**Caracterização estrutural e química das sementes, folhas e frutos de
diferentes espécies do gênero *Capsicum* L. e sua relação com
mecanismo de defesa**

GERMANA BUENO DIAS

Orientadora: Dr^a. Maura Da Cunha

Co-orientadora: Dr^a. Valdirene Moreira Gomes

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –

UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES

Outubro - 2012

**Caracterização estrutural e química das sementes, folhas e frutos de
diferentes espécies do gênero *Capsicum* L. e sua relação com
mecanismo de defesa**

GERMANA BUENO DIAS

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –
UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES
Outubro– 2012

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, pertencente ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e UENF.

DEDICO

À Deus.

Aos meus queridos Pais, Vitor e Vivi.

Ao Umberto, meu eterno companheiro.

Aos meus irmãos Caio e Luciana.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelas bolsas concedidas durante a elaboração desta tese. E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CNPq) pelo auxílio à pesquisa fornecido;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maura Da Cunha por todos estes anos de incentivo na vida de pesquisa, que me transformou em uma professora e uma pesquisadora. Saiba que lhe agradeço do fundo do meu coração por ter me aceitado como sua aluna, simplesmente do jeito que eu sou. Além do mais agradeço pelos ensinamentos na anatomia vegetal, pelos conselhos, pelo carinho e por sempre ter acreditado em meu potencial, dando-me liberdade para seguir com meus próprios passos;

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Valdirene Moreira Gomes pela amizade e por toda a ajuda e disponibilidade sempre, mostrando o caminho e sempre exigindo mais. E dessa forma, atribuo a ela, a pessoa e a profissional que sou hoje;

Ao Prof. Dr. André de Oliveira Carvalho, pessoa que admiro e estimo pelo conhecimento, prestígio e profissionalismo, por toda a dedicação durante o percurso dessa caminhada nas horas em que mais precisei, e por toda a descontração nos momentos de seriedade. Pela criteriosa revisão da tese. Muito obrigada por tudo, valeu Doido!

Ao Dr. Umberto Zottich (amor da minha vida), pelo amor constante, apoio, paciência, confiança e pela ajuda permanente, sem a qual não teria sido possível chegar até aqui! Obrigada por estar sempre ao meu lado de forma tão expressiva! Amo você!!!!!!!

À Prof^a. Dr^a. Rosana Rodrigues, Dr. Leandro S.A Gonçalves e seus alunos (em especial a Monique Moulin) pela importante colaboração, além do apoio, estímulo e amizade;

Aos membros da banca, Dr^a. Helena Regina Pinto Lima, Dr^a. Rosana Rodrigues, Dr^a. Kátia Valevski Sales Fernandes por aceitarem o convite;

À Beatriz Ribeiro, Giovana Moraes, Marcia Adriana Dutra pelo apoio técnico no preparo de amostras e utilização dos microscópios, sobretudo pela grande amizade;

Aos amigos do grupo da Prof^a. Dr^a. Maura: Saulo Pireda, Camila Alexandrino, Kris Tullinha, Jonas Brito, João Vitor Castelar, Fernanda Trindade, Carlos Eduardo, Glaziele Campbell, Vanessa Xavier, Bruna, Marcio Chaves, Marcos Vinicius, Isabel Titonelli e Ricardo Alves (*in memoriam*) pela amizade, alegria, bagunça, ajuda em todos os momentos que precisei. Adoro vocês!!!!!!

Aos amigos do grupo da Prof^a. Dr^a. Valdirene, em especial a Dr^a. Suzanna Ribeiro e o Gabriel Taveira pela amizade e constante ajuda;

Aos amigos Dr^a. Denise Klein, Dr^a. Tarsila Amaral, Dr^a. Hérica Chagas e Dr. Guilherme Rabelo, pela amizade que construímos, por sempre estarem dispostos a ajudar, as nossas conversas....., vocês são especiais;

Aos amigos Vitor e Fernanda por muitas vezes alegrarem a minha vida, amo vocês!!!!

Aos meus irmãos Caio e Luciana, por aguentarem muitas vezes meu mau humor, hehe, pelo amor, amizade, incentivo..... amo muito vocês!!!!

Aos amores da minha vida meus pais (Vitor e Vivi), por sempre me apoiarem, por me mostrarem que a vida é feita de desafios e que não devo desanimar, pelo amor incondicional. Amo vocês!!!!

Enfim, a todos que não foram mencionados aqui, mas que de alguma forma contribuíram e foram importantes na realização desta tese.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XVI
I – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 – A FAMÍLIA SOLANACEAE.....	1
1.2 – BOTÂNICA, ORIGEM E EVOLUÇÃO DE <i>Capsicum</i>	2
1.3 – PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE <i>Capsicum</i>	6
1.4 – DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE <i>Capsicum</i>	7
1.5 – MARCADORES MOLECULARES – ISSR.....	8
1.6 – PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM PLANTAS.....	9
1.7 - INIBIDORES DE PROTEINASES SERINICAS DE PLANTAS.....	11
II – CAPÍTULO 1: Caracterização das espécies <i>Capsicum</i> utilizando dados anatômicos e moleculares.....	13
2.1 – INTRODUÇÃO	13
2.2 – OBJETIVOS.....	15
2.3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.3.1 - Material Botânico.....	16
2.3.2 – Preparo de Amostra para Microscopia Óptica.....	17
2.3.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura	17
2.3.4 – Histoquímica.....	18
2.3.4.1 – OBTENÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS.....	18
2.3.4.2 – ANÁLISE HISTOQUÍMICA DOS ÓRGÃOS DE ESPÉCIES DE <i>Capsicum</i>	18
2.3.5 – Biometria das Sementes de <i>Capsicum</i>	19
2.3.6 - Material Genético.....	19
2.3.7 – Análise Molecular.....	20
2.3.7.1 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA CARACTERIZAÇÃO	

MOLECULAR.....	20
2.3.7.2 – EXTRAÇÃO DO DNA.....	20
2.3.7.3 – QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	21
2.3.8 – Marcador ISSR	21
2.3.8.1 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO.....	21
2.3.8.2 – SELEÇÃO DE INICIADORES	21
2.3.9 - Análise Estatística de Dados.....	22
2.3.9.1 - ANÁLISE DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	22
2.3.9.2 - DIVERGÊNCIA GENÉTICA.....	22
2.4 – RESULTADOS.....	24
2.4.1 – Anatomia Foliar.....	24
2.4.2 - Anatomia de Sementes.....	29
2.4.3 - Anatomia dos Frutos.....	33
2.4.4 – Histoquímica.....	35
2.4.5 - Análise Molecular.....	37
2.5–DISCUSSÃO.....	40
2.5.1 – Anatomia de Folhas, Sementes e Frutos.....	40
2.5.2 - Análise Molecular.....	44
2.6 – CONCLUSÕES.....	47
III – CAPITULO 2: Isolamento, caracterização e atividade antifúngica de inibidores de proteases de sementes de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	48
3.1 – INTRODUÇÃO.....	48
3.2 – OBJETIVOS.....	50
3.3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.3.1 - Material vegetal.....	51
3.3.2 – Leveduras.....	51
3.3.3 - Purificação dos Peptídeos.....	51
3.3.3.1 - PREPARO DA AMOSTRA SECA.....	51
3.3.3.2 - EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DAS PLANTAS PARA ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	51
3.3.3.3 - ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	52
3.3.4 - Quantificação de Proteínas.....	52
3.3.5 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Análise de Espectrometria de	

Massa	53
3.3.6 - Sequenciamento dos Peptídeos	53
3.3.6.1 PREPARO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO.....	53
3.3.6.2 - ELETROTRANSFERÊNCIA DE PEPTÍDEOS PARA SEQUENCIAMENTO.....	54
3.3.7 - Caracterização do Inibidor de Proteinase Serínica	54
3.3.7.1 - ENSAIO DE ATIVIDADE INIBITÓRIA	54
3.3.7.2 - ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA: EFEITO DO pH.....	55
3.3.7.3 - ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA: EFEITO DA TEMPERATURA.....	55
3.3.8 - Efeito das Frações PEFs sobre o Crescimento de Leveduras	56
3.3.8.1 - OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DAS LEVEDURAS.....	56
3.3.9 - Análises Morfológicas e Ultraestruturais das Leveduras	56
3.3.9.1 - MICROSCOPIA ÓPTICA.....	56
3.3.9.2 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	57
3.3.10 - Análise Estatística	57
3.4 – RESULTADOS	58
3.4.1 - Purificação e caracterização	58
3.4.2 - A Atividade Antimicrobiana contra Leveduras	61
3.4.3 – Caracterização das PEFs por Sequenciamento	68
3.4.4 - Avaliação da Atividade inibitória de Tripsina e Quimotripsina das PEFs	70
3.4.5 – Estabilidade de PEF1, PEF2 e PEF3 em Relação ao pH	72
3.4.6 – Estabilidade de PEF1, PEF2 e PEF3 em Relação à Temperatura	73
3.5 – DISCUSSÃO	74
3.5.1 – Purificação e Caracterização	74
3.5.2 - Avaliação da Atividade inibitória de Tripsina e Quimotripsina das PEFs .75	
3.5.3 – Estabilidade de PEF1, PEF2 e PEF3 em Relação à pH e Temperatura	76
3.5.4 - Atividade Antimicrobiana contra Leveduras	76
3.6 – CONCLUSÕES	79
IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diversas espécies da Família Solanaceae com grande importância econômica.....	2
Figura 2 – Espécies de <i>Capsicum</i> sp.....	4
Figura 3 - Distribuição de espécies de <i>Capsicum</i> nas Américas.....	6
Figura 4 – Anatomia de folhas de espécies do gênero <i>Capsicum</i>	26
Figura 5 - Micromorfologia das folhas de espécies do gênero <i>Capsicum</i>	27
Figura 6 - Anatomia do pecíolo de espécies do gênero <i>Capsicum</i>	28
Figura 7 – Anatomia das sementes de espécies do gênero <i>Capsicum</i>	30
Figura 8 – Anatomia e micromorfologia das sementes de espécies do gênero <i>Capsicum</i>	31
Figura 9 – Micromorfologia das sementes de espécies do gênero <i>Capsicum</i>	32
Figura 10 – Corte transversal do fruto de espécies de <i>Capsicum</i>	34
Figura 11 – Dendrograma obtido pelo método da distância média UPGMA com base em marcadores moleculares entre quatro acessos de espécies de <i>Capsicum</i>	38
Figura 12 – (A) Cromatografia de fase reversa-C18 do extrato de proteína da semente de <i>C. chinense</i> . (B) SDS-PAGE-tricina de bandas de PEF1, PEF2 e PEF3.....	59
Figura 13 - Cromatografia por fase reversa C2/C18 de PEF2. Gel de tricina- bandas de PEF2 após a separação por RP-C18 de HPLC.....	60
Figura 14 – (A – E) Ensaio de inibição de crescimento de leveduras na presença de PEF2 a partir de sementes de <i>Capsicum chinense</i>	62
Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura de leveduras.....	67
Figura 16 - Comparação de sequências N-terminais de aminoácidos das cadeias de 8,5 kDa e de 5,0 kDa.....	69
Figura 17 - Atividades inibitórias de PEF1, PEF2 e PEF3.....	71
Figura 18 - Efeito do pH sobre PEF1, PEF2 e PEF3, analisados por sua atividade inibitória.....	72
Figura 19 - Efeito da temperatura sobre PEF1, PEF2 e PEF3, analisados por sua atividade inibitória.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos acessos de espécies de <i>Capsicum</i> selecionados.....	16
Tabela 2 – Médias de comprimento, largura e espessura das sementes de espécies estudadas de <i>Capsicum</i> . (n = 100 indivíduos).....	29
Tabela 3 - Resultados dos testes histoquímicos nas quatro espécies estudadas de <i>Capsicum</i>	36
Tabela 4 – Iniciadores ISSR que foram usados, temperatura ótima de anelamento, número de bandas polimórficas e monomórficas que foram gerados no estudo dos quatro acessos de <i>Capsicum</i> e um acesso de <i>Solanum lycopersicum</i>	39

Esta tese foi escrita em capítulos, sob o formato de artigos destinados especificamente a revistas científicas nas áreas de botânica, genética e bioquímica. Estes são precedidos por uma introdução geral e seguidos por considerações finais.

O primeiro capítulo intitulado “Caracterização de espécies de *Capsicum* L. utilizando dados anatômicos e moleculares” gerou um artigo “***Capsicum* species characterization using anatomical and molecular data**”, de autoria de **Dias GB, Gomes VM, Moraes TMS, Zottich UP, Rabelo GR, Carvalho AO, Moulin M, Gonçalves LSA, Rodrigues R & Da Cunha M**. O mesmo encontra-se aceito para publicação na revista **Genetic and Molecular Research**.

O segundo capítulo intitulado “Isolamento, caracterização e atividade antifúngica de inibidores de proteases de sementes de *Capsicum chinense* Jacq.” gerou um artigo “**Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. seeds**”, de autoria de **Germana Bueno Dias, Valdirene Moreira Gomes, Umberto Zottich Pereira, Suzanna F. Ferreira Ribeiro, André O. Carvalho, Rosana Rodrigues, Olga L. Tavares Machado, Kátia Valevski Sales Fernandes, André Teixeira S. Ferreira, Jonas Enrique A. Perales e Maura Da Cunha**. O mesmo encontra-se aceito para publicação na revista **The Protein Journal**.

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae e tem grande relevância social, econômica e agrônômica. As espécies desse gênero são descritas em termos de divergência genética, considerando bases de dados morfológicos, agrônômicos e moleculares. No entanto, descrições de diferenças genéticas com base em caracteres anatômicos são raras. Este trabalho teve como objetivos caracterizar quatro espécies de *Capsicum* L. considerando a anatomia e a micromorfologia de órgãos vegetativos e reprodutivos, e discriminar os acessos usando marcadores moleculares “inter-simple sequence repeat” (ISSR). As espécies de *Capsicum* analisadas (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense* e *C. frutescens*) foram cultivadas em casas de vegetação. As folhas, frutos e sementes foram amostradas e analisadas por microscopia óptica e também microscopia eletrônica de varredura para determinar eventual polimorfismo entre anatomia e a micromorfologia, a fim de discriminar as espécies de *Capsicum*. A anatomia das folhas, frutos e sementes de *Capsicum* apresentaram os seguintes resultados: folhas com epiderme unisseriada recoberta por cutícula ligeiramente mais espessa na superfície adaxial; presença de estômatos anomocíticos em ambas as superfícies das folhas; presença de tricomas tectores e glandulares em ambas as superfícies; mesofilo dorsiventral; parênquima paliçádico com uma camada de células de parênquima lacunoso alongado e 4-5 camadas de células com diferentes formas e grandes espaços intercelulares; feixes vasculares do tipo bicolateral. As sementes são campilótopas, em forma de ferradura, elipsóide, albuminosas, com endosperma abundante, semi-transparente e esbranquiçado. Todas as quatro espécies têm embrião circinado e tegumento reduzido. Polimorfismo foi observado nos tricomas tectores e também para as cores e formas do fruto. A alta variabilidade entre os acessos foi detectada por meio de marcadores ISSR. Apesar das espécies estudadas apresentarem uma ampla variabilidade morfológica e molecular essa variabilidade não foi refletida pelas características anatômicas. Essa tese também apresenta dados sobre o isolamento e caracterização de peptídeos de sementes de *Capsicum chinense* Jacq. que foram analisados em relação às suas toxicidades sobre um conjunto diversificado de espécies de leveduras. O extrato de proteínas foi separado por cromatografia de alta performance (HPLC) em coluna de fase reversa C18, resultando em três diferentes frações enriquecidas em peptídeos (PEFs) denominadas PEF1, PEF2 e PEF3.

Eletroforese em gel de tricina de poliacrilamida da fração PEF2 revelou peptídeos com massas moleculares de cerca de 5,0 a 8,5 kDa. Peptídeos da PEF2 também exibiram forte atividade antifúngica contra diferentes leveduras. Na presença de PEF2, *Candida tropicalis* exibiu alterações morfológicas, incluindo aglomeração celular e formação de pseudohifas. Sequências N-terminais de PEF2 e PEF3 foram mostradas ser altamente homólogas com seqüências de inibidores de proteinases (IP) serínicas, quando analisados com base em bancos de dados comparativos. Por esta razão, foram realizados ensaios de atividade inibitória de proteases. Os PEFs apresentaram alta atividade inibitória contra tripsina e baixa atividade inibitória contra quimotripsina. PEF2 e PEF3 foram consideravelmente refratários a um intervalo amplo de pH e temperaturas. Devido à diversidade de possibilidades de aplicação de IPs em áreas que vão desde a proteção de plantas contra patógenos e pragas à medicina, como no câncer e inibição da replicação de vírus, a descoberta de novos IPs com novas propriedades são de grande interesse científico.

The genus *Capsicum* belongs to the Solanaceae family and has a great social, economic and agronomic significance. The species of this genus are described in terms of genetic divergence, considering morphological, agronomic and molecular databases. However, descriptions of genetic differences based on anatomical features are rare. This study aimed to characterize four species of *Capsicum* L. considering the anatomy and micromorphology of vegetative and reproductive organs, and discriminate the accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. The analyzed *Capsicum* species (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense* and *C. frutescens*) were grown in greenhouse. The leaves, fruits and seeds were sampled and analyzed by light microscopy and also scanning electron microscopy to determine possible polymorphism on anatomy and micromorphology which could be helpful to discriminate the species of *Capsicum*. The anatomy of leaves, fruits and seeds of *Capsicum* showed the following results: leaves with uniseriate epidermis covered with cuticle, slightly thicker in the adaxial surface; presence of anomocytic stomata on both surfaces of the leaves; presence of tector and glandular trichomes on both surfaces; dorsiventral mesophyll; palisade parenchyma with a layer of elongated spongy parenchyma cells and 4-5 cell layers with different shapes and large intercellular spaces; bicollateral type vascular beams. Seeds are campylotropous, horseshoe-shaped, ellipsoid, albuminous, with abundant, semi-transparent and albescent endosperm. All four species have circinate embryo and reduced tegument. Polymorphism was observed in tector trichomes and also for fruit colors and shapes. The high variability between accessions was detected by ISSR markers. Despite the wide morphological and molecular variability shown in the studied species, this was not reflected by the anatomical features. This study also presents data on the isolation and characterization of peptides from *Capsicum chinense* Jacq. seeds which have been analyzed for their toxicity towards a diverse set of yeast species. The protein extract was separated by high C18 reversed-phase column performance liquid chromatographic system (HPLC) in a resulting in three different peptide enriched fractions (PEFs) called PEF1, PEF2 and PEF3. Electrophoresis in tricine polyacrylamide gel of PEF2 fraction revealed peptides with molecular masses about 5.0 to 8.5 kDa. Peptides from PEF2 also exhibited strong antifungal activity against different yeasts. In the presence of PEF2, *Candida tropicalis*

exhibited morphological changes, including cell clumping and pseudohyphae formation. N-terminal sequences of PEF2 and PEF3 were shown to be highly homologous to those of serine protease inhibitors (IP), when analyzed by sequence tools of comparative database. For this reason, protease inhibitory activity of protease were carried out. The PEFs showed elevated inhibitory activity against trypsin and low inhibitory activity against chymotrypsin. PEF2 and PEF3 were significantly refractory to a wide range of pH and temperatures. Due to the diversity of possible applications in areas ranging from the protection of plants against pests and pathogens to medicine usage, such as cancer and inhibition of virus replication, the discovery of new IPs with new properties are of great interest.

1.1 – A FAMÍLIA SOLANACEAE

A família Solanaceae A. L. Jussieu é uma das famílias de plantas mais relevantes do mundo, pois é uma das maiores famílias do reino vegetal com mais de 3.000 espécies, distribuídos entre 106 gêneros (Olmstead *et al.*, 1999). Sua ocorrência concentra-se principalmente na América do Sul como um dos seus principais centros de diversidade e endemismo (Hunziker, 2001).

A família Solanaceae possui plantas com hábitos diferentes. Nesta família existem ervas, arbustos, cipós e algumas árvores e as plantas podem ser anuais, bienais, ou perenes, além de ser uma importante fonte de especiarias, alimentos e remédios.

Este grupo tem grande relevância econômica (Figura 1), com espécies cultivadas para a alimentação, como a batata (*Solanum tuberosum* L.) e o tomate (*Solanum lycopersicum* L.); espécies ornamentais (*Brunfelsia* spp., *Petunia* spp., *Solandra grandiflora*) e espécies medicinais, como *Atropa beladonna*, *Mandragora officinalis* (Agra & Bhattacharyya, 1999; Silva *et al.*, 2005). Dentro desta família, um dos gêneros que também apresenta alta relevância econômica é o *Capsicum* L., que pode ser associado à medicina tradicional de combate a enfermidades em criações domésticas, e mais fortemente relacionado a produtos condimentares, devido aos alcalóides (capsaicinóides) contidos em seus frutos (Barbosa *et al.*, 2002). O cultivo de pimenta e pimentões no Brasil é de grande importância, tanto pelas características de rentabilidade, principalmente quando o produtor agrega valor ao produto, quanto pela importância social, por empregar elevada mão de obra (Rufino & Pentead, 2006).



Figura 1 – Diversas espécies da Família Solanaceae, com grande importância econômica como *Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L., *Brunfelsia* spp., *Petunia* spp., *Solanandra grandiflora*, *Atropa belladonna*, *Mandragora officinalis* e *Capsicum* spp.

1.2 – BOTÂNICA, ORIGEM E EVOLUÇÃO DE *CAPSICUM*

As espécies de *Capsicum* são membros da Família Solanaceae (tribo Solaneae, Subtribo Capsicinae) que inclui tomate, tabaco, batata e petúnia. Estas espécies são nativas dos trópicos e subtropicais da América, mas tem se espalhado pelos trópicos da África e Ásia, como sugerida por Hunziker (2001) como os centros de distribuição de *Capsicum*.

Ainda não há um consenso quanto ao número de espécies classificadas de acordo com o nível de domesticação. Büttow *et al.* (2010) classificaram 20 espécies, enquanto Eshbaugh (1993) aproximadamente 25 espécies. No entanto Moscone *et al.* (2007) classificou cerca de 31 espécies. Mas no que se refere às espécies domesticadas, Reifschneider (2000) e Pikergill (1997) concordaram em afirmar a existência de cinco, que são: *Capsicum annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L. e *C. pubescens* Ruiz & Pav. Essas cinco espécies formam três complexos de *Capsicum*, o complexo *C. annuum*, complexo *C. baccatum*, e complexo *C. pubescens*. Um complexo de espécie inclui aquelas que podem hibridizar, embora algumas vezes com dificuldade.

O complexo *C. annuum* inclui três espécies proximamente relacionadas, *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, sendo o complexo mais amplamente distribuído nas Américas e no mundo. O complexo *C. baccatum* consiste em pelo menos três espécies, *C. baccatum*, *C. praetermissum*, e *C. tovarii*. O complexo *C. pubescens* contém: *C. pubescens* Ruiz & Pav., *C. cardenasii* Heiser & Smith e *C. eximium* Hunz (Pikergill, 1997; Tong & Bosland, 1999). Dados de melhoramento genético e citogenética confirmam que as espécies domesticadas pertencem às três distintas e separadas linhagens genéticas (Pikergill, 1997).

A espécie *Capsicum chinense* (Figura 2A) foi originalmente encontrada na bacia do rio Amazonas, mas está comercialmente distribuída por todo o Sul e Norte do Brasil, devido a sua adaptabilidade a diferentes solos e climas, e seu popular aroma cítrico. Os frutos desta espécie apresentam uma enorme variabilidade em tamanho, forma e cor, com diferentes intensidades indo desde o amarelo até o marrom, quando maduros (Lannes *et al.*, 2007; Reifschneider, 2000).

Capsicum baccatum var. *baccatum* possui ampla distribuição geográfica, enquanto *C. baccatum* var. *praetermissum* é endêmica do Brasil. A ocorrência de *C. baccatum* var. *pendulum* (Figura 2B) abrange o noroeste da América do Sul, incluindo Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e sudoeste do Brasil. *C. baccatum* var. *baccatum* possui flores brancas com duas manchas esverdeadas na base, enquanto *C. baccatum* var. *praetermissum*, além das cores da outra variedade, apresenta uma característica faixa lilás-violeta na margem das pétalas (Reifschneider, 2000). A espécie *Capsicum baccatum* var. *pendulum* tem manchas amarelas e corola branca, anteras amarelas, caule ereto, uma flor por nó, fruto largo, alongado e persistente. O fruto maduro tem cor laranja (Tong & Bosland, 1999).

Capsicum frutescens (Figura 2C) está distribuída por toda a América Central e planícies da América do Sul, e também em outras regiões tropicais e subtropicais, tais como Ásia, África e ilhas do Pacífico. *C. frutescens* é geralmente muito picante e tem um sabor característico. Esta espécie apresenta as seguintes características: são plantas perenes e de maturação tardia; a altura varia de 1,5-2,0 m; corola branco-esverdeada; anteras púrpura a azul, às vezes amarelas; nós com um a três pedúnculos eretos; fruto imaturo variando de verde a branco amarelado; fruto maduro vermelho a laranja escuro; caules e folhas glabros a muito pubescentes; folhas maleáveis e mais largas do que as de *C. annuum*; as sementes apresentam cor creme a amarelo (Yamamoto & Nawata, 2005).

Capsicum annuum (Figura 2D) foi domesticada nas terras altas do México. Esta espécie inclui a maioria das pimentas mexicanas, pimentas quentes da África e Ásia, e muitas das cultivares de pimenta doce crescidas em países temperados. No entanto, estas espécies não estão bem adaptadas às planícies úmidas dos trópicos, onde, ao menos na América Latina, esta é substituída por *C. frutescens* e *C. chinense* (Pikergill, 1997).



Figura 2 – A - Espécie de *Capsicum chinense*. Fonte: - http://www.ethnobotanik.org/Capsicum/Bhut-Jolokia-Chocolate/Bhut-Jolokia-Chocolate-Capsicum_chinense-pt.html; B - Espécie *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Fonte: <http://pimentasweb.blogspot.com/2010/04/pimenta-cambuci-ou-chapeu-de-frade.html>; C - *Capsicum frutescens*. Fonte: http://aquiya.skr.jp/zukan/Capsicum_frutescens.html; D - Espécies de *Capsicum annuum*. Fonte: <http://www.spicesmedicinalherbs.com/capsicum-annu-herb.html>.

As diferentes espécies e variedades de pimentas e pimentões podem ser discriminadas por características morfológicas dos frutos e, principalmente das flores (Moreira *et al.*, 2006). O gênero *Capsicum* tem sido separado de acordo com a cor de suas corolas em dois grandes grupos: branco e púrpura. As espécies domesticadas do gênero apresentam esses dois tipos de cor de corola, ao que se pode claramente diferenciar entre as espécies *C. baccatum* e *C. pubescens*: a primeira apresenta corola branca e anteras amarelas, já a segunda tem corola púrpura e anteras púrpuras ou violetas. A dificuldade se apresenta entre as espécies *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, pois nas três a cor da corola varia de branco a amarelo esverdeado e as anteras de púrpura a violeta. Neste caso, o que as diferencia, em nível de chave taxonômica, é o número de flores por nó e a constrição do cálice (Guerra, 2001). Além

dessas características, as principais espécies domesticadas do gênero podem ser identificadas pela posição da flor e do pedicelo, presença ou pela ausência de manchas nos lobos das pétalas e as margem do cálice (Carvalho & Bianchetti, 2004).

Com relação ao sistema reprodutivo, as espécies domesticadas de *Capsicum*, em geral, apresentam-se como autógamias, porém existe uma possível taxa de alogamia que segundo Tanksley (1984) pode variar de 0 a 83% sendo facilitada por alterações morfológicas na flor, pela ação de insetos polinizadores, por práticas de cultivo entre outros fatores. Considerando a existência de alogamia entre essas espécies, é possível que exemplos discrepantes, observados no processo de caracterização morfológica, sejam produtos de cruzamento entre diferentes espécies, pois apresentam a maior parte das características pertinentes a uma espécie, juntamente com características de outra (Carvalho *et al.*, 2003).

Uma característica do gênero *Capsicum* é a pungência atribuída à presença de capsaicinóides. Tais alcalóides acumulam-se na superfície da placenta e são liberados quando o fruto sofre qualquer dano físico (Carvalho *et al.*, 2003).

