

**Purificação, caracterização e atividade antifúngica
de proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) de sementes
de *Capsicum chinense* Jacq**

Arielle Pinheiro Bessiatti Fava Oliveira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO -2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

O48

Oliveira, Arielle Pinheiro Bessiatti Fava.

Purificação, caracterização e atividade antifúngica de proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) de sementes de *Capsicum chinense* Jacq / Arielle Pinheiro Bessiatti Fava Oliveira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

64 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2023.

Orientadora: Valdirene Moreira Gomes.

1. Peptídeos antimicrobianos . 2. *Capsicum* . 3. Proteínas transferidoras de lipídeos. 4. *Candida*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

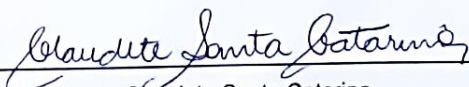
ARIELLE PINHEIRO BESSIATTI FAVA OLIVEIRA

**Purificação, caracterização e atividade antifúngica de proteínas
transferidoras de lipídeos (LTPs) de sementes de *Capsicum chinense***
Jacq

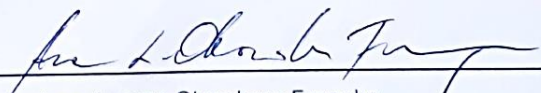
Dissertação apresentada ao Centro
de Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia
Vegetal.

Aprovada em 16 de fevereiro de 2023

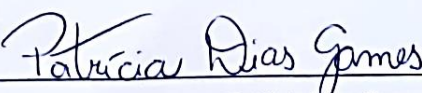
Banca Avaliadora



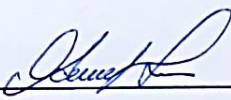
Claudete Santa Catarina



Anna Lvovna Okorokova Façanha



Patrícia Dias Gomes



Valdirene Moreira Gomes

Purificação, caracterização e atividade antifúngica de proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) de sementes de *Capsicum chinense* Jacq

Arielle Pinheiro Bessiatti Fava Oliveira

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valdirene Moreira Gomes

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO - 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, por me proporcionar força e sabedoria para concluir mais uma etapa importante em minha jornada. Aos meus pais Anderson e Ledeni, minha irmã Ariadne por todo apoio, dedicação e amor. Aos meus avós Antônio, Neide e Terezinha por todo ensinamento, carinho e amor incondicional. Ao Saulo por todo apoio e companheirismo durante o período de pós-graduação.

Agradeço a minha orientadora Valdirene Moreira Gomes, por todo ensino, pelo carinho e por acreditar em mim durante esse tempo vinculada em seu grupo de pesquisa. Aos meus amigos, professores e técnicos do Laboratório LFBM que mostraram prontidão em momentos colaborativos, em especial minha amiga Larissa que desde o primeiro momento de pesquisa foi quem me proporcionou aprendizagem na bancada para que este trabalho fosse realizado. Ao professor Jorge pela companhia nos finais e durante a semana no laboratório, pelas palavras trocadas, e por contribuir com minha glicose e meu sono após o almoço.

Agradeço todas minhas amigas fruto da pós-graduação, em especial a Barbara pela amizade gerada desde o CEDERJ, e juntas.

Gostaria de agradecer a toda equipe e colegas do programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), por me proporcionar a oportunidade de realizar o Mestrado, fornecendo todo o suporte necessário.

Por fim agradeço a FAPERJ pela concessão da bolsa e aos demais órgãos de fomento Capes e CNPq pelo financiamento de projetos de pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ESQUEMAS.....	9
LISTA DE TABELAS	9
ABREVIATURAS	10
1.INTRODUÇÃO	11
1.1 Peptídeos Antimicrobianos de Plantas	11
1.2 Proteínas Transferidoras de Lipídeos	12
1.3 Principais LTPs caracterizadas na literatura	14
1.4 Gênero <i>Capsicum</i>	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODO	24
3.1 Cultivo e obtenção de sementes de <i>Capsicum chinense</i>	24
3.2 Preparação dos extratos de sementes ricos em peptídeos	25
3.3 Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose	26
3.4 Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC	27
3.5 Recromatografia de fase reversa em sistema HPLC	27
3.6 Quantificação de Proteínas	27
3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo tricina.....	28
3.8 <i>Western blotting</i>	28
3.9 Espectometria de massas	29
3.10 Ensaio de inibição da atividade de α -amilase	29
3.11 Ensaio de inibição do crescimento de leveduras	30
3.12 Efeito sobre a permeabilização de membranas dos microrganismos	30
3.13 Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio intracelular	31
3.14 Análise da viabilidade celular após incubação com peptídeos	31
3.15 Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Perfil eletroforético e <i>western blotting</i> do extrato proteico de sementes de <i>Capsicum chinense</i> (acesso UENF 1751)	32

