

ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL PROTÉICO E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS DE FRUTOS IMATUROS E
MADUROS DE *Capsicum chinense* Jacq. SOBRE LEVEDURAS

MARILUCIA DE CARVALHO RIBEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

FEVEREIRO – 2021

ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL PROTÉICO E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS DE FRUTOS IMATUROS E
MADUROS DE *Capsicum chinense* Jacq. SOBRE LEVEDURAS

MARILUCIA DE CARVALHO RIBEIRO

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

Orientador: Prof^a. Valdirene Moreira Gomes

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

FEVEREIRO - 2021

ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL PROTÉICO E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS DE FRUTOS IMATUROS E
MADUROS DE *Capsicum chinense* Jacq. SOBRE LEVEDURAS

MARILUCIA DE CARVALHO RIBEIRO

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

Aprovada em 25 de fevereiro de 2021.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Anna Lvovna Okorokova Façanha (D.Sc., Química Biológica) – UENF

Dr.^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão (D.Sc., Biotecnologia e Biotecnologia) – UFRJ

Prof. Umberto Zottich Pereira (D.Sc., Biotecnologia e Biotecnologia) – UFRR

Prof^a. Valdirene Moreira Gomes (D.Sc., Ciências Biológicas) – UENF

(Orientadora)

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

Dedico este trabalho a Rose, a admirável mulher que chamo de mãe, pois me ensinou valores desde nova, os quais são atributos da grande mulher que sou hoje. Obrigada por me incentivar, por ser meu alicerce e companheira de caminhada em cada etapa da minha vida.

AGRADECIMENTO

Primeiramente à Deus e Pai Todo – Poderoso, a quem tributo toda honra e glória, sempre, pois sem ele eu não teria a capacidade de desenvolver este trabalho;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Valdirene Moreira Gomes, pois foi uma pessoa essencial para o engajamento desta etapa da minha vida, abriu portas que eu não imaginava conseguir, sempre me proporcionando a oportunidade de crescimento profissional, me auxiliando nos meus erros e comemorando as minhas vitórias. Obrigada pelos incentivos, por todo carinho, preocupação e por sempre acreditar em mim;

À Prof.^a Anna Lvovna Okorokova Façanha, Dr.^a Thatiana Biá Ventura Simão e ao Prof. Dr. Umberto Zottich Pereira, por me conceder o “sim” para participar da banca examinadora;

À Dr.^a Layrana de Azevedo dos Santos por ter aceitado revisar esta dissertação com todo carinho, e cada detalhe observado com minuciosidade destacando idéias para melhorar a escrita do meu trabalho;

Aos integrantes dos grupos de pesquisa dos professores Valdirene Gomes e André Carvalho, pois foram essenciais no meu desenvolvimento para este trabalho, sempre sanando dúvidas frequentes. Agradeço pela interação que gerou uma amizade para fora da instituição, pelas conversas, comemorações das vitórias de cada um, por me interagirem em um grupo incrível com pessoas maravilhosas;

À Thaynã Amanda, pois desde o início sem me conhecer aceitou com um sorriso em me orientar nas atividades do laboratório, uma pessoa incrível que se tornou uma grande amiga dentro e fora da instituição, sempre me dando uns tapas pra acordar, paciente em cada explicação e de uma didática clara e sucinta nos detalhes. Obrigada por compartilhar seu conhecimento, me apoiar em absolutamente TUDO, por confiar à mim tudo, por ser a melhor ouvinte e por ser minha melhor amiga;

Ao Rodrigo Gebara, que foi o primeiro que tive contato para integrar neste grupo de pesquisa, sem ter conhecimento da minha pessoa foi muito prestativo e atencioso em me ajudar nos primeiros passos dados na UENF. Uma pessoa bondosa que me guiou até a UENF, hoje se torna um membro da minha família, um irmão que nunca tive. Confiou à mim os conhecimentos adquiridos em seus experimentos, sem medo de ocorrer um desastre. Com cada detalhe em suas explicações, hoje tenho autonomia para resolver qualquer tipo de incidente e para realizar qualquer prática no laboratório, e esse foi o melhor sentimento que aderi nesses anos, coragem. Se disponibilizou em absolutamente todos os dias, de segunda à segunda, para a realização de todos os resultados obtidos deste trabalho, acordou 2 h, 5 h da manhã pra terminar experimentos comigo, mais ansioso que eu mesma em obter resultados positivos para o trabalho, se dedicou por inteiro em me ajudar com TUDO. Hoje tudo que sei devo à você e Thaynã, que foram anjos nessa caminhada, me faltam palavras para descrever o quanto agradecida sou, pois hoje sei que tenho potencial para ser uma boa profissional por você acreditar mais em mim do que eu mesma;

Ao meu companheiro Carlos Maycon, que embora não entenda a linha de pesquisa na qual trabalho, sempre me ouve, me aconselha, me apoia, tem em mim uma admiração pelo que faço, me incentiva quando o desânimo me assombra, entende minha ausência quando me dedico aos estudos, e se hoje almejo o Doutorado, é devido seu incentivo que disse que tenho capacidade para isso e muito mais. Obrigada por sempre estar ao meu lado;

À minha mãe Rose Mara de Carvalho Ribeiro, por ser compreensiva nas minhas escolhas, participar nas minhas decisões, cuidar sempre do meu bem-estar, por me acompanhar em mais um trajetória fundamental da minha vida, por todos ensinamentos, conselhos, abraços, por ser meu exemplo de vida, e TUDO que sou hoje é graças ao seu esforço feito por mim e TUDO que faço é pensando em lhe dar orgulho e tudo em dobro dado à mim;

À Instituição Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e a CAPES, pela oportunidade e suporte financeiro a este trabalho.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Peptídeos antimicrobianos.....	1
1.2 – Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.....	3
1.3 – Peptídeos antimicrobianos de plantas.....	6
1.4 – Pimentas do gênero <i>Capsicum</i>	8
1.5 – Gênero <i>Candida spp.</i>	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 – Objetivo Geral.....	12
2.2 – Objetivos Específicos.....	12
3. METODOLOGIA.....	13
3.1 – Materiais Biológicos.....	13
3.1.1 – Sementes.....	13
3.1.2 – Microrganismos.....	13
3.2 – Extração e purificação de proteínas dos frutos imaturos e maduros de <i>C. chinense</i> ...	13
3.2.1 – Cultivo das plantas.....	13
3.2.2 – Extração de proteínas dos frutos.....	14
3.2.3 – Cromatografia de troca iônica.....	14
3.2.4 – Cromatografia de fase reversa em HPLC.....	15
3.2.5 – Quantificação de proteínas.....	16
3.2.6 – Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS.....	16
3.2.9 – Identificação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas.....	17
3.3 – Análise da atividade antimicrobiana e mecanismo de ação dos peptídeos.....	18
3.3.1 – Ensaio antifúngico.....	18
3.3.2 – Análise da viabilidade celular fúngica.....	18
3.3.3 – Efeito das frações purificadas sobre a permeabilização de membranas de células de leveduras.....	19
3.3.4 – Ensaio de determinação da indução de ROS intracelular.....	19
3.3.5 – Análise estatísticas.....	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1 – Perfil cromatográfico das frações D1 e D2 de frutos imaturos e maduros de <i>C. chinense</i>	21
4.2 – Perfil eletroforético das frações dos frutos imaturos e maduros de <i>C. chinense</i>	22

4.3 – Ensaio antifúngico de leveduras patogênicas na presença de diferentes frações dos frutos de <i>C. chinense</i>	23
4.5 – Ensaio antifúngico de leveduras do gênero <i>Candida</i>	28
4.6 – Ensaio de viabilidade celular em leveduras do gênero <i>Candida</i>	31
4.7 – Efeito das frações HI9, HM6 e HM7 de <i>C. chinense</i> sobre a permeabilização de membranas de leveduras	33
4.8 – Efeito das frações HI9, HM6 e HM7 de <i>C. chinense</i> sobre a indução da produção endógena de ROS em células de leveduras	38
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eventos que ocorrem na membrana citoplasmática bacteriana após a adsorção inicial do peptídeo antimicrobiano (AMP). Esses eventos não são necessariamente exclusivos de uns aos outros. Imagem adaptada por NGUYEN et al. 2011.....5

Figura 2: Cromatografia de troca iônica dos ERPs de frutos imaturos (A) e maduros (B) utilizando resina DEAE-Sepharose. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Fração D1 foi eluída em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0; Fração D2 foi eluída em Tris-HCl 100 mM pH 8,0 acrescido de NaCl 0,1 M. O fluxo utilizado foi de 1mL/min⁻¹, coletamos 3 mL por tubo.....21

Figura 3: Efeito das frações D1 e D2 em gel de tricina das frações obtidas de frutos imaturos (A) e maduros (B) de *C. chinense*; (M) marcador de baixa massa molecular; (ERP) extrato rico em proteínas; (D1) fração eluída em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; (D2) fração eluída em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, acrescido de NaCl 0,1M.....22

Figura 4: Visualização gráfica do ensaio antifúngico frente ao crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* na ausência (controle) e presença de 100 µg.mL⁻¹ das frações D1 e D2. (A-B) Células fúngicas tratadas com as frações do fruto imaturo e (C-D) as células fúngicas tratadas com frações do fruto maduro. Os experimentos foram realizados em triplicata. (*) Indicam diferenças significativas ($p < 0.001$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras foi indicado o valor da inibição (%)......24

Figura 5: (A) Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC, da fração D2 de frutos imaturos de *C. chinense*, obtida após cromatografia de troca iônica. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida realizada com 0,1% de TFA (Solvente A) e a amostra eluída usando um gradiente linear de propanol (Solvente B). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL.min⁻¹. (B) Visualização eletroforética das frações HI1 a HI16 por gel de tricina na presença de SDS, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. Todas as frações foram tratadas β-mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (Da)......26

Figura 6: (A) Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC, da fração D2 de frutos maduros de *C. chinense*, obtida após cromatografia de troca iônica. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida realizada com 0,1% de TFA (Solvente A) e a amostra eluída usando um gradiente linear de propanol (Solvente B). O fluxo utilizado foi de 0,5

mL.min⁻¹. (B) Visualização eletroforética das frações HM1 a HM16 por gel de tricina na presença de SDS, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. Todas as frações foram tratadas β-mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (Da).....27

Figura 7: Visualização gráfica do ensaio antifúngico do crescimento da levedura *C. albicans* na ausência (controle) e presença de 50 µg.mL⁻¹ das frações HI1 a HI16, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. Os experimentos foram realizados em triplicata. (*) Indicam diferenças significativas ($p < 0.001$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras foi indicado o valor da inibição (%).....29

Figura 8: Visualização gráfica do ensaio antifúngico do crescimento da levedura *C. tropicalis* na ausência (controle) e presença de 50 µg.mL⁻¹ das frações HI3, HI8, HI9 e HI14, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. Os experimentos foram realizados em triplicata. (*) Indicam diferenças significativas ($p < 0.001$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras foi indicado o valor da inibição (%).....29

Figura 9: Visualização gráfica do ensaio antifúngico do crescimento da levedura *C. albicans* na ausência (controle) e presença de 50 µg.mL⁻¹ das frações HM1 a HM16, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. Os experimentos foram realizados em triplicata. (*) Indicam diferenças significativas ($p < 0.001$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras foi indicado o valor da inibição (%).....30

Figura 10: (A) Imagens das placas de Petri mostrando o crescimento de colônias na condição controle e após 24 h de tratamento com 50µg.mL⁻¹ das frações HI3, HI8, HI9 e HI14, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. (B) Tabela referente a porcentagem de perda de viabilidade em *C. albicans* após 24 h de tratamento com as frações HI3, HI8, HI9 e HI14 e (C) refere a porcentagem de perda de viabilidade em *C. tropicalis*. CFU = Unidade Formadora de Colônia (do inglês, *Colony Forming Unit*). Os experimentos foram realizados em triplicata.....32

Figura 11: (A) Imagens das placas de Petri mostrando o crescimento de colônias na condição controle e após 24 h de tratamento com 50 µg.mL⁻¹ das frações HM3, HM6, HM7 e HM13, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. (B) Tabela referente a porcentagem de perda de viabilidade em *C. albicans* após 24 h de tratamento com as frações HM3, HM6, HM7 e HM13. CFU = Unidade Formadora de Colônia (do inglês, *Colony Forming Unit*). Os experimentos foram realizados em triplicata.....33

Figura 12: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda *SYTOX Green*, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 50 µg.mL⁻¹ das frações HI9, HM6 e HM7, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. O ensaio foi lido no tempo de 24 h e as células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm.....35

Figura 13: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda *SYTOX Green*, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 25 µg.mL⁻¹ das frações HI9, HM6 e HM7, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. O ensaio foi lido no tempo de 24 h e as células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm.....36

Figura 14: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. tropicalis* incubadas com a sonda *SYTOX Green*, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 25 µg.mL⁻¹ e 50 µg.mL⁻¹ da fração HI9, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. O ensaio foi lido no tempo de 24 h e as células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm.....37

Figura 15: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda 2',7' – diclorofluoresceína diacetato, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 50 µg.mL⁻¹ da fração HI9, HM6 e HM7, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm. O ensaio foi lido no tempo de 24 h.....39

Figura 16: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda 2',7' – diclorofluoresceína diacetato, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 25 µg.mL⁻¹ das frações HI9, HM6 e HM7, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm. O ensaio foi lido no tempo de 24 h.....40

Figura 17: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. tropicalis* incubadas com a sonda 2',7' – diclorofluoresceína diacetato, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 25 µg.mL⁻¹ e 50 µg.mL⁻¹ da fração HI9, obtida após cromatografia de fase reversa em HPLC. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm. O ensaio foi lido no tempo de 24 h.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação dos resultados obtidos dos efeitos das frações D1 e D2 de frutos imaturos e maduros de <i>C. chinense</i> Jacq.	24
Tabela 2: Análise comparativa dos resultados obtidos dos efeitos da fração D2 de frutos imaturos e maduros de <i>C. chinense</i> Jacq. após purificação por cromatografia em fase reversa em coluna C18 – HPLC	30
Tabela 3: Análise comparativa dos resultados obtidos dos efeitos da fração D2 de frutos imaturos e maduros de <i>C. chinense</i> Jacq. após purificação por cromatografia em fase reversa em coluna C18 – HPLC	31
Tabela 4: Análise comparativa dos efeitos das frações isoladas de frutos de <i>C. chinense</i> Jacq. na caracterização da morfologia de células cultivadas de <i>C. albicans</i>	42
Tabela 5: Análise comparativa da concentração da fração HI9 de frutos imaturos de <i>C. chinense</i> Jacq. na caracterização da morfologia de células cultivadas de <i>C. tropicalis</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPs – do inglês, *antimicrobial peptides*;

CFU – do inglês, *colony forming unit*;

Cathi – do inglês, *Capsicum annuum thionine-like*;

Da – Daltons (unidade de massa atômica);

DEAE – do inglês, *diethylaminoethyl cellulose*;

DIC – Contraste de interferência diferencial;

D1 – fração básica não retida na coluna DEAE;

D2 – fração àcida retida na coluna DEAE;

ERP – extrato rico em proteínas, obtido da fase inicial do processo de extração proteica dos frutos;

EDTA – do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*;

HI1 – HI16 – frações provenientes da cromatografia em coluna de fase reversa C18, obtidas a partir da fração D2 dos frutos imaturos de *C. chinense*;

HM1 – HM16 – frações provenientes da cromatografia em coluna de fase reversa C18, obtidas a partir da fração D2 dos frutos maduros de *C. chinense*;

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio;

HCl – Cloreto de hidrogênio (ou ácido clorídrico);

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

KCl – Cloreto de potássio;

LTPs – do inglês, *lipid transfer proteins*;

MS – do inglês, *mass spectrometry*;

NaCl – Cloreto de sódio;

NaOH – Hidróxido de sódio;

Na₂HPO₄ – Fosfato dissódico ou hidrogenofosfato dissódico;

O⁻² – Ânions superóxido;

OH• – Radical hidroxil;

pH – Potencial hidrogeniônico;

PIs – do inglês, *proteinase inhibitor*;

ROS – do inglês, *reactive oxygen species*;

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio;

TFA – do inglês, *trifluoroacetic acid*;

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano;

RESUMO

O uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos contribui para o surgimento de microrganismos resistentes, promovendo prejuízos na saúde pública, sendo desta forma necessário a descoberta de novas moléculas terapêuticas, capazes de controlar enfermidades causadas por agentes infecciosos. Neste cenário, encontram-se os peptídeos antimicrobianos de plantas (AMPs) que são moléculas promissoras na área biotecnológica e que se destacam por suas propriedades antifúngicas. O objetivo deste trabalho foi extrair, purificar e avaliar o potencial antifúngico de peptídeos presentes em frutos imaturos e maduros de *C. chinense* Jacq. (acesso UENF 1706) sobre as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*. Inicialmente as proteínas desses frutos sem sementes foram extraídas em tampão fosfato de sódio, pH 5,4, precipitadas com sulfato de amônio a 70% de saturação, seguida de aquecimento a 80 °C. Posteriormente o extrato rico em peptídeos foi fracionado por cromatografia de troca iônica, resina DEAE-Sepharose, e fase reversa em HPLC. Todo processo foi monitorado por eletroforese por tricina-SDS-PAGE. Os resultados revelaram que a fração denominada D2 de frutos imaturos e maduros na concentração de 100µg.mL⁻¹, foram capazes de inibir significativamente o crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Desta forma a fração D2 obtida de frutos maduros e imaturos foi selecionada para purificação através de cromatografia de fase reversa em HPLC, onde dezesseis diferentes frações (H1-H16) foram obtidas para ambas as amostras de frutos, e estas foram submetidas a ensaio antifúngico, nas concentrações de 25 e 50 µg.mL⁻¹. A fração isolada HI9 de frutos imaturos apresentou atividade antimicrobiana mais ativa, após observar inibição de 99% sobre as leveduras testadas, isso quando comparada com as frações HM6 e HM7 de frutos maduros que apresentaram ser suscetíveis somente sobre *C. albicans*, com inibição do crescimento em 99% e 97,54%, respectivamente. O ensaio de viabilidade celular das frações HI9, HM6 e HM7 apresentaram propriedades fungicidas. Para elucidar o mecanismo de ação destas frações, avaliamos o potencial de permeabilização de membrana plasmática e o aumento da produção endógena de ROS nas leveduras. Foi mostrado que na presença das frações selecionadas houve diminuição do número de células fúngicas viáveis e alterações morfológicas nas condições testadas, porém não foi possível observar o comprometimento da permeabilidade da membrana e o aumento de ROS quando as células foram analisadas no tempo de 24 h. Desta forma, o estágio de desenvolvimento do fruto mostrou-se um fator importante na expressão de peptídeos relacionados com a defesa vegetal contra patógenos, como observado pelas distintas atividades antifúngicas obtidas.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos, Pimenta, *Candida*, *Capsicum*.

ABSTRACT

The indiscriminate use of antimicrobial drugs contributes to the emergence of resistant microorganisms, promoting damage to public health, making it necessary to discover new therapeutic molecules, capable of controlling diseases caused by infectious agents. In this scenario, plant antimicrobial peptides (AMPs) are found, which are promising molecules in the biotechnological area and which stand out for their antifungal properties. The objective of this work was to extract, purify and evaluate the antifungal potential of peptides present in immature and ripe fruits of *C. chinense* Jacq. (access UENF 1706) on the yeasts *C. albicans* and *C. tropicalis*. Initially the proteins of these seedless fruits were extracted in sodium phosphate buffer, pH 5.4, precipitated with ammonium sulfate at 70% saturation, followed by heating to 80 °C. Subsequently, the peptide-rich extract was fractionated by ion exchange chromatography, DEAE-Sepharose resin, and reverse phase by HPLC. The whole process was monitored by electrophoresis by tricine-SDS-PAGE. The results revealed that the fraction called D2 of immature and ripe fruits at a concentration of 100µg.mL⁻¹, were able to significantly inhibit the growth of *C. albicans* and *C. tropicalis*. In this way, the fraction D2 obtained from ripe and immature fruits was selected for purification by means of HPLC reverse phase chromatography, where sixteen different fractions (H1-H16) were obtained for both fruit samples, and these were subjected to antifungal assay, at concentrations of 25 and 50 µg.mL⁻¹. The HI9 isolated fraction of immature fruits showed more active antimicrobial activity, after observing 99% inhibition on the tested yeasts, when compared to the HM6 and HM7 fractions of ripe fruits that showed to be susceptible only to *C. albicans*, with growth inhibition 99% and 97.54%, respectively. The cell viability assay of the HI9, HM6 and HM7 fractions showed fungicidal properties. To elucidate the mechanism of action of these fractions, we evaluated the potential for plasma membrane permeabilization and the increase in the endogenous production of ROS in yeasts. It was shown that in the presence of the selected fractions there was a decrease in the number of viable fungal cells and morphological changes in the conditions tested, however it was not possible to observe the impairment of membrane permeability and the increase in ROS when the cells were analyzed within 24 h. Thus, the stage of development of the fruit proved to be an important factor in the expression of peptides related to plant defense against pathogens, as observed by the different antifungal activities obtained.