1.3 – PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE *CAPSICUM*

As pimentas do gênero *Capsicum* são amplamente cultivadas nas Américas (Figura 3), sendo utilizadas como matéria-prima para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Yamamoto & Nawata, 2005; Bento *et al.*, 2007).

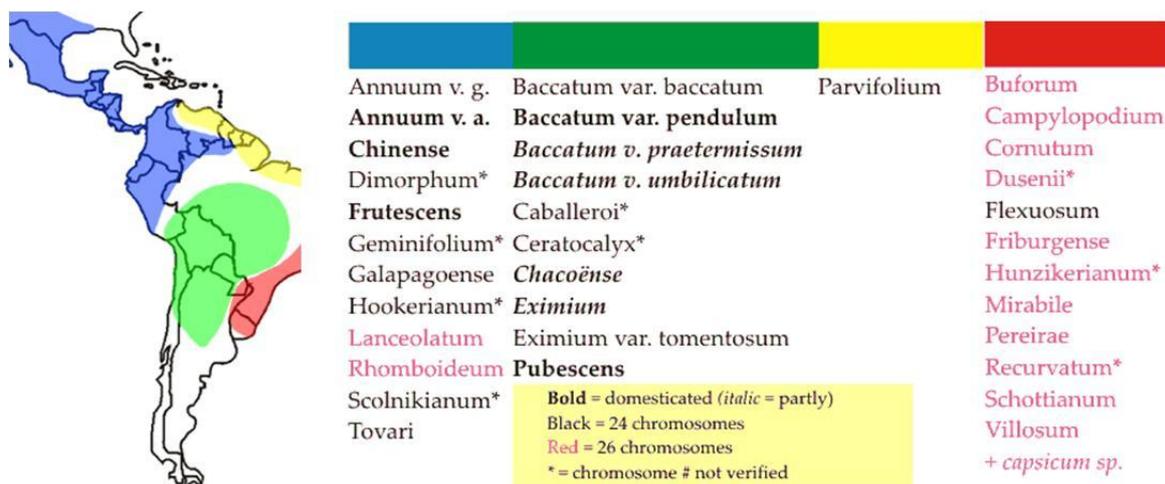


Figura 3 - Distribuição de espécies de *Capsicum* nas Américas. Legenda: negrito (espécies domesticadas), preto (24 cromossomos), vermelho (26 cromossomos), asterisco (número de cromossomos não verificados). Figura adaptada de Hietavuo, 1997 (<http://infernochili.net/?page=villichilit>).

As culturas de pimenta e pimentão são fundamentais no agronegócio brasileiro. A produção de pimenta vem crescendo muito nos últimos anos, com cultivos em regiões de clima subtropical como no Sul, ou tropical como no Norte e Nordeste. Os principais estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (Rufino & Pentead, 2006). Segundo dados do Ministério da Agricultura, o volume das exportações brasileiras atingiu 38.424 t em 2005. Em contrapartida, as importações foram de 363 toneladas, beneficiando assim a balança comercial brasileira.

A produção de pimenta para uso como condimento de diversos produtos alimentícios industrializados cresceu significativamente nos últimos anos. Existe intenso comércio internacional de pimenta-vermelha, seca em pó, com ou sem sementes e com diversos níveis de pungência. Esses produtos são utilizados no preparo de

alimentos, no processamento de conservas e na indústria de embutidos (Embrapa – <http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/index.htm>).

O Brasil possui uma grande variabilidade genética entre as espécies domesticadas, as semi-domesticadas e as silvestres, cultivadas em todas as regiões do país. Apesar da grande diversidade genética apresentada pela cultura de pimenta, a mesma pode ser acometida por doenças que limitam e oneram produção (Embrapa – <http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/index.htm>).

1.4 – DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE *CAPSICUM* L

Os estudos genéticos em populações naturais visam analisar e quantificar como a variabilidade genética está distribuída no tempo e no espaço, dentro e entre populações. Este fato permite compreender como a seleção está atuando de acordo com a adaptabilidade (Estopa *et al.*, 2006). Os marcadores moleculares de DNA são sequências genômicas localizadas num mesmo loco, são definidos como elementos capazes de prever, mapear e caracterizar um fenótipo molecular. Com o advento das técnicas de biologia molecular, na década de 80, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA. Os marcadores moleculares “inter-simple sequence repeat” (ISSR) têm demonstrado êxito nas análises de variabilidade genética.

Assim, o melhoramento e a obtenção de plantas de *Capsicum* que combinem características desejáveis dependem de conhecimento, da preservação e do uso dos recursos genéticos da espécie. Informações a respeito da diversidade genética intra e interespecífica é essencial para os programas de melhoramento genético e de conservação, além de prover informações úteis, aplicáveis ao estudo evolutivo e filogenético (Reddy *et al.*, 2002).

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

facultativas” (Tanksley, 1984, apud Bosland, 1996), o que pode ser determinante na escolha do método de melhoramento a ser empregado, principalmente, no que se refere à produção de sementes (Bosland, 1996).

A facilidade de cruzamentos naturais entre algumas espécies do gênero *Capsicum* pode levar a interpretações errôneas dos exemplos polimórficos de uma mesma espécie, suscitando o aparecimento de variadas sinonímias e dificultando até mesmo a identificação taxonômica dessas plantas. Neste sentido pode ocorrer ainda o contrário, pois a similaridade entre espécies diferentes também induz a erros de classificação (Viñals *et al.*, 1996).

A identificação de um acesso com base em características fenotípicas não oferece total segurança devido a fatores como insuficiência ou escassez de polimorfismo, plasticidade ambiental, dependência do estágio de desenvolvimento e dominância-recessividade (He *et al.*, 1995). Assim sendo, faz-se necessário um bom conhecimento quanto à extensão da diversidade genética dentro da coleção de germoplasma e quanto ao parentesco entre os acessos, uma vez que estas informações são cruciais para a exploração do germoplasma, focalizando áreas com máxima diversidade genética (He *et al.*, 1995).

1.5 – MARCADORES MOLECULARES – ISSR

Uma alternativa para se avaliar essa variabilidade é através do uso de marcadores moleculares que permitem identificar as diferenças entre os materiais (polimorfismo) em nível de DNA, minimizando a interferência ambiental e permitindo uma distinção mais segura dos acessos. Neste sentido, são várias as classes de marcadores moleculares. Dentre elas os marcadores moleculares ISSR, que representam uma das classes mais recentes e foi desenvolvida a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (Zietkiewicz *et al.*, 2004; Caixeta *et al.*, 2006). Estes marcadores são facilmente detectados usando poucos equipamentos, são bastante variáveis e fornecem grande número de dados por um custo razoável para o pesquisador (Wolfe, 2005). O princípio da técnica é baseado em PCR (Reação em cadeia da polimerase) e envolve ampliações de segmentos de DNA presente numa região de distância amplificável entre duas regiões repetidas de microssatélites idênticas orientadas em direções opostas. As ampliações não

requerem informação da sequência do genoma e conduzem a multilocus e altos padrões polimórficos. A técnica ISSR é simples rápida e eficiente. Os produtos amplificáveis são geralmente de 200 a 2.000 pb de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade possivelmente devido ao uso de iniciadores longos, os quais permitem um subsequente uso de alta temperatura de anelamento (Bornet & Branchard, 2001; Reddy *et al.*, 2002).

Os marcadores ISSR têm sido utilizados para estimar a extensão da diversidade genética a nível inter e intra-específico em uma ampla variedade de espécies. Devido à sua abundância e dispersão no genoma, têm sido muito empregados para estudar relações entre duas populações muito aproximadas (Reddy *et al.*, 2002; Deshpande *et al.*, 2001). Além disso, também tem sido utilizados em estudos de seleção na identificação de cultivares (Baum *et al.*, 2005), mapeamento genético (Rafalski, 2002; Bressan-Smith, 1998), filogenia (Gehrig *et al.*, 1997); melhoramento genético visando resistência a doenças (Santos, 2000) e sexagem (Urasaki *et al.*, 2002). Todos estes estudos buscam identificar variações em sequências genômicas que possam estar relacionadas com um fenótipo específico, sendo um importante elemento para os programas de melhoramento genético de plantas que visam resistência às doenças, pois gera informação sobre o nível e distribuição da variabilidade genética dos isolados existentes em uma população ou região.

1.6 – PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM PLANTAS

As plantas, por serem organismos sésseis, estão constantemente expostas aos diversos tipos de fatores físicos e químicos desfavoráveis no ambiente, incluindo a presença de um grande número de organismos fitopatogênicos. Sendo assim, a sua sobrevivência nessas condições exige uma rápida resposta de defesa (Castro & Fontes, 2005). Durante seu processo evolutivo as plantas desenvolveram eficientes sistemas de defesa os quais mostram um reconhecimento específico e uma alta sensibilidade a organismos patogênicos. Diversos mecanismos estão envolvidos na defesa de plantas contra seus agressores seja pelo acúmulo de componentes fenólicos, de alcalóides, de aminoácidos não protéicos, de glicosídeos ou proteínas e peptídeos com atividades antimicrobianas e inseticidas (Castro & Fontes, 2005).

Peptídeos antimicrobianos são moléculas de baixa massa molecular com uma vasta atividade inibitória contra bactérias, vírus e fungos (Izadphanah & Gallo, 2005).

Pertencem a um grupo diverso e abundante de moléculas que são produzidas por diversas células tanto em plantas quanto em animais (Brogden, 2005).

Uma característica comum presente nestes peptídeos é a presença de resíduos de cisteína em número par (4, 6 ou 8) interconectados por pontes dissulfeto, conferindo a eles uma alta estabilidade (Broekaert *et al.*, 1997) (excetuando-se os peptídeos lineares com estrutura em α -hélice, como cecropina e magainina). A maioria desses peptídeos com atividade antimicrobiana consiste de aproximadamente 50 resíduos de aminoácidos, são anfipáticos e apresentam uma carga líquida positiva em pH fisiológico (Van't Holf *et al.*, 2001).

Um grande número de peptídeos antimicrobianos tem sido isolado de plantas, especialmente de sementes, local em que podemos encontrá-los em nível elevado se compararmos as folhas, flores e demais órgãos da planta (Broekaert *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010).

Peptídeos antimicrobianos podem ser classificados levando-se em consideração, principalmente, suas características estruturais. Geralmente, esses peptídeos presentes em plantas possuem estrutura tridimensional globular, estabilizada pela presença de pontes dissulfeto. Dentre estes podemos citar: as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs), as quais inicialmente acreditavam-se participar no transporte de lipídeos entre organelas; as snakinas, que foram inicialmente isoladas de batata (*Solanum tuberosum*); as defensinas de planta, inicialmente isoladas de sementes de cevada (*Hordeum vulgare*); as tioninas, sendo a purotionina, isolada de trigo (*Triticum aestivum*), primeira proteína cuja atividade contra patógenos de plantas foi detectada *in vitro*; os peptídeos similares à heveína, descritos inicialmente como os peptídeos mais abundantes do látex de seringueiras; os peptídeos similares à knotinas, isolados inicialmente de sementes de maravilha (*Mirabilis jalapa*); as seferdinas, únicos peptídeos antimicrobianos de plantas descritos que não possuem pontes dissulfeto, representados por cadeias polipeptídicas lineares ricas em glicina e histidina, tem sido isolado de raiz de bolsa-de-pastoros (*Capsella bursa-pastoris*); peptídeos MBP-1, isolados de milho (*Zea mays*); peptídeos macrocíclicos purificados de várias plantas da família Rubiaceae, como o café (*Coffea arabica*) e 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 mais recentemente tem-se incluído neste grupo os inibidores de proteinase isolados de sementes de pimenta (*Capsicum annum* L.) (Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

1.7 - INIBIDORES DE PROTEINASES SERINICAS DE PLANTAS

Nos extratos de plantas é possível encontrar grande diversidade de biomoléculas. Dentre os metabólitos presentes nestes extratos e com possíveis aplicações industriais, encontra-se a classe protéica dos inibidores de proteinases, que são proteínas capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, bloqueando reversível ou irreversivelmente a sua atividade catalítica (Richardson 1991; De Leo *et al.*, 2002; Chye *et al.*, 2006).

Estas proteínas são amplamente distribuídas na natureza e nas plantas, relacionam-se com a estocagem de proteínas e/ou mecanismos de defesa da planta (Haq *et al.*, 2004; Macedo *et al.*, 2007; Torres-Castillo *et al.*, 2009). Ademais, os inibidores de proteinases são classificados de acordo com a classe de enzima inibida, podendo, então, serem inibidores de serino, cisteíno, aspártico e metaloproteinases (Richardson 1991; Haq *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2008).

Inibidores de proteinases serínicas são amplamente distribuídos no reino vegetal e já foram descritos em muitas espécies de plantas. Há um grande número de inibidores de proteinases serínicas conhecidos e caracterizados, uma vez que esta é a classe de inibidores mais amplamente estudada (Haq *et al.*, 2004). Os inibidores de proteinases serínicas são encontrados principalmente em plantas das famílias Brassicaceae, Cucurbitaceae, Salicicaceae, Glycinaceae, Leguminosae e Solanaceae (Karban & Baldwin, 1997).

As diversas classes de inibidores de proteinases serínicas foram subdivididas em várias famílias baseando-se na extensiva homologia entre seus membros, nas relações topológicas entre as pontes dissulfeto e a localização do sitio reativo (Laskowski & Kato, 1980). A princípio, os inibidores de proteinases serínicas de plantas foram agrupados em quatro famílias: (i) família dos inibidores tripsina (Kunitz) de soja, (ii) família dos inibidores Bowman-Birk de soja, (iii) família dos inibidores I de batata e (iv) família dos inibidores II de batata (Laskowski & Kato, 1980). Além destas, no ano de 1985, foram criadas famílias dos inibidores de tripsina de abóbora.

O interesse por peptídeos, principalmente os isolados de plantas, com a capacidade de inibir a atividade de proteases específicas e que concomitantemente possuem atividade antimicrobiana, tem despertado a atenção de muitos pesquisadores e vários são os trabalhos que vem demonstrando essas funções. Sels *et al.* (2008) incluíram, recentemente, novas classes de proteínas relacionadas a patogênese (PR) de

plantas, identificadas durante a última década, dentro da família dos peptídeos de plantas. Estes peptídeos relacionados a patogênese incluem os inibidores de proteinases, as defensinas de planta, as tioninas e as proteínas transportadoras de lipídeos, como parte das famílias PR6, PR12, PR13 e PR14, respectivamente.

Caracterização das espécies *Capsicum* L. utilizando dados anatômicos e moleculares

(Artigo aceito para publicação na revista Genetic Molecular and Research - GMR)

2.1 – INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Capsicum* são membros da família Solanaceae (tribo Solaneae, subtribo Capsicinae) que inclui espécies de importância econômica como o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), a batata (*Solanum tuberosum* L.), o tabaco (*Nicotiana glauca* L.) e petúnia (*Petunia integrifolia* (Hook.)). A produção de cultura de pimenta é importante para o agronegócio em todo o mundo, e este mercado estimula a agricultura familiar, o aumento do emprego e a geração de renda para a população (Reifschneider & Ribeiro, 2008), dentre outras. Este gênero contém cerca de 31 espécies (Moscone *et al.*, 2007), das quais cinco são domesticadas e abrangem as espécies *C. annum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L. e *C. pubescens* R. (IBPGR, 1983).

O principal continente produtor de pimentas e pimentões no mundo é a Ásia, especialmente representada pela China, que produziu aproximadamente 254 mil toneladas, seguido pela Índia que produziu 1,23 milhões de toneladas em 2008 (FAO 2010). No Brasil, Reifschneider & Ribeiro (2008) argumentam que este é um mercado que movimenta em torno de 100 milhões de dólares por ano, incluindo o consumo interno e das exportações. Ainda segundo esse autor, as pimentas vermelhas estão em terceiro lugar em produção e consumo de temperos vegetais no Brasil (Vilela, 2008).

Capsicum é nativa da América Central e do Sul (Perry *et al.*, 2007). Para este gênero, foram estabelecidas duas áreas de origem: um chamado centro principal e, em seguida, um outro chamado de centro secundário (Mongkolporn & Taylor, 2011). O Brasil é considerado um centro secundário de diversidade deste gênero.

Devido ao elevado grau de variação fenotípica das formas, tamanhos e cores dos frutos, assim como na morfologia geral das plantas deste gênero, muitas variedades foram classificadas de forma errônea (Clement *et al.*, 2010). Uma identificação errada das espécies mantidas em bancos de genes pode levar a perdas enormes, resultando em

um desperdício de tempo e recursos financeiros (Sudré *et al.*, de 2010). Por isso, a identificação de espécies tem grande importância taxonômica. Além disso, uma classificação correta das espécies botânicas é essencial para o bom gerenciamento de coleções de germoplasma.

Em relação à complexidade da taxonomia do gênero *Capsicum*, suas espécies podem variar consideravelmente em relação às características anatômicas das folhas, flores e frutos. Estas variações muitas vezes são fatores relacionados às condições geográfico-climáticas onde as plantas habitam (Petters, 2002). Em geral, estas identificações de gênero e espécies são feitas pelas características morfológicas que são observadas principalmente em flores (Sudre *et al.*, 2010). No entanto, características de flores não são suficientes. Em geral, uma combinação dos caracteres diagnósticos associados a características genéticas é geralmente necessária para identificar e diferenciar espécies do gênero *Capsicum*.

A caracterização e a avaliação da espécie domesticada de *Capsicum* são particularmente interessantes para curadores de bancos de genes, uma vez que uma grande variabilidade, ainda não totalmente conhecida e explorada, está disponível para estas espécies (Ince *et al.*, 2009). Apesar da divergência genética entre acessos constatada através de marcadores moleculares, o conhecimento do fenótipo dado pela morfologia ainda é importante. Além do aspecto de identificação das espécies corretas, a caracterização e avaliação de genótipos conservados são de importância fundamental, aumentando o conhecimento e tornando possível detectar genótipos superiores para uso em programas de melhoramento (Laurentin, 2009).

2.2 – OBJETIVOS

Neste capítulo, este estudo teve como objetivo analisar a divergência genética entre os quatro acessos de *Capsicum* com base na morfologia e dados moleculares e estimar a relação entre as distâncias genéticas obtidas com base em características morfológicas por marcadores ISSR, com os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar a anatomia dos sistemas de revestimento, fundamental e vascular das folhas, semente e frutos das espécies: *Capsicum baccatum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. annuum*;
- Caracterizar a micromorfologia da superfície das folhas, semente e fruto das espécies em questão;
- Detectar por meio da histoquímica a presença de metabólitos secundários nas folhas, semente e fruto das espécies estudadas;
- Verificar a correlação entre variáveis moleculares do tipo ISSR através de análise dos componentes principais e de agrupamentos das espécies em questão.

2.3 – MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 - Material Botânico

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na área de convênio da UENF com a PESAGRO-RIO, Estação Experimental de Campos, em Campos dos Goytacazes, RJ, no período de agosto de 2009 a dezembro de 2011. As sementes das espécies foram cedidas pela Dr^a. Rosana Rodrigues (Laboratório de Melhoramento e Genética Vegetal - UENF). Estas foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células, com substrato organo-vegetal, e, após o surgimento de dois pares de folhas definitivas, as mudas foram transferidas individualmente para vasos plásticos contendo uma mistura de solo e substrato, na proporção de 2:1. As sementes germinadas, caracterizadas pela protrusão da radícula, se desenvolveram até atingirem a fase adulta em casa de vegetação, depois foram levadas para o laboratório para análise. Os acessos utilizados estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação dos acessos de espécies de *Capsicum* selecionados.

Nº	Acessos	Espécies
1	UENF - 1381	<i>Capsicum annum</i>
2	UENF -1732	<i>Capsicum baccatum</i>
3	UENF -1755	<i>Capsicum chinense</i>
4	UENF -1775	<i>Capsicum frutescens</i>

2.3.2 – Preparo de Amostra para Microscopia Óptica

As amostras dos órgãos (sementes, folhas, e frutos) foram fixadas em uma solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4,0% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2, por 2 h. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes de uma hora no mesmo tampão e pós-fixadas em uma solução de tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2), à temperatura ambiente por duas horas. Após três lavagens de uma hora no mesmo tampão, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de acetona (50, 70, 90% e três vezes 100%). Em seguida, foram submetidas à etapa de infiltração onde a acetona foi substituída gradualmente pela resina epoxi (Epon 812). As amostras em resina pura foram colocadas em formas e levadas a estufa a 65 °C por 48 h para a polimerização e obtenção de blocos. Em ultramicrótomo foram retirados cortes semifinos, entre 0,60 e 0,70 µm de espessura com o auxílio de faca de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina 1% por 1 min. As lâminas foram seladas com Entelan e observadas e documentadas em microscópio de campo claro (Axioplan ZEISS), acoplado à câmera Cannon Power Shot A640.

2.3.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras foram fixadas em uma solução de glutaraldeído 2,5 %, formaldeído 4,0% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2, por duas horas, em seguida foram feitas três lavagens de uma hora no mesmo tampão. As amostras foram pós-fixadas em uma solução de tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2), à temperatura ambiente por duas horas. Após três lavagens de uma hora no mesmo tampão, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de acetona (50, 70, 90% e três vezes 100%). Após a desidratação, as amostras foram submetidas ao ponto crítico, com o auxílio do aparelho Bal-TecCritical Point Dryer CPD 030.

Em seguida, os fragmentos foram fixados com fita adesiva de carbono em suportes próprios e cobertos com uma fina camada de ouro de 20 nm (Bal-Tec Sputer Coater SCD 050). As amostras foram observadas e documentadas em microscópio eletrônico de varredura DSEM-ZEISS 962, em diferentes acelerações de voltagem.

2.3.4 – Histoquímica

2.3.4.1 – OBTENÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS

A metodologia para análises histoquímicas foi feita a partir de cortes finos. Os cortes (à mão livre) foram obtidos do material fresco ou do material fixado, para enfatizar presença sobre os sítios de armazenamento e/ou sítio de substâncias químicas ou grupos de compostos do metabolismo primário e secundário nas plantas.

2.3.4.2 – ANÁLISE HISTOQUÍMICA DOS ÓRGÃOS DE ESPÉCIES DE *Capsicum*

As análises histoquímicas foram feitas de acordo com Ascensão (2003), com algumas modificações. Os cortes foram submetidos a diversos reagentes e corantes. Os reagentes utilizados foram:

Para detecção de lipídeos totais, paredes cutinizadas e suberificadas, foi usado sudan IV etanólicos durante 20-30 min. Os cortes foram lavados por duas a três vezes em etanol 80% e depois colocados em lâminas e lamínula com glicerina 50%.

Para detectar a presença de lignina na parede celular os cortes foram colocados na lâmina e submetidos a 1 mL de floroglucinol, seguido de gotas de ácido clorídrico e o material foi marcado pela coloração vermelha (Teste de Wisner).

Para avaliar a presença de compostos pécticos, os cortes foram submetidos a uma solução aquosa de vermelho de rutênio 0,05% por 10 segundos. A presença de pectinas foi detectada no local onde foi observada uma coloração vermelha.

Para detectar os compostos através de ocorrência de metacromasia na parede periclinal externa, os cortes foram submetidos a uma solução aquosa de azul de toluidina a 0,05% por 15 segundos a um pH de 6,8.

Para detecção de alcalóides, os cortes foram colocados em placa de Petri contendo reativo de Dragendorff (solução de nitrato de bismuto pulverizado, ácido clorídrico 0,1 M e iodeto de potássio 0,1 M) durante dois minutos. Em seguida foram lavados em água destilada e montados em água entre lâmina e lamínula. A presença de alcalóides foi detectada no local onde se observou uma coloração escura.

Para detectar a presença de compostos fenólicos, os cortes foram submetidos a solução de cloreto férrico a 10% durante dois minutos. A seguir foram lavados em água

destilada e montados entre lâmina e lamínula. A presença dos compostos fenólicos foi detectada no local onde foi observada uma coloração marrom escuro.

A detecção de proteínas totais foi feita com o corante Azul de Comassie 0,25% em ácido acético 7%. A presença de proteína foi evidenciada pela coloração azul.

Para diferenciar a parede celular primária e celulósica e os tecidos com paredes secundárias e lignificadas os cortes foram submetidos a uma solução aquosa de azul de Astra a 0,5% por 10 segundos e, posteriormente, a uma solução aquosa de fucsina básica a 0,25% por 5 segundos. A lignina ficou corada em vermelho e a celulose em azul.

As imagens foram obtidas através de uma câmera Cannon Power Shot A640, acoplada ao microscópio Axioplan Zeiss.

2.3.5 – Biometria das Sementes de *Capsicum*

O tamanho das sementes foi mensurado utilizando-se 10 repetições de 10 sementes para cada uma das espécies estudadas; foram feitas medições de comprimento, da largura e de espessura das sementes. As medições foram feitas com paquímetro eletrônico.

Para descrição morfológica, as sementes foram cortadas com lâmina de barbear e observadas em estereomicroscópio, sendo fotografadas e posteriormente descritas. A descrição morfológica foi feita com base em Barroso *et al.* (1999).

2.3.6 - Material Genético

Os acessos como descrito na tabela 1 foram avaliados. A coleta das folhas foram feitas em “bulk”, com cerca de 16 indivíduos de cada genótipo, após 25 dias de plantio. Em seguida, as folhas foram embaladas em papel alumínio e conservadas em gelo até a transferência para o ultrafreezer a -80 °C. Os procedimentos laboratoriais, tais como, extração de DNA, amplificação de fragmentos, eletroforese e fotodocumentação, foram desenvolvidos no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF (LMGV/CCTA/UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ.

2.3.7 – Análise Molecular

2.3.7.1 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As folhas jovens, sadias e em fase ativa de crescimento foram coletadas logo nas primeiras horas da manhã, já que as plantas mantidas no escuro acumulam menor teor de polifenóis (Sharma *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2009). As folhas correspondentes a cada acesso (Tabela 1) foram enroladas em papel alumínio, identificadas e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido para que não ocorresse a degradação do DNA. Uma vez no laboratório, este material foi macerado em nitrogênio líquido até formar um pó bastante fino.

2.3.7.2 – EXTRAÇÃO DO DNA

Cerca de 50 mg de tecido macerado foram transferidos para tubos de 1,5 mL e imersos em nitrogênio líquido para a extração de DNA, de acordo com o protocolo Plant Genomic DNA mini Kit – RBC, fornecedor Bioamerica (Kit n. YGP100), com modificações, descritas a seguir.

Foram adicionados aos tubos contendo as amostras, 400 μL do tampão GPX1, e incubados a 65 °C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 10 μL de RNase (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 100 μL do tampão GP2 em cada uma das amostras. Este material foi incubado em gelo por 3 min e centrifugado a 13.000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo devidamente identificado e adicionado 750 μL do tampão GP3 a suspensão foi centrifugada por 2 min a 13.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, o material foi seco em condições naturais, até que o etanol estivesse evaporado. Em seguida, o material foi ressuspensionado em 100 μL de solução TE (Tris-EDTA – 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8,0) com RNase em uma concentração final de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e incubado em banho-maria a 37 °C por 30 min. Logo após, o material foi armazenado a – 20 °C até o uso.

2.3.7.3 – QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Para avaliação da concentração e da qualidade de DNA, as amostras foram avaliadas em gel de agarose a 1,0%, sendo a concentração das bandas determinada pelo Programa Image, utilizando-se como padrão um marcador de 250 pb. Em seguida, as amostras foram coradas com a mistura de “Blue Juice” seis vezes com “Gel Red”, na proporção de 1:1. Posteriormente o DNA foi diluído (5 ng.mL^{-1}) para as reações em cadeia de polimerase (PCR).

2.3.8 – Marcador ISSR

2.3.8.1 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

As reações de amplificação foram processadas em um volume final de 13 μL , contendo os seguintes reagentes: 1,5 μL do tampão 10 X (10 mmol.L^{-1} de Tris HCl, pH 8,3; 50 mmol.L^{-1} de KCl); 1,5 μL do MgCl_2 50 mM; 1,5 μL de cada um dos dNTP 10 mM; 2 μL de oligonucleotídeos iniciadores; 5 ng de DNA genômico e 0,12 unidade de Taq DNA polimerase. Foram aplicadas 2 μL de amostra, e posteriormente adicionado a mistura de reação descrita anteriormente.