4.2 Fracionamento do extrato proteico de sementes por cromatografia de troca iônica	33
4.3 Efeitos das frações peptídicas C1 e C2 sobre o crescimento de leveduras do gênero <i>Cândida</i>	34
4.4 Fracionamento da fração não retida (C1) por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.....	34
4.5 <i>Western blotting</i> das frações dos picos obtidos em fase reversa	35
4.6 Análise da sequência de aminoácidos da fração P10	36
4.7 Efeitos das frações peptídicas dos picos obtidos em fase reversa sobre atividade de α -amilase.....	38
4.8 Efeitos das frações peptídicas dos picos obtidos em fase reversa sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i>	38
4.9 Efeitos das frações peptídicas dos picos obtidos em fase reversa na análise de viabilidade celular.....	39
4.10 Efeito da fração P10 sobre a permeabilização de membranas em <i>Candida albicans</i>	40
4.11 Efeito da fração P10 sobre o aumento endógeno de ROS em <i>Candida albicans</i>	42
4.12 Fracionamento da fração do pico 10 por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.....	43
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS.....	52

RESUMO

No gênero *Capsicum* já foram isolados peptídeos com atividade antimicrobiana e de inibição da atividade de enzimas proteolíticas e glicosídicas. Entre eles podemos citar as defensinas, os inibidores de proteases, as tioninas, as vicilinas-like, as proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) e outras. O objetivo desse trabalho foi identificar, purificar e caracterizar peptídeos antimicrobianos da família das LTPs em sementes de *Capsicum chinense* Jacq. e avaliar o potencial de inibição das frações ricas em LTPs sobre o crescimento de leveduras e de atividade enzimática. Os peptídeos foram extraídos utilizando metodologia baseada na precipitação de proteínas com sulfato de amônio e aquecimento e purificados através da cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sepharose e cromatografia líquida de fase reversa em sistema HPLC. A cromatografia de troca iônica resultou em duas frações denominadas de C1 (fração não retida) e C2 (fração retida). A fração C1 foi submetida à purificação em HPLC devido a imunodeteção de uma LTP obtida por técnica de *western blotting* utilizando um anticorpo anti-LTP de *C. annuum*. A partir da fração C1 foram obtidas dez frações após cromatografia em HPLC. Essas frações foram denominadas de picos P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10 e, com exceção do P4 e P9, todos apresentaram valores inibitórios significativos no crescimento de *Candida albicans*. A análise de viabilidade dessas frações, na concentração de 100 µg/mL, sobre *C. albicans* não apresentou atividade fungicida, e sim fungistática. As frações P3, P4, P7 e P10 também mostraram inibição da atividade de α -amilase do intestino de larvas de *Tenebrio molitor* respectivamente à 78,7%, 85,8%, 77% e 99,3%. Em seguida o trabalho de purificação com a fração do P10, a qual apresentou em seu perfil eletroforético três bandas proteicas. Uma dessas bandas apresentou massa molecular entre 6,5 kDa e 14,2 kDa e reagiu positivamente ao anticorpo produzindo contra uma proteína da família das LTPs. Esta banda proteica foi também caracterizada por espectrometria de massas. Resultados da análise de resíduos de aminoácidos apresentaram similaridade com LTPs do tipo I e LTPs do tipo II. Para continuação da purificação dos peptídeos da fração P10, esta foi submetida a uma recromatografia em sistema de HPLC. Após a recromatografia obteve-se três novas frações, denominadas de R1, R2 e R3, as quais reagiram positivamente ao anticorpo anti-LTP. Ensaio de crescimento destas três frações sobre *C. albicans* não mostrou inibição significativa, mas atividade inibitória sobre a enzima α -amilase do intestino do inseto *T. molitor* foi visualizada, com 55% de inibição para R1, 72% para R2 e 93% para R3.