Keywords: Antimicrobial peptides, Pepper, *Candida*, *Capsicum*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*), são moléculas essenciais do sistema imune inato de organismos vivos como peixes, mamíferos, insetos, plantas e em microrganismos como bactérias e fungos. São expressos de forma constitutiva, fazendo parte do programa de desenvolvimento normal do organismo, ou podem ser induzidas, quando se trata da defesa do organismo a algum fator de estresse. Essas moléculas protéicas apresentam variedade quanto à sequência, estrutura e conformação, geralmente possuindo 12 a 100 resíduos de aminoácidos. São ricos em resíduos de cisteína, o que favorece a formação de pontes dissulfeto conferindo estabilidade, resistência à degradações decorrentes de altas temperaturas, alteração de pH e ações proteolíticas (ANNUNZIATO e COSTANTINO, 2020).

Os AMPs são classificados em dois grandes grupos conforme a forma de síntese. O primeiro grupo compreende os que são sintetizados por grandes complexos enzimáticos e apresentam aminoácidos não ribossomais, como as gramidinas, polimixinas, estreptograminas e vancomicina (AMPs de bactérias). O segundo grupo de AMPs são codificados por genes, e sintetizados em ribossomos. Este último grupo, possui subclassificações de acordo com a sequência primária, suas estruturas secundárias, tridimensional e pontes dissulfeto. A primeira subclassificação é formado por peptídeos que adotam conformação de α -hélice em ambientes hidrofóbicos, tais como a cecropina (AMP da hemolinfa do inseto *Hyalophora cecropia*) e a mangainina (AMP da pele do anfíbio *Xenopus leavis*). O segundo subgrupo envolve peptídeos que apresentam estruturas secundárias em folha- β , como por exemplo, a taquiplesia (AMP do caranguejo ferradura *Limulus polyphemus*) e a tanatina (AMP do inseto *Podisus maculiventris*) (TAM et al. 2015). Os que englobam o terceiro subgrupo são conhecidos como AMPs ricos em cisteínas que formam pontes dissulfetos, o que confere uma maior estabilidade da molécula, como por exemplo a PvD1 (AMP de sementes *Phaseolus vulgaris* L). O quarto subgrupo refere-se aos peptídeos cíclicos devido a presença de uma ligação peptídica formada entre o N e o C – terminal, como por exemplo a Kalata B1 (AMP

da planta *Oldenlandia affinis*). O último subgrupo englobam os AMPs estendidos, que são predominantemente ricos em aminoácidos específicos, como prolina, triptofano, arginina e histidina, não têm elementos de estrutura secundária regulares, como por exemplo a indolicidina (AMP de células sanguíneas de neutrófilos de vacas) (BROEKAERT et al. 1997; SEO et al. 2012).

Os AMPs compartilham algumas características em comum, como massa molecular relativamente baixa (inferior a 10 kDa), propriedades anfipáticas, possuindo tanto uma região hidrofóbica que interage com lipídeos quanto uma região hidrofílica carregada positivamente (com alto conteúdo de lisina, arginina e ou histidina) capaz de interagir com resíduos aniônicos e a presença de um número variável de resíduos cisteínicos que contribuem para estabilizar os arcaúos conservados através da formação da ligação dissulfeto que contribuem para uma estrutura compacta e resistente à degradação química e proteolítica, e pode ser atribuído a diferentes classes estruturais (PADOVAN et al. 2010; BROWNE et al. 2020).

Devido a problemática atual da resistência adquirida pelos microrganismo, gerado pelo uso indiscriminado de fármacos convencionais, se intensificou as buscas por moléculas com potencial terapêutico, e dentre elas os AMPs mostram-se promissores para o desenvolvimento de novos fármacos pelo seu diferencial no mecanismo de ação; atividade em baixas concentrações; potencial de aplicação em áreas como agricultura, veterinária, alimentação e medicina; amplas propriedades biológicas já postualadas em estudos anteriores como antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antitumorais; e não demandam de receptores específicos apresentando assim menor propensão de adaptação e resistência microbiana (OGUIS et al. 2019).

Muitos peptídeos antimicrobianos têm demonstrado também a capacidade de ativar a resposta imune inata com baixa ou sem exibir nenhuma imunogenicidade, apresentam uma gama de propriedades imunomoduladoras pelo sistema imune inato quanto pela adaptativa, incluindo a regulação da expressão de centenas de genes em variedade de células imunitárias e a indução de produção de citocinas pró-inflamatórias. Alguns AMPs mostraram um efeito sinérgico com antibióticos convencionais, aumentando a sua potência *in vivo*. Mediante a algumas aplicações já testadas, alguns desses peptídeos podem ser utilizados também no controle de

infecções sistêmicas, já que demonstraram reduzir o dano no tecido provocado pela resposta inflamatória à infecção, enquanto estimularam, simultaneamente, a atividade antimicrobiana do sistema imune. Outras aplicações incluem a utilização destas moléculas para impedir a colonização e o crescimento de microrganismos em materiais poliméricos sintéticos, tais como cateteres intravenosos de uso médico (PARK et al. 2011; UPTON et al. 2012; MELVIN et al. 2016).

O uso terapêutico dos AMPs manifestam um possível impedimento que reside na toxicidade frente as células humanas e susceptibilidade à degradação proteolítica, que gera uma farmacocinética potencialmente desfavorável (meia-vida curta no sangue). No entanto, este problema foi abordado e várias soluções têm sido propostas, incluindo a incorporação de fragmentos não protéicos; a amidação e acetilação da porção terminal da cadeia peptídica; a síntese de peptídeos contendo D-aminoácidos (em vez dos L-aminoácidos de origem natural) que torna os peptídeos resistentes às enzimas plasmáticas, mantendo a atividade antimicrobiana e, muitas vezes, reduzindo a atividade hemolítica (RIAHIFARD et al. 2018). Todavia, o uso terapêutico limitado dos AMPs tem a ver em grande média com o alto custo de obtenção/fabricação dos peptídeos. Mas, foram propostas muitas estratégias para produzir peptídeos em larga escala e pureza necessária para a aplicação terapêutica, utilizando uma variedade de métodos de DNA recombinante por meio de bactérias e fungos, bem como plantas e sistemas de produção animal (ZHARKOVA et al. 2019; MAHLAPUU et al. 2020).

1.2 – Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos

Vários estudos têm sido realizados sobre a relação estrutura-função dos AMPs através da modulação de parâmetros estruturais tais como carga, conformação, hidrofobicidade, momento hidrofóbico, anfipaticidade e ângulo polar. Por meio desses estudos, constatou-se que tais propriedades determinam a potência e o espectro de atividade antimicrobiana, porém atuando de maneira interdependente. A modificação em um parâmetro induz alterações simultâneas em outros, o que torna difícil avaliar a influência específica de uma única variável (YANG et al. 2018).

Os AMPs podem ser caracterizados por apresentarem carga líquida positiva, variando entre +2 e +9. Esta cationicidade ocorre devido à ausência de resíduos

ácidos (ácido glutâmico e aspártico) e a presença em excesso de resíduos de aminoácidos básicos tais como arginina, lisina e histidina. O caráter catiônico é de grande importância para a interação eletrostática dos AMPs com as membranas biológicas de caráter eletricamente negativo, e isto foi possível observar quando os AMPs manifestaram baixa atração pelas membranas citoplasmáticas eletricamente neutras, garantindo assim uma certa seletividade para a atividade antimicrobiana. Vários estudos mostraram que a atividade dos AMPs pode depender do seu caráter catiônico, relacionando mudanças na carga líquida com um aumento ou diminuição da efetividade antimicrobiana (ESPECHE et al. 2020).

Após rupturas ou permeabilização da membrana alvo, os AMPs tem acesso ao meio citoplasmático, no qual podem reagir com os elementos intracelulares, efetuando a inibição da atividade do DNA/RNA, de proteínas e de outros metabólitos essenciais, controlando ou interrompendo o crescimento de microrganismos. Também têm sido constatada a atividade a partir da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo este decorrente do excesso de ânions superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na célula do patógeno, levando a danos e até a apoptose celular. No entanto, autores postulam que o dano à membrana seria apenas a primeira ação desses peptídeos (DESRIAC et al. 2020; SAVINI et al. 2020).

Os diversos mecanismos de ação descritos para os AMPs são baseados na possível interação dessas moléculas com as membranas e a formação de poros quando alcançam uma concentração limiar. No modelo de barril, os AMPs se inserem de forma paralela na membrana formando um poro. Já no modelo de tapete, esses peptídeos inserem porções na membrana e induzem a formação de poros, enquanto que no modelo de poro toroidal também ocorre a formação de poros com os peptídeos inseridos na membrana de forma paralela, porém, nesse caso, eles são intercalados com lipídeos (NGUYEN et al. 2011). Na investigação do mecanismo de ação destas moléculas, estudos recentes sugerem novos modelos para elucidar como esses peptídeos rompem a membrana plasmática dos microrganismos. Entre eles está o modelo de poro toroidal desordenado, que ocorre a partir de uma menor concentração de peptídeos, comparada ao observado para o modelo poro toroidal, onde os peptídeos estão dispostos de forma desordenada,

formando um poro na membrana celular. Outro modelo é o de afinamento da membrana, em que a atração entre os fosfolípidios carregados gera regiões nas membranas mais finas e mais frágeis. Outro modelo que tenta explicar o mecanismo de ação dessas moléculas é o modelo de atração de ânions, o qual sugere que os AMPs são capazes de atrair pequenos ânions, fazendo-os atravessar a membrana de forma a causar perda do potencial eletrostático celular. Ainda em outro modelo, a perda do potencial eletrostático pode ocorrer sem a atração de íons. Já, no modelo da eletroporação, os peptídeos afetam o potencial de membrana de forma a diminuir sua permeabilidade a várias moléculas (NGUYEN et al. 2011; KUMAR et al. 2018). A importância de compreender as relações sobre as principais características estruturais dos AMPs e seus efeitos sobre a atividade antimicrobiana e hemolítica, podem auxiliar o desenho racional de análogos melhorados para o uso clínico (NGUYEN et al. 2011).

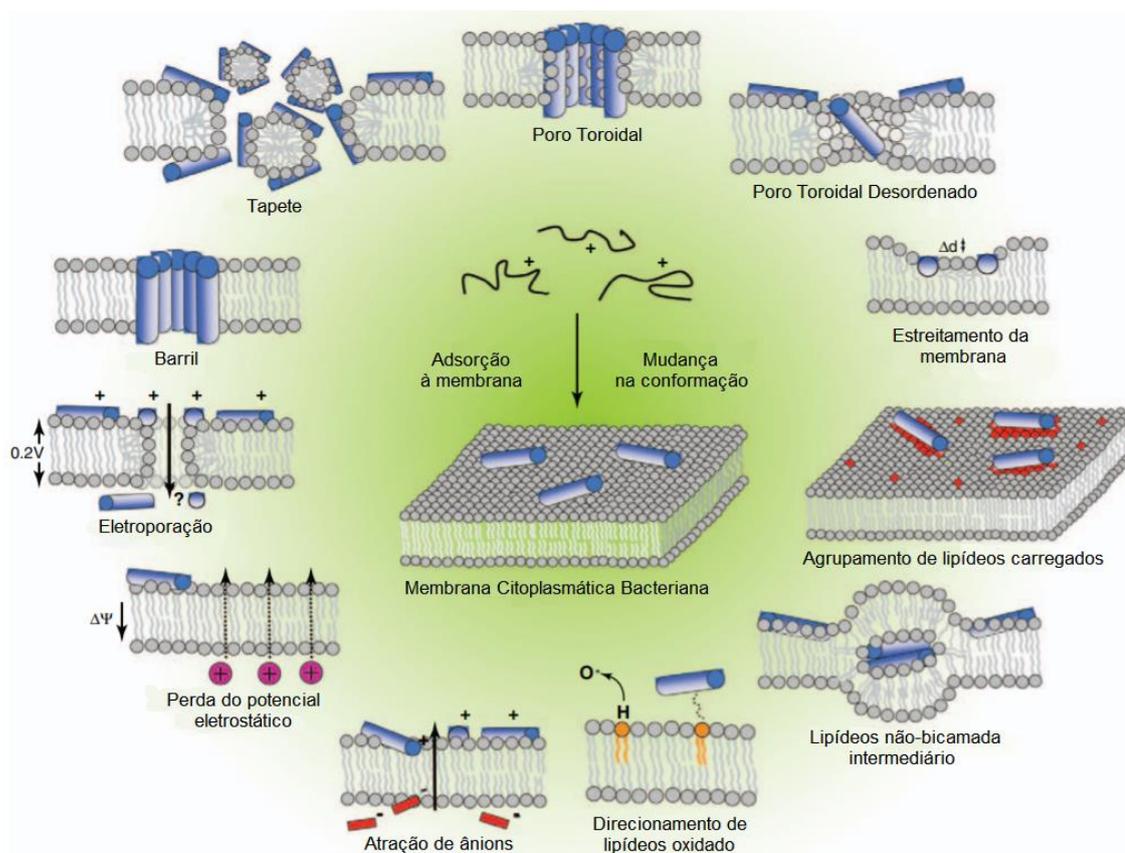


Figura 1: Eventos que ocorrem na membrana citoplasmática bacteriana após a adsorção inicial do peptídeo antimicrobiano (AMP). Esses eventos não são necessariamente exclusivos de uns aos outros. Imagem adaptada por NGUYEN et al. 2011.

1.3 – Peptídeos antimicrobianos de plantas

As plantas são organismos que não possuem a capacidade de locomoção, sendo assim permanecem fixos a um substrato, o que as tornam expostas a diversos fatores que podem comprometer seu desenvolvimento. Fatores que podem ser classificados como bióticos, no qual são todos os efeitos causados pelos organismos vivos; ou seja, estresse por diversos organismos fitopatogênicos, e os fatores abióticos, ocasionados por influências recebidas do ecossistema, como por exemplo, as variações bruscas de temperatura, altos níveis de salinidade de alguns solos, variações de pH e escassez de nutrientes (MITHÖFER; BOLAND, 2012).

Campos et al. (2018) postulam que entre as inúmeras estratégias que as plantas desenvolveram para evadir aos fatores bióticos e abióticos, os AMPs se destacam como uma das barreiras defensivas mais proeminentes que conferem resistência direta e duradoura contra uma ampla gama de pragas e patógenos. As propriedades estruturais específicas, como comprimento, carga, hidrofobicidade, ângulo polar e conformação, são essenciais para que os AMPs de plantas atuem como um escudo químico que dificulta o ataque do inimigo. Existem várias classes estruturais de AMPs que conferem a defesa das plantas, no entanto os que são melhor estudados e caracterizados são as defensinas vegetais, proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs), tioninas, inibidores de proteinase e os ciclotídeos. Em geral, estes peptídeos apresentam uma vasta atividade inibitória de organismos as quais inclui vírus, bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, insetos entre outros (BERROCAL-LOBO et al. 2009; BENKO-ISEPPON et al. 2010).

Em plantas, as defensinas foram inicialmente descritas em sementes de trigo e cevada, e foram erroneamente classificados como um subgrupo de tioninas (γ - tioninas) uma família que era conhecida como toxinas vegetais devido sua toxicidade sobre bactérias, fungos, células de mamíferos, bem como larvas de insetos. Essas duas classes de peptídeos compartilham as características de tamanho molecular (5 kDa), sequência de aminoácidos, oito cisteínas estabilizadas por quatro pontes dissulfeto e apresentam atividades antifúngicas e antibacterianas. Entretanto, estudos posteriores reclassificaram as defensinas como um grupo separado, com base em sua conformação estrutural, muito semelhante às defensinas identificadas

em mamíferos e insetos (ODINTSOVA et al. 2008; CARVALHO e GOMES, 2009; WHITE e CRAIK, 2016).

A classe dos inibidores de proteinases (PIs, do inglês *proteinase inhibitor*) podem ser encontradas em órgãos vegetativos, reprodutivos e de reserva em diversas espécies de plantas. São proteínas, cuja massa molecular varia entre 4 e 85 kDa, capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, bloqueando reversível ou irreversivelmente a sua atividade catalítica. Em geral, são caracterizados por serem moléculas estáveis, com resistência ao calor, variação de pH e a proteólise por proteinases presentes no meio intracelular e extracelular (OLIVEIRA e MACEDO, 2011; JAMAL et al. 2013).

As LTPs são peptídeos catiônicos encontrados em muitas espécies de monocotiledônea e dicotiledônea. Possuem a capacidade de facilitar a transferência de fosfolipídios entre as membranas celulares *in vivo*. São classificadas em duas famílias, onde o peptídeo sinal da família LTP1 apresenta em torno de 21 a 27 resíduos de aminoácidos, e na LTP2 de 27 a 35 resíduos. Ambos apresentam atividade antimicrobiana sobre bactérias, fungos e leveduras (THEVISSSEN et al. 2005).

O primeiro caso de atividade dos ciclotídeos foi associada a efeitos uterotônicos, da planta *Oldenlandia affinis*. É uma classe protéica cíclica devido a presença de uma ligação peptídica formada entre o grupo N e o grupo C – terminal. Possuem aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, sendo seis cisteínas conservadas e conectadas por três pontes dissulfeto. Sua expressão é constitutiva, tendo sua principal função na defesa vegetal contra patógenos. Com base na estrutura primária da cadeia polipeptídica, os ciclotídeos são divididos em três subfamílias, a Möbius, Bracelete e a subfamília dos inibidores de tripsina e possuem atividade inseticida; atividade moluscida, bem como atividade anti-helmíntico e antimicrobiana (CRAIK et al. 1999; HALLOCK et al. 2000; JENNINGS et al. 2001; CRAIK, 2010; LIMA, 2015).

1.4 – Pimentas do gênero *Capsicum*

A planta modelo do presente trabalho pertence ao gênero *Capsicum* que pertence à família Solanaceae, assim como o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), a batata (*S. tuberosum* L.) e a berinjela (*S. melongena*). Esse gênero se destaca pela sua importância comercial e econômica, sendo amplamente utilizado no setor alimentício, ornamental e medicinal. Engloba as plantas popularmente conhecidas como pimentas e pimentões (SOUZA, 2009). Possui mais de 38 espécies descritas, dentre as espécies de pimentas pertencentes a este grupo apenas cinco são consideradas domesticadas sendo *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens*, *C. baccatum* e *C. pubescens*. No Brasil as espécies *C. baccatum* e *C. chinense* são as de destaque no ramo comercial, uma vez que são bem adaptadas ao clima equatorial e tropical (RÊGO et al. 2011).

As pimentas são de grande importância cultural e nutricional para a saúde humana. Isso devido as diferentes formas da utilização desses frutos que estão relacionadas com aspectos multiculturais e étnicos, e é provavelmente o resultado da diversidade genética observada em cada região do país. A contribuição destas para a nutrição humana refere-se aos nutrientes encontrados em proporções adequadas na dieta, capazes de assegurar a manutenção das funções vitais do organismo, suprimindo as necessidades de produção de energia, elaboração e manutenção tecidual e equilíbrio biológico (REIFSCHNEIDER, 2000; SUDRÉ et al. 2010).

A utilização de plantas para tratamento de doenças que acometem os seres humanos é uma prática milenar que ainda aparece como principal recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos, o que fornecem oportunidades ilimitadas, visto que leva a obtenção de novos fármacos pela associação da disponibilidade destes com sua diversidade química (DORANTES et al. 2000).

A pimenta é descrita como um alimento funcional devido as suas propriedades biológicas que favorecem a prevenção e o tratamento de doenças como diabetes, câncer, problemas cardiovasculares, sendo também utilizada como matéria-prima na formulação de remédios caseiros que aliviam dores musculares, reumatismo, distúrbios gastrointestinais e na prevenção de arteriosclerose (ALVAREZ-PARRILLA, 2011).

Os frutos de *Capsicum* apresentam fitoquímicos, como a vitamina C, D, carotenoides e vitamina E, além de compostos fenólicos. Também são fontes de vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina e ácido fólico). Isto justifica o seu atributo para a medicina e para a área farmacológica, devido sua utilização na prevenção de doenças degenerativas (Parkinson, Alzheimer), doenças cardiovasculares, catarata, pois os fitoquímicos são substâncias antioxidantes capazes de sequestrar radicais livres (REIFSCHNEIDER et al. 2000).

No Brasil, as pimentas são cultivadas principalmente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Góias. O gênero *Capsicum* origina-se de zonas tropicais e úmidas da América Central e do Sul. Das espécies do *Capsicum*, três são muito propagadas e tem frutos com muita pungência, *C. annuum*, *C. frutescense* e *C. chinense*. A pungência do fruto *Capsicum* é devido a um grupo de compostos chamados capsaicinoides (alcaloides) que estão presentes em diferentes quantidades nas variedades de pimentas, considerados os principais agentes naturais com ação anestésica, psicoestimulante e neurodepressora (OTHMAN et al. 2011).