As reações de PCR (GeneAmp PCR System 9700 Thermalcycler - AppliedBiosystems) foram conduzidas da seguinte forma: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial, seguindo-se os 40 ciclos, cada um consistiu de 94 °C por 1 min, 40-55 °C por 1 min (dependendo do iniciador utilizado), 72 °C por 3 min, e uma extensão final a 72 °C por 7 min. Os fragmentos amplificados foram então separados em gel de agarose 1,5%, corados com gel red, e submetidos à luz UV para visualização dos resultados (Fotodocumentador Minibis Pro – Bio-Imaging System). As imagens dos géis foram capturadas para posterior análise.

2.3.8.2 – SELEÇÃO DE INICIADORES

As condições de amplificação foram otimizadas para cada iniciador, detectando-se a temperatura mais adequada para amplificação. Foram utilizados 41 iniciadores descritos na tabela 4 (UCB primers – Columbia, Canadá).

2.3.9 - Análise Estatística de Dados

2.3.9.1 - ANÁLISE DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Os dados foram obtidos pela avaliação visual das bandas mais consistentes e evidentes nos quatro acessos estudados. Estes foram utilizados para elaboração de uma matriz de dados binários, utilizada para calcular a matriz de dissimilaridade, em que o número 1 correspondeu à presença de banda, o zero, à ausência de banda, e quando não foi possível determinar se a banda estava presente ou não em função da não amplificação de um dado acesso para um determinado iniciador, foi computado como número 2.

A análise de todos os dados foi feita pelo programa Genes (Cruz, 2006), com exceção dos dendrogramas que foram obtidos pelo método UPGMA, e gerados com o auxílio do programa R (www.r-project.org). Posteriormente, foi realizada a correlação cofenética entre a matriz de agrupamento e a matriz de distância.

2.3.9.2 - DIVERGÊNCIA GENÉTICA

Após a exclusão dos marcadores monomórficos estimou-se a dissimilaridade genética entre os acessos de espécies de *Capsicum*. Para obtenção da matriz de dissimilaridade foi utilizado o complemento aritmético do Índice de Jaccard. Esse coeficiente consiste na comparação do número de presenças de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas (Meyer, 2002). Este coeficiente é definido pela expressão: $D_{ij} = 1 - S_{ij}$

Onde:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

$$a + b + c$$

a = número de bandas presentes nos acessos i, j;

b = número de bandas presentes no acesso i e ausentes no acesso j;

c = número de bandas presentes no acesso j e ausentes no acesso i.

O agrupamento foi realizado a partir dos dados dessa matriz. Para esta análise foi utilizado o método hierárquico de UPGMA. Segundo Cruz & Regazzi (2004), este método permite ao pesquisador verificar o grau de similaridade entre genitores, genitores e grupos similares, ou entre grupos distintos.

No método UPGMA, a distribuição dos indivíduos no dendrograma não segue um critério de formação de grupos, uma vez que o principal aspecto deste método consiste nas ramificações que são obtidas. Os indivíduos são agrupados aos pares, utilizando-se médias aritméticas da dissimilaridade. O dendrograma prioriza os genótipos com maior similaridade, e as distâncias entre um indivíduo e um grupo formado pelos indivíduos i e j são calculadas por:

$d(ij)k = \text{média } \{dik + djk\} = (dik + djk)$, onde:

$d(ij)k = \text{distância média entre o grupo } ij \text{ e o indivíduo } k$;

$dik = \text{distância entre os indivíduos } i \text{ e } k$;

$djk = \text{distância entre os indivíduos } j \text{ e } k$.

2.4 – RESULTADOS

Os aspectos anatômicos e micromorfológicos das folhas, frutos e sementes das espécies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum*, foram avaliadas através de técnicas de microscopia óptica e eletrônica de varredura. Por meio da utilização destas técnicas foram analisadas, em cada espécie estudada, características da lâmina foliar, do pecíolo, da semente e do fruto.

2.4.1 – Anatomia Foliar

A análise anatômica demonstrou que a epiderme foliar no terço médio das quatro espécies estudadas exibem, em vista frontal, células com paredes anticlinais sinuosas em ambas as faces (Figura 4A, B, C, F). Em secção transversal, da lâmina foliar, foi observado que as espécies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum* apresentam epiderme unisseriada coberta por uma cutícula ligeiramente mais espessa na superfície adaxial (Figura 4A, B, C e F e G). As células epidérmicas mostram forma retangular e as células da face adaxial são maiores do que da face abaxial (Fig. 4D). As paredes pericliniais externas mostram-se acentuadamente convexas (Figura 4F e G). Na face adaxial, as células apresentam-se ligeiramente maiores em relação às da face abaxial.

As quatro espécies de *Capsicum* estudadas apresentam mesofilo dorsiventral na lâmina foliar (Fig. 4C). O parênquima paliçádico é constituído de uma camada de células alongadas e o parênquima lacunoso de 4 a 5 camadas de células com formas diferentes e conspícuos espaços intercelulares (Fig. 4A, C e F).

Os feixes vasculares do tipo biclateral foram observados imersos no mesofilo das quatro espécies estudadas com floema intraxilemático (Fig. 4E).

Os estômatos das espécies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum* são do tipo anomocíticos e dispostos em mesmo nível das demais células epidérmicas. Os estômatos são observados em ambas as superfícies das quatro espécies estudadas, o que caracteriza uma folha anfiestomáticas (Fig. 5A e B).

As espécies *C. chinense* e *C. baccatum* apresentam tricomas tectores, e em *C. baccatum* o tricoma é em forma de gancho (Fig. 5C). Tricomas glandulares foram

observados em *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. baccatum* (Fig. 5D). Neste sentido foi observado polimorfismo para os tipos de tricomas.

Tricomas tectores com ornamentação verrucosa nas superfícies do pecíolo foram observadas nas espécies de *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* (Fig. 5E e F).

O pecíolo das quatro espécies estudadas, quando vistos em secção transversal e ao nível da inserção da folha sobre os ramos, apresenta contorno côncavo na face adaxial e convexo na face abaxial (Fig. 6A). A epiderme é unisseriada e suas células são cobertas com uma fina cutícula (Fig. 6B). Apresenta colênquima do tipo angular (Fig. 6C) representada por 2-3 camadas de células composto de 4 a 5 subcamadas da epiderme (Fig. 6D). As células do parênquima apresentaram forma isodiamétricas, que variam em tamanho e apresentam espaços intercelulares do tipo meato (Fig. 6E). O sistema vascular dispõe-se em arco, com o floema em torno do xilema de ambos os lados, com um sistema bicolateral vascular nos quatro espécies estudadas.

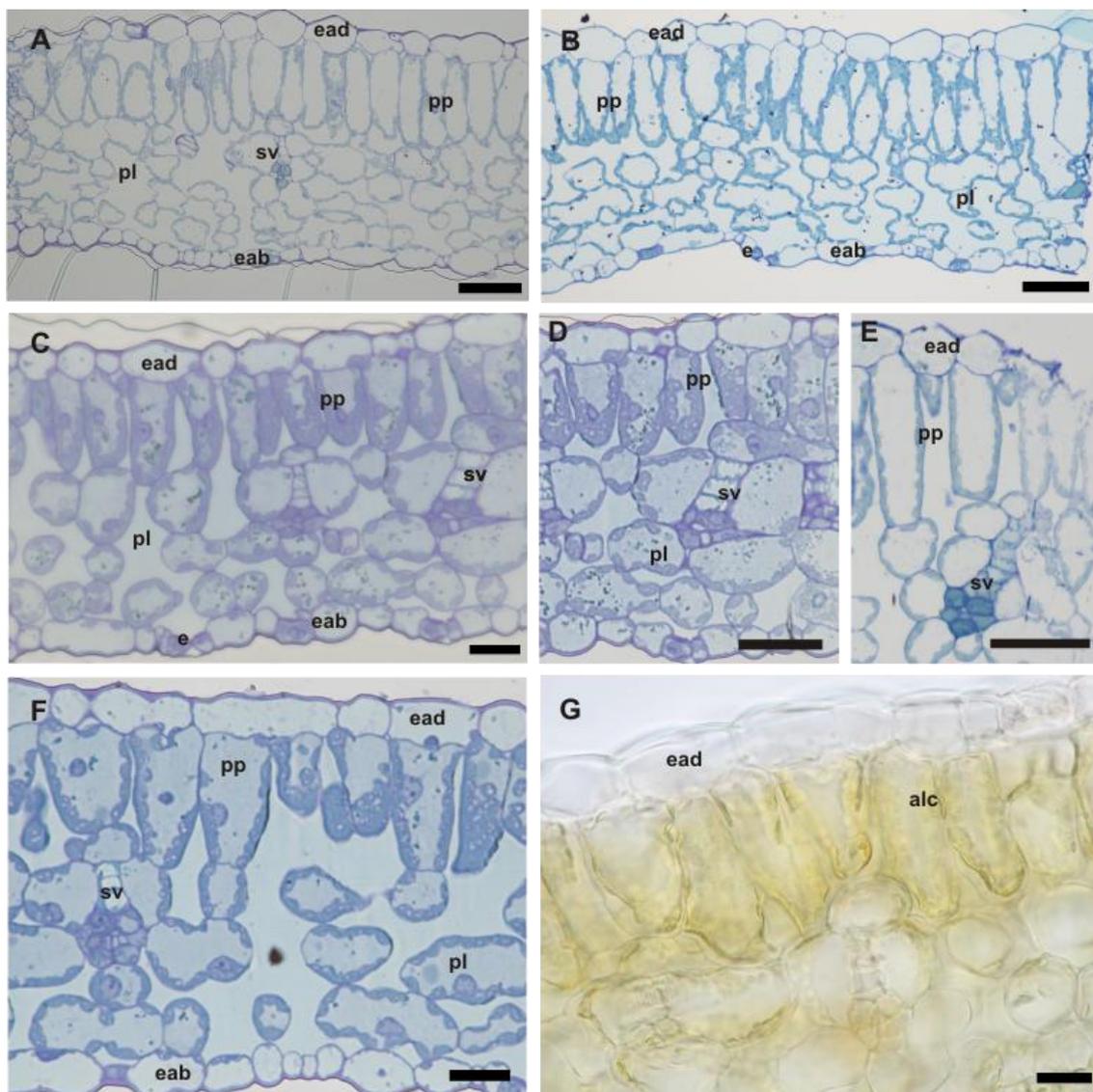


Figura 4 – Anatomia de folhas de espécies do gênero *Capsicum* em seção transversal. A – Lamina foliar de *C. annum*. B – Lâmina foliar de *C. baccatum*. C - Lâmina foliar de *C. chinense*. D – Detalhe da lâmina foliar de *C. chinense*. E - Detalhe do sistema vascular de *C. baccatum*. F - Seção transversal da folha de *C. frutescens*. G – Reação de detecção de alcalóides em *C. chinense*. Barras: A e B - 50 μm ; C – G – 20 μm . Legenda: ead – epiderme adaxial; eab – epiderme abaxial; e – estômatos; alc – alcalóide; pp - parênquima paliçádico; pl - parênquima lacunoso; sv – sistema vascular.

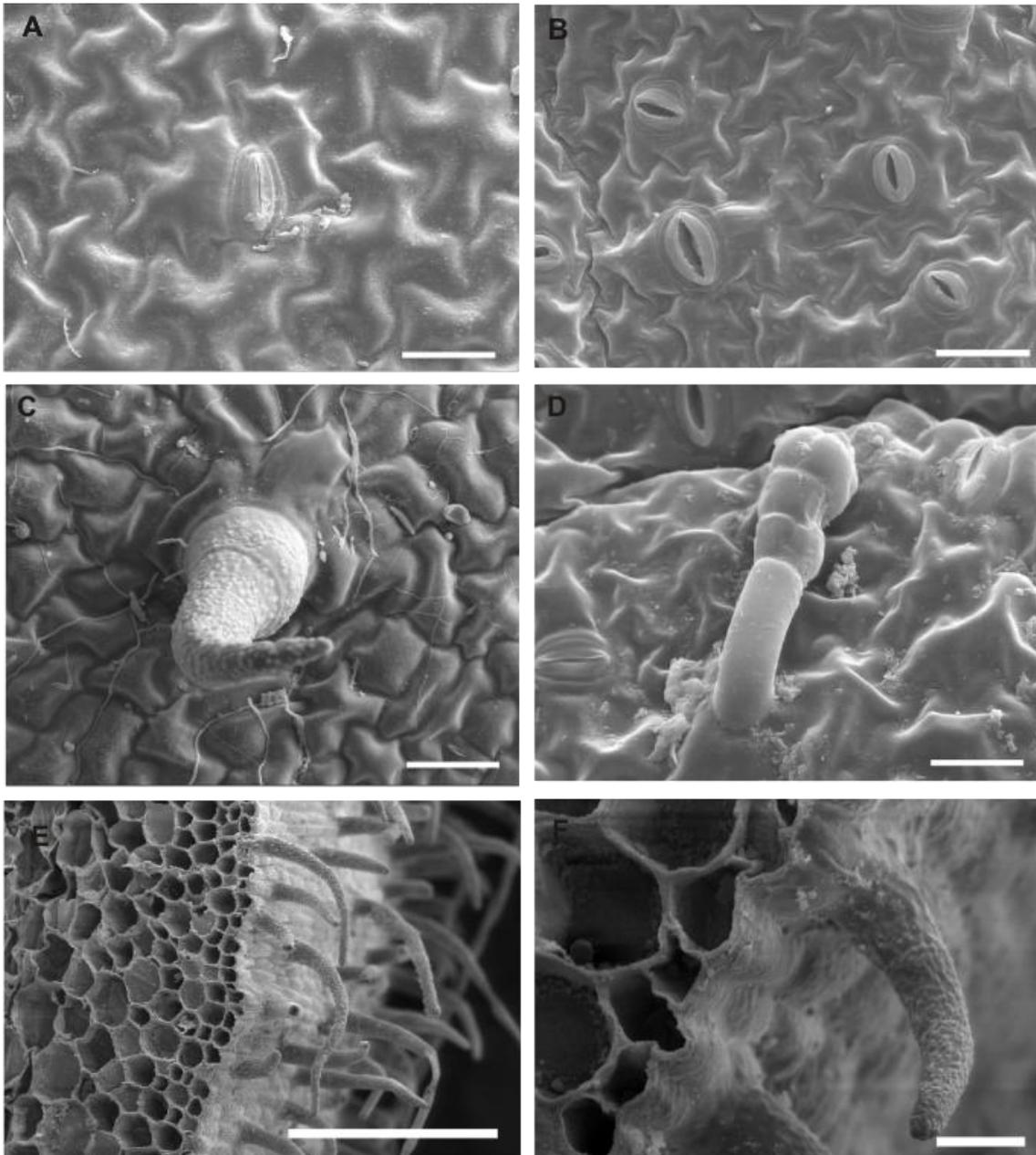


Figura 5 - Micromorfologia das folhas de espécies do gênero *Capsicum*. A - Superfície abaxial de *C. baccatum*, com ornamentação e fina camada de cera epicuticular. B - Ornamentação cuticular da superfície abaxial de *C. annuum*. Estômatos anomocíticos em ambas as superfícies da folha. C - Tricomas tectores com superfície ornamentada de folha *C. baccatum*. D - Tricomas glandulares ornamentados na superfície da folha de *C. baccatum*. E - Seção transversal do pecíolo, em microscópio eletrônico de varredura mostrando tricoma tector de *C. chinense*. F - Detalhe do tricoma tector ornamentado. Barras: A e B - 25 μm , C, D e F - 20 μm , E - 200 μm .

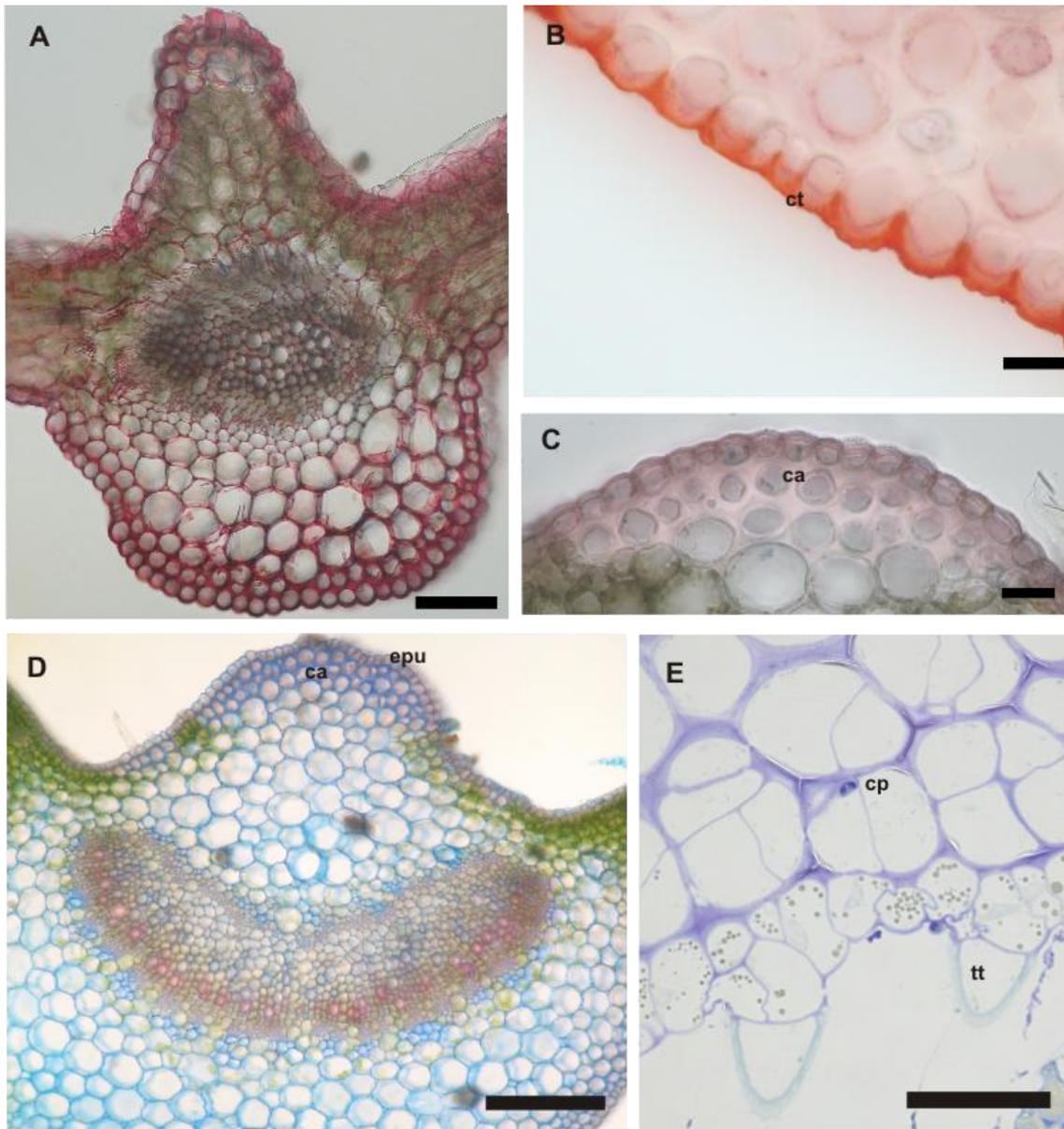


Figura 6 - Anatomia do pecíolo de espécies do gênero *Capsicum*. A - Seção transversal do pecíolo de *C. baccatum*. B - Superfície adaxial de *C. chinense*, com ornamentação e fina camada de cera epicuticular. C - Colênquima do tipo angular de *C. chinense*. D - Corte anatômico do pecíolo de *C. chinense*. E - Tricomas tectores ornamentada na superfície do pecíolo. Barras: A - 100 μm ; B, C e E - 20 μm ; D - 50 μm . Legenda: epu - epiderme unisseriada; ca - colênquima angular; tt - tricoma tector; ct - cutícula; cp - células do parênquima.

2.4.2 - Anatomia de Sementes

As sementes das espécies estudadas de *C. annum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum* são semelhantes em estrutura e forma, mas variaram em relação ao tamanho (Tabela 2).

Essas sementes são campilótropas (óvulo com eixo em forma de ferradura) (Fig. 7A e B), elipsóides, compridas, apresentando seção longitudinal largo-ovalada e seção transversal elíptica, sulcadas longitudinalmente na face plana e constituem-se de embrião, endosperma e um envoltório (Fig. 7C), representado por uma película prateada (Fig. 7D).

As sementes das quatro espécies de *Capsicum* são albuminosas (endosperma persiste durante o desenvolvimento do embrião), com endosperma abundante, semitransparente e coloração esbranquiçada (Fig. 8A).

Todas as quatro espécies possuem embrião circinado (Fig. 8A e B). O tegumento é reduzido a uma camada interna e a outra camada externa com mesofilo colapsado (Fig. 8C).

A epiderme externa é formada por uma camada compacta de células unisseriadas e justapostas, levemente onduladas e espessadas. O espessamento conspícuo da parede periclinal interna mostra uma composição lignificada, como evidenciado pela coloração azul esverdeada, obtida através do reagente azul de toluidina (Fig. 8D). A epiderme interna é vista como uma camada de células compridas e retangulares (Fig. 8E). Essas características coincidem com as observadas em microscopia eletrônica de varredura (Fig. 8C). A epiderme do tegumento é diferenciada para as quatro espécies estudadas, quando observadas ao microscópio eletrônico de varredura (Fig. 9A – D).

Tabela 2 – Médias de comprimento, largura e espessura das sementes de espécies estudadas de *Capsicum* (n= 100 indivíduos).

Espécie	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Peso de 1000 sementes (g)
<i>C. chinense</i> 1755	4,37	3,92	0,82	6,57
<i>C. annum</i> 1381	2,94	3,23	0,71	5,18
<i>C. baccatum</i> 1732	2,71	2,84	0,77	5,91
<i>C. frutescens</i> 1775	2,69	3,18	0,61	4,29

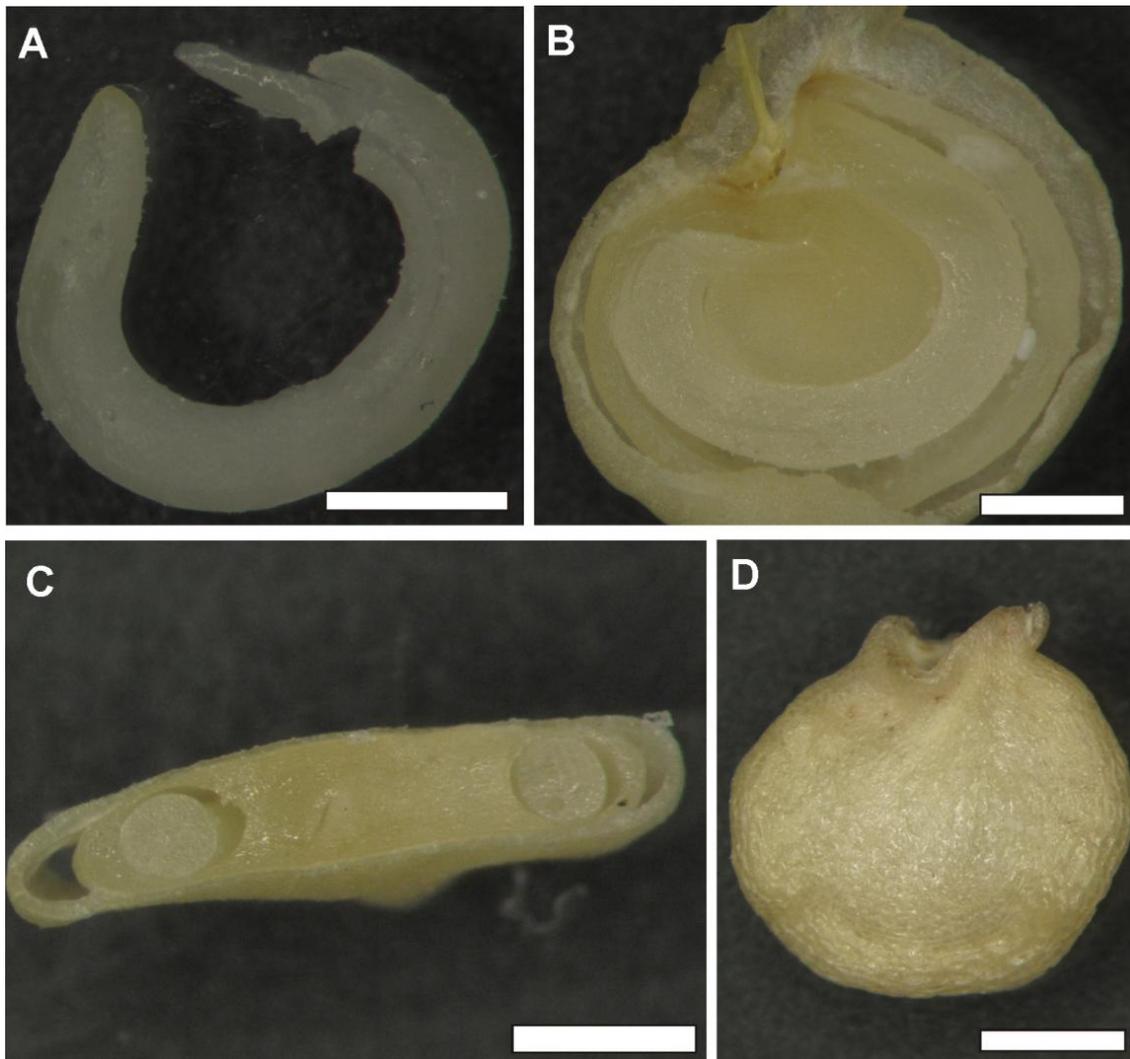


Figura 7 – Anatomia das sementes de espécies do gênero *Capsicum*. Espécies de *Capsicum chinense*. A - Seção longitudinal do eixo embrionário do tipo circinado. B - Corte longitudinal da semente inteira mostrando suas formas elipsóides, longo, oval. C - Seção transversal da semente inteira mostrando a sua forma elíptica. D - Sementes de *Capsicum chinense* inteira. Barras: A, C e D - 1 mm, B - 1 mm.

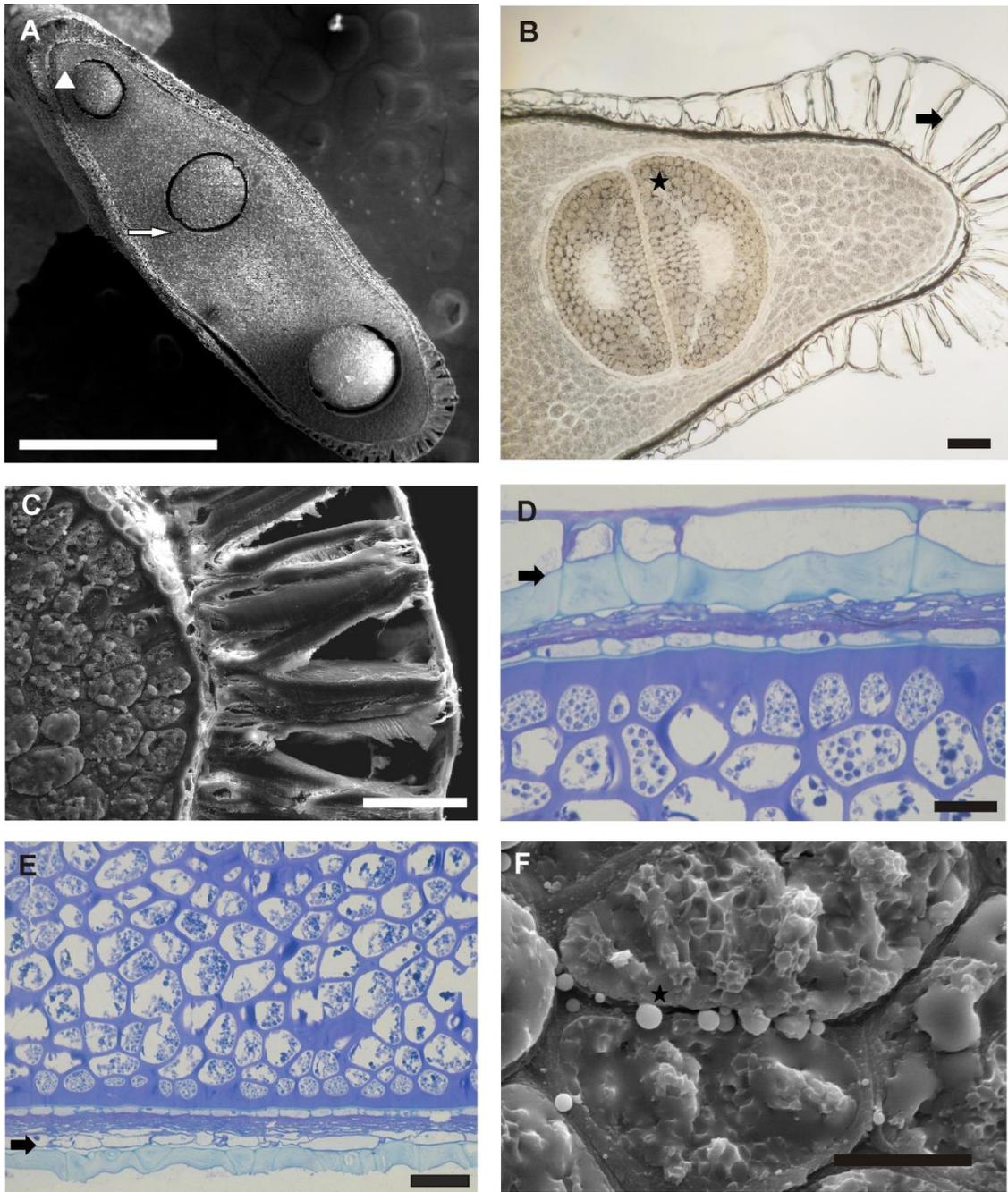


Figura 8 – Anatomia e micromorfologia das sementes de espécies do gênero *Capsicum*. A - Seção transversal da semente de *C. baccatum* visualizando o eixo embrionário (triângulo) e um duplo cotilédone (seta). B - Secção transversal de sementes de *C. chinense* visualizando o cotilédone (estrela) e tegumento (seta). C - Superfície externa da epiderme do tegumento com parede anticlinal ondulada da espécie *C. baccatum*. D - Camada externa da epiderme formada a partir de uma célula compacta mais ou menos células com paredes espessadas e onduladas da espécie de *C. annuum* (seta). E - Epiderme interna da camada é geralmente retangular e com células alongadas da espécie de *C. annuum* (seta). F - Detalhe dos grânulos de amido no endosperma da espécie de *C. frutescens* (estrela). Barras: A – 1 mm; B – 200 μm; C - 50 μm, D e E - 20 μm; F - 10 μm.