ABSTRACT

In the genus *Capsicum*, peptides with antimicrobial activity and inhibition of the activity of proteolytic and glycosidic enzymes have already been isolated. Among them we can mention defensins, protease inhibitors, thionins, vicilins-like, lipid transfer proteins (LTPs) and others. The objective of this work was to identify, purify and characterize antimicrobial peptides of the LTP family in *Capsicum chinense* Jacq seeds. and to evaluate the inhibition potential of LTPs-rich fractions on yeast growth and enzymatic activity. The peptides were extracted using methodology based on precipitation of proteins with ammonium sulfate and heating and purified through ion exchange chromatography on DEAE-Sepharose resin and reverse phase liquid chromatography on HPLC system. Ion exchange chromatography resulted in two fractions called C1 (unretained fraction) and C2 (retained fraction). Fraction C1 was subjected to HPLC purification due to immunodetection of an LTP obtained by western blotting using an anti-LTP antibody from *C. annuum*. From the C1 fraction, ten fractions were obtained after HPLC chromatography. These fractions were called peaks P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 and P10 and, with the exception of P4 and P9, all showed significant inhibitory values on the growth of *Candida albicans*. The viability analysis of these fractions, at a concentration of 100 µg/mL, on *C. albicans* did not show fungicide activity, but fungistatic activity. Fractions P3, P4, P7 and P10 also showed inhibition of α -amylase activity in the intestine of *Tenebrio molitor* larvae at 78.7%, 85.8%, 77% and 99.3% respectively. Then, the purification work with the P10 fraction, which presented three protein bands in its electrophoretic profile. One of these bands had a molecular mass between 6.5 kDa and 14.2 kDa and reacted positively to the antibody producing against a protein of the LTPs family. This protein band was also characterized by mass spectrometry. Results of analysis of amino acid residues showed similarity with type I LTPs and type II LTPs. To continue the purification of the peptides from the P10 fraction, this was subjected to rechromatography in an HPLC system. After rechromatography, three new fractions were obtained, called R1, R2 and R3, which reacted positively to the anti-LTP antibody. Growth assay of these three fractions on *C. albicans* did not show significant inhibition, but inhibitory activity on the α -amylase enzyme from the intestine of the *T.molitor* insect was visualized, with 55% inhibition for R1, 72% for R2 and 93% for R3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características comuns de AMP de plantas	11
Figura 2: Estruturas das subclasses de LTP	144
Figura 3: (A)- Visualização eletroforética do extrato em gel de poliacrilamida contendo tricina; (B)- Detecção por <i>western blotting</i> do extrato proteico de sementes de <i>C. chinense</i> acesso UENF 1751.....	32
Figura 4: Cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sepharose da extração proteica de sementes de <i>C. chinense</i> (acesso UENF 1751). (A)- Cromatograma obtido após a cromatografia de troca iônica em resina DAE- Sepharose; (B)- Visualização eletroforética do gel de poliacrilamida contendo tricina com as frações obtidas na cromatografia; (C)- <i>Western blotting</i> das frações obtidas na cromatografia de troca iônica.	333
Figura 5: Efeitos das frações obtidas em cromatografia de troca iônica sobre inibição do crescimento de <i>C. albicans</i> (A) e <i>C. tropicalis</i> (B) , após 24 h de incubação com 100 µg/mL; (%) - Porcentagem de inibição causada pelas frações; (*) - Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle pelo teste de Dunnett.	34
Figura 6: (A)- Cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC (coluna µRP C18), a partir da fração não retida (C1) da cromatografia de troca iônica do extrato de sementes de <i>C. chinense</i> (acesso UENF 1751). A coluna foi previamente equilibrada e a corrida realizada com TFA 0,1% (Solvente A). A amostra foi eluída usando-se um gradiente linear de propanol (Solvente B). O fluxo foi de 0, 5 mL/min. (B)- Visualização eletroforética do gel de poliacrilamida contendo tricina com as frações obtidas na cromatografia de fase reversa; M – Marcador de massa molecular em kDa; 1, 2, 3 e 4- Frações dos picos obtidos pelo cromatograma; LTP- Proteínas transferidoras de lipídeos. (C)- Visualização eletroforética do gel de poliacrilamida contendo tricina com as frações obtidas na cromatografia de fase reversa; M – Marcador de massa molecular em kDa; 5, 6, 7, 8, 9 e 10- Frações dos picos obtidos pelo cromatograma.	355
Figura 7: (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo tricina; M– Marcador de massa molecular em kDa; EPS- Extrato proteico de sementes; P10- Fração obtida do pico 10 no sistema em HPLC (B)- <i>Western blotting</i> detectado uma LTP na fração do P10 obtida em HPLC.....	36
Figura 8: Alinhamento dos resíduos de aminoácidos do peptídeo de sementes de <i>C. chinense</i> (acesso UENF 1751) da amostra P10. As sequências foram obtidas no BLAST e alinhadas pelo Clustal Omega	377