Nos últimos anos o gênero *Capsicum* vem sendo um material de grande interesse para a pesquisa científica, devido aos seus frutos e sementes apresentarem um grupo de moléculas protéicas com vasta atividade sobre microrganismos. Maracahipes et al. (2019) em um estudo para caracterizar moléculas bioativas de frutos de *C. annuum* analisaram a produção de várias proteínas de baixa massa molecular em resposta a lesão e inoculação do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*, e devido as características bioquímicas estas foram identificadas como AMPs. Dentre o arsenal protéico obtido, algumas proteínas foram caracterizadas estruturalmente como defensina, LTP e inibidor de proteinase. Taveira et al. (2014) em um trabalho para analisar o perfil protéico de frutos de *C. annuum*, obtiveram um peptídeo semelhante a tionina, o qual mostrou ser potente na inibição do crescimento das cepas fúngicas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*, como também de bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em 2018, Taveira et al. nomearam este peptídeo como *CaThi*, afim de analisar os eventos que poderiam estar relacionados ao processo de apoptose em leveduras do gênero *Candida* induzidas pelo peptídeo. Foi mostrado que as frações protéicas obtidas foram tóxicas para as

células fúngicas e induziu alterações nas membranas de todas as cepas testadas, mostrando que os peptídeos ocasionavam morte celular pela permeabilização da membrana.

1.5 – Gênero *Candida* spp.

O gênero *Candida* da família *Sacchoaromycetaceae* é constituído de aproximadamente 200 diferentes espécies de leveduras, que vivem normalmente nos mais diversos nichos corporais, como orofaringe, trato gastrointestinal, cavidade bucal, dobras da pele, mucosa do sistema respiratório e secreções brônquicas; vagina, urina e fezes. As espécies constituintes do gênero *Candida* mais importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, sendo que *C. albicans* permanece como a espécie mais comum nas infecções humanas devido maior relevância em função de sua taxa de prevalência em condições de normalidade e de doença. Essa levedura está amplamente distribuída na natureza, ocupando diversos habitats, ao contrário das outras espécies do gênero, de distribuição limitada (ODDS et al. 1988; SHIN et al. 2002).

Yamamoto e Texeira (2011) afirmam que as espécies de *Candida* podem ou não apresentar patogenicidade aos humanos, o principal fator do desenvolvimento de infecções por leveduras deste gênero, ocorre pelo rompimento do equilíbrio parasita-hospedeiro, desencadeado por alterações na barreira tecidual, alterações na microbiota autóctone e pelo comprometimento do sistema imunológico. Em enfermidades graves associadas a permanência prolongada em hospitais, há uma ocorrência maior no rompimento desse equilíbrio. O patógeno humano *C. albicans* é capaz de induzir infecções localizadas ou sistêmicas, como a candidíase, a meningite e septicemias. Todavia, as outras espécies do mesmo gênero são consideradas facultativas como, por exemplo, *C. tropicalis*, *C. parapsolosis* e *C. globrata*, sendo essas leveduras isoladas de habitats naturais como o solo, água e também de frutos.

As leveduras do gênero *Candida* constitui o principal grupo de leveduras que causam infecções oportunistas no ser humano, estão muito bem adaptadas ao corpo humano, por isso podem colonizá-lo sem produzir sinais de doença em condições de

normalidade fisiológica. Colonizam as mucosas de todos os seres humanos no decorrer ou pouco depois do nascimento, havendo sempre o risco de infecção endógena (KANTARCIOGLU e YUGEL, 2002; ASADI et al. 2009). Elas se tornam patogênicas em pacientes com o sistema imunológico comprometido e, nestas circunstâncias, podem causar doença em praticamente todos os órgãos e tecidos, resultando em infecção superficial, invasiva e sistêmica. Essas infecções fúngicas variam desde lesões superficiais em pessoas saudáveis até infecções disseminadas em pacientes neutropênicos (nível baixo de neutrófilos) (ABI-SAID et al. 1997).

As infecções por leveduras do gênero *Candida* são chamadas de candidíases ou candidoses. Essas leveduras fazem parte da microbiota endógena do corpo humano. Todavia, a capacidade da levedura de passar da condição de comensal a patógeno, quando sob condições favoráveis no hospedeiro, depende de diversos fatores, os quais favorecem o fungo, levando pacientes com organismos debilitados e susceptíveis a exposição ao microrganismo oportunista. Fatores estes como alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas. Alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas, características da infância (prematuridade) e envelhecimento ou mais frequentemente, associadas a doenças neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão induzida por atos médicos (DIGNANI et al. 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Identificar e caracterizar peptídeos antimicrobianos de frutos imaturos e maduros de *Capsicum chinense* Jacq. (acesso UENF 1706), analisando seu efeito inibitório sobre o crescimento de leveduras do gênero *Candida*.

2.2 – Objetivos Específicos

- Detectar e purificar peptídeos em frutos imaturos e maduros de plantas de *Capsicum chinense*;
- Avaliar o perfil antifúngico das frações obtidas dos frutos de *C. chinense* sobre as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*;
- Estimar a viabilidade das células fúngicas após ensaio antifúngico;
- Avaliar o efeito das frações isoladas sobre a permeabilização de membranas das leveduras do gênero *Candida*;
- Avaliar o aumento da produção endógena de ROS nas células fúngicas tratadas com as frações obtidas.

3. METODOLOGIA

3.1 – Materiais Biológicos

3.1.1 – Sementes

As sementes de *Capsicum chinense* Jacq. (acesso UENF 1706) foram fornecidas pela Prof^a. Dr^a. Rosana Rodrigues do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Brasil. As sementes foram acondicionadas à 4 °C até o momento do plantio no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da UENF, Campos dos Goytacazes – RJ.

3.1.2 – Microrganismos

As espécies de leveduras *C. albicans* (CE022) e *C. tropicalis* (CE017) foram obtidas em colaboração com a Universidade Federal do Ceará, na qual foram cultivadas em meio Ágar Sabouraud e mantidas conservadas, na geladeira à 4°C, no LFBM, do CBB, da UENF, Campos dos Goytacazes- RJ.

3.2 – Extração e purificação de proteínas dos frutos imaturos e maduros de *C. chinense*

3.2.1 – Cultivo das plantas

O semeio das sementes de *C. chinense* foram realizados em bandejas de isopor de 72 células com substrato adubado com formulação (4N/14P/8K), mantidas em câmara de crescimento, controlada a 28 °C e fotoperíodo de 12 h. Após o surgimento de dois pares de folhas definitivas, as mudas foram transferidas individualmente para vasos plásticos de 5 L contendo solo com cerca de 10% de húmus. Em seguida, os vasos foram transferidos para uma casa de vegetação do CBB, na qual foi devidamente aclimatada. Estes vasos foram irrigados diariamente, podendo repetir este procedimento, em períodos mais quentes e secos. O aparecimento de frutos na espécie ocorreu aproximadamente em 90 dias. Através da observação, os frutos imaturos foram colhidos 45 dias após a antese e 74 dias

para colheita dos frutos maduros. Sendo que o plantio das plantas iniciou-se em outubro de 2018 e terminou no último trimestre de 2019.

3.2.2 – Extração de proteínas dos frutos

A extração protéica dos frutos foi realizada, de acordo com a metodologia descrita por Taveira et al. (2014). Os frutos sem sementes, correspondendo a 40 g foram triturados em um multiprocessador de alimentos (Mix 3x1, Philips) combinado a 200 mL de tampão fosfato (Na_2HPO_4 10 mM; NaH_2PO_4 15 mM; KCl 0,1M; EDTA 1,5% e pH 5,4) até a completa homogeneização. Em seguida, essa homogeneização foi submetida à agitação constante por 2 h a 4 °C. O homogeneizado obtido foi submetido a uma centrifugação (15.400 x g por 45 min a 4°C), o precipitado foi descartado e, ao sobrenadante, foi adicionado sulfato de amônio a 0-70% de saturação. O material obtido foi mantido por 16 h a 4 °C. Posteriormente, foi centrifugado a 15.400 x g por 45 min a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão separadamente em água destilada e aquecido a 80 °C por 15 min. Após esta última etapa, foram novamente submetido a uma centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4 °C, na qual o precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido, dialisado com água destilada (tubo de diálise benzoilado, Sigma) e liofilizado (Liofilizador Liotop K105). Este extrato rico em proteínas (ERP) foi submetido à cromatografia de troca iônica para separação do extrato em duas frações nomeadas de D1 e D2 (item 3.2.3). Posteriormente estas frações foram novamente dialisadas, liofilizadas e submetidas à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (item 3.2.4).

3.2.3 – Cromatografia de troca iônica

Os extratos obtidos dos frutos imaturos e maduros de *C. chinense* foram submetidos a cromatografia de troca iônica, conforme a metodologia descrita por Resende (2018). Inicialmente uma coluna de troca iônica (3 x 7 cm) foi preparada utilizando-se a resina DEAE-Sepharose e empacotada sob a ação da gravidade. Posteriormente a resina foi lavada abundantemente com água destilada, em seguida

com NaOH 0,1 M, água destilada novamente, HCl 0,1 M, água destilada, e por fim, foi equilibrada com Tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0.

Para preparo da amostra, 0,05 mg do ERP de cada grupo de frutos *C. chinense* foi dissolvido em 5 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. A solução foi centrifugada a 16.000 x *g* por 5 min e o sobrenadante aplicado na coluna. Foram coletadas frações de 3 mL a um fluxo de 1 mL/min⁻¹. Os primeiros 30 tubos foram eluídos com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 e, aos 40 tubos restantes, foram adicionados tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, contendo NaCl 1 M para eluição das proteínas retidas. As frações obtidas foram nomeadas como D1 e D2, onde D1 refere se a fração não retida (proteína básica), e D2 a fração retida (proteína ácida). O perfil protéico da cromatografia foi monitorado com leituras de absorvância em espectrofotômetro (Espectrofotômetro BEL LGS 53) a 280 nm. Em seguida as frações foram dialisadas e liofilizadas (Liofilizador Liotop K105).

3.2.4 – Cromatografia de fase reversa em HPLC

A fração D2 obtida após cromatografia de troca iônica foi selecionada (devido a maior atividade antimicrobiana apresentada) e submetida a cromatografia de fase reversa em HPLC, utilizando uma coluna C18 (μRPC C18, GE-Healthcare). A coluna de fase reversa foi equilibrada com TFA 0,1% (solução A), conforme descrito por Taveira et al. (2014). Inicialmente 400 μg do extrato rico em proteínas foi solubilizado em 400 μL de solução A, e essa mistura foi filtrada em filtro de 0,2 μm (Millex- GV, Millipore) e injetada na coluna. A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, numa temperatura de 40 °C, na qual a eluição das amostras foi efetuada em gradiente linear de propanol 100% em 0,1% de TFA (solução B). A coluna foi lavada com TFA 0,1% e água ultrapura (solução A) e em seguida um gradiente linear foi formado pela adição da solução B. A eluição das proteínas na coluna foi acompanhada por absorvância lida a 220 ± 4 nm em um detector de arranjo de diodo (SPD-M20A, Shimadzu).

3.2.5 – Quantificação de proteínas

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

3.2.6 – Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS

O processo de purificação foi monitorado em gel de poliacrilamida em eletroforese descontínua, sob condições desnaturantes, em gel de tricina (SDS-tricina-PAGE), segundo o método descrito por Schägger e Von Jagow, 1987. Foram usadas placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 mm. O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4% de acrilamida/bis-acrilamida e o gel de concentração numa concentração de 3,9%. Estes foram montados no Mini Protean Tetra System (Biorad).

3.2.7 – Preparo da amostra e condição da “corrida”

As frações obtidas após cromatografia de troca iônica e cromatografia de fase reversa em HPLC foram concentradas por liofilização, ressuspensas em tampão de amostra (0,125 M de Tris, 2,5% de SDS, 0,25% de azul de bromofenol; β -mercaptoetanol 5% e 15% de sacarose), aquecidos por 5 min a 100 °C e posteriormente centrifugados a 16,000 x g por 2 min, a temperatura ambiente. Em seguida, 15 μ g de cada amostra foram aplicados ao gel de concentração. A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 24 V por um período de aproximadamente de 16 h, utilizando na corrida o tampão cátodo (Tricina 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M pH 8,31; SDS 0,1%) e tampão ânodo (Tris-HCl 0,2 M pH 8,9; SDS 0,2%). Para estimar a massa molecular dos peptídeos, foi usado marcador de massa molecular em Da: 26,600; 17,000; 14,200; 6,500; 3,496; 1,060) (MW-SDS-17S (Ultra low Ranger Molecular Weight Marker, Sigma-Aldrich).

3.2.8 – Coloração e descoloração do gel

Após a finalização da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado numa solução corante (0,025% de Coomassie Blue G, 10% de ácido acético em água destilada) em agitação constante por aproximadamente 1 h. Depois de corado, o gel foi transferido para uma solução descorante (10% de ácido acético em água destilada). O mesmo foi mantido nesta última solução até a visualização das bandas proteicas e em seguida foi armazenado em água destilada. As imagens dos géis foram digitalizadas em um fotodocumentador LAS 500 (GE Healthcare).

3.2.9 – Identificação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas

Para identificação da sequência de aminoácidos dos peptídeos presentes nas bandas peptídicas de nosso interesse, estas bandas foram excisadas do gel de tripsina e submetidas à digestão por tripsina, posteriormente, analisada por espectrometria de massas (LEÓN et al. 2007). Em resumo, a digestão dos peptídeos pela tripsina foi primeiro cocristalizada com 0,3 UL de matriz α -ciano-4-ácido hidroxicinâmico (CHCA) antes de ser analisada por dessorção/ionização a laser assistida por matriz seguida de espectrometria de massas por tempo de voo (MALDI-TOF-MS). O instrumento utilizado foi um AB SCIEX TOF/TOFTM 5800 *System spectrometer* (AB SCIEX) em modo reflexão. A comparação da sequência de aminoácidos obtida e o alinhamento foram feitos utilizando o algoritmo do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/Blast>) e do Clustal (<http://www.expasy.org>).

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

3.3.1 – Ensaio antifúngico

Os ensaios foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (TROX[®] TECHNIK), onde inicialmente inóculos de células de *C. albicans* e *C. tropicalis* foram retirados de placas de petri com colônias mantidas em ágar Sabouraud (Merck) e transferidos para novas placas com meio previamente estéril, fazendo-se estrias sobre o meio para a obtenção de um crescimento homogêneo. Posteriormente as placas foram mantidas em estufa (TECNAL TE-371 BOD) a 30 °C por 24 h. Após o crescimento, com auxílio de uma alça bacteriológica foram retirados colônias para homogeneização em 10 mL de caldo Sabouraud (KASVI) objetivando a quantificação das células em câmara de Neubauer (Laboroptik) com auxílio de um microscópio óptico (Axio Imager – A2, Zeiss). Em uma placa de cultura de 96 poços (NUNC, Nunclon Surface), as células de leveduras (1×10^4 cel.mL⁻¹) foram incubadas em caldo Sabouraud com os extratos obtidos após cromatografia de troca iônica na concentração de 100 µg.mL⁻¹, e 25 µg.mL⁻¹ / 50 µg.mL⁻¹ das frações obtidas após purificação da fração D2 em cromatografia de fase reversa em HPLC dos frutos imaturos e maduros de *C. chinense* Jacq. A placa foi mantida na estufa a 30 °C por 24 h, e para observação do crescimento fúngico a densidade óptica foi mensurada após 24 h em um leitor de microplacas (EZ Read 400, Research, Biochrom) num comprimento de 620 nm, conforme a metodologia adaptada de Broekaert et al. (1990).

3.3.2 – Análise da viabilidade celular fúngica

Após o ensaio antifúngico a viabilidade celular foi realizada, no intuito de analisar se a ação antifúngica das frações protéicas obtidas eram fungicida ou fungistática sobre o crescimento fúngico. Segundo a metodologia descrita por Vermelho (2006), as células tratadas (teste) e não tratadas (controle) com as frações obtidas da cromatografia de fase reversa na concentração 50 µg.mL⁻¹, foram retiradas do ensaio antifúngico e lavadas e diluídas 1.000 vezes. Uma alíquota de 100 µL da diluição foi espalhada com uma alça de *Drigalski* sobre a superfície de uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud e cultivadas a 30 °C durante 24 h. No final deste período as unidades formadoras de colônias (CFU) foram determinadas,

e as placas de Petri foram fotografadas. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram mostrados assumindo que o controle representa 100% de viabilidade celular.

3.3.3 – Efeito das frações purificadas sobre a permeabilização de membranas de células de leveduras

A permeabilização da membrana das células de *C. albicans* e *C. tropicalis* tratadas com as subfrações (obtidas após purificação da fração D2 em cromatografia de fase reversa em HPLC) dos frutos imaturos e maduros nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foi avaliada através da utilização do corante fluorescente *SYTOX Green* (Thermo Fisher), segundo metodologia descrita por Thevissen et al. (1999). Após 24 h do ensaio antifúngico, uma alíquota das diferentes células fúngicas foram incubadas sob constante agitação por 2 h com o corante fluorescente *SYTOX Green* a uma concentração final de 0,2 mM, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Após este período, estas células foram transferidas para lâminas, cobertas com lamínulas e analisadas por fluorescência em microscópio óptico (Axio Imager – A2, Zeiss, excitação 450-490 nm; emissão 500 nm).

3.3.4 – Ensaio de determinação da indução de ROS intracelular

Para analisar a indução da produção endógena de ROS em células fúngicas, estas foram tratadas com as frações (obtidas após purificação da fração D2 em cromatografia de fase reversa em HPLC) dos frutos imaturos e maduros sob concentração de 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e avaliadas através da utilização do corante fluorescente 2',7' diclorofluoresceína diacetato (Sigma Aldrich), segundo metodologia descrita por Mello et al. (2011). Após 24 h do ensaio antifúngico, uma alíquota das células tratadas e não tratadas (controle) com as frações foram transferidas para microtubos de centrifugação, e incubadas sob constante agitação por 2 h com o corante fluorescente a uma concentração final de 20 μM , de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Após este período, estas células foram transferidas para lâminas, cobertas com lamínulas e analisadas por fluorescência em microscópio óptico (Axio Imager – A2, Zeiss, excitação 450-490 nm; emissão 500 nm).

3.3.5 – Análise estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados usando o software *GraphPad Prisma* (versão 5.0 para Windows), expressos com média das triplicatas e desvio padrão (\pm SD). As análises estatísticas foram feitas por ANOVA unidirecional, seguidas pelo teste de Tukey para determinar diferenças entre os tratamentos e controle. As diferenças estatísticas das médias consideradas significantes ($p \leq 0.05$) foram indicadas por asteriscos.

4. RESULTADOS

4.1 – Perfil cromatográfico das frações D1 e D2 de frutos imaturos e maduros de *C. chinense*

Após a extração protéica dos frutos imaturos e maduros de *C. chinense*, os ERPs obtidos foram submetidos a cromatografia de troca iônica (DEAE–Sepharose), onde as duas frações obtidas foram nomeadas como D1 e D2. Sendo D1 referente a fração não retida (básica), eluída em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, e D2 correspondente a fração (ácida) retida na coluna, eluída com NaCl 0,1 M em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (Figura 2). Após coletadas as amostras, foram lidas em 280 nm no espectrofotômetro e dialisadas com água destilada (três trocas ao dia durante três dias consecutivos) para remoção do sal (NaCl 0,1 M) e em seguida foram liofilizadas.

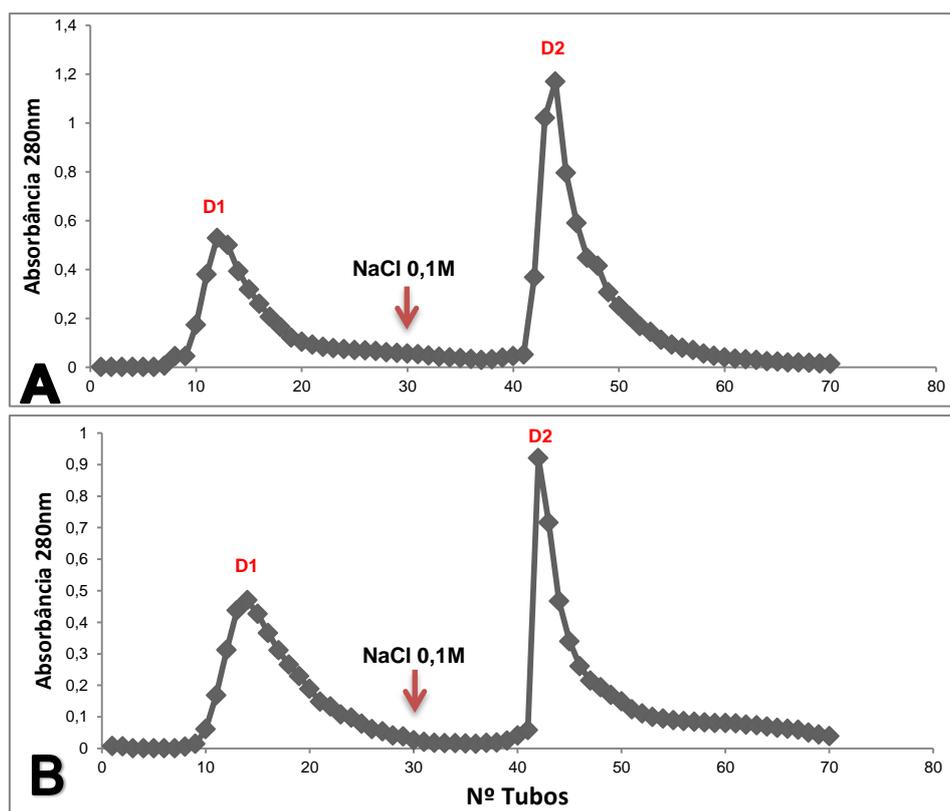


Figura 2: Cromatografia de troca iônica dos ERPs de frutos imaturos (A) e maduros (B) utilizando resina DEAE-Sepharose. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Fração D1 foi eluída em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0; Fração D2 foi eluída em Tris-HCl 100 mM pH 8,0 acrescido de NaCl 0,1 M. O fluxo utilizado foi de $1\text{mL}/\text{min}^{-1}$, coletamos 3 mL por tubo.