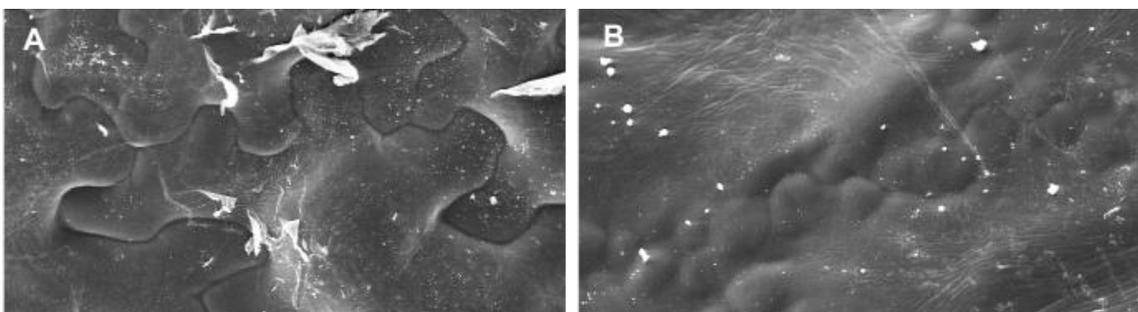


Figura 9 – Micromorfologia das sementes de espécies do gênero *Capsicum*. A – Epiderme do tegumento de *C. annuum*. B - Epiderme do tegumento de *C. chinense*. C - Epiderme do tegumento de *C. baccatum*. D - Epiderme do tegumento de *C. frutescens*. Barras: A, B e D – 50 μm ; C – 20 μm .

2.4.3 - Anatomia dos Frutos

Em termos botânicos, o fruto das espécies de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, define-se como uma baga, de estrutura oca e forma lembrando uma cápsula.

A grande variabilidade morfológica apresentada pelos frutos é destacada pelas múltiplas formas, tamanhos e colorações. Os frutos das quatro espécies investigadas são de tamanho pequeno a médio variando de 1 a 8 cm de diâmetro e apresentaram variações de cores e formas.

C. annuum apresenta frutos com formato triangular, pericarpo espesso e cuja cor muda de verde escuro, quando imaturos, para vermelho, quando maduros. Em *C. baccatum*, as características do fruto desta espécie, em relação a cor e dimensões do fruto, são similares à espécie *C. annuum*, mas o seu formato é em forma de “chapéu”. *C. frutescens* apresentam frutos de coloração vermelha quando maduros, formato cônico e parede delgada e em *C. chinense* o fruto apresentou a cor marrom quando maduro e formato alongado (resultados não mostrados).

O pericarpo dos frutos das espécies *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* é composto por três áreas bem distintas: o exocarpo, mesocarpo e endocarpo.

O exocarpo dos frutos das espécies de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* apresentaram epiderme unisseriada, sem sobreposição de células tabulares e com textura densa e paredes celulósicas tipicamente encontradas em bagas. A cutícula foi bastante variável e habitualmente espessa como mostra o fruto da espécie de *C. chinense* (Fig. 10A).

Em todas as espécies estudadas, uma camada de cutícula espessa foi observada nas células epidérmicas. Logo abaixo da epiderme, observou-se uma hipoderme diferenciada compreendendo várias camadas de células de colênquima, como observado em *C. frutescens* (Fig. 10B). A epiderme e a hipoderme constituem uma unidade, o exocarpo, que geralmente têm camadas que reduzem gradualmente o grau de lignificação de fora para dentro do fruto. Normalmente, em frutos imaturos, as camadas de células localizadas abaixo da epiderme apresentam cloroplastos e cromoplastos, o mesmo não acontece para frutos maduros, onde os cloroplastos desaparecem e as células tornam-se comprimidas. O colênquima sempre está presente, com o número de camada que irá variar conforme o grau de lignificação de acordo com as espécies.

O mesocarpo é composto por duas zonas distintas: uma externa (imediatamente abaixo da hipoderme), e uma interna. As espécies estudadas apresentam o mesocarpo

composto de cinco camadas colênquima, seguido pelo parênquima e feixes vasculares acompanhados externamente por fibras perivasculares (Fig. 10C).

Finalmente, foi observado o endocarpo; esta camada é muito difícil de ser observada devido à sua estrutura delicada. As espécies *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* apresentam a camada da endoderme unisseriada com células parenquimáticas com diferentes tamanhos e formas e uma parede fina (Fig. 10D).

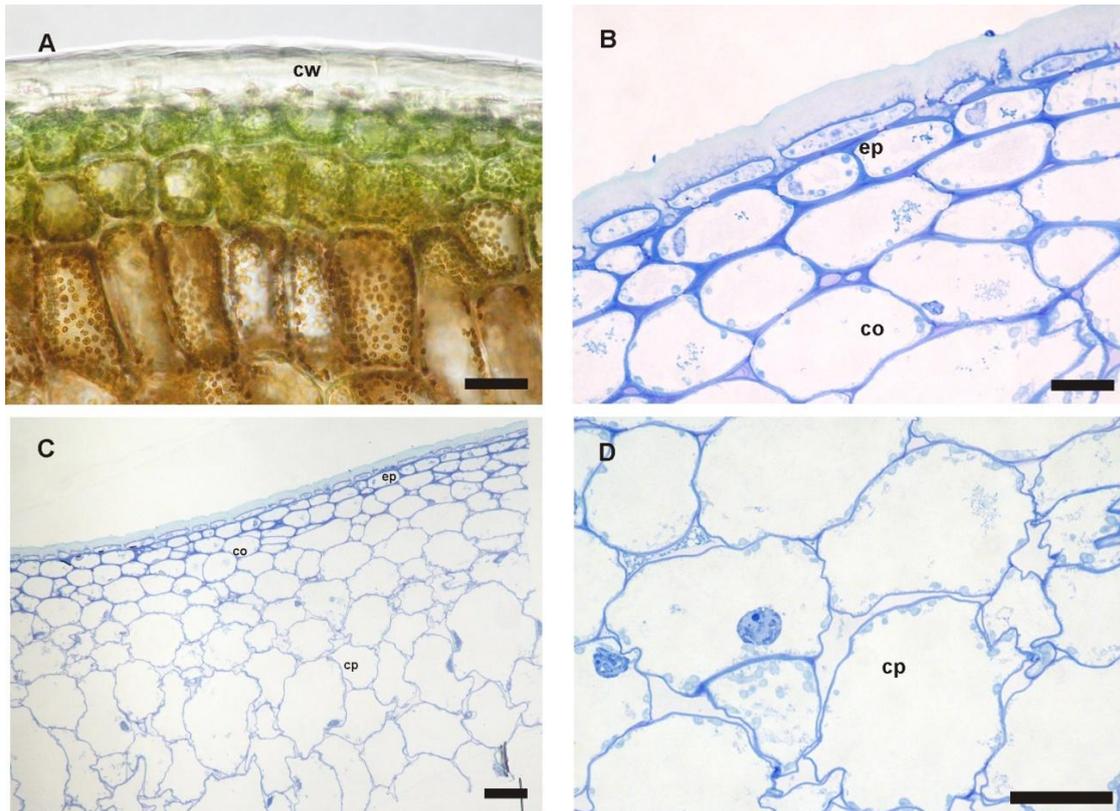


Figura 10 – Corte transversal do fruto de espécies de *Capsicum*. A - Detalhe da cutícula do fruto de *C. chinense*. B – Exocarpo de *C. frutescens*. C – Mesocarpo de *C. baccatum*; D - Detalhe do endocarpo de *C. annuum*. Barras: A e B - 20 μ m; C - 10 μ m; D - 40 μ m. Legenda: cw: cutícula; ep: epiderme; co: colênquima; cp: células do parênquima.

2.4.4 – Histoquímica

Os resultados dos testes histoquímicos estão resumidos na Tabela 3.

A caracterização de grãos de amido por lugol nas espécies *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* mostram que estes estão presentes em grande quantidade nas sementes e nos tecidos do parênquima; no pecíolo estes foram encontrados apenas nas células do parênquima cortical e na lâmina foliar na região do mesofilo. Em tecidos dos frutos não foram encontrados grãos de amido.

As substâncias lipídicas presentes em todos os órgãos analisados estão bem evidenciadas no sistema vascular, cutícula, súber e no interior de células parenquimáticas, pela coloração vermelha obtida através do reagente Sudan IV, sob a forma de gotículas.

A presença de alcalóides foi evidenciada também nas células da epiderme e mesofilo das folhas e em todos os tecidos das sementes e frutos. Foi verificada após aplicação do reagente vermelho de rutênio, a presença de substâncias pécnicas nas paredes das células epidérmicas e na célula basal dos tricomas tectores, resultando em coloração rosa.

Os compostos fenólicos em luz visível e taninos estão ausentes em todos os órgãos, mostrando reação negativa para esses compostos.

As proteínas, ocorrem em todos os órgãos das espécies de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*. Ligninas coradas em presença de floroglucinol coram de vermelho, estiveram presentes nos tecidos da epiderme e tecidos do sistema vascular.

Tabela 3 - Resultados dos testes histoquímicos nas 4 espécies estudadas de *Capsicum*. (+) reação positiva; (-) reação negativa.

Compostos / Reagentes	Material Analisado - <i>Capsicum</i> sp.															
	<i>C. annum</i>				<i>C. baccatum</i>				<i>C. chinense</i>				<i>C. frutescens</i>			
	teg	cot	end	emb	teg	cot	end	emb	teg	cot	end	emb	teg	cot	end	emb
Alcalóide / Dragendorff	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido / Lugol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lignina / Floroglucinol	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Lípideos / Sudan IV	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Proteínas / Azul de Comassie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos / Vanilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenóis / Cloreto Ferrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	epi	par	col	fv	epi	par	col	fv	epi	par	col	fv	epi	par	col	fv
Alcalóide / Dragendorff	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido / Lugol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lignina / Floroglucinol	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Lípideos / Sudan IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteínas / Azul de Comassie	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Taninos / Vanilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenóis / Cloreto Ferrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	epi	par	mes	fv	epi	par	mes	fv	epi	par	mes	fv	epi	par	mes	fv
Alcalóide / Dragendorff	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amido / Lugol	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
Lignina / Floroglucinol	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Lípideos / Sudan IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteínas / Azul de Comassie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos / Vanilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenóis / Cloreto Ferrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	epi	par	col	fv	epi	par	col	fv	epi	par	col	fv	epi	par	col	fv
Alcalóide / Dragendorff	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Amido / Lugol	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Lignina / Floroglucinol	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Lípideos / Sudan IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteínas / Azul de Comassie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos / Vanilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenóis / Cloreto Ferrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: epi – epiderme; par – parênquima; col – colênquima; fv – feixe vascular; teg – tegumento; cot – cotilédone; end – endosperma; bem - embrião.

2.4.5 - Análise molecular

Um total de 41 iniciadores foram testados e destes, 26 foram selecionados e avaliados no que diz respeito ao número de bandas geradas e ao polimorfismo verificado para estas bandas (Tabela 4). Os demais iniciadores foram descartados, pois não houve uma eficiente produção de bandas. Foi obtido um total de 331 bandas sendo 323 polimórficas (91,2%) e 41 monomórficas (8,5%).

O número médio de fragmentos polimórficos produzidos por iniciador foi de 12,03. O iniciador mais polimórfico foi o (CT)₈GC (indicado pelo número 21, Tabela 4), gerando 27 bandas polimórficas, seguido em ordem decrescente de poliformismo pelos iniciadores CGA₇ (indicado pelo número 16, Tabela 4), gerando 24 bandas polimórficas, (CT)₈AC (indicado pelo número 20, Tabela 4), gerando 20 bandas polimórficas, (GT)₆GG, TACA(GCA)₃G (indicado pelo número 19, Tabela 4), gerando 12 bandas polimórficas, e na seqüência (GAA)₇EAA, CGA₇, T(TTA)₄TT e (GTG)₄RC (indicados pelos números 13, 14, 15, respectivamente, Tabela 4), gerando 14 bandas polimórficas.

O dendrograma gerado com base nos dados moleculares indicam a formação de dois grupos principais (Fig. 11). O primeiro grupo contendo *C. annuum*, *C. baccatum* e *C. frutescens* e o segundo grupo contendo apenas os acessos de *C. chinense*. No primeiro grupo, verificou-se que, embora tivessem sido separados por espécies, os acessos formam dois subgrupos, um subgrupo de *C. baccatum* e outro com as espécies de *C. frutescens* e *C. annuum*.

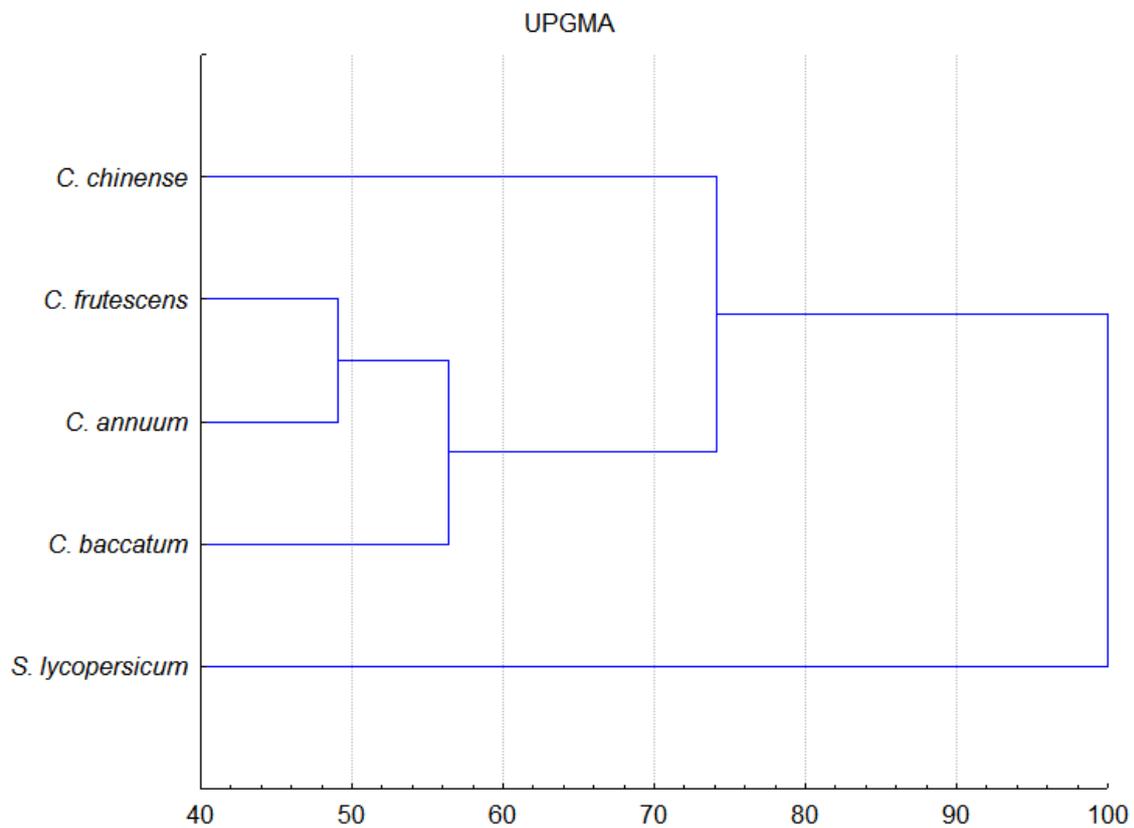


Figura 11 – Dendrograma obtido pelo método da distância média UPGMA com base em marcadores moleculares entre quatro acessos de espécies de *Capsicum* pertencente ao acervo do banco de germoplasma da UENF e um acesso de *Solanum lycopersicum*.

Tabela 4 – Iniciadores ISSR que foram usados, temperatura ótima de anelamento (Ta C°), número de bandas polimórficas e monomórficas que foram geradas no estudo dos quatro acessos de *Capsicum* e um acesso de *Solanum lycopersicum*.

N°	Sequencia 5' - 3'	Ta (°C)	Bandas polimórficas	Bandas monomórficas	Total de bandas
1	(AC) ₈ CT	47	9	2	11
2	(GA) ₈ YT	47	9	1	10
3	(GT) ₈ YC	47	11	1	12
4	(AC) ₈ YA	47	13	0	13
5	(GT) ₈ YG	47	11	0	11
6	(AC) ₈ YT	47	10	2	12
7	GAC(CAA) ₅	47	6	0	6
8	CTC(GT) ₈	47	14	0	14
9	(GAA) EAA	49,5	14	0	14
10	(AG) ₈ TG	47	10	0	10
11	(CCA) ₇	47	9	1	10
12	(GCC) ₅	47	4	0	4
13	CGA ₇	50	14	0	14
14	T(TTA) ₄ TT	46	14	1	15
15	(GTG) ₄ RC	49,5	14	0	14
16	CG(A) ₇	50	24	1	25
17	(GC) ₂ CGCCGCCGCC	50	17	3	20
18	(GT) ₈ CTC	50	0	6	6
19	TACA(GCA) ₃ G	50	19	0	19
20	CT ₈ AC	50	20	0	20
21	CT ₈ GC	50	27	0	27
22	(CA) ₆ AG	50	13	0	13
23	(GT) ₆ GG	50	13	20	0
24	CGAA(TTA) ₃ TT	50	10	0	10
25	(AA) ₂ (TAA) ₃ T	44	5	1	6
26	(AA) ₂ AT(AAT) ₃	48	13	2	15
27	TG ₈	50	*	*	*
28	TG ₇ T	50	*	*	*
29	TG ₉ T	50	*	*	*
30	CT(ATT) ₄	41	*	*	*
31	TCA(TTA) ₃ TT	50	*	*	*
32	(CT) ₈ AGG	50	*	*	*
33	GA ₈ T	50	*	*	*
34	(GGGTG) ₃	50	*	*	*
35	CT ₈ TG	50	*	*	*
36	(CA) ₆ AC	50	*	*	*
37	(GT) ₆ CC	50	*	*	*
38	CA(CCA) ₂ CGC	50	*	*	*
39	GA(GGA) ₂ GGC	50	*	*	*
40	GA(ATT) ₄	50	*	*	*
41	(AG) ₈ CG	50	*	*	*
Total de bandas/column			323	41	331

R= A,G; Y=C,T; (*) não apresentou bandas polimórficas e monomórficas

2.5–DISCUSSÃO

2.5.1 – Anatomia de Folha, Sementes e Frutos

Estudos sobre a anatomia e ultraestrutura vegetal têm indicado importantes características para separar taxa, bem como para relacionar características estruturais com o ambiente (Bredenkamp & Van Wyk, 2000; Kong, 2001).

O conhecimento das características morfológicas e anatômicas das plantas é de grande relevância para o sucesso de estudos das interações entre plantas, herbívoros e inimigos naturais (Price, 1997). Espécies de um mesmo gênero de planta podem variar consideravelmente quanto às características das folhas, flores e frutos, e essas variações muitas vezes são determinantes na ocorrência, abundância e diversidade de organismos (Petters, 2002).

Nas espécies aqui estudadas, a epiderme foliar exibe, em vista frontal, células com paredes sinuosas em ambas as faces. Segundo Elias *et al.* (2003), a sinuosidade da parede celular pode estar relacionada às características adaptativas contra a perda excessiva de água, o que justifica a maior sinuosidade observada na epiderme adaxial dessas espécies *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, que se encontra mais exposta à radiação solar.

As folhas das quatro espécies de *Capsicum* estudadas foram classificadas como anfiestomáticas. De acordo com Metcalfe & Chalk (1950), as folhas com características anfiestomáticas são comuns em Solanaceae. Segundo Mott *et al.* (1982), folhas anfiestomáticas podem representar uma adaptação ao aumento da taxa fotossintética por permitirem uma troca gasosa mais eficiente, quando comparada às folhas hipoestomáticas. Possivelmente, as espécies de *C. annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. frutescens* apresentem maior eficiência nesse aspecto, uma vez que exibem estômatos em ambas as faces da folha. Além disso, o tipo de estômatos anomocíticos observados indica que as espécies de *Capsicum* são filogeneticamente relacionadas (Nwachukwu *et al.*, 2007).

Segundo Metcalfe & Chalk (1972), plantas da família Solanaceae podem apresentar numerosos tipos de tricomas, que incluem uma diversidade considerável de formas glandulares e não glandulares, servindo em alguns casos, para caracterizar algumas famílias. As espécies de *C. chinense* e *C. baccatum* apresentaram tricomas

tectores, sendo que em *C. baccatum* o tricoma é em forma de gancho. Tricomas glandulares foram observados em *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. baccatum*. Neste sentido, o polimorfismo da forma e do tipo desta estrutura foi observado. A presença de tricomas glandulares é uma característica das espécies da família Solanaceae (Maiti *et al.*, 2002). Tricomas glandulares são caracterizados por possuírem células especializadas que produzem exsudados tóxicos que, em contacto com predadores, podem prender, irritar ou potencialmente matar algumas pragas ou patógenos (Simmons *et al.*, 2003). Além disso, compostos encontrados nos exsudados dos tricomas podem ter potencial econômico.

Em muitas espécies de plantas, em que a composição da secreção foi caracterizada, mostrou-se que esta é constituída por compostos diferentes que pertencem a diversas classes de substâncias, tais como terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Além disso, a secreção tem sido relacionada à defesa da planta contra patógenos, como indicado pela atividade biológica sobre os organismos diferentes (Amme *et al.*, 2005).

Como mostrado os mesófilos das espécies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e *C. chinense* são do tipo dorsiventral, como afirma Metcalfe & Chalk (1972) para a família Solanaceae. Também foi observado que o parênquima paliçádico é uniestratificado e o parênquima lacunoso apresenta de quatro a cinco estratos celulares com formas diferentes e notáveis espaços celulares, não variando entre as espécies.

Os feixes vasculares das espécies estudadas são do tipo biclateral e imersos no mesófilo. O padrão de feixes vasculares colaterais é a organização vascular mais comum, onde o xilema e o floema são arranjados paralelamente. No entanto, em algumas famílias, como Curcubitaceae e Solanaceae, predomina o padrão biclateral, onde o xilema é colocado em paralelo com o floema externo e floema interno (Ye, 2002).

Em *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e *C. chinense*, o pecíolo apresenta contorno ligeiramente côncavo-convexo. Segundo Howard (1979), a estrutura anatômica do pecíolo é importante na identificação de alguns táxons, podendo ter valor significativo na determinação de certas espécies de Solanaceae. Essa mesma organização é observada em plantas de outras famílias de eudicotiledôneas, como apontado por Alves & Neves (2003). Metcalfe & Chalk (1972) afirmam que o sistema vascular do pecíolo dispõe-se em forma de arco para algumas espécies de Solanaceae, assim como foi observado em *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e *C. chinense*. A

aplicação das características morfológicas e anatômicas tem provado ser de grande importância na interpretação de problemas relacionados com a classificação, aliadas a um conjunto de interpretações químicas e moleculares. Assim, a necessidade de incluir os resultados da folha com dados provenientes de outras características botânicas permanece vital na formulação de conclusões sobre a sistemática da espécie *Capsicum*.

Em relação à caracterização anatômica de sementes foi verificada uma relativa homogeneidade nas amostras das quatro espécies estudadas, embora tenha sido perceptível a existência de alguma variabilidade entre as diferentes espécies.

As sementes das espécies estudadas são de formato elipsóide, variando apenas em tamanho e peso. Estas são campilótopas, com base na descrição feita por Corner (1976). São albuminosas, com endosperma abundante, periférico, carnoso-firme e semitransparente e de coloração esbranquiçada. Para as quatro espécies, os embriões foram classificados de acordo com Martin (1946) em circinado. Para as espécies em estudo, as formas descritas enquadram-se nas características descritas por Barroso *et al.* (1999) para o gênero *Solanum*. Os embriões ocupam cerca de um quarto da semente. A epiderme do tegumento é diferenciada para as quatro espécies, sendo comprovado também em microscópio eletrônico de varredura. Estas diferenças são características que podem auxiliar a identificação taxonômica das espécies, como também afirma Castellani *et al.* (2008).

De acordo com Knapp (2002), os frutos de pimenta são classificados como baga. Possuem muitas variações de cores e formas (Moscone *et al.*, 2007). Estes frutos podem ser vermelhos, por exemplo, em *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens* e marrons, em *C. chinense*.

A parede do fruto é dividida anatomicamente em três regiões: epicarpo, mesocarpo e endocarpo (Roth, 1977). De acordo com Fahn (1990), a separação serve para facilitar a descrição anatômica, sendo que a definição destes termos varia conforme cada autor. A maioria dos autores modernos prefere usar os termos epicarpo e endocarpo em seu sentido mais amplo, que inclui na sua formação, além das epidermes externa e interna, respectivamente, também células do mesofilo ovariano (Roth, 1977).

De acordo com Roth (1977) o epicarpo é usualmente unisseriado e representa a camada mais externa do pericarpo. As quatro espécies estudadas neste trabalho apresentam epicarpo unisseriado, da mesma forma que a maioria das espécies já estudadas na família (Kuriachen *et al.*, 1992; Souza & Moscheta, 1992; Thomas & Dave, 1994; Aguiar *et al.*, 2009).

A superfície dos frutos sempre se encontra recoberta por cutícula, sendo a sua formação influenciada por vários fatores, como luz, temperatura, dentre outros (Roth, 1977). Cutícula espessa é um caráter muito comum em frutos de Apocynaceae (Aguiar *et al.*, 2009) e também está presente nos frutos aqui estudados. A cutícula possui papel fundamental na diminuição da perda de água para o ambiente (Thomas & Dave, 1994).

Um dos maiores problemas no estudo de frutos e sementes é a escassez de dados literatura e, no caso de frutos, o grande conflito nas terminologias utilizadas. Características anatômicas de frutos e de sementes têm sido sempre negligenciadas em estudos sistemáticos porque são tecnicamente difíceis de serem investigadas (Bobrov *et al.*, 2005). No entanto, estas podem ter uma grande importância em trabalhos taxonômicos, devido à pequena plasticidade fenotípica exibida por tais órgãos e ao grande número de dados morfoanatômicos que podem revelar.

Os compostos químicos das plantas estão didaticamente divididos em compostos originários do metabolismo primário ou do secundário. O metabolismo primário envolve os metabólitos ou macromoléculas essenciais, com funções vitais bem definidas (Poser & Von Mentz, 2001). Os metabólitos secundários são usados principalmente como auto-proteção contra ataques microbianos, herbivoria e radiação UV ou na interação benéfica com outros organismos, como polinização de flores. Geralmente são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos taxonômicos (Poser & Mentz, 2001).