4.2 – Perfil eletroforético das frações dos frutos imaturos e maduros de *C. chinense*

Após as extrações proteicas dos frutos imaturos e maduros de *C. chinense*, os ERPs e as frações D1 e D2 obtidos através da extração protéica dos frutos, foram submetidos a eletroforese em gel de tricina na presença de SDS. Na figura 3, observa-se o perfil protéico dos extratos e frações obtidos de frutos imaturos (3A) e frutos maduros (3B), no qual é possível observar bandas majoritárias com massa molecular entre 26 a 6 Da para as frações dos frutos imaturos, e bandas na altura de 26 e 3 Da para as frações obtidas pela cromatografia de troca iônica dos frutos maduros.

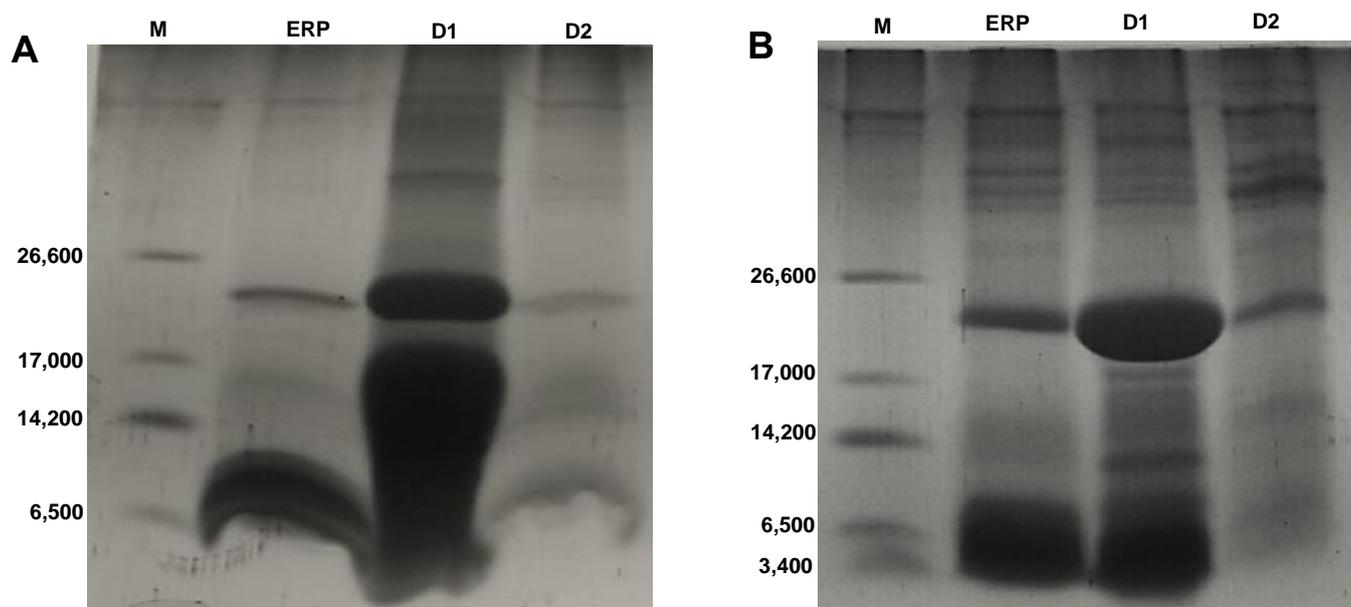


Figura 3: Efeito das frações D1 e D2 em gel de tricina das frações obtidas de frutos imaturos (A) e maduros (B) de *C. chinense* (M) marcador de baixa massa molecular; (ERP) extrato rico em proteínas; (D1) fração eluída em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; (D2) fração eluída em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, acrescido de NaCl 0,1M.

4.3 – Ensaio antifúngico de leveduras patogênicas na presença de diferentes frações dos frutos imaturos e maduros de *C. chinense*

Foi realizado um ensaio para avaliar o efeito das frações D1 e D2 de frutos imaturos e frutos maduros, sob o crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*. Estas células fúngicas foram combinadas a $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$ das respectivas frações obtidas.

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram uma maior atividade inibitória da fração D2, tanto de frutos imaturos quanto maduros, sendo que a fração D1 de frutos imaturos apresentou atividade antifúngica significativa (Figura 4A). Para *C. albicans* (Figura 4A-4C), a fração D2 dos frutos imaturos exibiu 61,91% de inibição do crescimento, e 87,60% de inibição, quando tratada com a fração D2 de frutos maduros.

A fração D2 do fruto imaturo reduziu o crescimento das células de *C. tropicalis* em 51,90% (Figura 4B), e quando tratadas com a fração D2 do fruto maduro ocasionou uma inibição de 66,20% do crescimento fúngico (Figura 4D).

Quanto as frações D1 dos frutos, tanto imaturos quanto maduros, não apresentaram uma redução significativa no crescimento das leveduras utilizadas no ensaio, exceto a fração D1 dos frutos imaturos sobre o crescimento de *C. albicans*, na qual observamos uma inibição de 63,86%.

Perante a este resultado, observamos que as frações D2 dos frutos de *C. chinense*, quando comparadas com o controle e com as frações D1 (dos frutos imaturos e maduros), nestas condições avaliadas, foi a mais promissora na capacidade de inibir significativamente ($p < 0.05$) o crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*, na concentração utilizada. Desta forma, as frações D2 dos frutos imaturos e maduros foram selecionados para os posteriores passos.

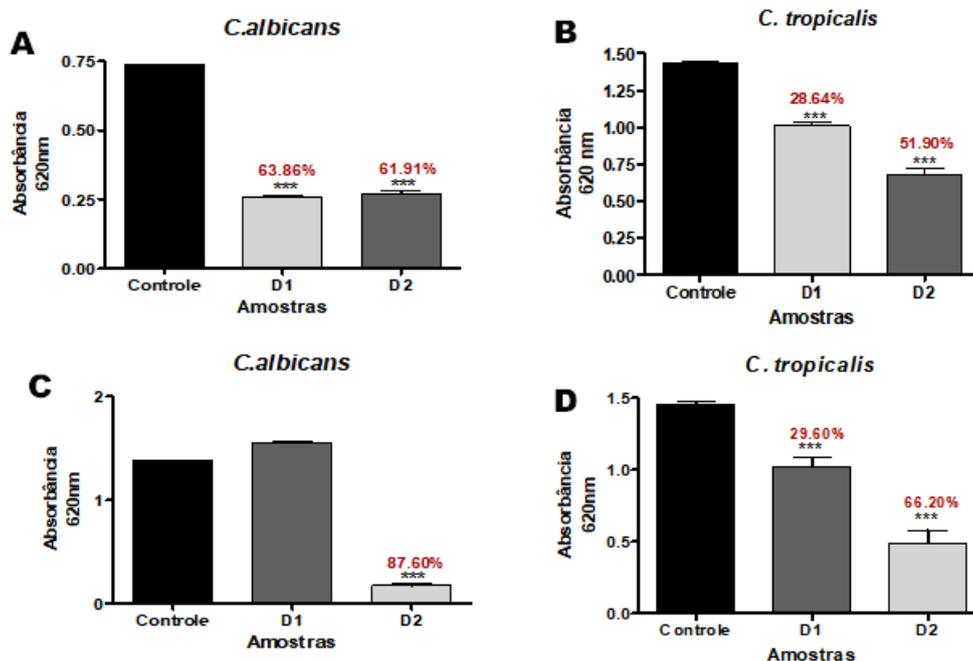


Figura 4: Visualização gráfica do ensaio antifúngico frente ao crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* na ausência (controle) e presença de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações D1 e D2. (A-B) Células fúngicas tratadas com as frações do fruto imaturo e (C-D) as células fúngicas tratadas com frações do fruto maduro. Os experimentos foram realizados em triplicata. (*) Indicam diferenças significativas ($p < 0.001$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras foi indicado o valor da inibição (%).

Tabela 1: Comparação dos resultados obtidos dos efeitos das frações D1 e D2 de frutos imaturos e maduros de *C. chinense* Jacq.

Controle 100%	Frutos imaturos		Frutos maduros	
	D1	D2	D1	D2
<i>Candida albicans</i>	*63,86%	*61,91%	-	*87,60%
<i>Candida tropicalis</i>	28,64%	*51,90%	29,60%	*66,20%

4.4 – Cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético das frações de *C. chinense*

Após observar que a fração D2 de *C. chinense* possui maior atividade inibitória que a fração D1, sobre células fúngicas testadas, as frações D2 dos frutos imaturos e maduros foram submetidas à purificação através da cromatografia em coluna de fase reversa pela coluna C18 em sistema HPLC. Na Figura 5A é mostrado que para a fração D2 de frutos imaturos foram obtidas 16 diferentes frações, denominadas HI1 à HI16. E para a fração D2 dos frutos maduros obteve outras 16 diferentes frações, nomeados de HM1 à HM16 (Figura 6A).

Na Figura 5B é mostrado o perfil eletroforético das frações oriundas da fração D2 de frutos imaturos após cromatografia de fase reversa em HPLC. Observa-se bandas isoladas nas frações HI1 e HI4, com massa molecular inferior a 26 kDa; Já para a fração HI2 não foi possível observar banda proteica; a HI3 possui uma banda fracamente marcada na altura de 6 kDa; as frações HI6, HI7, HI9 e HI10 apresentam bandas inferiores a 10 kDa; as frações HI5 e HI8 apresentaram bandas parcialmente purificadas na altura de 17 e 8 kDa, respectivamente; a fração HI14 possui uma banda isolada inferior a 14 kDa; e as frações HI11, HI12, HI13, HI15 e HI16 apresentaram bandas parcialmente purificadas inferiores a 17 kDa.

Já para as frações obtidas de D2 dos frutos maduros, após cromatografia de fase reversa em HPLC, é mostrado na Figura 6B o perfil eletroforético. Observa-se que HM1 e HM16 não apresentam nenhuma banda protéica; as frações HM2, HM4, HM5, HM6, HM7, HM8, HM9, HM10 e HM11 demonstraram bandas isoladas inferiores a 10 kDa; a fração HM3 se mostrou parcialmente purificada, com bandas na altura de 6 kDa; já as frações HM12, HM13, HM14 e HM15 apresentou bandas parcialmente purificadas com massa inferior a 17 kDa.

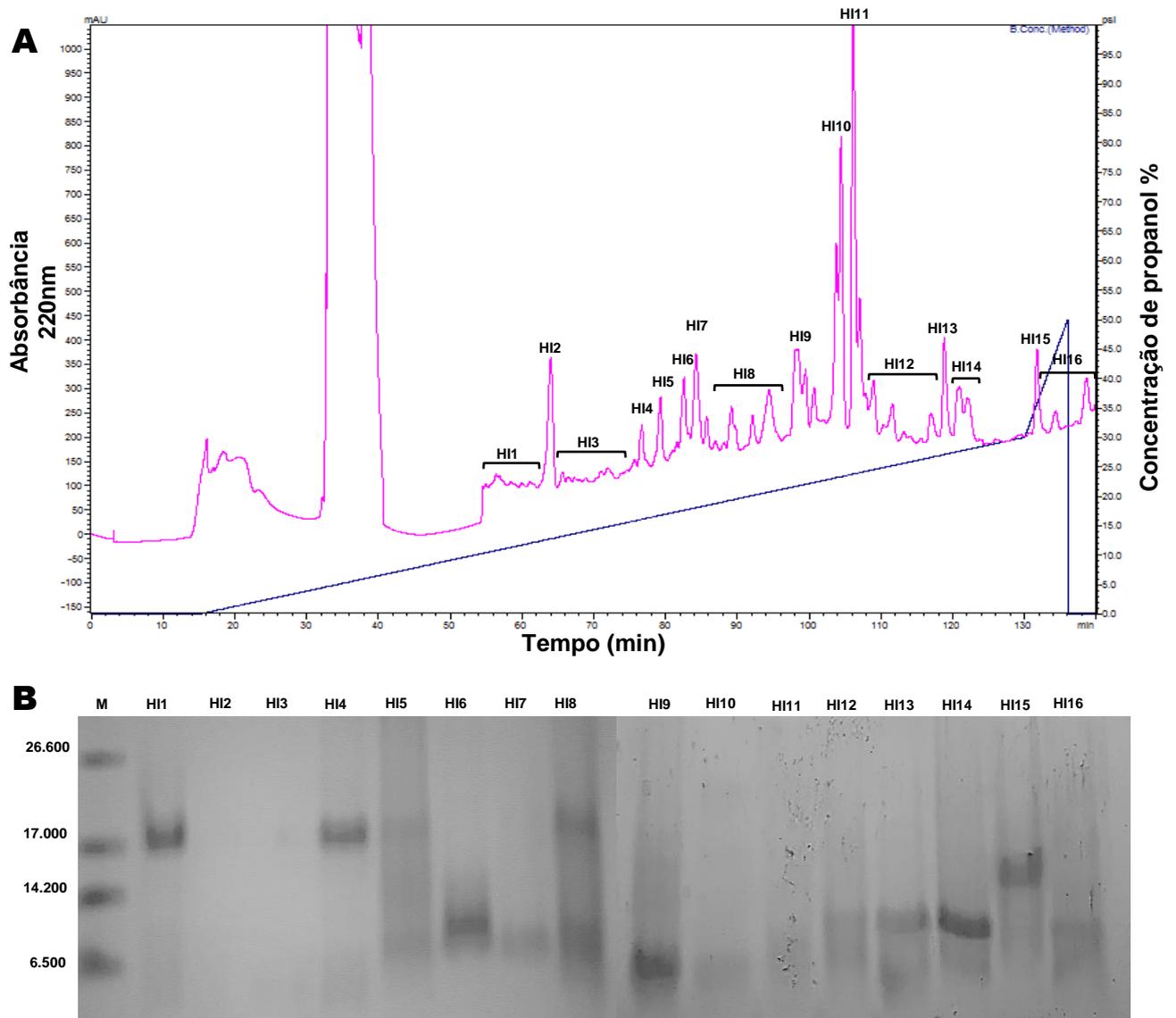


Figura 5: (A) Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC, da fração D2 de frutos imaturos de *C. chinense*, obtida após cromatografia de troca iônica. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida realizada com 0,1% de TFA (Solvente A) e a amostra eluída usando um gradiente linear de propanol (Solvente B). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL.min⁻¹. (B) Visualização eletroforética das frações HI1 a HI16 por gel de tricina na presença de SDS, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. Todas as frações foram tratadas β-mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (Da).

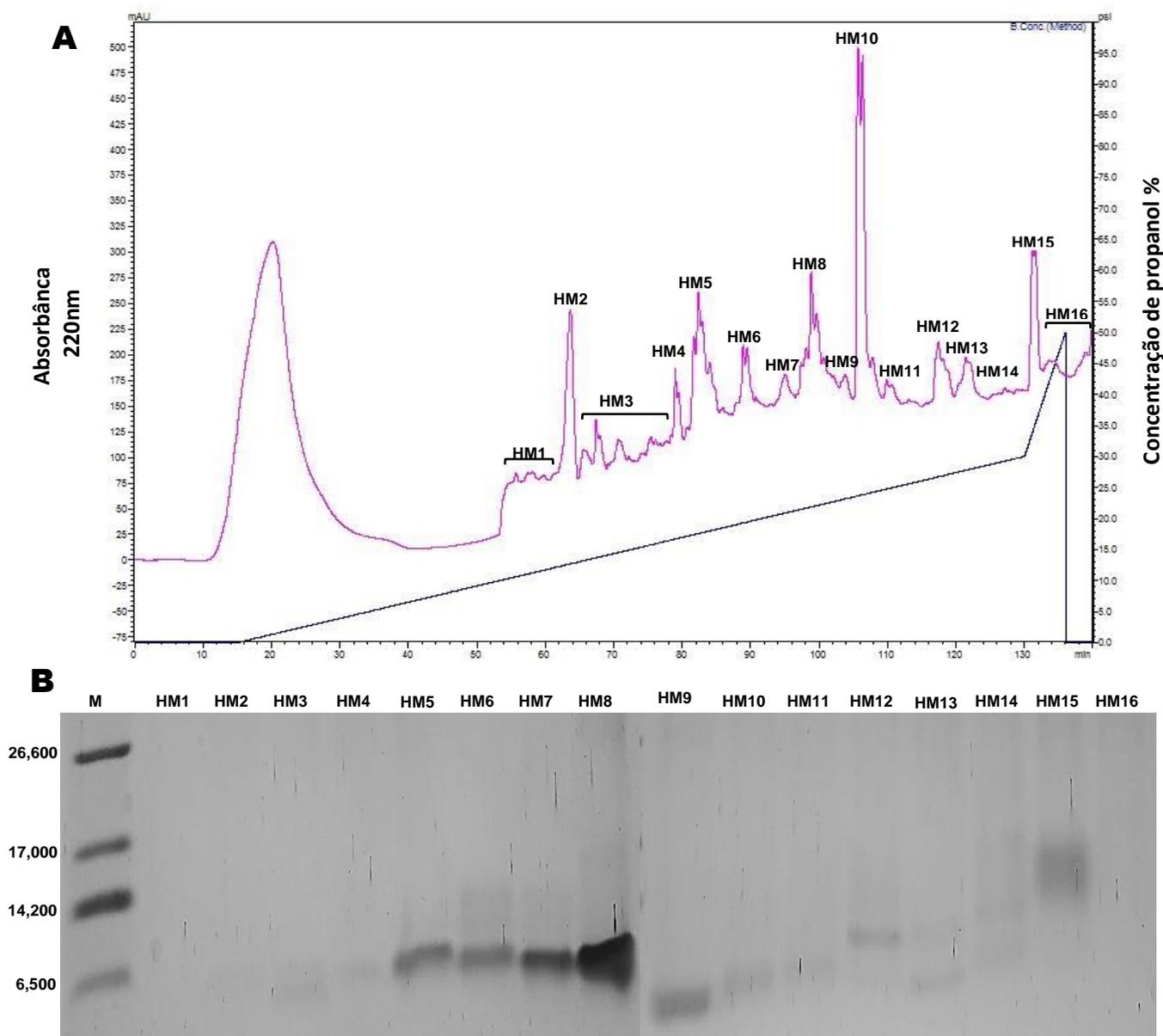


Figura 6: (A) Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC, da fração D2 de frutos maduros de *C. chinense*, obtida após cromatografia de troca iônica. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida realizada com 0,1% de TFA (Solvente A) e a amostra eluída usando um gradiente linear de propanol (Solvente B). O fluxo utilizado foi de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. (B) Visualização eletroforética das frações HM1 a HM16 por gel de tricina na presença de SDS, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. Todas as frações foram tratadas β -mercaptoetanol e aquecidas por 5 min. (M) marcador de baixa massa molecular (Da).

4.5 – Ensaio antifúngico de leveduras do gênero *Candida*

Após a obtenção das frações dos frutos maduros e imaturos de *C. chinense* por cromatografia de fase reversa em HPLC, as mesmas foram submetidas a ensaio antifúngico, utilizando as células de *C. albicans* e *C. tropicalis*, nas quais foram tratadas com as frações numa concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em um ensaio lido no tempo de 24 h.

Inicialmente testou-se todas as frações obtidas sob células de *C. albicans*, pois é uma das cepas do gênero *Candida* menos suscetível à ensaios antifúngicos. Na Figura 7 observa-se que as frações purificadas dos frutos imaturos, HI3, HI8, HI9 e HI14 inibiram significativamente o crescimento da levedura *C. albicans*, obtendo inibições de 95%, 87,6%, 99% e 87,1% respectivamente. As frações foram selecionadas conforme o rendimento das amostras, devido o perfil eletroforético e pelas significativas porcentagens vistas no ensaio antifúngico, para um ensaio subsequente com células de *C. tropicalis*, e conforme o observado na Figura 8, a fração HI3 não apresentou capacidade de controle do crescimento fúngico, mostrando assim leitura aumentada da absorbância quando comparada ao controle. Já as frações HI8, HI9 e HI14 inibiram o crescimento em 46,07%, 99,33% e 48,18%, respectivamente.

Já as frações obtidas da purificação de D2 de frutos maduros, quando submetidas ao ensaio biológico com a cepa *C. albicans*, nota-se (Figura 9) que as frações HM3, HM6, HM7 e HM13 demonstraram porcentagens significativas na inibição sobre o crescimento fúngico, mediante as porcentagens de 93,59% 99%, 97,54% e 93,59%, respectivamente. Todavia, quando essas mesmas frações foram testadas sobre o crescimento de *C. tropicalis*, observamos o aumento da absorbância nas respectivas leituras (dados não mostrados). Sendo assim, as amostras HM3, HM6, HM7 e HM13 por apresentar dados significativos no ensaio antifúngico, rendimento da amostra e por apresentar bandas de interesse de baixa massa molecular ($< 10 \text{ kDa}$), foram selecionadas para dar continuidade nos experimentos.

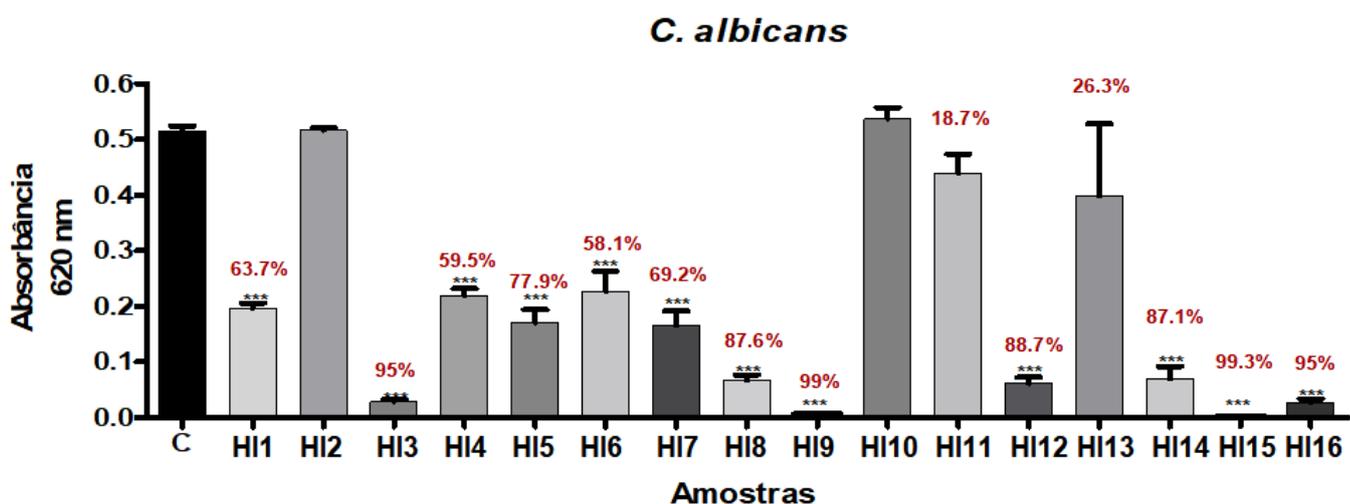


Figura 7: Visualização gráfica do ensaio antifúngico do crescimento da levedura *C. albicans* na ausência (controle) e presença de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações HI1 a HI16, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. Os experimentos foram realizados em triplicata. (*) Indicam diferenças significativas ($p < 0.001$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras foi indicado o valor da inibição (%).

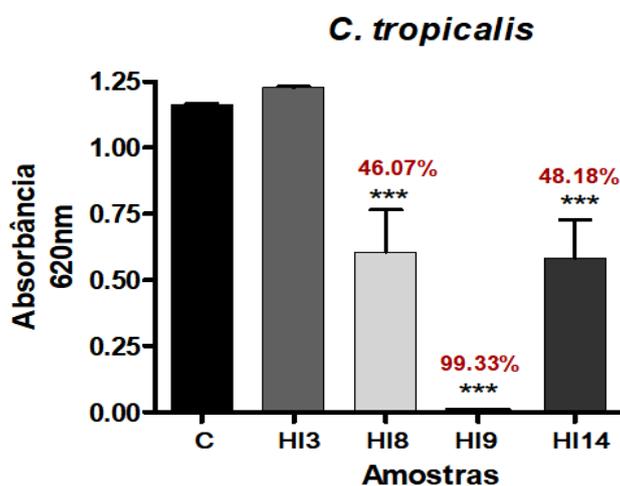


Figura 8: Visualização gráfica do ensaio antifúngico do crescimento da levedura *C. tropicalis* na ausência (controle) e presença de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações HI3, HI8, HI9 e HI14, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. Os experimentos foram realizados em triplicata. (*) Indicam diferenças significativas ($p < 0.001$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras foi indicado o valor da inibição (%).

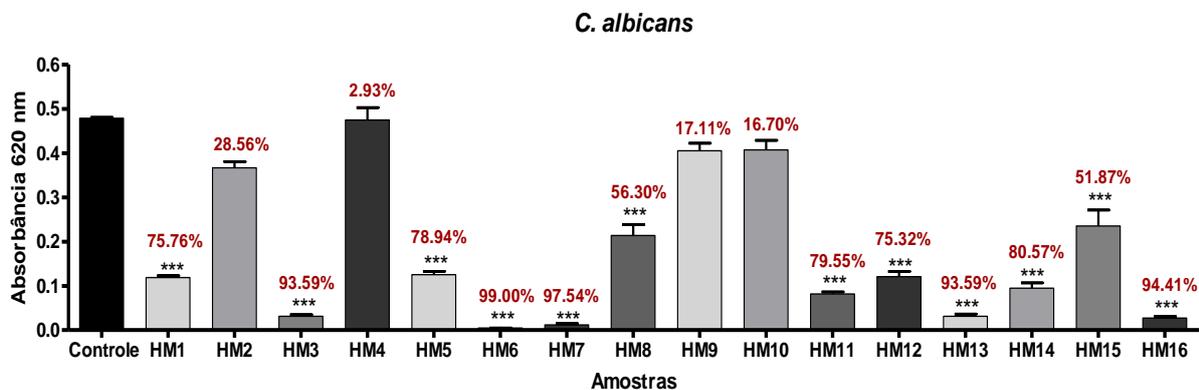


Figura 9: Visualização gráfica do ensaio antifúngico do crescimento da levedura *C. albicans* na ausência (controle) e presença de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações HM1 a HM16, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. Os experimentos foram realizados em triplicata. (*) Indicam diferenças significativas ($p < 0.001$) entre o tratamento e o controle. Acima das barras foi indicado o valor da inibição (%).

Tabela 2: Análise comparativa dos resultados obtidos dos efeitos da fração D2 de frutos imaturos e maduros de *C. chinense* Jacq. após purificação por cromatografia em fase reversa em coluna C18 – HPLC

	Frações	Frutos imaturos	Frutos maduros
<i>Candida albicans</i> (Controle 100%)	H1	*63,7%	*75,76%
	H2	-	28,56%
	H3	*95%	*93,59%
	H4	*59,5%	2,93%
	H5	*77,9%	*78,94%
	H6	*58,1%	*99%
	H7	*69,2%	*97,54%
	H8	*87,6%	*56,3%
	H9	*99%	17,11%
	H10	-	16,7%
	H11	18,7%	*79,55%
	H12	*88,7%	*75,32%
	H13	26,3%	*93,59%
	H14	*87,1%	*80,57%
	H15	*99,3%	*51,87%
	H16	*95%	*94,41%

Tabela 3: Análise comparativa dos resultados obtidos dos efeitos da fração D2 de frutos imaturos e maduros de *C. chinense* Jacq. após purificação por cromatografia em fase reversa em coluna C18 – HPLC

<i>Candida tropicalis</i> (Controle 100%)	Frações frutos imaturos		Frações frutos maduros	
	HI3	-	HM3	-
HI8	*46,07%	HM6	-	
HI9	*99,33%	HM7	-	
HI14	*48,18%	HM13	-	

4.6 – Ensaio de viabilidade celular em leveduras do gênero *Candida*

Na figura 10 é mostrado o ensaio de viabilidade celular, realizado após ensaio antifúngico, com as frações HI3, HI8, HI9 e HI14 (frutos imaturos), no qual se observa que a levedura *C. albicans* foi mais suscetível as frações do que *C. tropicalis*. Quando as frações HI3, HI8, HI9 e HI14 foram testadas sobre *C. albicans*, apresentaram perda de viabilidade de 83,21%, 98,29%, 100% e 96,4%, respectivamente, demonstrando assim que para *C. albicans* a fração HI9 apresenta um perfil fungicida em frente ao crescimento fúngico (lise das células), enquanto que as frações HI3, HI8 e HI14 apresentaram perfil fungistático quando se observa a formação de unidades de colônias após as células do ensaio serem expostas a um meio rico em nutrientes.

Já quando estas mesmas frações são testadas sobre *C. tropicalis*, observa-se que induziram perda de viabilidade celular (Figura 10B), exceto pelas frações HI3 e HI14 que não mostraram resultados significativos quando avaliado a perda de viabilidade celular pelas células fúngicas, se observando perda de 0% e 20,86%, respectivamente. A fração HI8 induziu perda de viabilidade de 54,30%, enquanto que o número de células viáveis de *C. tropicalis* foram inibidas em 100% quando tratadas com a fração HI9. Dos dados analisados, a fração HI9 de frutos imaturos foi escolhida pela sua atividade biológica ativa sobre crescimento das leveduras testadas e por apresentar perda de células viáveis em 100%, demonstrando ser uma fração com carácter fungicida.

Já na Figura 11 é mostrado que as frações HM3 e HM13, obtidas da fração D2 de frutos maduros após cromatografia de fase reversa em HPLC, apresentaram porcentagens significativas no controle de crescimento da levedura *C. albicans*, porém quando exposta ao meio rico em nutrientes voltam ao metabolismo normal, caracterizando-as como fungistáticas, isto é notório mediante as porcentagens de perda de viabilidade celular em 84,45% e 17,65%, respectivamente, e pela formação de unidades de colônias observadas. Ainda na Figura 11, é visto que as frações HM6 e HM7 induziram perda de viabilidade celular em 100% e 99,87% em células *C. albicans*, respectivamente, caracterizando as frações como fungicidas, sendo assim selecionadas para avaliar o mecanismo de ação envolvido na morte das leveduras.

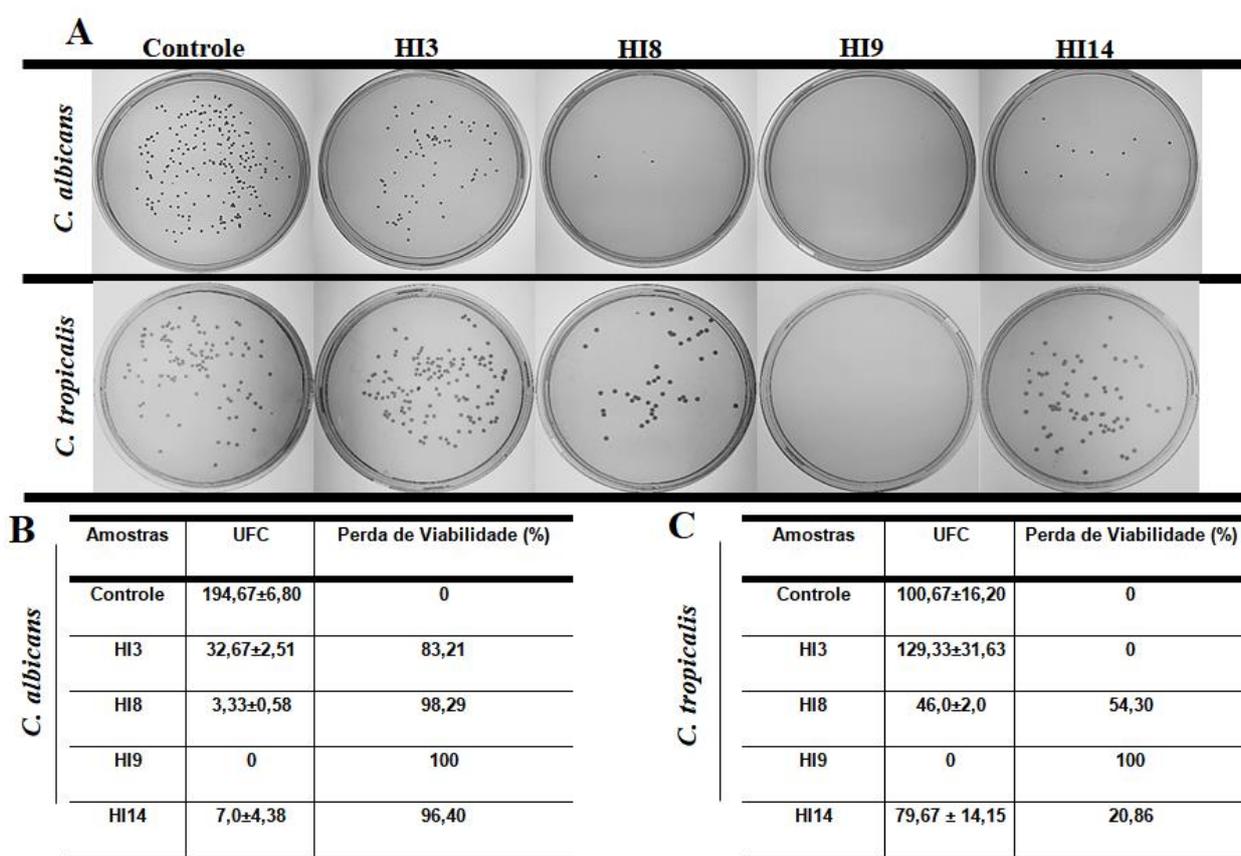


Figura 10: (A) Imagens das placas de Petri mostrando o crescimento de colônias na condição controle e após 24 h de tratamento com 50µg.mL⁻¹ das frações HI3, HI8, HI9 e HI14, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. (B) Tabela referente a porcentagem de perda de viabilidade em *C. albicans* após 24 h de tratamento com as frações HI3, HI8, HI9 e HI14 e (C) refere a porcentagem de perda de viabilidade em *C.*

tropicalis. CFU = Unidade Formadora de Colônia (do inglês, *Colony Forming Unit*). Os experimentos foram realizados em triplicata.

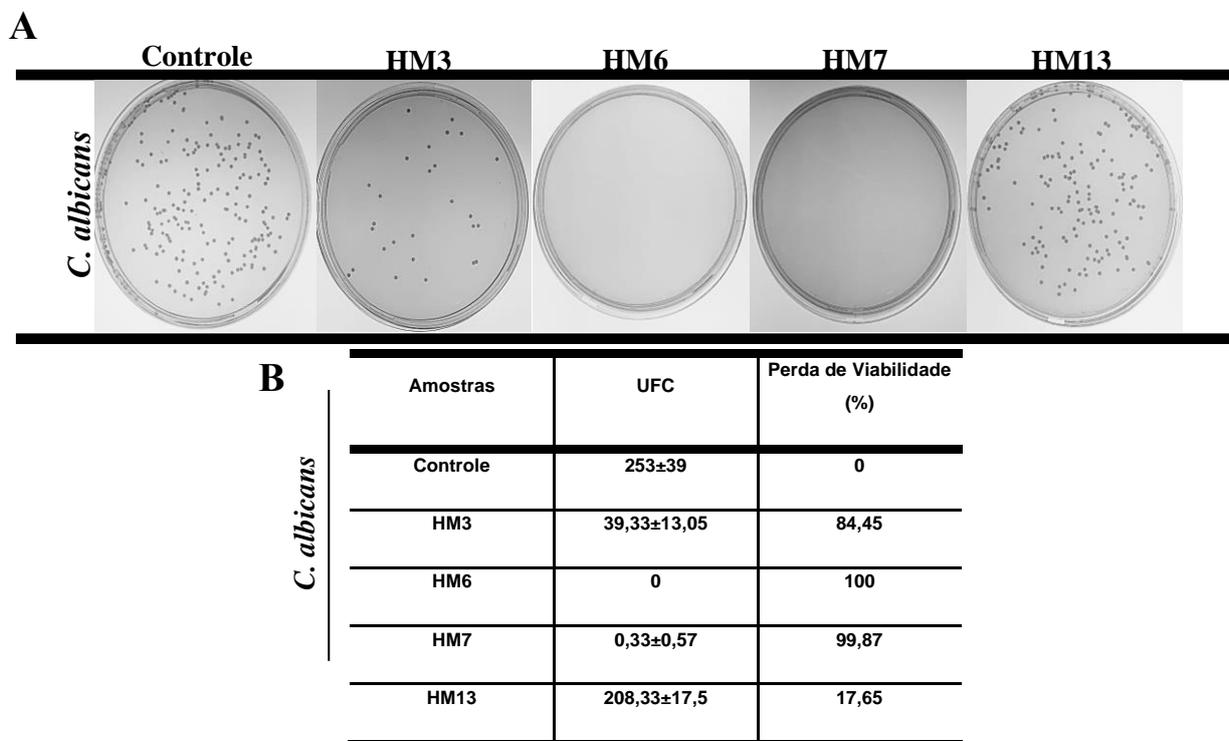


Figura 11: (A) Imagens das placas de Petri mostrando o crescimento de colônias na condição controle e após 24 h de tratamento com 50 µg.mL⁻¹ das frações HM3, HM6, HM7 e HM13, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. (B) Tabela referente a porcentagem de perda de viabilidade em *C. albicans* após 24 h de tratamento com as frações HM3, HM6, HM7 e HM13. CFU = Unidade Formadora de Colônia (do inglês, *Colony Forming Unit*). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 – Efeito das frações HI9, HM6 e HM7 de *C. chinense* sobre a permeabilização de membranas de leveduras

O efeito antifúngico da fração HI9 de frutos imaturos, HM6 e HM7 de frutos maduros de *C. chinense*, foi avaliado em relação ao seu mecanismo de ação, após 24 h de ensaio antifúngico. A permeabilização da membrana foi avaliada em *C. albicans* e *C. tropicalis* na presença das frações que foram suscetíveis (na concentração de 50 µg.mL⁻¹), através da incubação com a sonda *SYTOX Green*.

Conforme visto na Figura 12 não houve detecção da emissão de sinal fluorescente nas células de *C. albicans*, confirmando a não permeabilização de membrana, pois as frações HI9 e HM6, nesta concentração, reduziu a população de células, e para a fração HM7 ainda notamos que esta causou alterações morfológicas sobre a levedura.

Para analisar a possibilidade da ausência de sinal de emissão fluorescente estar relacionado com as concentrações das frações testadas, uma vez que não foi observado crescimento significativo de células para avaliar o mecanismo de ação, realizamos ensaios antifúngicos com as frações HI9, HM6 e HM7, nas concentrações de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no tempo de 24 h (Figura 13). Assim, quando observado os resultados com as células tratadas na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, é evidente as alterações morfológicas nas células, mas ainda assim não foi possível observar a permeabilização de membranas pelas frações HI9, HM6 e HM7 em *C. albicans*, sugerindo assim a presença de outro mecanismo de ação envolvido na morte celular.

Como as células de *C. tropicalis* foram mais suscetíveis as frações dos frutos imaturos, demos continuidade da avaliação do mecanismo de ação da fração HI9 sobre membranas de células de *C. tropicalis*, que foram tratadas nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em um ensaio lido no tempo de 24 h.

Nos resultados obtidos para a fração HI9, na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em células de *C. tropicalis*, houve uma redução de células quando observadas em DIC, e ainda foi possível observar a emissão de fluorescência (Figura 14), mas estatisticamente não significativo, devido ao crescimento de poucas células no ensaio. Os ensaios com a fração na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mostrou mais células em imagens de DIC, com alterações morfológicas quando submetidos a essa concentração, porém ainda assim, não foi possível observar permeabilização de membranas em *C. tropicalis*.