Os resultados dos testes histoquímicos mostraram que os grãos de amido estão presentes nos tecidos das folhas e sementes, e ausente nos tecidos dos frutos das espécies de *Capsicum*. De acordo com Meyer *et al.* (1965) e Costa (1994), os grãos de amido embora variem em tamanho e em número apresentam morfologia praticamente constante para uma determinada espécie, sendo por isso utilizados nas identificações taxonômicas (Galliard, 1987) e arqueobotânicas (Freitas, 2002). Estas estruturas evidenciam a função de armazenamento e produção de energia destes órgãos para a planta, visto que os tecidos constituintes dos feixes vasculares são responsáveis pela circulação de substâncias pela planta, o que requer um alto consumo de energia (Fahn, 1979).

As principais características do fruto de pimenta são a pungência, conferida por substâncias alcalóides denominadas capsaicinóides. Esses ocorrem apenas no gênero *Capsicum* e são produzidos em glândulas presentes na placenta dos frutos (Bosland, 1993). Neste estudo, foi evidenciada também a presença de alcalóides nas células da

epiderme e mesofilo das folhas e em todos os tecidos das sementes e frutos nas quatro espécies estudadas. Os alcalóides podem ser encontrados em todas as partes da planta, mas se acumulam em um ou mais órgãos, principalmente em tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos laticíferos (Henriques *et al.*, 2002). Nas células, os alcalóides são produzidos no retículo endoplasmático e em seguida concentram-se nos vacúolos (Henriques *et al.*, 2002). Alcalóides são encontrados em cerca de 4.000 espécies de plantas, sendo mais frequentes em dicotiledôneas (Castro *et al.*, 2007). Este grupo de metabólitos secundários é encontrado em diversas famílias botânicas, destacando-se Apocynaceae, Solanaceae, Papaveraceae, Loganiaceae, Ranunculaceae, Berberidaceae e Rubiaceae (Robbers *et al.*, 1996).

A ausência de taninos nos tecidos de espécies do gênero *Capsicum* é um dos caracteres importantes para a sua aplicação na indústria alimentícia (Pinto *et al.*, 2000). Dessa forma, confirma o potencial econômico do gênero.

As proteínas, com reação positiva, ocorrem em todos os órgãos. Estas substâncias são mobilizadas após a germinação, durante o desenvolvimento das plântulas, e seus produtos de degradação são utilizados em diversos propósitos, tais como a geração de energia e produção de matéria-prima (proteínas, ácidos nucléicos); na construção de novos tecidos de células; mecanismos de proteção e defesa (herbivoria, patógenos) (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975), os quais envolvem, por exemplo, os peptídeos antimicrobianos e inibidores protéicos discutidos no capítulo 2 desta tese.

2.5.2 - Análise Molecular

Embora o Brasil seja reconhecido como habitat natural de várias espécies silvestres de pimentas do gênero *Capsicum*, ainda há pouco conhecimento biológico e ecológico dessas espécies. Por exemplo, na Amazônia, *C. chinense* é muito utilizada pela população local, mas há poucas referências científicas sobre a morfologia e a variabilidade intraespecífica. Para Arriel (2004), apesar dos caracteres morfológicos serem amplamente usados na caracterização da diversidade, a combinação com os marcadores moleculares poderia fornecer um quadro mais completo para o agrupamento de genótipos e o planejamento de cruzamentos no melhoramento genético vegetal.

Baseando-se na morfologia floral, Pickersgill (1977) relatou que a caracterização morfológica de acessos tem sido utilizada por anos como a forma mais usual de estudar a variabilidade genética das pimentas e pimentões. Pickersgill (1988) relatou que apenas com base na morfologia floral, pode ser constatado que as espécies *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. annuum* estão agrupadas e distantes da espécie *C. baccatum*.

Nesse estudo, o dendrograma gerado com base nos dados moleculares indicou a formação de dois grupos principais, o primeiro contendo os acessos de *C. annuum*, *C. baccatum* e *C. frutescens* e o segundo grupo contendo apenas os acessos de *C. chinense*. No primeiro grupo, foi verificado que apesar de terem sido separados por espécies, os acessos formam dois subgrupos, um subgrupo de *C. baccatum* e outro com as espécies de *C. frutescens* e *C. annuum*. Os nossos resultados mostraram que o dendrograma gerado pelos caracteres moleculares mostra um padrão diferente de agrupamento da proposta de divisão do Complexo gênico de *Capsicum* (Pickersgill, 1991). Nesta proposta o complexo gênico de *C. annuum* incorpora as espécies domesticadas de *C. annuum* var. *annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, sugerindo que existe uma grande proximidade e maior possibilidade de troca de genes entre as espécies, o que também acontece no complexo gênico de *C. baccatum* que agrupa as espécies *C. baccatum* var. *pendullum*, *baccatum* e *praetermissum* e também *C. tovarii* (Tong & Bosland, 1999).

Em nosso estudo, a análise molecular do “cluster” de *C. baccatum* com *C. annuum* e *C. frutescens* separou essas duas últimas espécies de *C. chinense*. O mesmo resultado foi observado por Costa *et al.* (2009) trabalhando com marcadores de amplificação aleatória de DNA polimórfico RAPD e descritores morfológicos para estimar a diversidade genética entre acessos de *Capsicum*. Analisando-se apenas descritores morfoagronômicos, estes autores descobriram acessos de *C. baccatum*, *C. annuum* e *C. frutescens* no mesmo “cluster”, enquanto acessos de *C. chinense* foram colocados em um “cluster” diferente. Além disso, os autores levantaram a hipótese de que este “cluster” pode indicar alguma possibilidade de proximidade e a possibilidade de intercâmbio entre genes de *C. baccatum*, *C. annuum* e *C. frutescens*. Os resultados obtidos por Monteiro *et al.* (2011) reforçam essa hipótese, com a obtenção de híbridos férteis que foram obtidas entre a espécie *C. annuum* var. *annuum* (pimenta doce ou quente) e *C. baccatum* var. *pendullum* com viabilidade de pólen superior a 90%. Além disso, Potnis *et al.* (2012) transferiram um gene que controla a resistência à mancha bacteriana de *C. baccatum* para *C. annuum* mostrando que a troca de genes entre espécies diferentes de *Capsicum* é bastante viável.

Apesar de polimorfismo altamente observado para marcadores ISSR, juntamente com polimorfismo para frutos das espécies de *C. baccatum*, *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense* e outras características agronômicas, essas diferenças não se refletiram em grande variabilidade de descritores anatômicos. Alguns estudos concluíram que a associação entre dados morfológicos, agronômicos e molecular é a abordagem mais adequada para estimar a divergência genética de *Capsicum* (Costa *et al.*, 2009) ou que a análise conjunta dos dados quantitativos e qualitativos resultou em maior eficiência na determinação da divergência genética entre os acessos de *Capsicum* (Moura *et al.*, 2010). Estratégias multivariadas como a metodologia de Ward-MLM na análise de dados para a caracterização dos acessos morfoagronômicos permitidos, com algum nível de eficiência, a separação de espécies de *Capsicum* com a utilização simultânea de variáveis morfológicas e agronômicas (Sudre *et al.*, 2010). No entanto, Sudre *et al.* (2010) observaram que apenas descritores morfológicos pode eficientemente discriminar entre as espécies do gênero *Capsicum* e suas variedades botânicas.

2.6 - CONCLUSÕES

Levando em consideração a complexidade taxonômica do gênero *Capsicum* (Barbosa *et al.*, 2006), o estudo comparativo da anatomia de quatro espécies de *Capsicum* demonstrou a existência de algumas diferenças anatômicas entre *C. baccatum*, *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*. No entanto, muitas características são presentes nas quatro espécies e podem ser típicas do gênero. Polimorfismo na morfologia dos tipos e forma de tricomas nas espécies estudadas são caracteres diferenciais destas espécies. Algumas dessas características são válidas na distinção entre as espécies deste gênero e também podem contribuir para a taxonomia de Solanaceae. Outras características devem ser levadas em consideração, como morfologia da flor, para ajudar na descrição e discriminação dos acessos de espécies de *Capsicum*. Como esperado, os marcadores de ISSR foram capazes de detectar alto nível de polimorfismo, embora este não tenha sido refletido em caracteres anatômicos e ultraestruturais.

Isolamento, caracterização e atividade antifúngica de inibidores de proteases de sementes de *Capsicum chinense* Jacq.

(Artigo submetido para publicação na revista *The Protein Journal*)

3.1 – INTRODUÇÃO

As plantas por serem organismos sésseis, estão constantemente expostas a diversos tipos de fatores físicos e químicos desfavoráveis no ambiente, incluindo a presença de um grande número de organismos fitopatogênicos. Sendo assim, a sua sobrevivência nessas condições exige uma rápida resposta de defesa (Rausher, 2001). Suas sementes, ricas em substâncias como óleos, carboidratos e proteínas para alimentar a nova planta, são especialmente atraentes como uma boa fonte de nutrientes para diversos organismos predadores. As sementes têm mecanismos de defesas pré-formados para lidar com esse tipo de situação. No mecanismo de defesa de plantas estão envolvidas várias classes de peptídeos antimicrobianos (AMPs) como: defensinas, proteínas transportadoras de lipídios, tioninas, ciclotídeos e inibidores de protease (IPs) (Castro & Fontes, 2005). Diferentes pesquisadores demonstraram a presença destes AMPs em sementes, relacionando-as com a proteção das sementes durante a fase de germinação (Rausher, 2001; Terras *et al.*, 2005). As sementes são grande fonte de AMPs e estes têm sido relatadas em diversas plantas. Contudo, alguns não apresentam homologia com qualquer classe já descrita, como demonstrado por Egorov *et al.* (2005).

Pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) pertencem à família Solanaceae, são cultivadas em todo o mundo e constituem um segmento muito importante do mercado de hortaliças, condimentos, especiarias e conservação de alimentos em todo o mundo (Pereira & Crisostomo, 2011). Embora a colheita ainda seja feita de forma rústica, sabe-se que este é um mercado que movimenta cerca de 100 milhões de dólares por ano, incluindo o consumo interno e das exportações (Ribeiro *et al.*, 2008). Ainda segundo esses autores, pimentas vermelhas estão em terceiro lugar em produção e consumo de hortaliças para temperos no Brasil, perdendo apenas para o alho e cebola. Este gênero é rico em vitaminas (A, B e C) e também em minerais (molibdênio, manganês, potássio, ácido fólico e tiamina) (Simonne *et al.*, 1997; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2010). A importância econômica, nutritiva e farmacológica desse gênero é responsável por sua

alta demanda de produção. No entanto, a produção mundial é dificultada por limites impostos por patógenos, como vírus (Ristaino & Stephen, 1999), bactérias (Jones *et al.*, 1998) e fungos (Diz *et al.*, 2006). Desta forma, os programas de melhoramento de plantas buscam entender as estratégias utilizadas pelas plantas para se defenderem de condições de estresse biótico e abiótico. Estes estudos são importantes para identificar novas fontes de genes interessantes que poderiam no futuro, servir para criação de novas variedades com melhores características agrônômicas (Babu *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem purificado peptídeos antimicrobianos de várias plantas (Carvalho *et al.*, 2001; Diz *et al.*, 2006; Zottich *et al.*, 2011), em especial da espécie *Capsicum annumm*. Nesta última foram isolados uma proteína transportadora de lipídeo (Diz *et al.*, 2011) e um peptídeo com similaridade a inibidores de tripsina (Ribeiro *et al.*, 2007), os quais apresentaram atividade contra microrganismos. Com objetivo de investigar a presença de novos AMPs presentes no gênero *Capsicum*, utilizamos a espécie *C. chinense*, acesso UENF 1755, que possui o seu centro de diversidade na Amazônia brasileira (Costa *et al.*, 2008). Com base em pesquisas anteriores de sua resistência contra mancha bacteriana, o uso do acesso *C. chinense*, UENF 1755, em programas de melhoramento, tem sido considerado uma estratégia importante para o estabelecimento de resistência a doenças nestas culturas (Riva *et al.*, 2004).

3.2 – OBJETIVOS

Neste capítulo o objetivo central foi caracterizar AMPs de sementes do acesso UENF 1755 de *Capsicum chinense* Jacq. investigando seu mecanismo de ação contra fungos, com os seguintes objetivos específicos:

- Isolar AMPs de *C. chinense*;
- Caracterizar físico-quimicamente o(s) AMPs isolados;
- Avaliar a atividade antifúngica dos AMPs sobre o desenvolvimento de leveduras;
- Analisar o efeito morfológico e ultraestrutural dos AMPs sobre as células de leveduras;
- Determinar o efeito dos AMPs sobre a permeabilização de membranas das leveduras.

3.3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 - Material vegetal

Sementes de *Capsicum chinense* Jacq. (acesso: UENF 1755) foram fornecidas pelo Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil.

3.3.2 - Leveduras

As cepas das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (1038), *Candida albicans* (CE022), *Candida tropicalis* (CE017), *Pichia membranifaciens* (CE015) e *Kluyveromyces marxianus* (CE025) foram obtidas do departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. As leveduras foram mantidas em meio de cultura Sabouraud Agar (1,0% peptona, 2,0% glicose e 1,7% agar-agar), conservadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos (LFBM), do Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

3.3.3 - Purificação dos Peptídeos

3.3.3.1 - PREPARO DA AMOSTRA SECA

Sementes de pimenta, *C. chinense* Jacq., foram maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de uma farinha de granulação fina. Após a obtenção desta farinha, seguiu-se a extração das proteínas.

3.3.3.2 - EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE SEMENTES PARA ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

As proteínas foram extraídas e purificadas conforme Egorov *et al.* (2005), com as seguintes modificações: Nesta extração, a farinha foi submetida à ação de éter de

petróleo na proporção de 1:4 (farinha:éter) por 1 h sob agitação a 4 °C e posteriormente a suspensão foi centrifugada a 15.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em papel de filtro. Após secagem, o precipitado foi colocado em tampão de extração (TFA 1%, HCl 1 M, ácido fórmico 5%, NaCl 1%, pepstatina A 1 µg/mL, PMSF 1 mM e PVPP 4%). A solução ficou sob agitação por 1 h a 4 °C e em seguida submetida a centrifugação a 14.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi dialisado e liofilizado.

3.3.3.3 - ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Proteínas e peptídeos extraídos das espécies de plantas de *Capsicum chinense* L. foram purificados através de técnicas de cromatografia. As amostras foram diluídas em 0,1% (v/v) TFA e submetidas a uma coluna de fase reversa C18 (coluna analítica Shim-pack CLC-ODS, Shimadzu-Japão) acoplada a uma coluna guarda C8 em HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Shimadzu-Japão. A cromatografia foi desenvolvida a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ com 100% de solvente A (0,1% TFA em água) por 8 min, seguido de um gradiente crescente até 65% do solvente B (0,1% TFA em propanol) por 64 min, permanecendo por 5 min em 65% do solvente B e finalmente 100% do solvente A. O volume de amostra injetado foi de 500 µL. A eluição das proteínas foi monitorada por medida da absorbância de 280 nm e as etapas de purificação foram acompanhadas por técnicas de eletroforese, descritas abaixo.

3.3.4 - Quantificação de Proteínas

As determinações quantitativas de proteínas foram feitas pelo método de Bradford (1976) ou pelo método do ácido bicinonínico (método descrito pelo fabricante, Sigma Co, St. Louis, USA), sendo a albumina sérica bovina utilizada como padrão.

3.3.5 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Análise de Espectrometria de Massas

A eletroforese em gel de tricina foi feita segundo método de Schagger e Von Jagow (1987). Para isso, foram usadas placas de vidro de 8 x 10 cm e de 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 mm. A corrida foi feita em uma voltagem constante de 20 V, por um período de aproximadamente 14 h. Para a realização da eletroforese, amostras contendo proteínas de interesse foram acrescidas de tampão de amostra quatro vezes concentrado e 4% de β -mercaptoetanol. As amostras foram então aquecidas por 5 min a 100 °C e posteriormente, centrifugadas a 16.000 x g por 3 min. Após este procedimento, as amostras foram aplicadas em gel. Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado em uma solução corante com 0,1% de azul brilhante de Coomassie R250 (Sigma) em 1:8:1 de metanol: água: ácido acético (Merck), por duas horas. Após esse período, o gel foi transferido para uma solução descorante (ácido acético 10% e metanol 30% em água destilada) e mantido até a visualização de bandas de proteína.

Adicionalmente, as bandas de interesse foram extraídas com auxílio de um bisturi a partir do gel e em seguida submetidas à análise de espectrometria de massa. Peptídeo foi cristalizado com um excesso de matriz de ácido alfa ciano-4-hidroxicinâmico e depois analisados por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). O instrumento utilizado foi um AB SCIEX TOF / TOF™ 5800 Sistema espectrômetro (AB SCIEX) no modo linear.

3.3.6 - Sequenciamento dos Peptídeos

3.3.6.1 PREPARO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO

Os peptídeos presentes nas frações peptídicas enriquecidas (PEFs) denominadas de PEF2 e PEF3 foram separados em gel de tricina, e posteriormente tratados com tampão de amostra contendo 5% de β -mercaptoetanol, para redução das pontes dissulfeto e vinil piridina (5 μ L para 60 μ L da amostra), para marcar os resíduos de cisteína, incubados 30 min, a 37 °C. Posteriormente estes foram submetidos à

eletroforese em gel de tricina na presença de SDS, sendo feita uma pré-corrida de 30 min no gel antes das amostras serem aplicadas.

3.3.6.2 - ELETROTRANSFERÊNCIA DE PEPTÍDEOS PARA SEQUENCIAMENTO

A eletrotransferência para o sequenciamento de aminoácidos dos peptídeos foi desenvolvida conforme método descrito por Towbin *et al.* (1979). Após o término da eletroforese, o gel foi retirado das placas e as proteínas eletro transferidas para membrana de PVDF utilizando uma célula comercial “Trans-blot” semi-seco. O gel foi imerso em tampão de transferência (glicina 182 mM, Tris 25 mM e metanol 20%) por 15 min.

A membrana de PVDF foi cortada nas mesmas dimensões do gel e imersa, rapidamente, em metanol 100%, imersa em água e então imersa no tampão de transferência por 15 min. Em seguida, foi montado sobre a célula de transferência um “sanduíche” com quatro folhas de papel filtro previamente embebidas em tampão de transferência. Sobre essa camada de papel foi colocada a membrana e acima da membrana o gel, sendo então finalizado o “sanduíche” com mais uma camada de quatro folhas de papel filtro 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 com a transferência das proteínas.

A célula de transferência, após este procedimento, foi fechada e foi aplicada uma corrente constante de 1 mA/cm² por duas horas no sentido gel-membrana. Após a transferência, o “sanduíche” foi cuidadosamente desfeito, sendo a membrana submetida à coloração com Ponceau S (0,1%) para determinação do sucesso da transferência.

3.3.7 - Caracterização do Inibidor de Proteinase Serínica

3.3.7.1 - ENSAIO DE ATIVIDADE INIBITÓRIA

A atividade inibitória das proteases tripsina (Sigma) e quimotripsina (Sigma) (1 mg.mL⁻¹ cada) pelas frações enriquecidas com peptídeos (PEFs) foram determinadas medindo a atividade residual hidrolítica das enzimas. Para as curvas de titulação da atividade inibidora, tripsina ou quimotripsina, foram incubadas com as PEFs em tampão

Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, a 37 °C, usando as seguintes concentrações de proteína: PEF1 (0; 2,18; 4,36; 6,54; 8,72; 10,9 e 13,08 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$), PEF2 (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 4,8; 6,4; 8 e 9,6 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$) e PEF3 (0; 1,45; 2,9; 5,8; 11,6; 23,2; 34,8; 46,4; 58 e 69,6 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$). Em seguida, os substratos N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) e N-benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida (BTPNA) (0,0625 mM cada) foram adicionados à tripsina e quimotripsina, respectivamente, para um volume final de 200 μL . Esta reação foi incubada durante 30 min. As concentrações dos PEFs decorreram das soluções estoque de 1,09 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ PEF1, 0,8 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ PEF2 e 5,8 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ PEF3. As reações hidrolíticas foram então paradas pela adição de 100 μL de 30% de ácido acético (v/v), e as atividades proteolíticas foram mensuradas com base na extensão da liberação de p-nitroanilida a partir dos substratos em uma absorbância de 405 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados mostrados são médias de três ensaios, como descrito por Macedo *et al.* (2007). Os gráficos foram expressos em termos de percentual de atividade inibitória. As concentrações inibitórias utilizadas nos ensaios de estabilidade físico-químicas foram escolhidas a partir das curvas de inibição.

3.3.7.2 - ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA: EFEITO DO pH

Para medir a estabilidade das PEFs em relação ao pH, PEF1 (4,6 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$), PEF2 (1,6 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$) e PEF3 (1,45 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$), foram diluídas com um volume igual de tampões (100 mM cada) com diferentes pHs, incluindo pH 2,0 (tampão ácido hidrocloreídrico-potássio), pH 3,0 (tampão glicina-HCl), pH 4,0 e 5,0 (tampão acetato, pH 6,0 e 7,0 (tampão fosfato), pH 8,0 e 9,0 (tampão Tris-HCl) e pH 10,0 (tampão carbonato-bicarbonato). Após incubação em cada pH durante 30 min a 37 °C, o pH foi ajustado com solução de HCl 16 M para o pH 8,0, e a atividade enzimática residual da tripsina foi realizada como descrito no final da seção de ensaio de atividade do inibidor (item 3.3.7.1). Adicionalmente, os gráficos foram normalizados para a concentração de proteína.

3.3.7.3 - ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA: EFEITO DA TEMPERATURA

Para o ensaio de estabilidade térmica das atividades inibitórias de tripsina, PEF1 (4,6 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$), PEF2 (1,6 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$) e PEF3 (1,45 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$) foram incubadas em várias temperaturas que variam de 37 a 100 °C durante 30 min em banho-maria. Após o

tratamento térmico, as alíquotas foram arrefecidas em gelo, e a atividade enzimática residual de tripsina foi ensaiada como descrito no final da secção de ensaio de atividade do inibidor (item 3.3.7.1). Adicionalmente, os gráficos foram normalizados para a concentração de proteína.

3.3.8 - Efeito das Frações PEFs sobre o Crescimento de Leveduras

3.3.8.1 - OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DAS LEVEDURAS

Para a preparação de culturas de células de levedura, um inóculo de cada cultura de reserva foi transferido para placas de Petri contendo ágar Sabouraud onde permaneceu a 30 °C, por dois dias. As células foram transferidas para 10 mL de caldo Sabouraud estéril. As células de levedura foram quantificadas em uma câmara de Neubauer para o cálculo adicional de diluições apropriadas. Para monitorar o efeito da PEF2 sobre o crescimento das leveduras, as células (10^4 células.mL⁻¹ em 1ml de meio de meio) foram incubadas na presença do PEF2 (50 e 100 µg.mL⁻¹) a 30 °C em 200 µL. Leituras ópticas a 670 nm foram realizadas em espectrofotômetro a cada 6 h pelas seguintes 24 h (excetuando-se o período da madrugada). Controles de crescimento celular, sem a adição de PEF2 foram também determinados. As densidades ópticas foram representadas como uma função da concentração de peptídeo e do tempo de incubação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e as médias de leitura, erros padrão e coeficientes de variação foram calculados, sob condições de assepsia em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert *et al.* (1990).

3.3.9 - Análises Morfológicas e Ultraestruturais das Leveduras

3.3.9.1 - MICROSCOPIA ÓPTICA

Ao final do ensaio de inibição, as células das leveduras, tanto as crescidas na ausência quanto as crescidas na presença dos peptídeos, foram separadas por centrifugação do meio de cultura, lavadas com meio de cultura novo e visualizadas e

documentadas em microscópio óptico ZEISS Axioplan acoplado à câmera Cannon Power Shot A640.

3.3.9.2 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), células de levedura ao final do ensaio de inibição foram fixadas durante 30 min a temperatura ambiente numa solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4,0% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,0. Subseqüentemente, as células foram lavadas três vezes no mesmo tampão a pH 7,0, pós-fixadas durante 30 min a temperatura ambiente, com 2,0% de tetróxido de ósmio em 0,05 M de tampão cacodilato de sódio a pH 7,0 e lavadas três vezes com este mesmo tampão. Após este procedimento, as células de levedura foram desidratadas em série crescente de álcool (30, 50, 70, 90% e três vezes 100%). Após a desidratação, as amostras foram submetidas ao ponto crítico, com o auxílio do aparelho Bal-Tec Critical Point Dryer CPD 030.

As amostras secas foram aderidas ao topo de suporte próprio e por pulverização catódica revestidas com uma camada de 20 nm de ouro (SDC 050 Baltec). Estas amostras foram fotografadas com um microscópio eletrônico de varredura DSEM ZEISS 962 a 25 kV. As células de levedura cultivadas na ausência do PEF2 foram também analisadas.

3.3.10 - Análise Estatística

Os dados foram obtidos a partir de experimentos realizados em triplicata. Para testar os efeitos do tratamento, os dados foram analisados utilizando teste t de Student. Dados para o ensaio de crescimento da levedura foram avaliados usando o ANOVA de uma via. As diferenças médias de $P < 0,05$ foram consideradas significativas. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software *Graph Pad Prism* (versão 5.0 para Windows).

3.4 – RESULTADOS

3.4.1 - Purificação e Caracterização

Extratos de proteínas de sementes de *Capsicum chinense* foram fracionados por cromatografia de fase reversa-C18 e os peptídeos foram eluídos utilizando gradiente linear de propanol. No perfil cromatográfico a 280 nm (Fig. 12A), foram obtidas três principais frações denominadas PEF1, PEF2, PEF3. Análise por gel de tricina revelou que as PEFs continham bandas de proteína que variam em massa de aproximadamente 5,0 a 14 kDa (Fig. 12B). PEF1 e PEF2 apresentaram duas bandas majoritárias com massas moleculares de aproximadamente 5,0 (PEF-B) e 8,5 (PEF-A) kDa. Além das bandas de 5,0 (indicadas por uma seta) e 8,5 kDa, o PEF3 também mostrou uma banda com cerca de 14 kDa. As frações PEF2-A e PEF2-B foram analisadas por espectrometria de massa, revelando massas moleculares no valor de 8.361 e 4.143 Daltons, respectivamente.

Com intuito de purificar os peptídeos apresentados em PEF2, esta fração foi submetida a uma recromatografia em coluna de fase reversa C2/C18 e eluída utilizando gradiente linear de propanol (Fig. 13A). O cromatograma apresentou dois picos principais que foram eluídos a partir da PEF2, com o nome PEF2-A e PEF2-B. Estes, exibiram bandas protéicas de massa molecular estimada em 8,5 e 5,0 kDa, respectivamente, mostradas em gel de tricina (Fig. 13B).