C. albicans

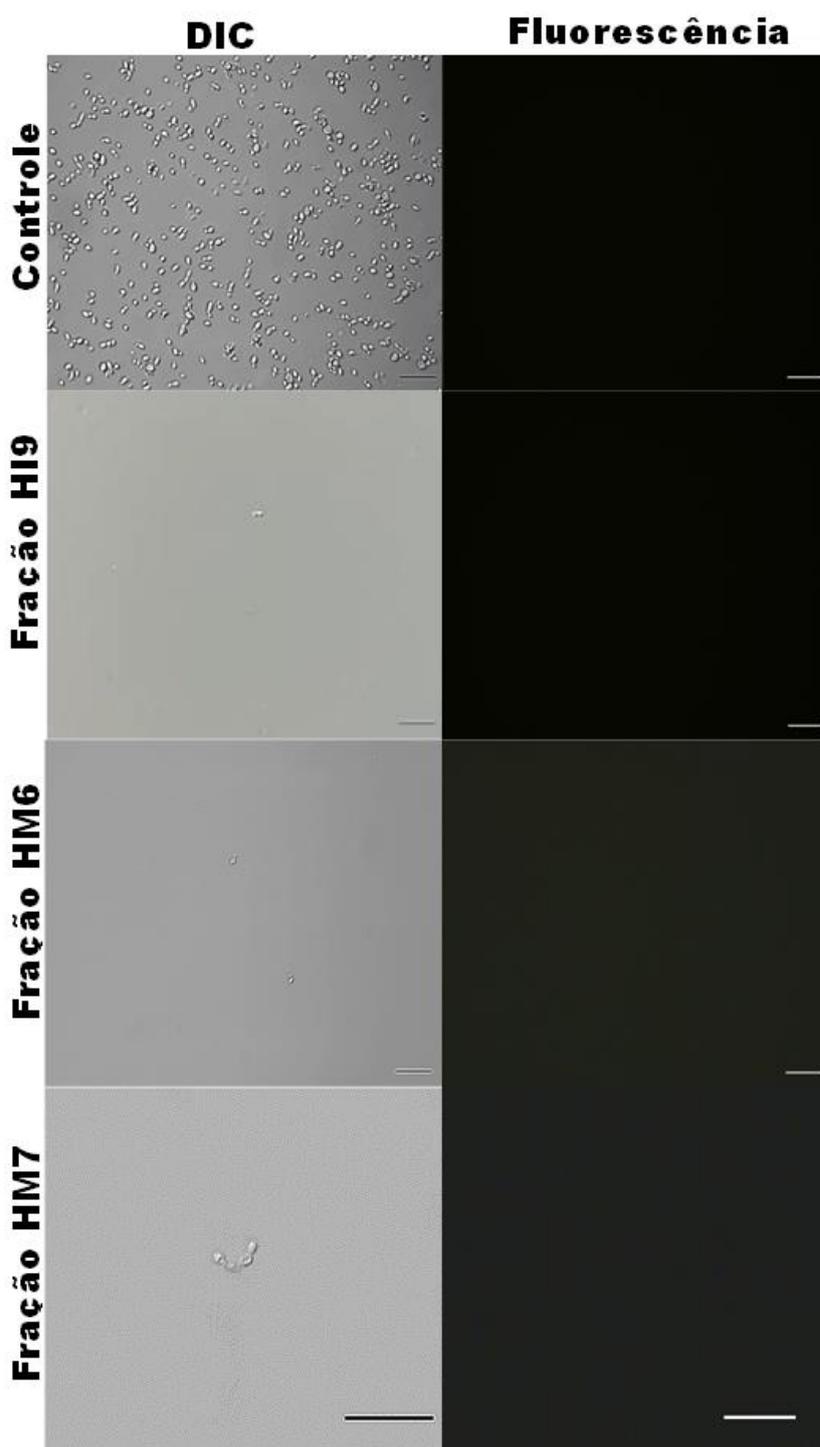


Figura 12: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda SYTOX Green, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das fração HI9, HM6 e HM7, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. O ensaio foi lido no tempo de 24 h e as células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm .

C. albicans

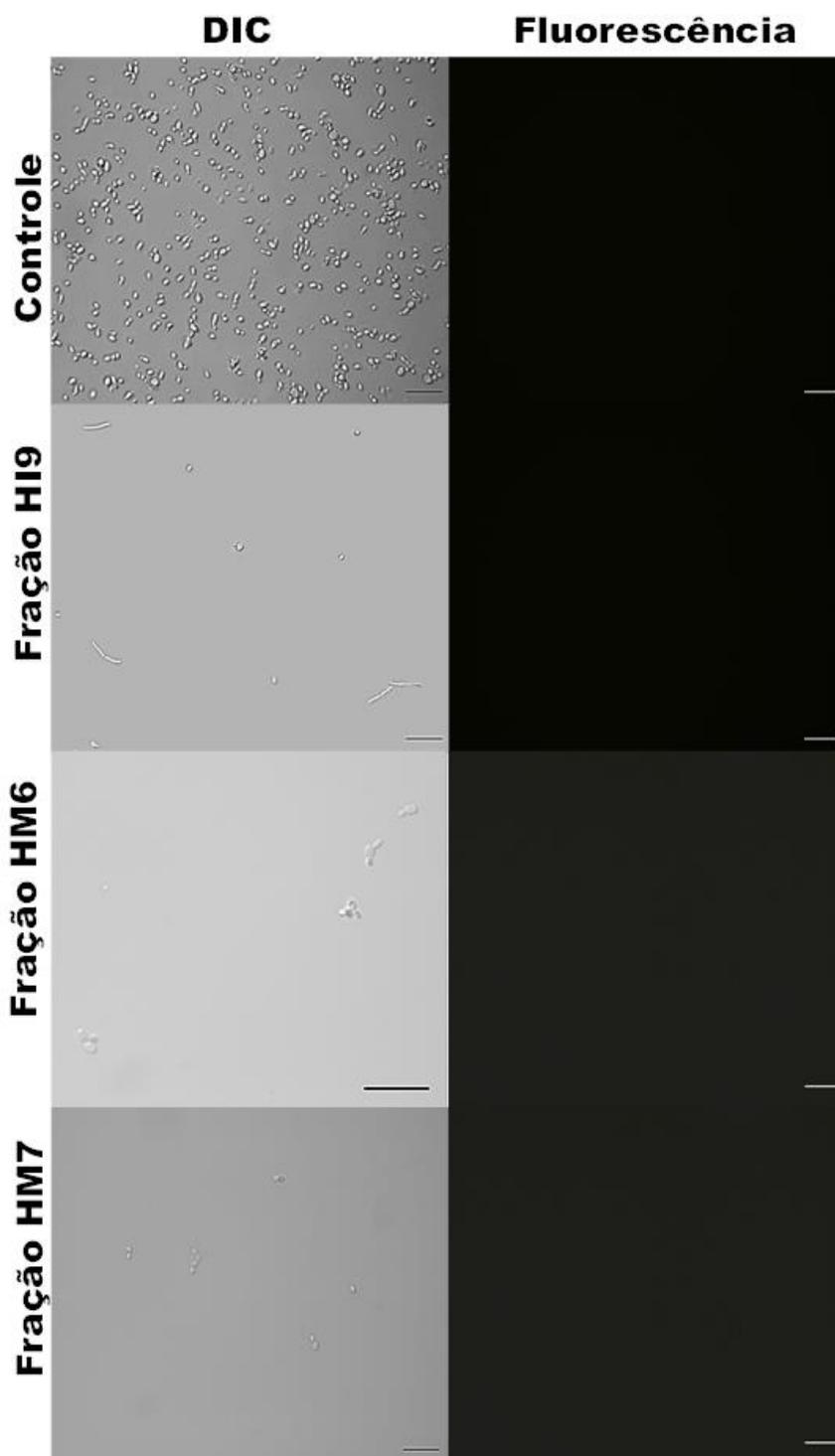


Figura 13: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda SYTOX Green, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das fração HI9, HM6 e HM7, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. O ensaio foi lido no tempo de 24 h e as células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm .

C. tropicalis

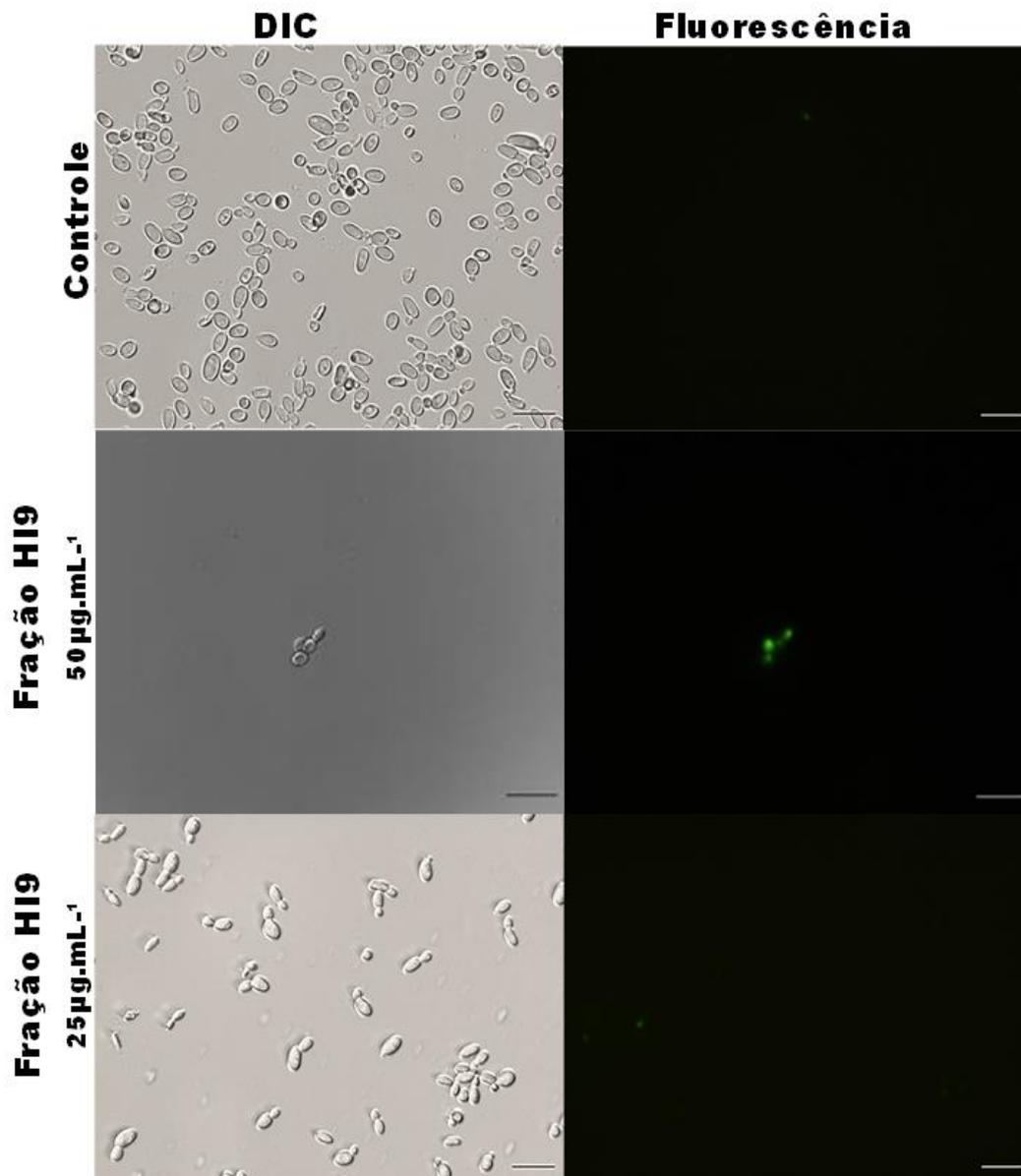


Figura 14: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. tropicalis* incubadas com a sonda SYTOX Green, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 25 µg.mL⁻¹ e 50 µg.mL⁻¹ da fração HI9, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. O ensaio foi lido no tempo de 24 h e as células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm.

4.8 – Efeito das frações HI9, HM6 e HM7 de *C. chinense* sobre a indução da produção endógena de ROS em células de leveduras

Após 24 h do ensaio antifúngico, analisamos a capacidade das frações HI9, HM6 e HM7, na concentração de 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em aumentar a produção endógena de ROS, utilizando a sonda 2',7' – diclorofluoresceína diacetato, contra a espécie de *C. albicans* que se mostrou suscetível nos testes de atividade biológica.

Os resultados obtidos mostram que não houve marcação do corante nas células tratadas na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, então para questionar se não foi possível observar a emissão de fluorescência pelas células incubadas pelo corante por não apresentarem metabolismo ativo e o corante ser específico para marcação em células vivas, foi realizado um ensaio lido no tempo 24 h com as frações na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre *C. albicans*. Mas, observa-se que nessas condições testadas, as frações foram capazes de reduzir o número de células e causar danos na morfologia celular das leveduras, se mostrando tóxicas sobre *C. albicans* (Figura 15 e 16). Sugerindo-se outro possível mecanismo de ação para estas frações, que não seja a indução de estresse oxidativo em *C. albicans*.

Para avaliar o aumento de produção endógena de ROS em *C. tropicalis*, as células foram tratadas com 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração HI9 em um ensaio lido no tempo de 24 h. Posteriormente as células foram incubadas com o corante e analisadas em microscópio equipado com um conjunto de filtros fluorescentes. Assim como mostrado para *C. albicans*, a fração HI9 mostrou-se potente na inibição do crescimento das células fúngicas quando tratadas na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e quando submetidas a uma concentração menor (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) se observa alterações no desenvolvimento da célula. Porém não foi possível captar sinal de fluorescência nas células testadas, e observamos que esta fração apresenta alta toxicidade em células fúngicas, e quando submetidas a concentrações menores, provoca alterações na morfologia que podemos supor pelo estresse celular, que seja ocasionado pela exposição das frações na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no tempo de 24 h.

C. albicans

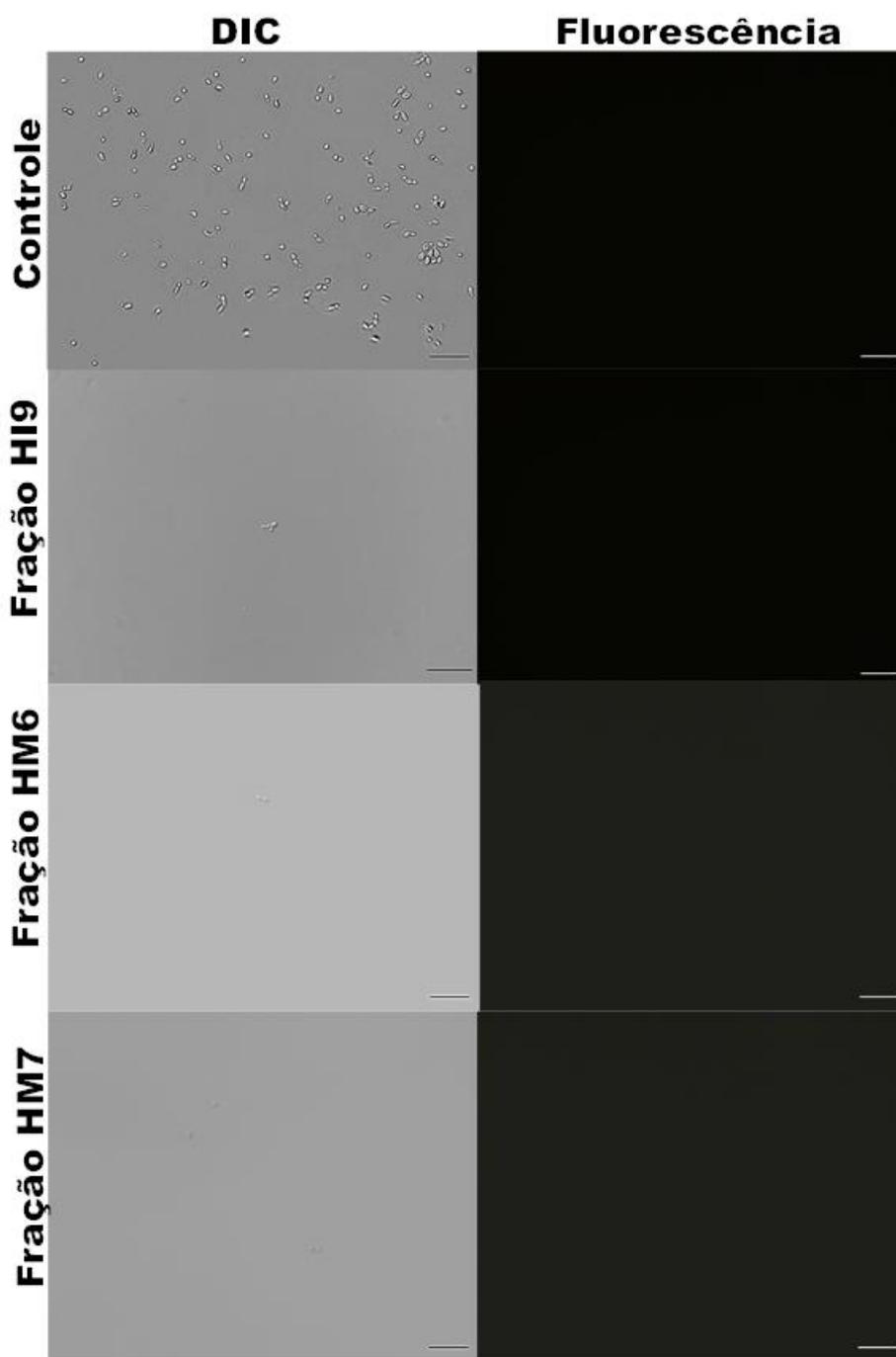


Figura 15: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda 2',7' – diclorofluoresceína diacetato, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração HI9, HM6 e HM7, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm . O ensaio foi lido no tempo de 24 h.

C. albicans

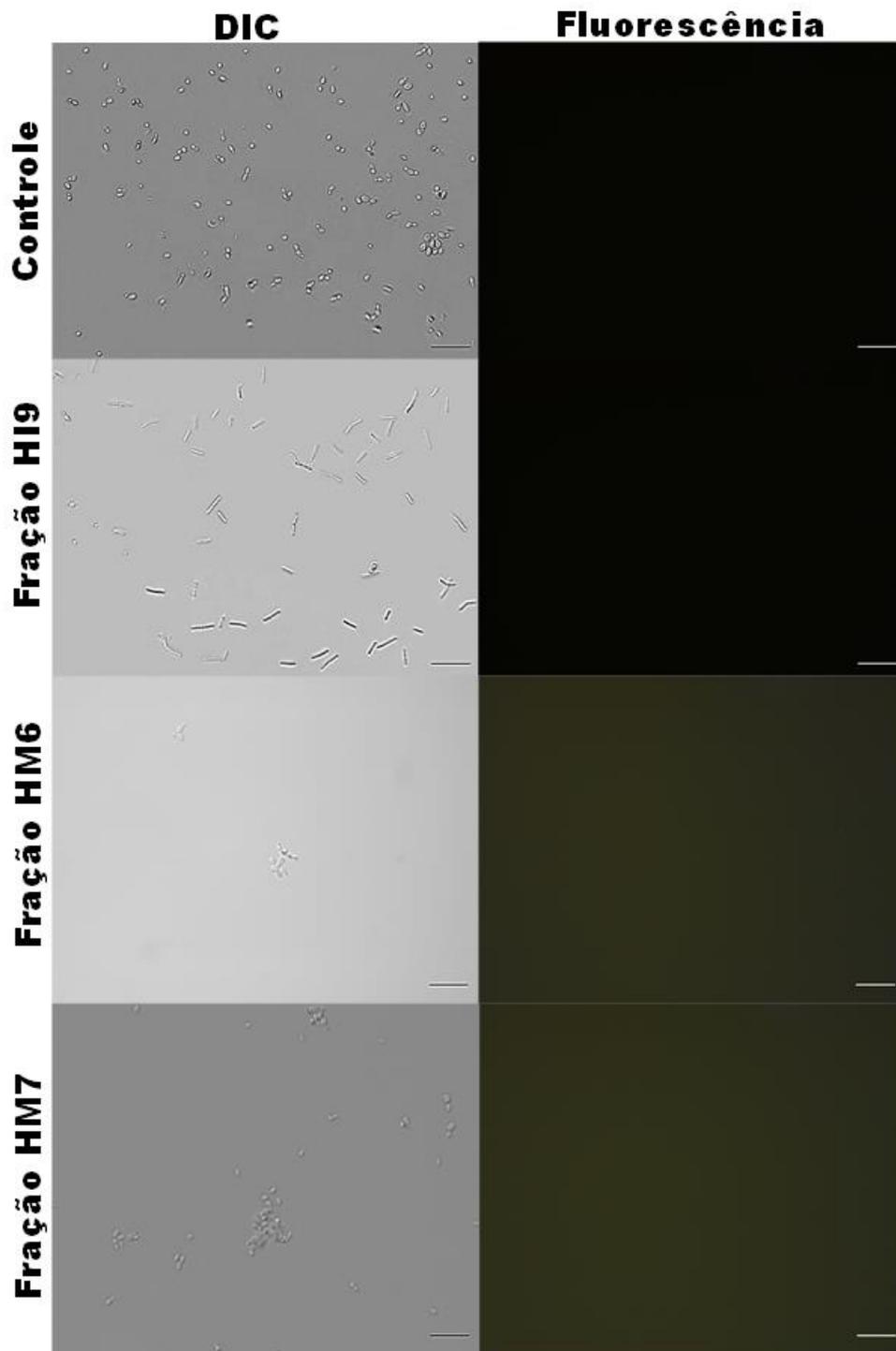


Figura 16: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com a sonda 2',7' – diclorofluoresceína diacetato, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações HI9, HM6 e HM7, obtidas após cromatografia de fase reversa em HPLC. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 μm . O ensaio foi lido no tempo de 24 h.