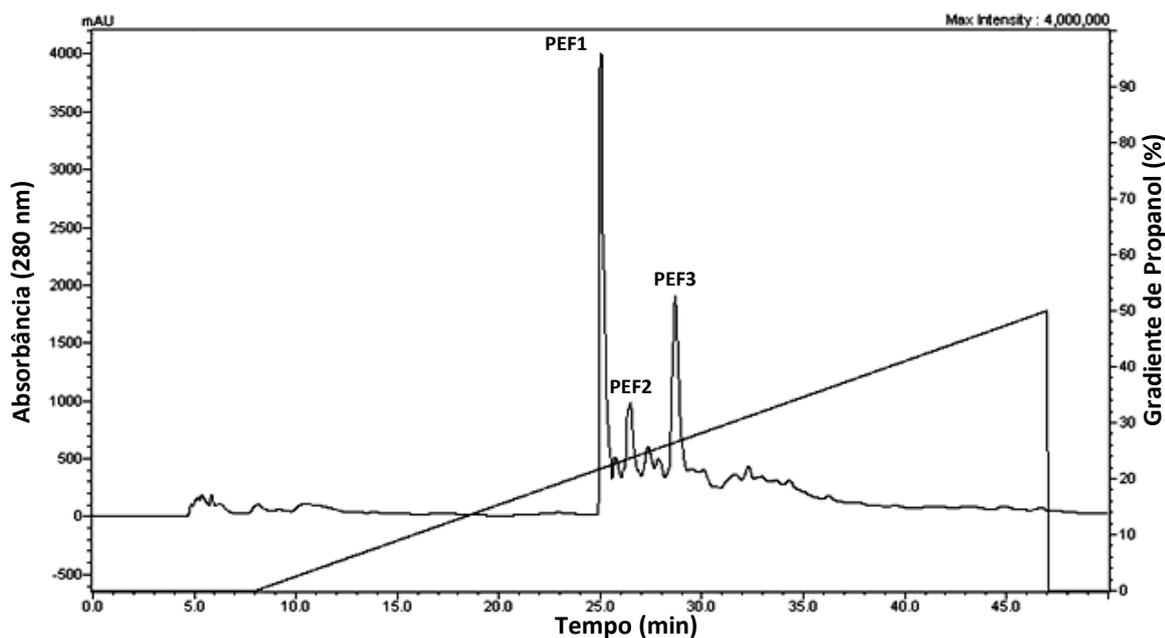
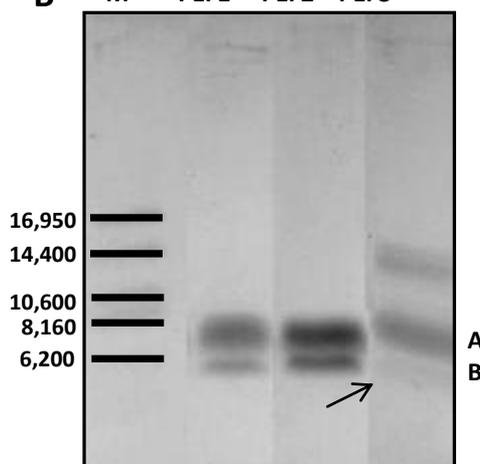
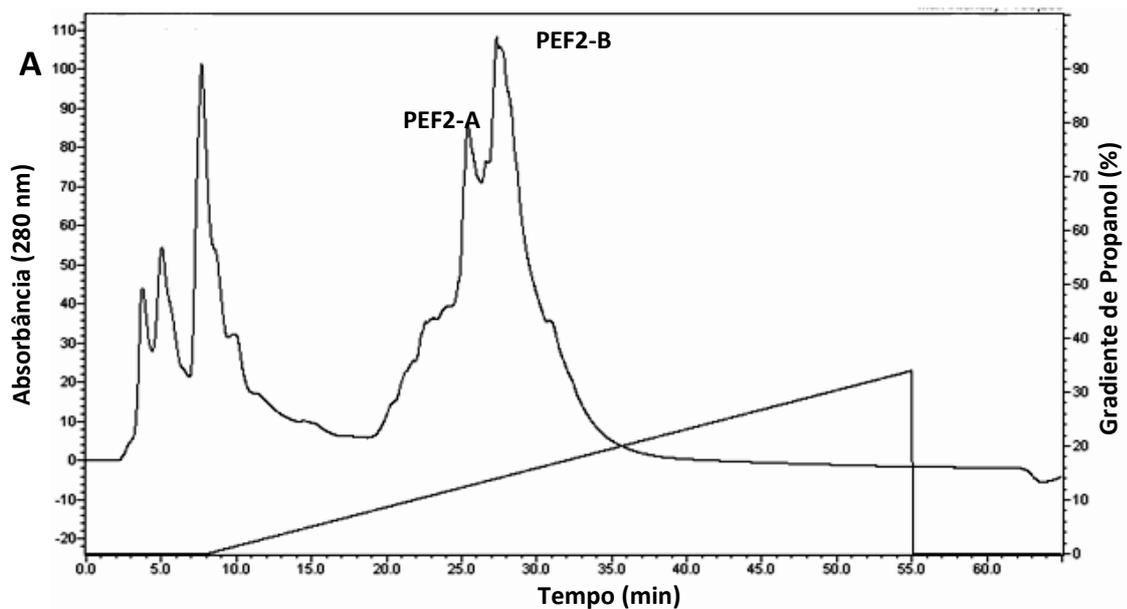
A**B** M PEF1 PEF2 PEF3

Figura 12 - (A) Cromatograma em coluna de fase reversa C18 do extrato de proteína da semente de *C. chinense* em HPLC. A coluna foi equilibrada em 100% de solvente A, e os peptídeos foram eluídos e monitorados a 280 nm com um gradiente contínuo de propanol fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Solvente A foi 0,1% (v/v) de TFA, e o solvente B foi TFA a 0,1% em propanol. (B) Visualização eletroforética em gel de tricina das frações PEF1, PEF2 e PEF3. As bandas de proteínas foram coradas com Coomassie G-250 (coloidal Coomassie Blue). M - Os marcadores moleculares de baixo peso. A - indica a banda de aproximadamente 8,5 kDa e B - indica a banda de 5,0 kDa. A seta indica a banda fraca de 5,0 kDa denominada PEF3B.



B

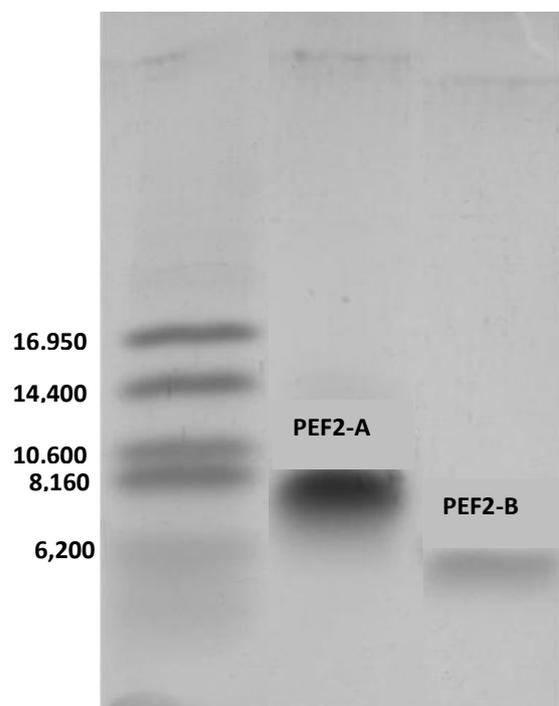
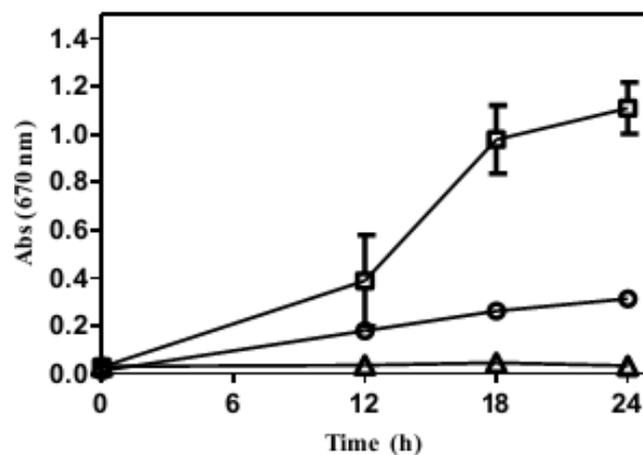


Figura 13 - (A) Cromatograma de PEF2 em coluna de fase reversa C2/C18. A coluna foi equilibrada em 100% de solvente A, e os peptídeos foram eluídos e monitorados a 280 nm com um gradiente contínuo de propanol (fluxo de 1,0 mL.min⁻¹). Solvente A foi 0,1% (v/v) de TFA, e o solvente B foi TFA a 0,1% em propanol. (B) Visualização eletroforética em gel de tricina das bandas de PEF2 após a separação em RP-C18 por HPLC. As bandas de proteínas foram coradas com Coomassie G-250. M - marcadores moleculares de baixo peso.

3.4.2 - Atividade Antimicrobiana contra Leveduras

Devido à sua homogeneidade foi escolhida PEF2 para os testes antimicrobianos. O efeito de PEF2 foi testado sobre o crescimento das leveduras *C. albicans*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *C. tropicalis* e *K. marxianus*. Os perfis de crescimento das leveduras expostas a 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PEF2 são mostrados na fig. 14A-E. O crescimento de *C. albicans*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *C. tropicalis* e *K. marxianus* foi inibido pela presença de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PEF2, em taxas percentuais de 58; 89,2; 96,4; 72,5 e 21%, respectivamente (Fig. 14A-E). Não foram observados efeitos inibitórios para *P. membranifaciens* e *C. tropicalis* expostas a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PEF2 (Fig. 14B, D). Adicionalmente, foi observada, para todas as leveduras testadas, uma aglomeração celular (Fig. 14A-E) em 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PEF2. Neste sentido, nestas amostras foi observado especificamente um dimorfismo celular para culturas de *P. membranifaciens* e *C. tropicalis* (Fig. 14B, D) em 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PEF2. Para estas leveduras foi visualizado o desenvolvimento de pseudohifas. Estas últimas culturas foram também propensas a redução do número de células e agregação celular (Fig. 15). Além disso, foi notado um material liberado a partir das células tratadas com PEF2, levando à hipótese de detritos citoplasmáticos (Fig. 15B, E). O desenvolvimento de pseudohifas foi também observado em microscopia eletrônica de varredura para *P. membranifaciens* e *C. tropicalis* (Fig. 15C, F).



Controle

Teste

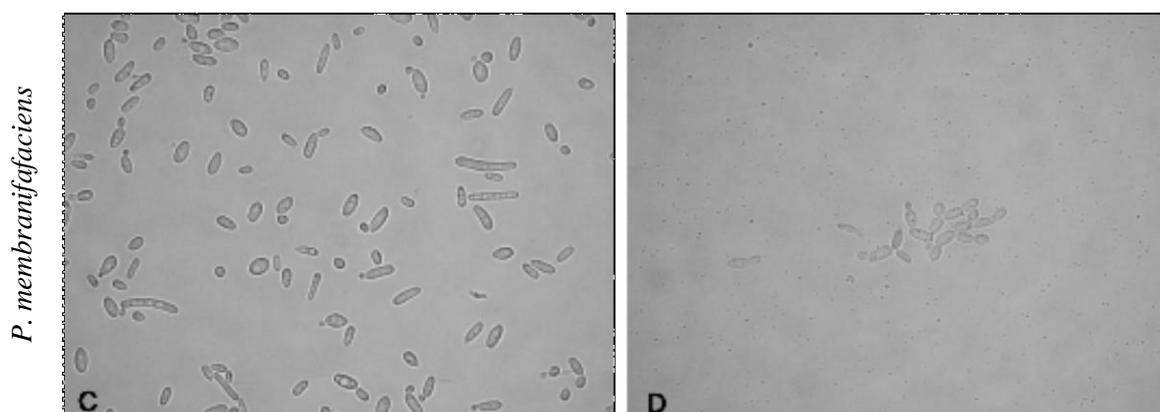
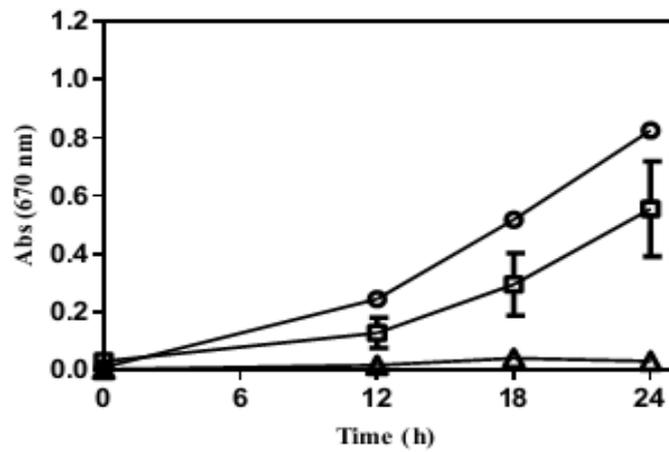


Figura 14B - Ensaio de inibição de crescimento de leveduras *Pichia membranifaciens* na presença de PEF2 a partir de sementes de *Capsicum chinense*. O crescimento foi observado durante 24 h. Controle (○); 50 µg.mL⁻¹ (□); 100 µg.mL (Δ). Os experimentos foram realizados em triplicata. (C-D) Microscopia óptica de (400x) de células de leveduras após o teste de inibição de crescimento de fungos na presença de 100 µg.mL⁻¹ de PEF2.



Controle

Teste

S. cerevisiae

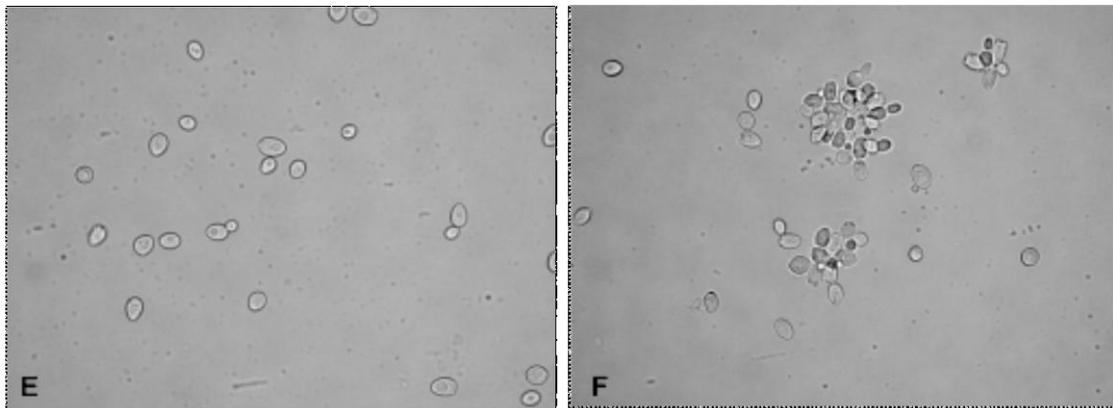
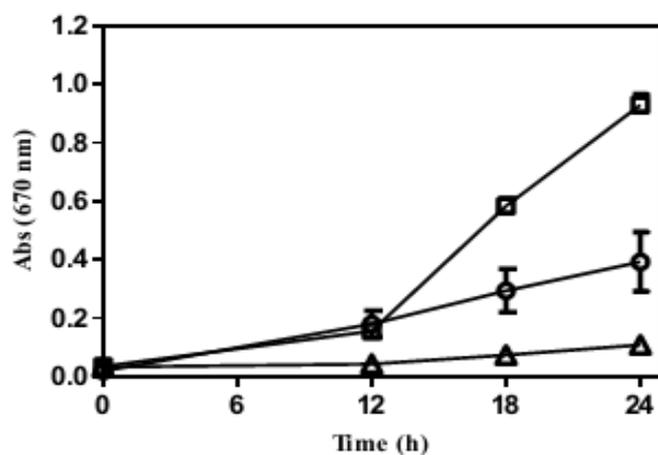


Figura 14C - Ensaios de inibição de crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* na presença de PEF2 a partir de sementes de *Capsicum chinense*. O crescimento foi observado durante 24 h. Controle (○); 50 µg.mL⁻¹ (□); 100 µg.mL (Δ). Os experimentos foram realizados em triplicata. (E-F) Microscopia óptica de (400x) de células de leveduras após o teste de inibição de crescimento de fungos na presença de 100 µg.mL⁻¹ de PEF2.



Controle

Teste

C. tropicalis

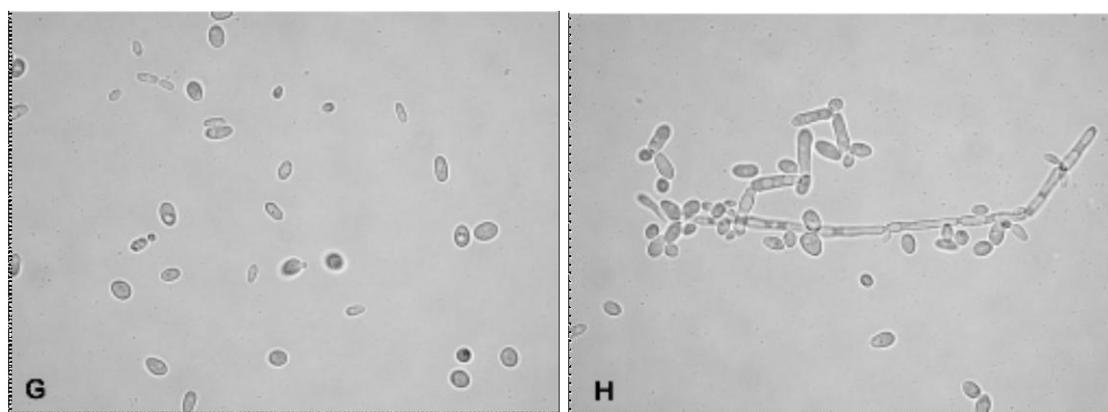
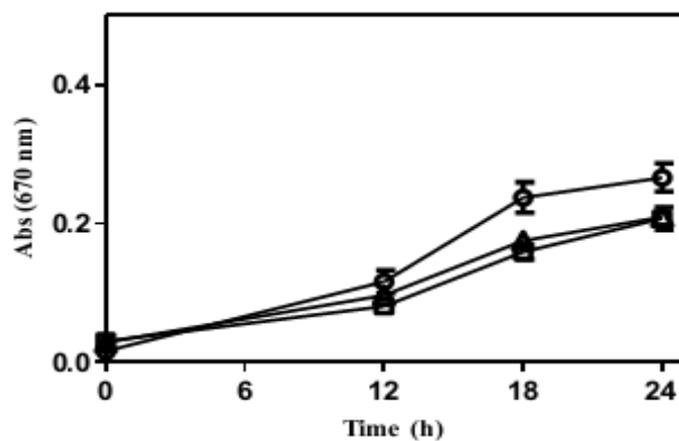


Figura 14D - Ensaio de inibição de crescimento de leveduras *Candida tropicalis* na presença de PEF2 a partir de sementes de *Capsicum chinense*. O crescimento foi observado durante 24 h. Controle (○); 50 µg.mL⁻¹ (□); 100 µg.mL (Δ). Os experimentos foram realizados em triplicata. (E-F) Microscopia óptica de (400x) de células de leveduras após o teste de inibição de crescimento de fungos na presença de 100 µg.mL⁻¹ de PEF2.



Controle

Teste

K. maximilianus

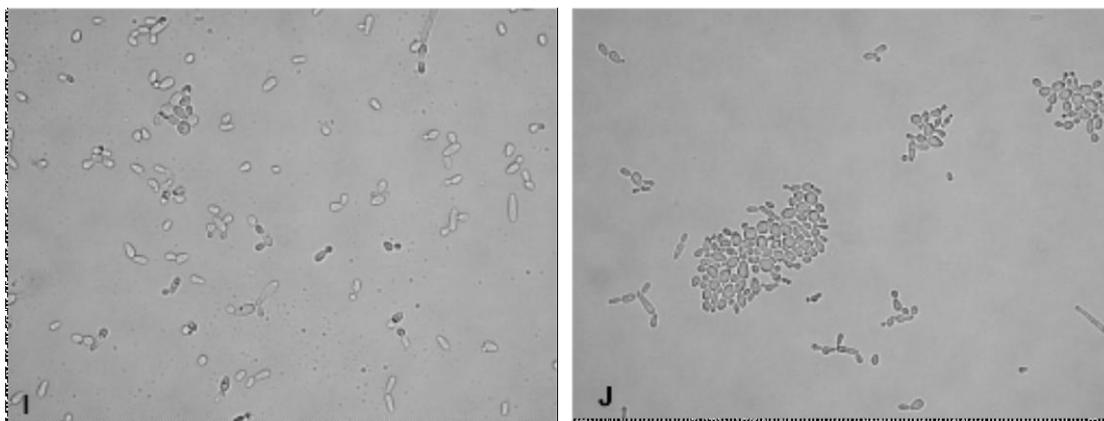


Figura 14E - Ensaio de inibição de crescimento de leveduras *Kluyveromyces maximilianus* na presença de PEF2 a partir de sementes de *Capsicum chinense*. O crescimento foi observado durante 24 h. Controle (○); 50 µg.mL⁻¹ (□); 100 µg.mL (Δ). Os experimentos foram realizados em triplicata. (E-F) Microscopia óptica de (400x) de células de leveduras após o teste de inibição de crescimento de fungos na presença de 100 µg.mL⁻¹ de PEF2.

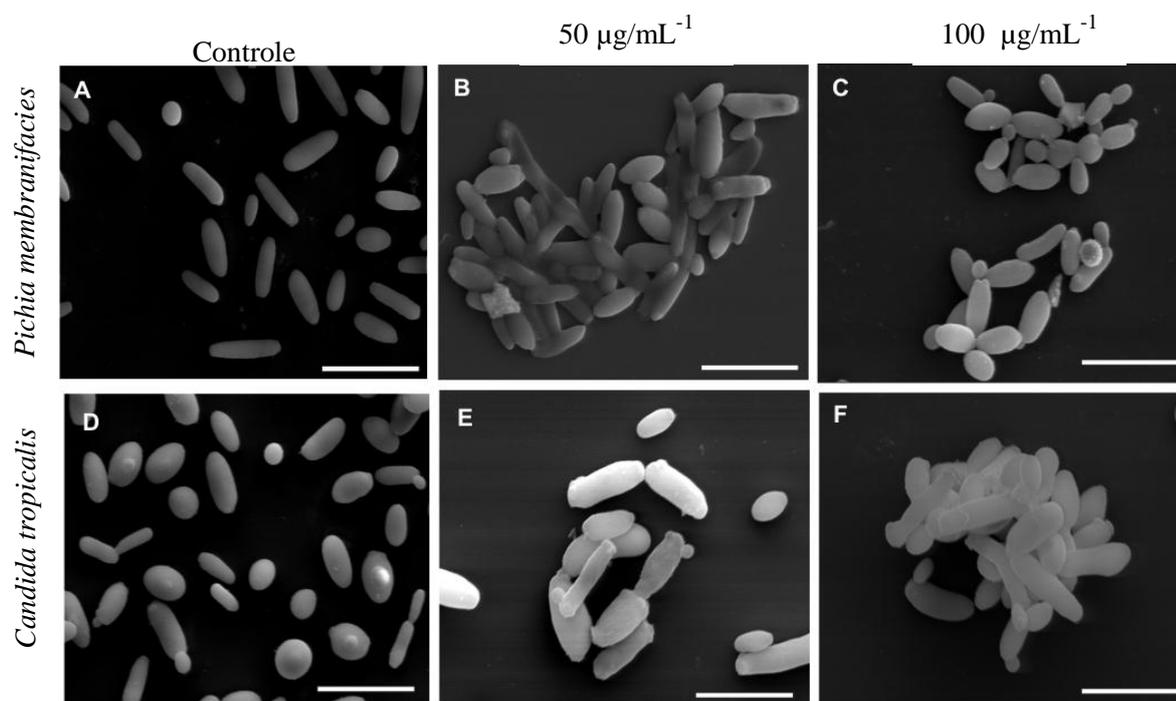


Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura de leveduras tratadas com o PEF2. Barras = 200 µm.

3.4.3 – Caracterização das PEFs por Sequenciamento

Após a demonstração da atividade antimicrobiana do PEF2, a sequência N-terminal das respectivas bandas foi avaliada. A banda PEF2-A (8,5 kDa) mostrou a seguinte sequência: QICTNCCAGRKGCNYYSAD (Fig. 16A) e a banda PEF2-B (5,0 kDa) mostrou a seguinte (GICTNCCAGRKGCNYFSAD) (Fig. 16B). Além disso, foi sequenciada também a banda de 5,0 kDa de PEF3. Esta última mostrou sequência de aminoácidos idêntica a de PEF2-B (Fig. 16B). Todas as sequências apresentaram alta identidade com inibidores de proteinases serínicas das Solanaceae *C. annuum* (gi: 8948493), *Solanum melongena* (gi: 477995), *S. tuberosum* (gi: 15809084), em níveis percentuais de 95, 85 e 73% para a banda 8,5 kDa e 89, 84 e 79% para a banda 5,0 kDa, respectivamente (Fig. 16A e B).

A

PEF2-A (8.5 kDa)	1	Q	I	C	T	N	C	C	A	G	R	K	G	C	N	Y	Y	S	A	D	19	I	P
<i>Capsicum annuum</i>	1	R	I	C	T	N	C	C	A	G	R	K	G	C	N	Y	Y	S	A	D	19	95	95
<i>Solanum melongena</i>	1	Q	I	C	T	N	C	C	A	G	R	K	G	C	S	Y	F	S	E	D	19	85	90
<i>Solanum tuberosum</i>	1	D	I	C	T	N	C	C	A	G	T	K	G	C	N	T	T	S	A	N	19	73	78

B

PEF2-B (5.0 kDa)	1	G	I	C	T	N	C	C	A	G	R	K	G	C	N	Y	F	S	A	D	19	I	P
PEF3-B (5.0 kDa)	1	G	I	C	T	N	C	C	A	G	R	K	G	C	N	Y	F	S	A	D	19	I	P
<i>Capsicum annuum</i>	1	R	I	C	T	N	C	C	A	G	R	K	G	C	N	Y	Y	S	A	D	19	89	95
<i>Solanum melongena</i>	1	Q	I	C	T	N	C	C	A	G	R	K	G	C	S	Y	F	S	E	D	19	84	84
<i>Solanum tuberosum</i>	1	R	I	C	T	N	C	C	A	G	Y	K	G	C	N	Y	Y	S	A	N	19	79	89

Figura 16 - Comparação de seqüências N-terminais de aminoácidos das bandas de 8,5 kDa (A) e de 5,0 kDa (B) de sementes de *C. chinense* com sequencias de proteínas de outras plantas. Para os aminoácidos sequenciados, resíduos idênticos estão apresentados nos resíduos negritos e positivos são mostradas em cinza. As sequencias das seguintes proteínas são apresentadas: Inibidor de proteinase de *Capsicum annuum* (gi: 8948493), de *Solanum melongena* (gi: 477995) e de *Solanum tuberosum* (gi: 15809084). (I) representa a percentagem de resíduos idênticos, e (P) representa a percentagem de resíduos positivos. Os números que flanqueiam as seqüências indicam a posição em que o alinhamento inicia-se.

3.4.4 – Avaliação da Atividade Inibitória de Tripsina e Quimotripsina das PEFs

Após esta descoberta de similaridade dos peptídeos isolados com inibidores de proteinases serínicas, foi caracterizada a atividade inibitória destes peptídeos para enzimas serínicas. Inicialmente na Fig. 17, são mostradas as curvas de titulação das duas proteinases expostas a níveis crescentes de PEF1, PEF2 e PEF3. Na presença de 8,72; 3,2 e 1,45 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de PEF1, PEF2 e PEF3, respectivamente, a atividade inibitória de tripsina foi nivelada, sugerindo uma saturação dos complexos. A atividade de tripsina foi quase completamente inibida na presença de 8,72 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de PEF1 (94% de inibição), 3,2 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de PEF2 (92% de inibição) e 1,45 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de PEF3 (83% de inibição). A capacidade de inibição da atividade enzimática da quimotripsina foi também testada e esta foi inibida em 90, 36 e 24%, quando submetida às mesmas concentrações (8,72; 3,2; 1,45 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) dos respectivos PEFs.