C. tropicalis

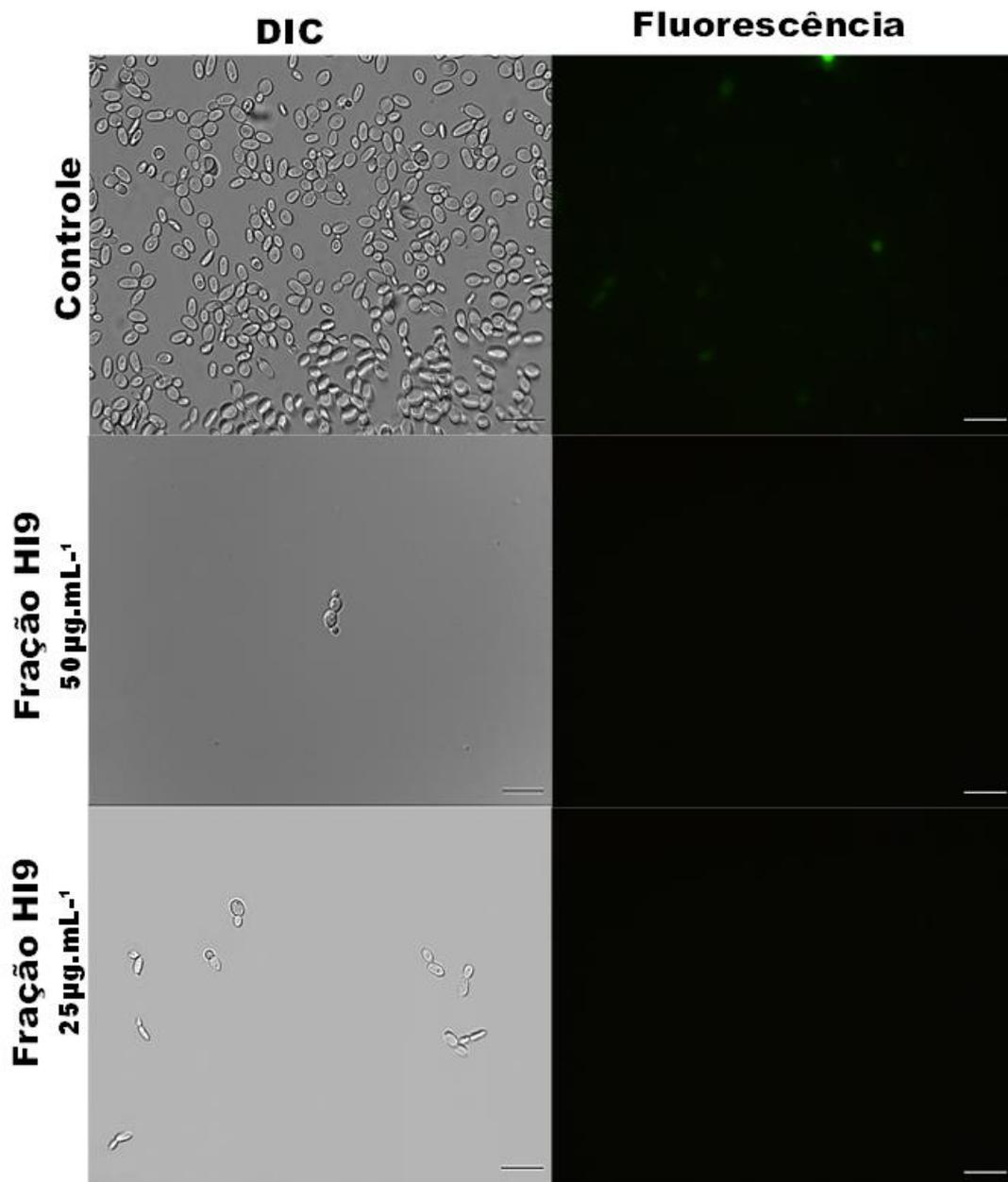


Figura 17: Imagens de microscopia de fluorescência de células da levedura *C. tropicalis* incubadas com a sonda 2',7' – diclorofluoresceína diacetato, após terem sido cultivadas na ausência (controle) e na presença de 25 µg.mL⁻¹ e 50 µg.mL⁻¹ da fração HI9, obtida após cromatografia de fase reversa em HPLC. As células foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barras = 20 µm. O ensaio foi lido no tempo de 24 h.

Tabela 4: Análise comparativa dos efeitos das frações isoladas de frutos de *C. chinense* Jacq. na caracterização da morfologia de células cultivadas de *C. albicans*

Frações	Alterações na concentração/Tempo	
	50µg.mL ⁻¹ /24 h	25 µg.mL ⁻¹ /24 h
HI9	A fração reduz a população de células quase não sendo possível observar nenhuma célula no campo claro	A fração reduz parcialmente o número de células e induz um alongamento que ocorre da falha na separação da célula mãe, mas que mantém constrições nas junções do septo, e seu comprimento é bastante variável.
HM6	A fração reduz o número de células	A fração reduz a população de células e induz formação de curtos segmentos do blastoconídio
HM7	A fração além de reduzir a população de células, induz a formação de um pequeno filamento que brota do blastoconídio	A fração reduz a população de células e induz aglutinação das poucas células cultivadas

Tabela 5: Análise comparativa da concentração da fração HI9 de frutos imaturos de *C. chinense* Jacq. na caracterização da morfologia de células cultivadas de *C. tropicalis*

Frações	Alterações na concentração/Tempo	
	50µg.mL ⁻¹ /24 h	25 µg.mL ⁻¹ /24 h
HI9	A fração reduz a população de células, sendo possível observar um curto segmento que brota do blastoconídio da única célula visualizada no campo claro	A fração reduz parcialmente o número de células e induz uns pequenos alongamentos em algumas célula, e seu comprimento é bastante variável.

5. DISCUSSÃO

Capsicum é um gênero botânico pertencente a família Solanaceae, que abrange as pimentas e os pimentões, além dos tomates e berinjela. O Brasil é considerado centro da diversidade de pimentas *Capsicum*, pois em seu território podemos encontrar espécies de todos os níveis de domesticação. O gênero é composto por mais de 30 espécies, onde cinco são consideradas domesticadas e as demais classificadas como semidomesticadas e silvestres (BONTEMPO, 2007; MARTINS et al. 2010; BARBOZA et al. 2011; POZZOBON et al. 2011).

O uso medicinal das pimentas é tão antigo quanto a civilização. O homem vem buscando na natureza o suprimento para as suas necessidades básicas, utilizando-as como alimentos, temperos e remédios. Com respeito ao emprego medicinal, alguns autores sugerem que o mesmo pode ter precedido aos demais usos, mesmo ao condimentar, durante o processo de domesticação dessas plantas nas Américas (DEWITT e BOSLAND, 1996; BOSLAND e VOTAVA, 2000). Informações encontradas em trabalhos que abordam a medicina ameríndia revelam uma grande diversidade de aplicação terapêutica do gênero *Capsicum*. Castiglioni (1947), por exemplo, menciona o conhecimento que povos americanos detinham, antes do contato com os europeus, sobre a propriedade antiblenorrágica dessas plantas. Índios colombianos as empregavam no tratamento de picadas de cobras (OTERO et al. 2000). Povos maias e astecas usavam-as misturadas com milho, para cura de resfriados comuns. Também as utilizavam em casos de queimaduras e no tratamento de asma, tosses e dores de garganta (CICHEWICZ e THORPE, 1996; BOSLAND; VOTAVA, 2000).

Em relação as propriedades biológicas de plantas *Capsicum*, autores postulam a influência da interação entre ambiente e planta, que resultam em moléculas do metabolismo secundário no intuito de defesa vegetal. Entre estas moléculas, proteínas que participam da imunidade inata se destacam como promissores para o ramo biotecnológico, uma vez que o mecanismo oferece proteção rápida ao hospedeiro com baixo gasto de energia e biomassa, propriedades antimicrobianas e amplos espectros de bioatividade (HANCOCK e LEHRER, 1998; ZASLOFF, 2002; LAY e ANDERSON, 2005).

As espécies vegetais tem sido alvo de atenção, em relação à busca por novas proteínas e peptídeos que tenham um potencial antimicrobiano. Estas substâncias têm exercido um importante papel no controle de doenças causadas por bactérias e fungos (DEMAIN e SANCHEZ, 2009). Estudos apontam que estas moléculas naturais atuam na biossíntese da parede celular ou mesmo na síntese dos ácidos nucleicos, dificultando a formação de purina ou pirimidina ou bloqueia a polimerização dos nucleotídeos, contribuindo desta maneira como agentes antimicrobianos (LIMA, 2001).

No trabalho mostrado por Santos et al. (2020), isolaram de frutos de *C. chinense* diferentes AMPs com atividade antifúngica, dentre eles um pertencente a família das LTPs e outro semelhante as defensinas de plantas. Silva et al. (2020) identificaram inibidores bifuncionais de frutos de *C. chinense* com atividade sobre fungos fitopatogênicos. Recentemente, também foi mostrado por Resende (2020) um estudo de caracterização bioquímica e antimicrobiana, que demonstrou peptídeos presente em frutos de *C. chinense* com propriedades de inibidores bifuncionais, como inibidores de proteases e alfa-amilase, e atividade antifúngica sob os fungos do gênero *Fusarium* e *Colletotrichum*.

Estes trabalhos nos direcionaram para o presente estudo de caracterização e purificação de peptídeos antimicrobianos em frutos imaturos e maduros de *C. chinense*. Comparando a influência do estado de desenvolvimento do fruto ao potencial antifúngico, no estudo realizado por Francelino (2017) foi mostrado que os ERPs, D1 e D2 de frutos de *C. chinense*, em especial dos frutos imaturos, possuíam atividade antifúngica sobre desenvolvimento de leveduras e fungos fitopatogênicos.

Este trabalho teve seu início a partir da comparação da atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos imaturos e maduros de *C. chinense* (acesso UENF 1706) sobre cepas fúngicas de importância médica, no intuito de selecionar a fração mais ativa. O trabalho de Francelino (2017) utilizou as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*, nas quais foram tratadas com 100 µg.mL⁻¹ do ERP, D1 e D2 dos frutos de *C. chinense*. Observou-se que no ensaio antifúngico contra as células de *C. albicans*, a fração D1 de frutos imaturos inibiu 67% do crescimento fúngico e D2 inibiu 97%; e para *C. tropicalis*, a inibição foi de 13% e 67%, respectivamente para D1 e D2. Em comparação com o obtido no presente trabalho as porcentagens se

diferem para *C. albicans*, onde D1 de frutos imaduros inibiu 63,86% e D2, 61,91%; e para *C. tropicalis* foi observado 28,64% e 51,90%, respectivamente (Figura 4).

Para frutos maduros foi observado que neste estudo de comparação com *C. albicans*, D1 não causou inibição, onde para D2 obtivemos uma inibição de 80,9%; e para *C. tropicalis* D1 também não apresentou inibição e D2 inibiu 55,8%. Comparando as atividades inibitórias obtidas, avaliadas na mesma concentração para as frações D1 e D2 dos frutos maduros, nota-se que estes dados corroboram com os obtidos por Francelino (2017), onde foi visto que para *C. albicans* a fração D1 também não inibiu o crescimento fúngico, e D2 inibiu 87,6%, já para *C. tropicalis* a fração D1 inibiu 29,6% e D2 inibiu 66,2%. As diferenças significativas do controle do crescimento fúngico pelas amostras observadas entre o trabalho de Francelino (2017) e o presente estudo, são decorrentes de distintas técnicas de cultivo das plantas, período de colhimento dos frutos, assim como os métodos para extração de proteínas dos frutos e cuidados durante plantio contra pragas e patógenos vegetais.

Assim como Santos et al. (2017) que utilizou a cromatografia de fase reversa em HPLC para purificação de proteínas, as respectivas frações obtidas neste estudo (D2 de frutos maduros e imaturos) foram também submetidas a cromatografia em coluna de fase reversa C18. Essa coluna promove a separação por hidrofobicidade, e obtivemos 16 diferentes frações tanto para a fração D2 de frutos imaturos (HI1 à HI16) (Figura 4A) quanto para a fração D2 dos frutos maduros (HM1 a HM16) (Figura 5A). Em relação ao perfil eletroforético dessas respectivas frações, foi mostrado a presença de variadas bandas proteicas, dentre elas, peptídeos de baixa massa molecular (Figura 4B e 5B). Outros trabalhos também já demonstraram a presença de diferentes peptídeos de frutos de *Capsicum*, com diferentes massas moleculares e com atividade antimicrobiana (LIU et al. 2006; TAVEIRA et al., 2014; HENRIQUES, 2015), assim como em diferentes órgãos da planta deste gênero, como por exemplo, sementes (TEXEIRA et al. 2006; DIAS et al. 2013; RIBEIRO et al. 2013; VIEIRA BARD et al. 2015), folhas (PEREIRA, 2013; DIZ, 2007) e raiz (PEREIRA, 2015).

As frações obtidas por cromatografia de fase reversa foram inicialmente testadas em um ensaio antifúngico sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis*, na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e assim selecionamos as frações com

maior atividade antifúngica. As frações HI3, HI8, HI9 e HI14 oriundas dos frutos imaturos demonstraram inibições de 95%, 87,6%, 99% e 87,1% respectivamente sobre células de *C. albicans*, e assim devido a maior atividade inibitória foram selecionadas (Figura 6). Esta seleção foi também baseada pelo seu perfil eletroforético, mostrando a presença de peptídeos isolados e de baixa massa molecular. Posteriormente estas frações foram testadas *in vitro* sobre o crescimento de *C. tropicalis*, onde somente a fração HI9 apresentou atividade inibitória significativa de 99,33%, enquanto as frações HI8 e HI14 apresentaram metade da capacidade inibitória observada no ensaio com *C. albicans*. Importante ressaltar que para a fração HI3 foi observado um aumento nas leituras de absorbância (Figura 7). Tanto no trabalho de Brown e Hancock (2006), como em outros trabalhos já publicados sobre AMPs (JAEYONG et al. 2012; TAM et al. 2015; MARACAHIPES et al. 2019; SANTOS et al. 2020; GEBARA et al. 2020), mostraram que essas moléculas possuem ação contra diferentes microrganismos, no entanto esta atividade antimicrobiana varia de acordo com a concentração, com o peptídeo e com o microrganismo testado, bem como com a propriedade desses peptídeos de promover alterações morfológicas.

Gebara et al. (2020) purificou três frações de frutos maduros de *C. annuum* e testou sua atividade antimicrobiana sobre *C. albicans*. As frações denominadas como F2 e F3 inibiram o crescimento fúngico em 75,8% e 89,5%, e F4 não foi capaz de inibir significativamente. Porém quando testada sobre *C. tropicalis*, as três frações inibiram o crescimento em 94,5%, 90,3% e 58,4%, respectivamente, mas ainda assim as frações F2 e F3 mostraram-se mais tóxicas para ambas as leveduras quando comparada com F4. Quando comparado com os dados deste trabalho, é o oposto, as células de *C. albicans* se mostraram suscetíveis as frações dos frutos imaturos e maduros, enquanto que *C. tropicalis* se mostrou menos suscetível as frações dos frutos maduros.

Das nossas frações obtidas a partir de D2 dos frutos maduros, as que demonstraram inibições significativas ($p < 0.05$) de 93,59%, 99%, 97,54% e 93,59% sobre *C. albicans* foram HM3, HM6, HM7 e HM13, respectivamente. Embora outras frações demonstraram inibir significativamente o crescimento de *C. albicans*, essas foram selecionadas mediante ao perfil eletroforético e sua capacidade inibitória.

Mas, quando estas frações são testadas sobre *C. tropicalis*, nenhuma das 16 frações foram capazes de inibir o crescimento, havendo um aumento nas leituras de absorvância. Estes resultados reforçam a idéia de Molina et al. (1993), os quais mostraram que os ensaios de inibição podem ser explicados por uma possível interação sinérgica dos peptídeos contidos nas frações, quando comparado os ensaios dos extratos dos frutos com as frações mais purificadas, bem como pelo fato de alterações mais predominantes na morfologia da levedura que pode levar uma interferência durante a leitura do ensaio biológico, o que já foi mostrado também por Taveira et al. (2018).

Para avaliar o perfil antifúngico das frações purificadas, as frações de interesse foram submetidas a ensaio de viabilidade celular no intuito de caracterizar suas respectivas atividades como fungicida (morte, lise) ou fungistáticas (metabolismo interrompido) sobre *C. albicans* e *C. tropicalis*. Das frações purificadas de D2 de frutos imaturos HI3, HI8 e HI14 apresentaram um perfil fungistático, pois após o ensaio quando as células fúngicas foram expostas em um meio rico em nutrientes observou-se o crescimento de colônias após 24 h do ensaio. Já para a fração HI9 não houve crescimento, demonstrando assim um caracter fungicida, com perda de viabilidade celular em 100% tanto para *C. albicans* quanto para *C. tropicalis*. Para as frações HM3, HM6, HM7 e HM13 apresentaram redução significativa da viabilidade, enquanto as frações HM6 e HM7 exibiram perda de viabilidade fúngica em 100% e 99,87%, respectivamente, e as frações HM3 e HM13 que demonstraram ser fungistático, apresentando a perda da viabilidade celular em 84,45% e 17,65%. Moraes (2008) postula que a avaliação estatística de viabilidade celular de células testadas com extratos de plantas em ensaios antifúngicos, colaboram com observações morfológicas, a quantidade de colônias está correlacionada com a concentração da amostra, isso irá refletir nas observações microscópicas das células tratadas, com alterações na morfologia e/ou redução de células. Com isso as frações HI9, HM6 e HM7 foram submetidas a estudos para avaliar seu mecanismo de ação sob células fúngicas.

A partir dos resultados obtidos, as frações com perfil fungicida foram avaliadas quanto a sua capacidade de permeabilizar membranas fúngicas. Mostramos que na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a fração HI9 não causou permeabilização de

membrana das células de *C. albicans* e *C. tropicalis*. No entanto, foi observado que além desta fração causar a inibição do crescimento destas leveduras, causou alterações morfológicas em seus padrões de crescimento. O mesmo foi observado para as frações HM6 e HM7 sob as mesmas condições.

No intuito de melhor investigar a permeabilidade nas células fúngicas, supomos que a ausência de permeabilização observada poderia estar relacionada a concentração das frações HI9, HM6 e HM7 utilizadas, uma vez que essa foi capaz de inibir o crescimento total das células das leveduras. Desta forma, diminuimos a concentração para $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações citadas, notamos alterações na morfologia das células tratadas, mas ainda assim não foi observado permeabilização de membrana nas células. Mas, vale ressaltar que a permeabilização de membranas e a inibição do crescimento de microrganismos não são fenômenos obrigatoriamente relacionados, visto que é possível encontrar peptídeos com atividade antimicrobiana, capazes de induzir a permeabilização de membranas, porém não apresentaram um efeito fungicida e vice-versa, (KOSHLUKOVA et al. 1999; STEFFEN et al. 2006; VYLKOVA et al. 2007).

Estudos recentes vêm demonstrando que a permeabilização de membranas não é a única causa da morte de um microrganismo, uma vez que os AMPs podem ter vários alvos. Em estudos Klimpel et al. (2018) e Li et al. (2018) obtiveram resultados semelhantes ao analisar a ausência de permeabilização de membranas em bactérias patogênicas, porém com ativa ação antimicrobiana, apoiando a hipótese da existência de outros alvos intracelulares para ação peptídica. Embora não muito bem elucidados os mecanismos de ação dos AMPs, há evidências que após a interação com a membrana, os AMPs podem desencadear a indução de ROS (MOORE et al. 2019); a inibição da síntese de proteínas (ZAHN et al. 2013; MARDIROSSIAN et al. 2018); a inibição da atividade mitocondrial (VIEIRA et al. 2015; ZENG et al. 2018) e também podem disparar cascatas de sinalização que conduzem à apoptose (HIGUCHI et al. 2016). Esses eventos podem levar à morte celular de forma independente ou complementares.

Addabbo et al. (2009) afirmaram que a permeabilização de membranas pode resultar no colapso do potencial de membrana. Entretanto, as células dependem desse potencial de membrana para cumprir as suas funções fisiológicas vitais e sua

restauração é obrigatória exigindo uma maior demanda de energia celular. Segundo Silva (2016) uma possível consequência deste processo é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) por mitocôndrias ativadas. Portanto, foi analisado a capacidade da fração HI9 induzir o aumento na produção endógena de ROS nas células de *C. albicans* e *C. tropicalis* na presença de 25 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e avaliamos também nestas mesmas concentrações, a indução de ROS pelas frações HM6 e HM7 em *C. albicans*, a qual se mostrou mais sensível a essas frações. Nas condições avaliadas, não foi possível observar o aumento de ROS nas células fúngicas de nenhuma levedura testada.

Mediante aos resultados expostos dos frutos imaturos e maduros, é possível notar como o fenômeno de maturação influencia nos metabólitos produzidos pelas plantas no decorrer de seu desenvolvimento, afim de proteger a semente (órgão responsável pela perpetuação). Segundo Topuz e Ozdemir (2007) a concentração de metabólitos encontrados em espécies de *Capsicum* sofrem influência do genótipo e do grau de maturação dos frutos. Com isso, a planta produz proteínas bioativas para o controle de ataques, no sentido de proteger o fruto durante o amadurecimento. Outros autores reforçam que a idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também nas proporções relativas dos componentes (JENKS et al. 1996; HENDRIKS e ANDERSON-WILDEBOER, 1997; WILKINSON e KASPERBAUER, 1972). Hartmann (1996) ainda ressalta que os tecidos mais novos geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos secundários, ou seja, frutos ainda imaturos, assim como outros órgãos ainda no período de desenvolvimento.

Das leveduras utilizadas neste trabalho, *C. albicans* é a espécie mais associada a diversos quadros patológicos relacionados a infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos. Esta espécie é naturalmente sensível a uma gama de antifúngicos, entretanto casos de resistência têm sido associados ao uso prolongado de azólicos. A cepa *C. tropicalis* constitui um agente oportunista em casos de neoplasias, sendo sua frequência maior em leucemias e menor em tumores sólidos. Em países da América Latina, principalmente no Brasil, esta

espécie é extremamente frequente (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003).

A distribuição das espécies de leveduras do gênero *Candida* é um desafio significativo e há uma considerável variabilidade geográfica na prevalência de espécies patogênicas. Cada espécie de *Candida* apresenta suas próprias características únicas com relação ao tropismo do tecido, propensão para causar virulência invasiva por doença e suscetibilidade antifúngica (Zhang et al. 2020). Isto se observa devido a cepa *C. tropicalis* se mostrar menos suscetível as frações isoladas dos frutos de *C. chinense* quando comparada com *C. albicans*, que conforme referências é a cepa mais resistente do gênero *Candida*, e apresentou-se mais sensível quando testadas com as frações obtidas no estudo.

Mediante ao apresentado, os AMPs oferecem muitas possibilidades interessantes na pesquisa farmacêutica para desenvolvimento de novos fármacos, além de contribuir para o setor agrícola e para o desenvolvimento de compostos de proteção de plantas (LAY e ANDERSON, 2005; MYGIND et al. 2005). Uma qualidade adicional promissora é que os AMPs aparentemente não induzem a resistência nos microrganismos expostos a eles (ZASLOFF, 2002), um efeito colateral comum entre agentes patogênicos após exposição frequente a fármacos convencionais.

Do estudo comparativo do perfil protéico e antimicrobiano de peptídeos dos frutos imaturos e maduros de *C. chinense* Jacq., as frações de frutos imaturos apresentaram atividade antimicrobiana mais ativa em frente as leveduras do que as frações isoladas obtidas da purificação da fração D2 de frutos maduros, isso quando observa-se que as frações isoladas de frutos maduros demonstraram atividade antimicrobiana somente quando testadas sobre células de *C. albicans*.

Diante dos resultados apresentados pelas frações HI9, HM6 e HM7 sobre as leveduras, as mesmas foram preparadas (conforme descrito no item **3.3.5**) e enviadas para identificarmos a família a qual pertence estes peptídeos, e para realizar a síntese química em estudos futuros. Mas, com a atual situação pandêmica decorrente ao vírus Covid-19, houve atraso na previsão da entrega dos resultados devido a pausa nas atividades dos laboratórios colaboradores das instituições de ensino.

6. CONCLUSÃO

- As frações D1 e D2 obtidas dos extratos dos frutos de *C. chinense* Jacq. (acesso UENF 1706), apresentaram atividades inibitórias significativas sobre as leveduras testadas, onde a D2 mostrou-se mais ativa contra *C. albicans* e *C. tropicalis*;
- Após cromatografia de fase reversa em HPLC, da fração D2 de frutos imaturos e maduros, foram obtidas 16 frações, respectivamente;
- As frações HI3, HI8, HI9 e HI14 (de frutos imaturos) foram capazes de inibir o crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*, enquanto as frações HM3, HM6, HM7 e HM13 (de frutos maduros) apresentaram potencial inibitório somente sobre *C. albicans*;
- As frações HI9, HM6 e HM7 apresentaram um perfil fungicida, HI9 para as duas leveduras e as subfrações HM6 e HM7 somente sobre as células de *C. albicans* enquanto que as frações HI3, HI8, HI14, HM3, HM13 demonstraram caráter fungistático sobre as leveduras;
- A fração HI9 induziu alterações morfológicas, mas não causou permeabilização de membrana e aumento de ROS das células de *C. albicans* e *C. tropicalis*;
- As frações HI9, HM6 e HM7 causaram alterações morfológicas nas células das leveduras testadas, mas não causou permeabilização de membrana e aumento de ROS nestas células.
- Mediante os dados apresentados do estudo comparativo do perfil protéico dos frutos de *C. chinense* Jacq., as frações e subfrações protéicas dos frutos imaturos demonstraram atividade antifúngica mais ativa sobre células de *C. albicans* e *C. tropicalis*, portando – se tóxica em frente ao desenvolvimento fúngico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI-SAID, D., et al. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 1122-1128, 1997.

ADDABBO, F., et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Hypertension**, v. 53, p. 885-892, 2009.

ALVAREZ-PARRILLA, E., et al. Antioxidant activity off reshand processed jalapeño and Serrano peppers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 59, p. 163-173, 2011.

ANNUNZIATO, G.; COSTANTINO, G. Antimicrobial peptides (AMPs): a patent review (2015-2020). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, n. 12, p. 931-947, Dec., 2020.

ASADI, M. A., et al. Epidemiologic study of onychomycosis and tinea pedis in Kashan, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 2, p. 61-64, 2009.

BARBOZA, G. E., et al. New Endemic Species of *Capsicum* (Solanaceae) from the Brazilian Caatinga: Comparison with the Re-circumscribed *C. parvifolium*. **Systematic Botany**, v. 36, n. 3, p. 768-781, 2011.

BENKO-ISEPPON, A.M., et al. Overview on plant antimicrobial peptides. **Curr Current Protein & Peptide Science**, v. 11, n. 3, p. 181-188, May. 2010.

BERROCAL-LOBO, M., et al. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. **Plant Physiology**, v. 128, n. 3, p. 951-961, Mar. 2002.

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

BROEKAERT, W. F., et al. Antimicrobial peptides from plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, n. 3, p. 297-323, 1997.

BONTEMPO, M. Pimenta: e seus benefícios à saúde. **São Paulo**: Alaúde, 2007.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. Peppers: vegetable and spice *Capsicums*. **Wallingford**: CABI Publishing, 2000. (Crops Production Science in Horticulture, 22). 224 p.

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 1, p. 24-30, 2006.

BROWNE, K. et al. A new era of antibiotics: the clinical potential of antimicrobial peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7047, Sep., 2020.

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

CAMPOS, M. L., et al. A structural perspective of plant antimicrobial peptides. **Biochemical Journal**, v. 475, p. 3359-3375, Nov. 2018.

CRAIK, D. J., et al. Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1327–1336, dez. 1999.

CRAIK, D. J. Discovery and applications of the plant cyclotides. **Toxicon**, v. 56, p. 1092-1102, 2010.

CASTIGLIONI, A. História da medicina. **São Paulo**: Nacional, 1947. 613 p.

CICHEWICZ, R. H.; THORPE, P. A. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 52, p. 61-70, 1996.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, Set./Out., 2003.

DEWITT, D.; BOSLAND, P. W. Peppers of the world: an identification guide. **Berkeley**: Ten Speed, 1996. 219 p.

DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S. Microbial drug Discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 05-16, 2009.

DESRIAC, F. et al. Alterins Produced by Ostra-Associated *Pseudoalteromonas* are antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. **Marine Drugs**, v. 18, n. 12, p. 630, Dec., 2020.

DIGNANI, M. C.; et al. *Candida*. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA (eds) *Medical Mycology*. 1ª Edição, **Churchill Livingstone**, Filadélfia, p. 195-239, 2003.

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

DIAS, G. B., et al. Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. seeds. **The Protein Journal**, v. 32, p. 15-26, 2013.

DORANTES, L., et al. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annuum* extracts. **International Journal of Food Microbiology**, n. 57, p. 125-128, 2000.

ESPECHE, J. C. et al. Unraveling the mechanism of action of the newly designed P1 peptide with model membranes and gram-positive and gram-negative bacteria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 693, p. 108549, Oct. 2020.

FRANCELINO, H. O. Peptídeos antimicrobianos de *Capsicum chinense*: Purificação, caracterização e atividade antifúngica. 2017. 59 f. Dissertação (Mestre em Biociências e Biotecnologia). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ. 2017.

GEBARA, R. S. et al. Identification and characterization of two defensins from *Capsicum annuum* fruits that exhibit antimicrobial activity. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 12, p. 1253-1265, March. 2020.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, p. 177-188, November, 1996.

HANCOCK, R. E. W.; LEHRER, E. R. I. Peptídeo catiônico: uma nova fonte de antibióticos. **Trends Biotechnology**, v. 16, p. 82-88, 1998.

HENRIQUES, L. N. F. Purificação parcial, caracterização eletroforética e atividade inibitória de peptídeos antimicrobianos de frutos de *Capsicum baccatum*. 2015. 54 f. Monografia (Biologia Celular) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 2015.

HENDRIKS, H., et al. Parthenolide content and yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. **Planta Medica**, v. 63, n. 4, p. 356-359, August, 1997.

HIGUCHI, N., et al. NP24 induces apoptosis dependent on caspase-like activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, p. 619-624, 2016.

JENKS, M. A., et al. Changes in epicuticular waxes in wild and eceriferous mutants in *Arabidopsis* during development. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 29-34, May. 1996.

HALLOCK, Y. F., et al. Cycloviolins AD, Anti-HIV Macrocyclic Peptides from *Leonia cymosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 124-128, 2000.

JAMAL, F., et al. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. **Phytochemical Review**, v. 12, p. 01-34, 2013.

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

JAEYONG, C., et al. The novel biological action of antimicrobial peptides via apoptosis induction. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 22, p. 1457-1466, 2012.

KANTARCIOGLU, A. S.; YUGEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. **Mycoses.**, v. 45, p. 160-165, 2002.

KLIMPEL, A.; NEUNDORF, I. Bifunctional peptide hybrids targeting the matrix of mitochondria. **Journal of Controlled Release**, v. 291, p. 147-156, 2018.

KUMAR, P., et al. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, p.1-24, jan. 2018.

KOSHLUKOVA, S. E., et al. Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 18872-18879, 1999.

LAY, F. T.; ANDERSON, E. M. A. Componentes de defesa do sistema imunológico inato em plantas. **Curr. Current Protein & Peptide Science**, v. 6, p. 85-101, 2005.

LÉON, I.R.; et al. Improved protein identification efficiency by mass spectrometry using N-terminal chemical derivatization of peptides from *Angiostrongylus costaricensis*, a nematode with unknown genome. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 781–792, 2007.

LIU, K., et al. Isolation and characterization of a lipid transfer protein expressed in ripening fruit of *Capsicum chinense*. **Planta**, v. 223, p. 672-683, 2006.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001.

LI, Z., et al. Improved antibacterial activity of a marine peptide-N2 against intracellular *Salmonella Typhimurium* by conjugating with cell-penetrating peptides-bl.Fcin 6/Tat 11. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 263-272, 2018.

LIMA, S. C. B. S. Isolamento e caracterização in silico de ciclótídeos em milho (*Zea mays*) e centeio (*Secale cereale*). 2015. 115 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco - Recife - PE, fev. 2015.

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. **Critical Reviews in biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 978-992, August, 2020.

MARDIROSSIAN, M., et al. The dolphin proline-rich antimicrobial peptide tur1a inhibits protein synthesis by targeting the bacterial ribosome. **Cell Chemical Biology**, v. 25, p. 530-539, 2018.

MOORE, J., et al. Mode of action of the antimicrobial peptide D4E1 on *Aspergillus flavus*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 25, p.1135- 1145, 2019.

MARTINS, K. C., et al. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, 2010.

MELVIN, J. A., et al. Clinical potential of engineered cationic antimicrobial peptides against drug resistant biofilms. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, Sep 14, 2016.

MARACAHIPES, A. C., et al. Biochemical analysis of antimicrobial peptides in two different *Capsicum* genotypes after fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Bioscience Reportes**, v. 39, p. 01-14, April, 2019.

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

MORAES, L. U. Identificação e descrição morfoanatômica e farmacognóstica das folhas de *Solanum scuticum* M. Nee e bioatividade de extrato bruto em microorganismos e da fração alcaloídica em células cultivadas da linhagem Vero. 2008. 98 f. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal de Goiás - GO, 2008.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 431-450, Feb. 2012.

MOLINA, A., et al. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. **FEBS Letters**, v. 316, p. 119-122, 1993.

MYGIND, P. H., et al. A plectasina é um antibiótico peptídico com potencial terapêutico de um fungo saprofítico. **Nature**, v. 473, p. 975-980, 2005.

NGUYEN, L. T., et al. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464-72, 2011.

OTHMAN, Z. A. A., et al. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in Capsicum fruit samples using high performance liquid chromatography. **Molecules**, n. 16, p. 8919-8929, 2011.

ODINTSOVA, T.; EGOROV, T.A. Plant antimicrobial peptides. **Plant Signaling Peptides**: Springer, v. 16, p. 107-133, 2012.

ODINTSOVA, T. I., et al. Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. **Biochimie.**, v. 90, p. 1667-1673, 2008.

OGUIS, G. K. et al. Butterfly pea (*Clitoria ternatea*), a plant that contains cyclotides with applications in agriculture and medicine. **Frontier in Plant Science**, v. 10, p. 645, May, 2019.

OLIVEIRA, C. F. R.; MACEDO, M. L. R. Emprego de inibidores de protease vegetais como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. **Ciências biológicas da saúde**, v. 1, n. 1, p. 01-11, 2011.

ODDS, F. C., et al. Candida concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 26, p. 277-283, 1988.

OTERO, R., et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the hemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 73, p. 233-241, 2000.

POZZOBON, M. T., et al. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Horticultura Brasileira**. v. 29, n. 2, 2011.

PEREIRA, L. S. Peptídeos de folhas de *Capsicum baccatum* com atividade inibitória contra *Leishmania amazonensis*. 2013. 67 f. Monografia (Biologia Celular). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes – RJ, 2013.

PEREIRA, L. S. Peptídeos antimicrobianos de folhas e raízes de *Capsicum annum* L.: Caracterização e atividade inibitória sobre microrganismos fitopatogênicos. 2015. 96 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes – RJ, 2015.

PADOVAN, L., et al. Structural aspects of plant antimicrobial peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 11, n. 3, p. 210-219, May. 2010.

PARK, S. C., et al. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 5971-92, 2011.

RIAHIFARD, N. et al. Design, synthesis and evaluation of cyclic and linear amphiphilic peptides composed of hydrophobic and positively charged amino acids as antibacterial agents. **Molecules**, v.23, n.10, p. 2722, Oct., 2018.

RÊGO, E. R., et al. **Produção, genética e melhoramento de pimentas (*Capsicum spp.*)** Recife: Imprima, 2011. 223p.

RESENDE, L. M. Purificação, caracterização parcial e atividade antifúngica de peptídeos antimicrobianos de *Capsicum chinense* Jacq. 2018. 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ, 2018 .

RESENDE, L. M. Caracterização bioquímica e atividade antimicrobiana de peptídeos de frutos de *Capsicum chinense* Jacq. sobre fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*. 2020. 63 f. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ, 2020.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. ***Capsicum: Pimentas e Pimentões no Brasil***. Brasília, D.F.: Embrapa. 2000; 113p.

RIBEIRO, S. F. F., et al. New small proteinase inhibitors from *Capsicum annuum* seeds: characterization, stability, spectroscopic analysis and a cDNA cloning. **Peptide Science**, v. 100, p. 132-140, 2013.

SAVINI, F. et al. Binding of an antimicrobial peptide to bacterial cells: interaction with different species, strains and cellular components. **BBA – Biomembranes**, v. 1862, n. 8, p. 183291, August, 2020.

SANTOS, L. A. et al. Purification and characterization of peptides from *Capsicum annuum* fruits which are α -amylase inhibitors and exhibit high antimicrobial activity against fungi of agronomic importance. **Protein Expression and Purification**, v. 132, p. 097-107, Feb. 2017.

SANTOS, L. A. et al. Antimicrobial peptides from *Capsicum chinense* fruits: agronomic alternatives against phytopathogenic fungi. **Bioscience Reports**, doi: 10.1042 / BSR20200950, v. 40, n. 8, 2020.

SEO, M. D., et al. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. **Molecules**, n. 17, p. 12276-12286, 2012.

SILVA, M. S., et al. Bifunctional Inhibitors from *Capsicum chinense* Seeds with Antimicrobial Activity and Specific Mechanism of Action against Phytopathogenic Fungi. **Protein & Peptide Letters**., doi: 10.2174 / 0929866527666200617124221, 2020.

SILVA, M. S. Atividade antifúngica de Cati, um inibidor de proteinase serínica de *Capsicum annuum*, e presença de inibidores similares em outras espécies do gênero *Capsicum*. 2016. 86 f. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas). UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - RJ, 2016.

SILVA, F. P.; MACHADO, M. C. C. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. **Peptides**, n. 36, p. 308-314, 2012.

SILVA, J. A. M.; DIAMOND, G. Antimicrobial Peptides from Fish. **Pharmaceuticals**, n. 7, p. 265-310, 2014.

STEFFEN, H., et al. Naturally processed dermicidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. **Antimicrobial agents chemotherapy**, v. 50, p. 2608-2620, 2006.

SHIN, J.H. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1244-1256, 2002.

SUDRÉ, C. P., et al. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. **Genetics and Molecular Research**, n. 9, p. 283-294, 2010.

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

SOUZA, V. S. F. S. Caracterização morfológica e determinação da pungência em pimentas picantes. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônoma - Produção Agrícola Tropical). Lisboa. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. 2009. 114p.

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

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

TAVEIRA, G. B., et al. Programmed cell death in yeast by thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits involving activation of caspases and extracellular H⁺ flux. **Bioscience Reports**, v. 38, p. 01-12, April, 2018.

TEXEIRA, F. R., et al. Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. **J. Phytopathol.**, v. 154, p. 418- 421, 2006.

TOPUZ, A.; OZDEMIR, F. Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 596-602, 2007.

THEVISSSEN, K., et al. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5451-5458, Dec. 1999.

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

UPTON, M., et al. Antimicrobial peptides as therapeutic agents. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 2012, p. 326503, 2012.

VIEIRA, M. E. B., et al. Isolation, characterization and mechanism of action of an antimicrobial peptide from *Lecythis pisonis* seeds with inhibitory activity against *Candida albicans*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 47, p. 716-29, 2015.

VIEIRA-BARD, G. C., et al. Characterization of peptides from *Capsicum annum* hybrid seeds with inhibitory activity against α -amylase, serine proteinase and fungi. **The Protein Journal**, v. 34, p. 122-129, 2015.

VYLKOVA, S., et al. Human β -defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. **Antimicrobial agents chemotherapy**, v. 51, p. 154-161, 2007.

VERMELHO, A. B., et al. (2006). **Práticas de Microbiologia**, Editora Guarabara Koogan – 1ª edição - Rio de Janeiro.

WILKINSON, R. E.; KASPERBAUER, M. J. Tobacco epicuticular alkane content influenced by photoperiod, temperature and leaf age. **Phytochemistry**, v. 11, n. 8, p. 2439-2442, August, 1972.

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

YAMAMOTO, A. C. A.; TEIXEIRA, A. F. R. Leveduras do gênero *Candida* isoladas de sítios anatomicamente distintos de profissionais militares em Cuiabá (MT), Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 675-680, 2011.

YANG, M. et al. Beta-defensin-derived cationic antimicrobial peptides with potent killing activity against gram negative and gram positive bacteria. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 54, June, 2018.

ZASLOFF, M. Peptídeos antimicrobianos de organismos multicelulares. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

ZHANG, W., et al. Epidemiology, species distribution, and predictive factors for mortality of candidemia in adult surgical patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, 2020.

ZAHN, M., et al. Structural studies on the forward and reverse binding modes of peptides to the chaperone DnaK. **Journal of Molecular Biology.**, v. 24, p. 2463-2479, 2013.

ZENG, H., et al. TUBP1 protein lead to mitochondriamediated apoptotic cell death in *Verticillium dahliae*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.**, v. 103, p.35-44, 2018.

ZHARKOVA, M. S. et al. Application of antimicrobial peptides from the innate immune system in combination with conventional antibiotics - a new way to combat antibiotic resistance?. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 128, p. 1673-1719.