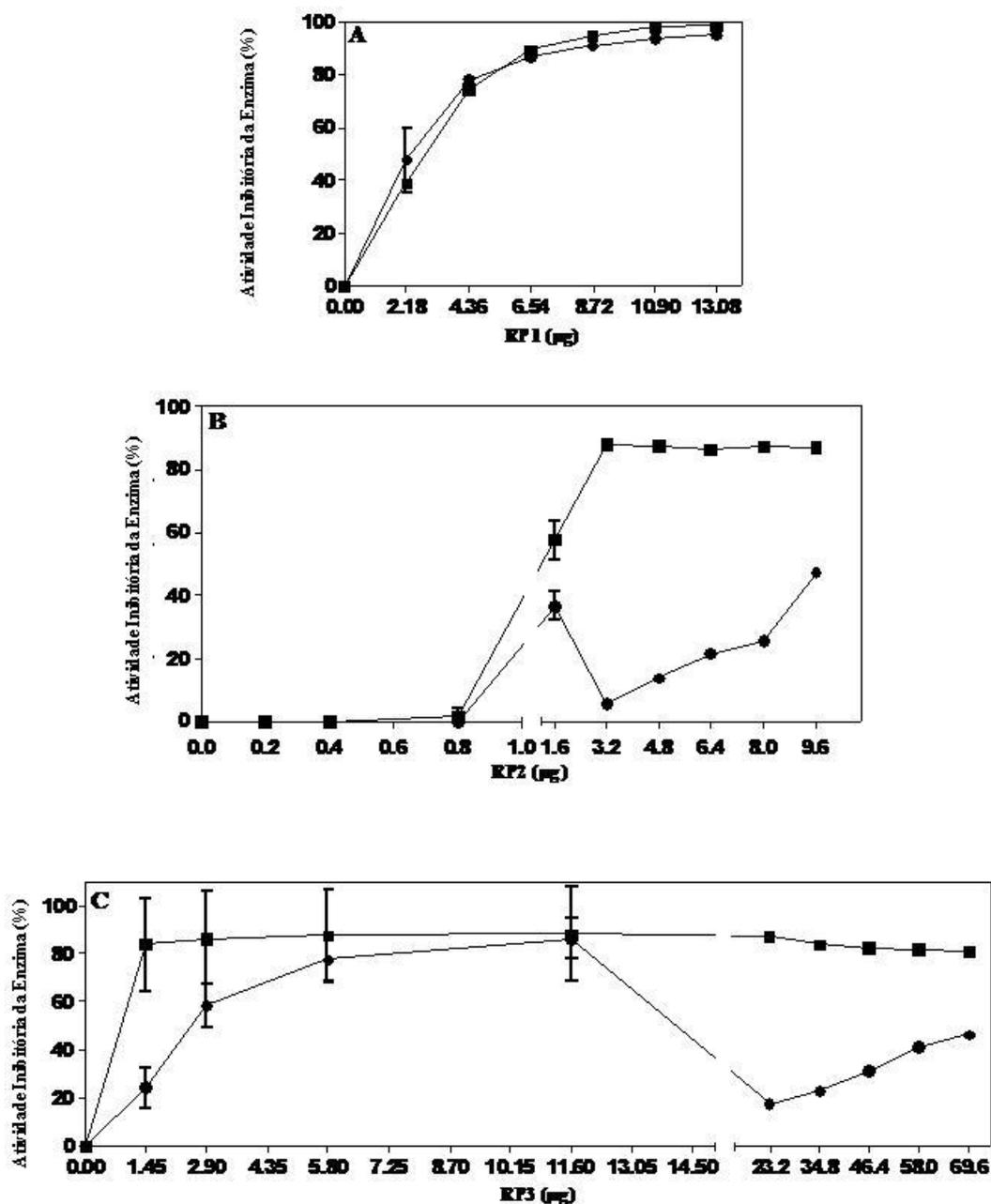


Figura 17 - Atividades inibitórias sobre proteinases séricas quimotripsina (●) e tripsina (■) das PEF1 (A), PEF2 (B) e PEF3 (C). Concentrações crescentes do inibidor foram adicionadas a concentrações fixas das enzimas. As atividades enzimáticas residuais de tripsina e quimotripsina foram determinadas na presença de BAPNA e BTPNA, respectivamente, como substratos. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes.

3.4.5 – Estabilidade de PEF1, PEF2 e PEF3 em relação à pH

No que diz respeito à estabilidade físico-química, PEF1 não foi estável a partir de pH 7,0. PEF2 foi menos estável em todos os pH testados, apresentando uma média de 62% de atividade inibitória em todos os pH testados, e PEF3 exibiu uma estabilidade elevada em pHs variando de 5,0 a 10,0 (Fig. 18).

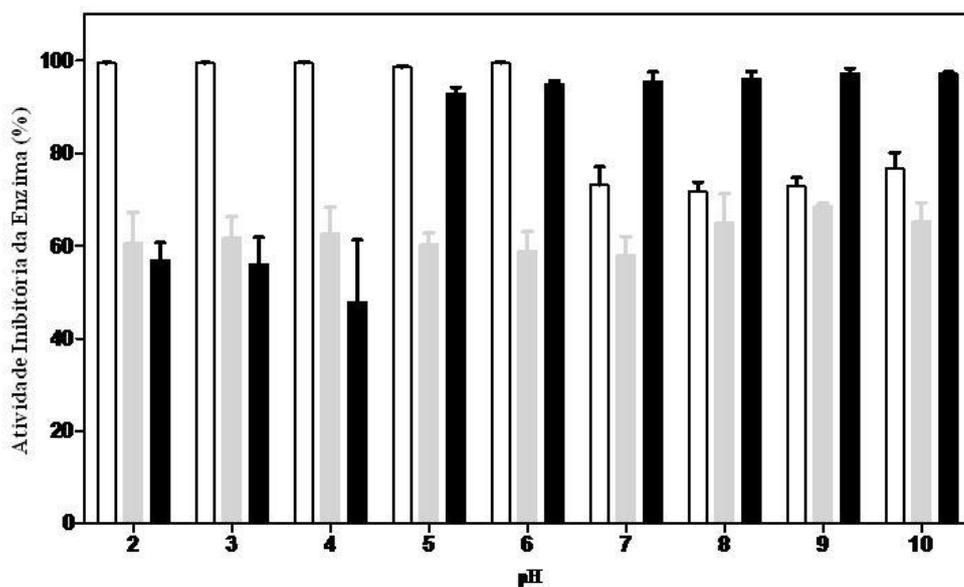


Figura 18 - Efeito do pH sobre PEF1 (branco), PEF2 (cinza) e PEF3 (preto), analisado por sua atividade inibitória. Inibidores purificados foram pré-incubados sob diferentes valores de pH.

3.4.6 – Estabilidade de PEF1, PEF2 e PEF3 em Relação à Temperatura

Na avaliação da estabilidade dos PEFs em diferentes intervalos de temperatura, a atividade de PEF1 inibiu aproximadamente 80% da atividade de tripsina após o aquecimento às temperaturas crescentes variando entre 37 e 100 °C, após incubação durante 30 min. PEF2 era menos estável em todas as temperaturas testadas, apresentando uma média de 66% de atividade inibitória e PEF3 foi resistente às temperaturas crescentes (Fig. 19).

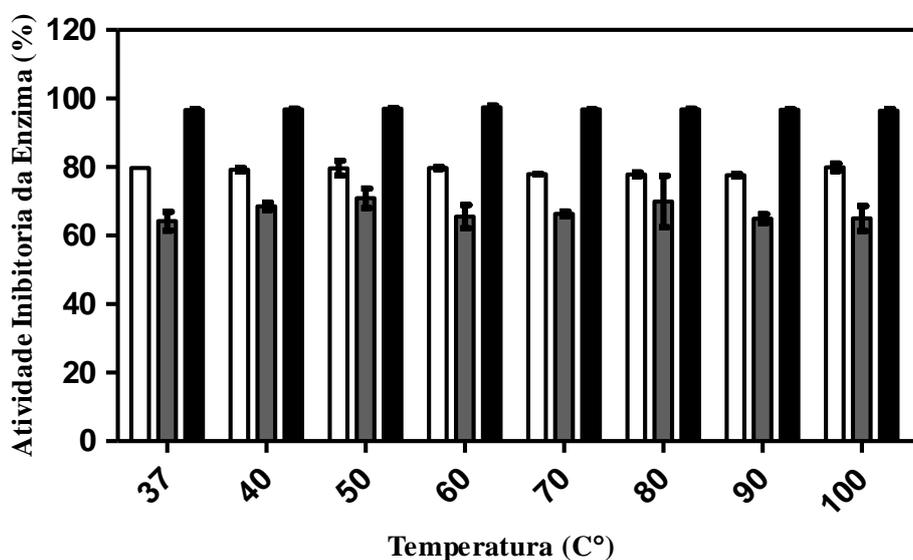


Figura 19 - Efeito da temperatura sobre PEF1 (branco), PEF2 (cinza) e PEF3 (preto), analisados por sua atividade inibitória. Inibidores purificados foram pré-incubados a diferentes temperaturas.

3.5 – DISCUSSÃO

3.5.1 – Purificação e Caracterização

Inibidores de proteinases (IPs) são moléculas de ampla ocorrência. Estes têm sido isolados e caracterizados a partir de um grande número de organismos incluindo plantas, animais e microrganismos (Christeller & Laing, 2005; Mosolov & Valueva, 2005). Os IPs nas plantas são geralmente considerados como proteínas de reserva, sendo expressos na sua grande maioria em sementes e em tubérculos (Park *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2006). Os IPs estão também envolvidos nos mecanismos de defesa da planta hospedeira em resposta ao ataque de insetos e patógenos (Ryan & Pearce, 2001).

Neste trabalho, três frações foram obtidas e denominadas PEF1, PEF2 e PEF3. O perfil eletroforético em gel de tricina de PEF1 e PEF2 mostrou que estas frações eram compostas por duas bandas protéicas de aproximadamente 5,0 e 8,5 kDa, enquanto que PEF3 apresentou também duas bandas protéicas, uma de 5,0 e outra de 8,5 kDa e uma banda adicional de 14 kDa. Ribeiro *et al.* (2007) também caracterizou um inibidor isolado de sementes de pimenta com massa molecular de 6 kDa.

A análise da sequência N-terminal de PEF2-A revelou similaridade de sequência de 95, 87 e 73% com inibidores de proteases das plantas (inibidor de tripsina) *C. annuum*, *S. melongena* e *S. tuberosum*, respectivamente (Fig. 13A). A banda PEF2-B e a banda PEF3 de 5,0 kDa mostraram as mesmas sequências de N-terminais e ambas mostraram identidade de 89, 84 e 79% com inibidores de proteases das plantas *C. annuum*, *S. melogena* e *S. tuberosum*, respectivamente (Fig. 13B). Para as outras bandas não foi possível a determinação da sequência do N-terminal, provavelmente porque os peptídeos tinham seu N-terminal bloqueado.

Pelo padrão de eluição cromatográfica, com tempos de retenção muito próximos, os peptídeos encontrados em PEF1, PEF2 e PEF3, provavelmente são isoformas que foram fracionada pela coluna de fase reversa C18 por sua pequena diferença de hidrofobicidade. Esta ideia é reforçada pela detecção de duas sequências parciais idênticas em PEF2-B e a banda PEF3 de 5,0 kDa. Adicionalmente, a análise em gel bidimensional da fração PEF3 mostrou a presença de várias bandas de pontos

isoeletrícos distintos, o que também reforça a nossa idéia de que o extrato total é composto de muitas isoformas (resultado não mostrado).

A presença de isoformas de inibidores de proteases em sementes de plantas é frequentemente relatada. Um estudo anterior de IPs nas folhas de *C. annuum* revelou a presença de seis inibidores, com cerca de 6 kDa. Outra pesquisa relatou três isoformas de inibidores de proteases que foram purificadas de sementes de *A. plumosa* (Lopes *et al.*, 2009). IPs de planta como os de batata e tomate, mostraram 50% de similaridade de aminoácidos entre as duas isoformas (Barta *et al.*, 2002).

3.5.2 - Avaliação da Atividade Inibitória de Tripsina e Quimotripsina das PEFs

Os IPs têm sido comumente utilizados como meio de estudar os aspectos bioquímicos e fisiológicos das funções de proteases (Garcia-Olmedo *et al.*, 1987; Ribeiro *et al.*, 2007; Page & Di Cera, 2008). Por esta razão, a especificidade de cada atividade inibitória das PEFs foi investigada.

As sementes de *C. chinense* se mostraram fontes ricas de inibidores de tripsina / quimotripsina. Estas contêm três frações contendo inibidores de proteases serínicas. A análise dos resultados da curva de inibição nos permite avaliar as concentrações ótimas necessárias para a ligação entre a enzima e o inibidor (Araujo *et al.*, 2005). Neste sentido, é importante notar que o complexo enzima-inibidor pode ser considerada similar ao complexo constituído entre a enzima e o seu substrato, porque o inibidor tem características estruturais semelhantes ao substrato.

Torres-Castillo *et al.* (2009) confirmaram em um estudo anterior que sementes de *Opuntia streptacantha* também são fontes de IPs com especificidade para enzimas similares à tripsina. Wang & Rao (2012) mostraram que o IP limenina inibiu a atividade tripsina e quimotripsina, e a eficácia da limenina para tripsina foi maior, comparável ao observado para tripsina de soja preta (*G. max*) e soja selvagem (Broze *et al.*, 1997). Resultados similares foram mostrados pelas PEFs neste trabalho. Valores similares foram verificados para IPs isolados de *Enterolobium contortisiliquum* (Batista *et al.*, 1996), *Dimorphandra mollis* (Macedo *et al.*, 2000), *Archidendron ellipticum* (Bhattacharyya *et al.*, 2006) e *Capsicum annuum* (Ribeiro *et al.*, 2007). Ademais, todos esses IPs mostraram-se capazes de inibir a atividade residual de alguma protease seja tripsina, quimiotripsina ou ambas.

Esta inibição seletiva mais forte para a tripsina pode ser determinada por posições de aminoácidos no interior da estrutura primária de um polipeptídeo que determinam a estrutura terciária. Por estas razões, as referidas alterações na estrutura primária impõem pequenas variações na conformação espacial da estrutura tridimensional do polipeptídeo, proporcionando diversificação estrutural global. Em conclusão, tais variações de aminoácidos podem ser a base para as especificidades destes inibidores em relação a proteases alvo específicos.

3.5.3 – Estabilidade de PEF1, PEF2 e PEF3 em relação à pH e temperatura

A PEF1, PEF2 e PEF3 apresentaram forte atividade inibitória de tripsina e moderada atividade inibitória contra quimotripsina. Por esta razão, as caracterizações físico-químicas destes PEFs foram investigadas apenas com tripsina.

As ligações dissulfeto intramoleculares podem ser relacionadas com a estabilidade funcional de inibidores de protease do tipo Kunitz expostos a agentes físicos e a químicos de desnaturação (Broze *et al.*, 1997).

A alta estabilidade de PEF2 e PEF3 a alterações de pH sugere ser uma característica comum para os inibidores das famílias de Kunitz e Bowman-Birk. Resultados semelhantes foram relatados para outros IPs, incluindo os de *Carica papaya* e *Solanum tuberosum* (Azarkan *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005). Este resultado reforça a presença de isoformas de inibidores da protease encontrados nas frações PEF1, PEF2 e PEF3 (correspondente aos peptídeos de 5,0 e 8,5 kDa).

Nós também estudamos a influência da temperatura sobre a atividade PEF1, PEF2 e PEF3 e foi constatada uma estabilidade térmica elevada (Fig. 19). Estes resultados corroboram com a maioria dos trabalhos de IPs, que perdem a sua atividade inibitória após incubação a temperaturas elevadas. A partir destes resultados, estes PEFs pareceram ser mais estáveis do que os inibidores de tripsina do tipo Kunitz (massas moleculares de 20,078 e 20,279 Da) e de inibidores de tripsina de *Calliandra selloi* e *Murraya koenigii* (Shee *et al.*, 2007).

3.5.4 - Atividade antimicrobiana contra leveduras

Diferentes peptídeos têm sido estudados por possuírem algum tipo de atividade biológica *in vitro* contra uma variedade de patógenos fúngicos. Dentre estes,

destacamos os mais estudados em relação ao grupo de peptídeos de plantas como: as knotinas (Garcia-Olmedo *et al.*, 2001), as defensinas (Aerts *et al.*, 2008; Mello *et al.*, 2011), as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) (Cammue *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 2001; Diz *et al.*, 2006; Zottich *et al.*, 2011), alguns inibidores de proteases (Ribeiro *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2009), dentre outros.

IPs são comumente presentes em órgãos e tecidos de armazenamento de plantas, onde são creditados como relevantes moléculas de defesa de herbívoros através da inibição de proteases digestivas (Koiwa *et al.*, 1997). Outros autores tem demonstrado efeito antimicrobiano *in vitro* de alguns IPs de plantas. Um IP de 5,6 kDa foi isolado de tubérculos de *S. tuberosum* e apresentou uma forte atividade antifúngica contra os fungos *C. albicans* e *Rhizoctonia solani* e também contra a bactéria *Clavibacter michiganense* (Kim *et al.*, 2005). Além disso, um inibidor de protease de trigo kernel (WTI) apresentou atividade antimicrobiana contra os fungos *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* e *Septoria tritici*. Os fungos apresentaram o crescimento de hifas e ramificação inibida, bem como a germinação de esporos (Koiwa *et al.*, 1997). Adicionalmente vem sendo mostrado que algumas proteinases secretadas por fungos podem ser um importante fator para a determinação de sua patogenicidade e sua inibição reduziria, significativamente, infecções causadas por esses fungos (Soares-Costa *et al.*, 2002; Satheesh & Murigan, 2011).

Culturas de *P. membranifaciens* e *C. tropicalis* tratados com 50 µg.mL⁻¹ de PEF2 sofreram agregação celular. Estas alterações morfológicas podem justificar a inibição do crescimento detectada por estas leveduras em particular, levando em consideração que mostramos que a aglomeração celular e a formação de pseudohifas podem causar aumento na absorção.

Koo *et al.* (2004) demonstraram que Pn-AMP1, uma proteína de defesa de planta, era capaz de induzir alterações morfogênicas nas células das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, provocando um rompimento e indução de dobras nas suas células. Os autores explicaram que o modo de ação do Pn-AMP1 é a despolarização dos filamentos de actina e que as alterações observadas possam ser um fenótipo de ajuste da despolarização, levando-os a concluir que esta habilidade de induzir a despolarização dos filamentos de actina possa ser um fenômeno importante para o desenvolvimento de sua atividade antimicrobiana. Outras famílias de proteínas e/ou peptídeos de plantas vem tendo destaque também por induzirem alterações na morfologia de microrganismos (Zottich *et al.*, 2011).

Em uma forma interessante, o dimorfismo celular observadas nas amostras tratadas pelas PEFs, pode ter sido desencadeada por variações de pH do crescimento do meio causada pela ação IPs sobre as membranas plasmáticas da levedura. Diz *et al.* (2006) demonstraram que os peptídeos de semente de *Capsicum annuum* promoveram uma fase de conversão semelhante a pseudohifas em *C. albicans*, ligada a permeabilização da membrana plasmática induzida pelos peptídeos.

Kim *et al.* (2005) demonstraram que PT-1, um inibidor de tripsina e quimiotripsina de 5,6 kDa, isolado de tubérculo de batata, apresentava atividade antimicrobiana contra um vasto espectro de microrganismos com *Candida albicans*, *Rhizoctonia solani* e *Clavibacter michiganense subsp. michiganensis*.

Para melhor compreensão do efeito da PEF2 sobre as leveduras estudadas, os detalhes da morfologia das células foram observados através das microscopias óptica e eletrônica de varredura e foram verificadas diferentes alterações morfológicas. Essas alterações foram vistas na maioria das células crescidas na presença de CaTI (Ribeiro *et al.*, 2007), sendo muito provável que a sua presença no meio tenha provocado condições de estresse, impossibilitando um desenvolvimento normal das leveduras. Existem poucos estudos a respeito de alterações morfológicas de microrganismos induzidos pelos inibidores de proteases.

Koiwa *et al.* (1997) mostraram que WTI, um inibidor de proteases encontrado em trigo, apresentava a capacidade de inibir o crescimento das hifas de diferentes fungos fitopatogênicos, com IC₅₀ variando de 111,7 e 500 µg.mL⁻¹. Os autores relataram algumas alterações na morfologia do fungo *Fusarium culmorum*, e correlacionaram essas modificações a presença de WTI no meio. Além disso, os pesquisadores notaram que essas alterações estavam acompanhadas de um acúmulo de material exsudado ao redor das hifas, sugerindo que este inibidor induz uma diminuição da atividade das proteases produzidas por fungo (Ribeiro *et al.*, 2007).

3.6 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste capítulo permitem concluir que:

- Três frações peptídicas (PEFs) enriquecidos com peptídeos de 5,0 e 8,5 kDa foram obtidos a partir de extratos de sementes de *Capsicum chinense*;
- A sequência da PEF2-A apresenta similaridade de 95, 87 e 73% com inibidores de tripsina de plantas de *C. annuum*, *Solanum melongena*, *S. tuberosum*, respectivamente, e PEF2-B e PEF3 apresentam semelhança de 89, 84 e 79% com os inibidores de tripsina de plantas de *C. annuum*, *S. melongena* e *S. tuberosum*, respectivamente;
- Três frações peptídicas (PEFs) enriquecidos com inibidores de protease serínica de sementes de *C. chinense*, inibem tanto atividade tripsina e quimotripsina, inibindo mais fortemente a atividade trípica do que a atividade quimiotrípica;
- Três frações peptídicas (PEFs) enriquecidos com inibidores de protease serínica apresentaram alta estabilidade a temperatura e ao pH;
- Três frações peptídicas (PEFs) enriquecidos com inibidores de protease serínica inibiram o crescimento de diferentes leveduras patogênicas e adicionalmente, causadas aglomeração celular e formação de pseudohifas.

O gênero *Capsicum* possui ampla diversidade genética, sendo composto por cerca de 31 espécies, das quais cinco são domesticadas. A classificação taxonômica ainda é bastante complexa, muitas vezes sendo extremamente difícil definir determinados acessos dentro das espécies descritas.

Esta tese buscou caracterizar a anatomia e a micromorfologia das folhas, frutos e sementes de espécies de *Capsicum baccatum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. annuum* da família Solanaceae com a finalidade de gerar uma fonte de informações sobre sistemática do gênero e também permitir a correlação das características anatômicas e micromorfológicas com a técnica molecular de ISSR. Além disso, foi investigada a presença de compostos químicos nos órgãos das quatro espécies estudadas. No segundo capítulo, foi proposto caracterizar peptídeos antimicrobianos de sementes do acesso UENF 1755 de *Capsicum chinense* Jacq. investigando sua ação contra fungos.

Os resultados anatômicos e micromorfológicos obtidos sugerem que caracteres como: folhas com epiderme unisseriada recoberta por cutícula ligeiramente mais espessa na superfície adaxial; presença de estômatos anomocíticos em ambas as superfícies; presença tricomas tectores e glandulares em ambas as superfícies; mesofilo dorsiventral; parênquima paliçádico com uma camada de células e parênquima lacunoso com 4-5 camadas de células; feixes vasculares do tipo bicolateral, sementes campilótopas, em forma de ferradura, elipsóide, albuminosas, com endosperma abundante, semi-transparente e esbranquiçado, embrião circinado e tegumento reduzido, são importantes para a caracterização do gênero de *Capsicum*.

A conjugação dos resultados de análises anatômicas e moleculares é de grande valia para auxiliar a identificação taxonômica de acessos, bem como para melhor inferir sobre a distância genética entre eles.

Com o objetivo de quantificar a diversidade genética existente entre quatro acessos de *Capsicum*, identificar características anatômicas e morfológicas para subsidiar a taxonomia de alguns acessos e reconhecer possíveis duplicatas e/ou erros de identificação, foi realizada análise molecular com base em marcadores ISSR, no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF. Neste sentido, observamos que algumas características poderiam ser descritas como diagnóstica de espécies os tricomas tectores e também as formas e as cores do fruto. A alta variabilidade entre os

acessos foi detectada por meio de marcadores ISSR. Apesar das espécies estudadas apresentarem uma ampla variabilidade morfológica e molecular essa variabilidade não foi refletida pelas características anatômicas.

As análises de agrupamento e análise de componente principal realizadas nesta tese mostram a formação de dois grupos, o primeiro grupo contendo *C. annuum*, *C. baccatum* e *C. frutescens* e o segundo grupo contendo apenas os acessos de *C. chinense*. No primeiro grupo, verificou-se que, embora tivessem sido separados por espécies, os acessos formam dois subgrupos, um subgrupo de *C. frutescens* e outro com as espécies de *C. baccatum* e *C. annuum*. Esse agrupamento não corresponde a proposta de separação dos complexos gênicos *annuum*, que engloba as espécies *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, complexo *baccatum* e complexo *pubescens*. Entretanto, outros trabalhos também relatam agrupamentos diferentes dessa proposta.

Observou-se que sementes de *Capsicum chinense* parecem ser uma boa fonte de IPs, que são fisiologicamente importantes para a proteção de plantas, mas que biotecnologicamente pode ser exploradas para aplicação comercial como agentes químicos para a agricultura, agentes para a proteção de sementes, defesa de frutos e grãos no pós-colheita, ou para produtos agrícolas obtidos sob cultivo controlado, como vegetais, entre diversas outras aplicações.

Em biotecnologia, sabe-se que os procedimentos para purificação de proteínas e peptídeos correspondem a processos de alto custo em geral com alto grau de complexidade, e apresentam baixa recuperação das moléculas de interesse. Deste modo, frações enriquecidas em peptídeos aqui avaliadas podem ser empregadas no desenvolvimento de compostos comerciais na defesa de plantas ou em associação com compostos antimicrobianos disponíveis. Formulações feitas a partir de material vegetal poderiam ser preparadas de forma semelhante ao que ocorre para vários produtos naturais disponíveis comercialmente para animais e seres humanos.

IPs são amplamente distribuídas na natureza, onde desenvolvem um papel muito importante na atividade fisiológica do controle de protease, tais como a coagulação do sangue, pressão arterial, a degradação de proteínas de reserva durante a germinação de sementes, entre outros (Zimmer *et al.*, 2012). Devido à grande quantidade de aplicação de IPs em áreas que vão desde a proteção da planta contra patógenos e pragas, na medicina, indústria farmacêutica, como no câncer e a inibição da replicação do vírus, a descoberta de novos IPs com novas propriedades são de grande interesse. Relatamos

neste trabalho a identificação de novos inibidores de proteases, que mostraram atividade antifúngica e, adicionalmente, apresentaram diferentes propriedades físico-químicas.

V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AERTS, AM; FRANÇOIS, IEJA; CAMMUE, BPA; THEVISSSEN, K. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci.* v. 65, p. 2069-2079, 2008.
- AGRA, MF; BHATTACHARYYA, J. Ethnomedicinal and phytochemical investigation of the *Solanum* species in the Northeast of Brazil. In: NEE, M. *et al.* (Ed.). *Solanaceae IV*. Kew: Royal Botanic Gardens. p.341-343,1999.
- ALDER, E. Lignin chemistry-past. Present and future. *Wood science technology*, v. 11, n.1/2, p.1-13, 1997.
- ALLARD, RW. Princípios do melhoramento genético das plantas. São Paulo: Edgard Blucher, p. 381, 1971.
- ALVES, VFG; NEVES, LJ. Anatomia foliar de *Less.* (Asteraceae). Rio de Janeiro, *Vernonia polyantes*. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, v. 22, n. 2, p. 1-8, 2003.
- AMME, S; RUTTEN, T; MELZER, M; SONSMANN, G; VISSERS, JPC; SCHLESIER, B; MOCK, HP. A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics*, v. 5, p. 2508-2518, 2005.
- ARAÚJO, APU; HANSEN, D; VIEIRA, DF; DE OLIVEIRA, C; SANTANA, LA; BELTRAMINI, LM; SAMPAIO, CA; SAMPAIO, UM; OLIVA, MLV. Kunitz type *Bauhinia bauhinioides* inhibitors devoid of disulfide bridges: isolation of the cDNAs, heterologous expression and structural studies. *Biol Chem*, v. 386, p. 561-568, 2005.
- ARRIEL, EF; PAULA, RC; BAKKE, OA; ARRIEL, NHC. Divergência genética em *Cnidocolus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm., *Revista de oleaginosas e fibrosas*, v. 8, n. 2/3, p. 813-822, 2004.
- ASCENSÃO, L. Técnicas histoquímicas convencionais de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado. Botucatu: IB-UNESP, 20 p. (mimeogr), 2003.
- AZARKAN, M; DIBIANI, R; GOORMAGHTIGH, E; RAUSSENS, V; BAEYENS-VOLANT, D. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable beta-sheet glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, v.1764, p. 1063-1072, 2006.

- BABU, BS; PANDRAVADA, SR; RAO, RDVJ; ANITHA, K; CHAKRABARTY, SK; VARAPRASAD, KS. Global sources of pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. *Crop Prot*, v. 30, p. 389-400, 2011.
- BARBOSA, RI; LUZ, FJF; NASCIMENTO FILHO, HR; MADURO, CB. Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia brasileira. I. Espécies Domesticadas. *Acta Amazonica*, v.32(2), p.177-192, 2002.
- BARROSO, GM; MORIM, MP; PEIXOTO, AL; ICHASO, CLF. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa Imprensa Universitária (UFV) p 443, 1999.
- BARTA, E; PINTAR, A; PONGOR, S. Repeats with variations: accelerated evolution of the Pin2 family of proteinase inhibitors. *Trends Genet* , v. 18, p. 600-603, 2002.
- BATISTA, IFC; OLIVA, MLV; ARAUJO, MS; SAMPAIO, UM; RICHARDSON, M; FRITZ, H; SAMPAIO, CAM. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry*, Oxford, v.41, n.4, p.1017-1022, 1996.
- BAUM, DA; DEWIT SMITH, S; DONOVAN, SSS. The tree thinking challenge, *Science*, v. 310, p. 979-980, 2005.
- BELLETTI, P; MARZACHI, C; LANTERI, S. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 209, p. 85-91, 1998.
- BENKO-ISEPPON, AM et al. Data Bank Based Mining on the Track of Antimicrobial Weapons in Plant. *Current Protein and Peptide Science*, Holanda, v. 11, p. 195-198, 2010.
- BENTO, CS; SUDRÉ, CP; RODRIGUES, R; RIVA, EM; PEREIRA, MG. Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. *Scientia Agraria*, v. 8, p. 146- 153, 2007.
- BHATTACHARYYA, A; MAZUMAR, S; LEIGHTON, SM; BABU, CR. A kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization and kinetic properties. *Phytochemistry*, v. 67, p. 232 – 241, 2006.
- BLANK, AF. Teste precoce da capacidade combinatória de linhagens de pimentão (*Capsicum annuum* L.). Tese (Doutorado em Melhoramento de Plantas) - Lavras - MG, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 71p, 1997.

- BORNET, B; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat ISSR Markers; reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular BIOLOGY Reporter*, v.19, p. 209-215, 2001.
- BOSLAND, PW. Breeding for quality in *Capsicum*. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, v. 12, p. 25-31, 1993.
- BOSLAND, PW. Capsicums: innovate veuses of an ancient crop. In: Janick, J. (Ed.), *Progress in New Crops*. ASHS Press, Arlington, VA, pp. 479–487. 1996.
- BOSTOCK, RM. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiological and Mole-cular Plant Pathology, USA*, v. 55, p. 99-109, 1999.
- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BREDENKAMP, CL; VANWYK, AE. The epidermis in Passarina (Thymelaeaceae): structure, function and taxonomic significance. *Bothalia*, v. 30, p. 69-86, 2000.
- BRESSAN-SMITH, RE. Mapeamento de locos de características quantitativas associadas com a morfologia, a fotossíntese e o rendimento do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Tese (doutorado em produção vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ. 99 f. 1998.
- BROEKAERT, WF; TERRAS, FRG; CAMMUE, BPA; VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth. *FEMS Microbiol Lett*, v. 69, p. 55-60, 1990.
- BROEKAERT, WF; CAMMUE, BPA; et al. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sc.*, v. 16, p. 297-323, 1997.
- BROGDEN, KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 3, n. 3, p. 238-50, 2005.
- BROZE, GJ; GIRARD, TJ; NOVOTNY, WF. Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry*, v. 29, p.7539-7546, 1990.
- BÜTTOW, MV; BARBIERI, RL; *et al.* Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. *Ciência Rural*, v.40, n.6, p.1264-1269, 2010.
- CAIXETA, ET; OLIVEIRA, ACB; BRITO, GG; SAKIYAMA, NS. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A; CAIXETA, ET. (Ed.). *Marcadores moleculares*. Viçosa: UFV, p. 9-78, 2006.

- CARLQUIST, S. Structure and ontogeny of glandular trichomes of *Madinae* (Compositae). *Amer. J. Bot.*, v. 45, p. 675–682, 1958.
- CARVALHO, AO; MACHADO, OLT; DA CUNHA, M; SANTOS, IS; GOMES, VM. Antimicrobial peptides and immunocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 39, p. 137-146, 2001.
- CARVALHO, SIC; BIANCHETTI, LB. Sistema de produção de pimentas (*Capsicum* spp.): botânica. Embrapa Hortaliças. Brasília, 2004. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.sisprod/pimenta/index.htm>. Acesso em 3 de maio de 2010.
- CARVALHO, SIC; BIANCHETTI, LB; BUSTAMANTE, PG AND SILVA DB. Catálogo de Germoplasma de Pimentas e Pimentões (*Capsicum* spp) da Embrapa Hortaliças. Embrapa Hortaliças, Brasília, 2003.
- CASTELLANI, ED; FILHO, CFD; AGUIAR, IB; PAULA, RC. Morfologia de frutos e sementes de espécies arbóreas do gênero *Solanum* L. *RBS*, v. 30, n. 1, p. 102-113, 2008.
- CASTRO, HG; BARBOSA, LCA; LEAL, TCAB; SOUZA, CM; NAZARENO, AC. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L) *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.9, n.4, p. 55-61, 2007.
- CASTRO, MS; FONTES, W. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett*, v. 12, p. 11-16, 2005.
- CHIARINI, FE; BARBOZA, GE. Karyological studies in *Jaborosa* (Solanaceae). *Bot J Linn Soc*, v. 156, n. 3, p. 467–478, 2008.
- CHRISTELLER, J; LAING, W. Plant serine proteinase inhibitors. *Protein and Peptide Letters*, v.12, n.5, p. 1-9. 2005.
- CHYE, ML; SIN, SF; XU, ZF; YEUNG, EC. Serine proteinase inhibitor proteins: exogenous and endogenous functions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, v. 42, p. 100-108, 2006.
- CLEMENT, CR; CRISTO-ARAÚJO, M; D’EECKENBRUGGE, GC; PEREIRA, AA; PICANÇO-RODRIGUES, D. Origin and Domestication of Native Amazonian. *Crops. Diversity*, v. 2, p. 72-106, 2010.
- CORNER, EJH. The seeds of dicotyledons. Cambridge: Cambridge University. Press, v.1, p.232-237, 1976.

- COSA, MT; HADID, M; DOTTORI, N; BRUNO, G. Anatomía de órganos vegetativos en *Solanum palinacanthum*, *S. sisymbriifolium* y *S. euacanthum* (Solanaceae). *An. Inst. Biol. Univ.*, v. 73, n. 1; p. 27-38, 2002.
- COSTA, AF. Farmacognosia. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1982.
- COSTA, FR; PEREIRA, TNS; SUDRE, CP; RODRIGUES, R. Marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos na determinação da diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões. *Cienc. Rural*, v. 39, n. 3, p. 696-704, 2009.
- COSTA, LV; LOPES, MTG; LOPES, R; ALVES, SEM. Polinização e fixação de frutos em *Capsicum chinense* Jacq. *Acta Amazo*, v. 38, p. 361-364, 2008.
- CRUZ, CD. Programa GENES: estatística experimental e matrizes. Viçosa: UFV. 2006.
- CRUZ, CD; REGAZZI, AJ. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 480 p, 2004.
- DE LEO, F; VOLPICELLA, M; LICCIULLI, F; LIUNI, S; GALLERANI, R; CECI, LR. Plant-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*, v. 30, p. 347-348, 2002.
- DIZ, MS; CARVALHO, AO; RIBEIRO, SFF; DA CUNHA, M; BELTRAMINIC, L; RODRIGUES, R; NASCIMENTO, VV; MACHADO, OLT; GOMES, VM. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. *Physiologia Plantarum*, v. 142, p. 233–246, 2011.
- DIZ, MSS; CARVALHO, AO; RODRIGUES, R; NEVES-FERREIRA, AGC; DA CUNHA, M; ALVES, EW; OKOROKOVA, AL; OLIVEIRA, MA; PERALES, J; MACHADO, OLT; GOMES, VM. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, v. 1760, p. 1323-1332, 2006.
- DOYLE, JJ; DOYLE, JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.
- EGOROV, AT; ODINTSOVA, IT; PUKHALSKY, AV; GRISHIN, EV. Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, v. 26, p. 2064-2073, 2005.
- ELIAS, SEM, et al. Anatomia foliar em plantas jovens de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. (Solanaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v.26, n.2, p.169-174, 2003.
- EMBRAPA – <http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/index.htm>

- ESHBAUGH, WH. Peppers: History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. Pp. 132-139 in J. Janick and J.E. Simon, eds., *New Crops*. John Wiley & Sons, New York. 1993.
- ESTOPA, RA. et al. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropapus* (DC.) MacLeish). *Scientia Forestalis*, n.70, p.97-106, 2006.
- F. DE LEO, M. BONADE-BOTTINO, L.R. CECI, R. GALLERANI, L. JOAUNIN. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests, *Insect Biochem. Mol. Biol.* V. 31, p. 593–602, 2001.
- FAHN, A. *Plant anatomy*. Oxford, Pergamon Press, 1990.
- FAOSTAT. Agricultural production data. Available at: <<http://www.faostat.fao.org/>>. Acesso em 14/05/2012, 2010.
- FILHO, H. Pimentas Quentes; www.geosites.com/napavalley/1819/index.htm 10/09/12, página mantida por Ring of Fire, 2002.
- GAHAN, PB. *Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction*. Academic Press, London, 1984.
- GARCIA-OLMEDO, F; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P; MOLINA, A; et al. Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.*, n. 498, p. 219-222, 2001.
- GARCIA-OLMEDO, F; SALCEDO, G; SANCHEZ-MONGE, R; GOMEZ, L; ROYO, J; CARBONERO, P. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amylases. *Oxf Surv Plant Mol Cell Biol*, v. 4, p. 275-334, 1987.
- GEHRIG, HH; ROSICKE, H; KLUGE, M. Detection of DNA polymorphisms in the genus *Kalanchoe* by RAPD-PCR fingerprint and its relationships to infrageneric taxonomic position and ecophysiological photosynthetic behaviour of the species. *Plant Science*, v.125, p.41- 41, 1997.
- GOMORI, G. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies *Methods Enzymology* v. 1, p. 138-146, 1955.
- GRANADA-CHACÓN, WA; DE ROJAS, BCE. Anatomia foliar de cuatro especies de *Solanum* L. seccion *Acanthophora* Dunal en Venezuela. *Acta Cient. Venez.*, v. 55, p. 13-26, 2004.
- GUERRA, NA. Estudios cromossómicos de cuatro selecciones de *Capsicum chinense* Jacq. *Revista Científica UDO Agrícola*, v.1, p.34-41, 2001.

- HAQ, SK; ATIF, SM; KHAN, RH. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch. Biochem. Biophys*, v. 43, n. 1, p. 145-159, 2004.
- HE, G; PRAKASH, CS; JARRET, RL. Analysis of genetic diversity in a sweet potato (*Ipomea batata*) germplasm collection using DNA amplification evidence. *Genome*, v. 39, p. 1133-114, 1995.
- HOWARD, RA. The petiole. In *Anatomy of the dicotyledons* (C.R. Metcalfe & L. Chalk, eds.). Clarendon Press, Oxford, v.1, p.88-96, 1979.
- HUNZIKER, A. T. The genera of Solanaceae. Liechtenstein:A.R.G Gantner /Ruggel. 500p, 2001.
- IBPGR. Genetic resources of Capsicum. IBPGR Secretariat Roma p 13, 1983.
- INCE, AG; KARACA, M; ONUS, AN. Development and utilization of diagnostic DAMD-PCR markers for *Capsicum* accessions. *Genet. Resour. Crop Evol.*, v. 56, p. 211 – 221, 2009.
- IZADPANA, A; GALLO, RL. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol.*, v. 52, p. 381-390, 2005.
- JENSEN, WA. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco: WH Freeman, 408p, 1962.
- JOHANSEN, D.A. Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill, 523p, 1940.
- JONES A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends in Plant science Perspectives, USA*, v. 5, p. 225-230, 2000.
- JONES, JB; STALL, RE; BOUZAR, H. Diversity among Xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annu Rev Phytopathol*, v. 36, p. 41–58, 1998.
- KARBAN, R; BALDWIN, IT. Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. *Plant Physiology*, v.115, n.4, p.1299-1305, 1997.
- KIM, JY; PARK, SC; KIM, MH; LIM, HT; PARK, Y; HAHM, KS. Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 330, p. 921-927, 2005.
- KLEIN, DE; GOMES, VM; NETO, SJS; DA CUNHA, M. The Structure of Colleters in Several Species of *Simira* (Rubiaceae). *Ann Bot*, v. 94, p. 733–740, 2004.
- KNAPP, S. Tobacco to tomatoes: A phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J Exp Bot*, v. 53, p. 2001-2022, 2002.

- KOIWA, H; BRESSAN, RA; HASEGAWA, PM. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci*, v. 2, p. 379-384, 1997.
- KONG, H. Comparative morphology of leaf epidermis in the Chloranthaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 136, p. 279-294, 2001.
- KUMAR, R; DWIVEDI, N; *et al.* A Review on Molecular Characterization of Pepper for Capsaicin and Oleoresin. *Intl. J. Plant Breeding*, v. 5, n.2, p. 99-110, 2011.
- KURIACHEN, PM; THOMAS, V; DAVE, Y. Taxonomic and phylogenetic significance of fruit walls in Asclepiadaceae. *Feddes Repertorium* 103: 179-193, 1992.
- LANNES SD; FINGER FL; SCHUELTER AR; CASALI VWD. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. *Scientia Horticulturae*, v. 112, p. 266-270, 2007.
- LASKOWSKY, M; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, v. 49, p. 593-626, 1980.
- LAURENTIN, H. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genet. Res. Crop Evol.*, v. 56, p. 277-292, 2009.
- LOPES, JLS; VALADARES, NF; MORAES, DI; ROSA, JC; ARAÚJO, HSS; BELTRAMINI, LM. Physico-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumose*. *Phytochemistry*, v. 70, p. 871-879, 2009.
- LUCS, JA. Plant immunisation: from myth to SAR. *Pes-ticide science, UK*, v. 55, p. 193-196, 1999.
- MACEDO, ML; MATOS, DGC; MACHADO, OLT; MARANGONI, S; NOVELLO, JC. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry*, v. 54, p. 553-558, 2000.
- MACEDO, MLR; GARCIA, VA; FREIRE, MGM; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd, *Phytochemistry*, v. 68, p. 1104-1111, 2007.
- MAITI, RK; VILLARREAL, LR; TREVINO, AV; VALADES-CERDA, MC. Some aspects on pharmacology of ten species of the family Solanaceae utilized in traditional medicine. *Caldasia*, v. 24, p. 317-321, 2002.
- MARTIN, AC. The comparative internal morphology of seeds. *Am. Midl. Nat.*, Notre Dame, v.36, n.3, p.513-660, 1946.
- MAYER, AM; POLJAKOFF-MAYBER, A. The germination of seeds. 2. ed. Oxford: Pergamon Press Ltda., 192p, 1975.

- METCALFE, C. R. Secreted mineral substances. In: Metcalfe, C.R.; L. Chalk. Anatomy of the Dicotyledons. Clarendon Press: Oxford, v.2, 1989.
- METCALFE, CR; CHALK, L. Anatomy of the Dicotyledones: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press, v.2. 1972.
- METCALFE, CR; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons 2, 2. Nord. J. Bot., v. 4, n. 5, p. 668, 1983.
- MEYER, K. "RRGIBBS" – A program for simple random regression analyses via Gibbs Sampling. In: WORLD CONGRESS OF GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 7, 2002, Montpellier. Proceedings. Montpellier: CD- ROM. 2002.
- MONGKOLPORN, O; TAYLOR, PWJ. Capsicum. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, p. 43-57, 2011.
- MONTEIRO, CES; PEREIRA, TNS; CAMPOS, K; PEREIRA. Reproductive characterization of interspecific hybrids among Capsicum species. *Crop Breed Appl Biotechnol.*, v. 11, p. 241-249, 2011.
- MORAES, TMS; RABELO, GR; ALEXANDRINO, C; NETO, SJS; DA CUNHA, M. Comparative leaf anatomy and micromorphology of Psychotria species (Rubiaceae) from the Atlantic Rainforest. *Acta Bot Brasilica*, v. 25, n.1, p. 178-190, 2011.
- MOREIRA, GRM. *et al.* Espécies e variedades de pimenta. Belo Horizonte: EPAMIG, (Informe Agropecuário), v.27, p.16-29, 2006.
- MORRISON, SC; SAVAGE, GP; MORTON, JD; RUSSELL, AC. Identification and stability of trypsin inhibitor isoforms in pea (*Pisum sativum* L.) cultivars grown in New Zealand. *Food Chem*, v. 100, p. 1-7, 2007.
- MOSCONE, EA *et al.* The evolution of chili peppers (Capsicum – Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Hortic*, v. 745, p. 137-169, 2007.
- MOSOLOV, VV; VALUEVA, TA. Proteinase Inhibitors and Their Function in Plants: A review *Appl Microbiol Biot*, v. 41, p. 227–246, 2005.
- MOTT, KA; GIBSON, AC; O'LEARY, JW. The adaptive significance of amphistomatic leaves. *Plant Cell Environment*, Oxford, v. 5, n. 6, p. 455-60, 1982.
- MOURA, MCCL; GONÇALVES, LSA; SUDRÉ, CP; RODRIGUES, R; AMARAL JÚNIOR, AT; PEREIRA, TNS. Algoritmo de Gower na estimativa da

- divergência genética em germoplasma de pimenta. *Horticultura Brasileira*, v. 28, p. 155-161, 2010.
- NWACHUKWU, CU; MBAGWUF, N; ONYEJIA, N. Morphological And Leaf Epidermal features of *Capsicum annum* and *Capsicum frutescens*, Solanaceae. *Nature and Science*, v. 5, n. 3, 2007.
- O'BRIEN, TP; FEDER, N; MCCULLY, ME. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, v. 59, p. 368-373, 1964.
- OLMSTEAD, RGR; SPRANGLER, E; BOHS, L; PALMER, JD. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: NEE, M. et al. (Ed.). *Solanaceae IV. Advances in Biology and Utilization*. Kew: Royal Botanic Gardens. p.111–138, 1999.
- PAGE, MJ; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci*, v. 65, p. 1220-1236, 2008.
- PARK, S; TAE, S; KANG, C; KIM, JH; KIM, S; SMITH, R; PIKE, LM; HIRSCHI, K. D. Genetic manipulation for enhancing calcium content in potato tuber. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.53, n.14, p.5598–5603, 2005.
- PATEL, AS; SASIDHARAN, N; ASHISH, GV; KUMAR, V. Genetic relation in *Capsicum annum* [L.] cultivars through microsatellite markers: SSR and ISSR. *Intl. J. Plant Breeding*, v. 2, n. 1, p. 67-76, 2011.
- PEREIRA, RCA; CRISOSTOMO, JR. Agronegócio Pimenta no Ceará. *Hortic. Bras.* 29: S6009-S6015, 2011.
- PERRY, *et al.* Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, v. 315, n. 5814, p. 986-988, 2007.
- PETTERS, PJ. Correlations between leaf structural traits and the densities of herbivorous insect guilds. *Biol J Linn Soc Lond*, v. 77, p. 43-65, 2002.
- PICKERSGILL, B. Citogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchia T, Gupta PK (ed) *Chromosome engineering plants: genetics, breeding evolution*. Amsterdam, pp 139-160, 1991.
- PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, v. 96, n. 1, p. 129-133, 1997.
- PICKERSGILL, B. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chilli peppers (genus *Capsicum*). *Evolution*, v. 25, p. 683-691, 1971.

- POSER, GL; VON MENTZ, LA. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, CMO et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2.ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p. 63-76, 2001.
- POTNIS N, MINSAVAGE G, SMITH JK, HURLBERT CJ, NORMAN D. RODRIGUES R, STALL RE, JONES JB Avirulence Proteins AvrBs7 from *Xanthomonas gardneri* and AvrBs1.1 from *Xanthomonas euvesicatoria* contribute to a novel gene-for-gene interaction in pepper. *Mol Plant Microbe Interact.*, v. 25, n. 3, p. 307-320, 2012.
- PRICE, PW. Insect Ecology. 3 ed. John Wiley e Sons, New York, 874 pag, 1997.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2009.
- RAFALSKI, JA. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science*, v.162, p.329- 333, 2002.
- RAMOS, VS; SILVA, GS; FREIRE, MGM; MACHADO, OLT; PARRA, JRP; MACEDO, MLR. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 11348-11355, 2008.
- RAUSHER, M. Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature*, v. 411, p. 857-864, 2001.
- REDDY, M.P; SARLA, N; REDDY, EA. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. *Euphytica*, n. 128, p. 9-17, 2002.
- REFAAT, MH; HODA, AS; ELGARHY. Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on ISSR-PCR markers in Pepper (*Capsicum annum* L.) *Annals of Agric. Sci., Moshtohor*, v.45, n. 4, p. 1565-1579, 2007.
- REIFSCHNEIDER, FJB. (Org.) *Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000.
- REIFSCHNEIDER, FJB; RIBEIRO, CSC. Cultivo. In: Ribeiro, CSC; Lopes, CA; CARVALHO, SIC; HENZ, GM; REIFSCHNEIDER, FJB (ed) *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, p. 11-14, 2008.
- REYES-ESCOGIDO, ML; GONZALEZ-MONDRAGON, EG; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, E. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules* 16: 1253-1270, doi:10.3390/molecules16021253, 2011.

- RIBEIRO, CS; LOPES, CA; CARVALHO, SIC; HENZ, GP; REIFSCHNEIDER, FJB. Pimentas *Capsicum*. Embrapa Hortaliças, p.11-14, 2008.
- RIBEIRO, SFF; CARVALHO, AO; DA CUNHA, M; RODRIGUES, R; CRUZ, LP; MELO, VMM; VASCONCELOS, IM; MELO, EJT; GOMES, VM. Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon* v. 50, p. 600-611, 2007.
- RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzymes inhibitors. *Methods in Plant.Biochemistry*, v. 5, p. 259-305, 1991.
- RISTAINO, JB; STEPHEN, AJ; Ecologically Based Approaches to Management of Phytophthora Blight on Bell Pepper. *Plant Disease*, v. 83, p. 1080-1089, 1999.
- RIVA, EM; RODRIGUES, R; PEREIRA, MG; SUDRÉ, CP; KARASAWA, M; AMARAL, JR; Inheritance of bacterial spot disease in *Capsicum annuum* L. *crop breed appl biotechnol*, v. 4, p. 490-494, 2004.
- ROBBERS, EJ; SPEEDIE, KM; TYLER, EV. *Farmacognosia e biotecnologia*. São Paulo: Premier, p 372, 1996.
- 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 peppers species from the Andean region. *J Food Sci*, v. 75, p. S446–S453, 2010.
- RODRÍGUEZ-BURRUEZO, AH; KOLLMANNNSBERGER, MC; GONZÁLEZ-MÁS, S; NITZ, F. HS-SPME comparative analysis of genotypic diversity in the volatile fraction and aroma-contributing compounds of *Capsicum* fruits from the *annuum-chinense-frutescens* complex. *J. Agric. Food Chem*, v. 58, p. 4388-4400, 2010.
- ROTH, I. *Fruits of angiosperms: encyclopedia of plant anatomy*. Berlin, Gebrüder Borntraeger, 1977.
- RUFINO, JLS; PENTEADO, DCS. Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. *Inf. Agropecu.*, Belo Horizonte, v. 27, p. 7-15, 2006.
- RYAN, CA; PEARCE, G. Polypeptide hormones. *Plant Physiol.*, v. 125, p. 65-68, 2001.
- SANTOS, AS. Marcadores de DNA no melhoramento genético do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, Campos dos Goytacazes. 140p. 2000.

- 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 Biochem*, v. 166, p. 368-379, 1987.
- SELS, J; MATHYS, J; DE CONINCK, BM; CAMMUE, BP; DE BOLLE, MF. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.46, n.11, p.941-950, 2008.
- SHEE, C; ISLAM, A; AHMAD, F; SHARM, AK. Structure-function studies of *Murraya koenigii* trypsin inhibitor revealed a stable core beta sheet structure surrounded by α -helices with a possible role for α -helix in inhibitory function. *Int J Biol Macromol*, v. 41, p. 410-414, 2007.
- SILVA, TMS; AGRA, MF; BHATTACHARYYA, J. Studies on the alkaloids of *Solanum* of northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n.4, p.292-293, 2005.
- SIMMONS, AT; GURR, GM; MCGRATH, D; NICOL, HI; MARTIN, PM. Trichomes of *Lycopersicon* spp. and their effect on *Myzus persicae* (Sulzer), Hemiptera: Aphidae. *Austr. J. Entomol.*, v. 42, p. 373–378, 2003.
- SIMONNE, AH; SIMONNE, EH; EITENMILLER, RR; MILLS, HA; GREEN, NR. Ascorbic acid and provitamin A contents in unusually colored bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *J Food Compos Anal*, v. 10, p. 299–311, 1997.
- SMITH, WK; VOLGEMANN, TC; DELUCIA, EH; BELL, DT; SHEPHERD, KA. Leaf form and photosynthesis. *BioScience*, v. 47, p.785-793, 1997.
- SOUZA, LA; MOSCHETA, IS. Morfo-anatomia do fruto e da plântula de *Aspidosperma polyneuron* M.Arg. (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 52, p. 439-447, 1992.
- STICHER, L; MAUCH-MANI, BM; MÉTRAUX, JP. Systemic acquired resistance. *annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, North Carolina, v. 35, p. 235-270, 1997.
- SUDRÉ, CP *et al.* Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genet Mol Res*, v.9, n. 01, p. 283-294, 2010.
- TANKSLEY, DS. High rates of cross pollination in chilli pepper. *Hort Science*, v. 4, p. 580–2, 1984.
- TERRAS, FR; EGGERMONT, K; KOVALEVA, V; RAIKHEL, NV; OSBORN, RW; KESTER, A; REES, SB; TORREKENS, S; VAN LEUVEN, F;

- VANDERLEYDEN, J; *et al.* Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, v. 7, n. 5, p. 573–588, 1995.
- THOMAS, V; DAVE, Y. Significance of follicle anatomy of Apocynaceae. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, v. 63, p. 9-20, 1994.
- TONG, N; BOSLAND, PW. *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, v. 109, n. 2, p. 71-77, 1999.
- TORRES-CASTILLO, JA; JACOBO, CM; BLANCO-LABRA, A. Characterization of a highly stable trypsin-like proteinase inhibitor from the seeds of *Opuntia streptacantha* (*O. streptacantha* Lemaire) *Phytochemistry*, v. 79, p. 1374-1381, 2009.
- URASAKI, N; TOKUMOTO, M; TORORA, K; BAN, Y; KAYANO, T; TANAKA, H; OKU, H; CHINEN, I; TERAUCHI, R. A male and hermaphrodite specific RAPD markers for papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v.104, n.2-3, p.281-285, 2002.
- VAN LOON, LC; BAKKER, PAHM & PIETERSE, CMJ. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, North Carolina, v.36, p. 453- 483, 1998.
- VESQUE, J. Mémoire sur l'anatomie comparée de l'écorce. *Ann Sci Nat Bot*, v. 2, p. 82-198, 1875.
- VILELA, NJ; RIBEIRO, CSC; MADAIL, JCM. Eficiência técnico-econômico de quatro sistemas de produção de pimentas *Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, p 7, 2008.
- VIÑALS, FN; ORTEGA, RG; GARCIA, JC. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Madrid: Mundi-Prensa, p. 607, 1996.
- WANG, S; RAO, P. A leguminous trypsin-chymotrypsin inhibitor Limenin with antifungal activity from *Phaseolus limensis*. *Eur Food Res Technol*, v. 231, p. 331–338, 2010.
- WILLIAMS, JGK; KUBELIK, AR; LIVAK, KJ; RAFALSKI, JÁ; TINGEY, SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, v.18, p., 6531-6535, 1990.
- WOLFE, AD. ISSR techniques for evolutionary biology. *Methods Enzimol*, v. 395, p. 134-144, 2005.
- WOLFE, MS; XIA, W; MOORE, CL; LEATHERWOOD, DD; OSTASZEWSKI, B; RAHMATI, T; DONKOR, IO; SELKOE, DJ. Peptide mimetic probes and

- molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry*, v.38, p. 4720-7, 1999.
- YAMAMOTO, S.; NAWATA, E. *Capsicum frutescens* L. in southeast and east Asia, and its dispersal routes into Japan. *Economic Botany*, v.59, n.1, p.18-28, 2005.
- YE, ZH. Vascular tissue Differentiation and Pattern Formation in Plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, v. 53, p. 183-202, 2002.
- ZIETKIEWICZ, E; RAFALSKI, A; LABUDA, A. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification *Genomics*, v. 1, p.176-183, 2004.
- ZIMMER, AR; LEONARDIA, B; MIRONA, D; SCHAPOVALA, E; OLIVEIRA, JR, GOSMANN, G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *J. Ethnopharmacol*, v. 139, p. 228– 233, 2012.
- ZOTTICH, U; DA CUNHA, M; CARVALHO, A; DIAS, GB; SILVA, N; SANTOS, IS; DO NACIMENTO, V; MIGUEL, EC; MACHADO, O; GOMES, V. 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*, v. 1810, p. 375-383, 2011.