Figura 9: Efeito inibitório das frações P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10 obtidas por HPLC da fração C1 de sementes de <i>C. chinense</i> (acesso UENF 1751) sobre a atividade de α -amilases..	38
Figura 10: Efeitos das frações da cromatografia de fase reversa sobre inibição do crescimento da <i>C. albicans</i> após 24 horas de incubação com 100 μ g/mL.....	39
Figura 11: Efeito das frações obtidas em fase reversa (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10) na viabilidade de célula de levedura <i>C. albicans</i> (100 μ g/mL). Após 36 h a viabilidade celular foi medida por contagem direta de unidades de colônias formadoras (UFC).....	40
Figura 12: Microscopia de fluorescência do ensaio de detecção da permeabilização de membrana induzido pela fração P10 em células de leveduras <i>C. albicans</i> . As células foram visualizadas por microscopia óptica utilizando o DIC e por microscopia de fluorescência. Barra de 20 μ m.	41
Figura 13: Microscopia de fluorescência do ensaio de detecção do aumento endógeno de ROS induzido pela fração P10 em células de leveduras <i>C. albicans</i> com o corante H2DCFDA (2',7' diclorofluoresceína diacetato). As células foram visualizadas por microscopia óptica utilizando o DIC e por microscopia de fluorescência. Barra de 20 μ m.	42
Figura 14: (A) Recromatografia da fração P10 obtida em HPLC em coluna μ RP C18. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida foi realizada com TFA 0,1% (Solvente A) e a amostra foi eluída usando-se um gradiente linear de propanol (Solvente B). O fluxo foi de 0,5 mL/min. (B)- Visualização eletroforética do gel de poliacrilamida contendo tricina com as frações obtidas na recromatografia; M – Marcador de massa molecular em kDa; P10 - Fração obtida em HPLC a partir da fração C1 (utilizado como controle para o <i>western blotting</i>); R1, R2 e R3 - Frações da recromatografia; (C) - <i>Western blotting</i> das frações obtidas na recromatografia em sistema HPLC.....	433
Figura 15: Efeitos das frações obtidas na recromatografia por cromatografia de fase reversa sobre inibição do crescimento da <i>C. albicans</i> após 24 horas de incubação com 100 μ g/mL.....	444
Figura 16: Efeito inibitório das frações P10, R1, R2 e R3 obtidas por cromatografia de fase reversa sobre a atividade de α -amilase de <i>T.molitor</i>	455

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Diagrama da extração proteica de sementes (EPS) de <i>C. chinense</i> (acesso UENF 1751).....	26
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais LTPs caracterizadas na literatura com atividade antimicrobiana.....	18
---	----

Tabela 2: Meta análise de AMPs e Genes isolados no gênero <i>Capsicum</i>	23
--	----

Tabela 3: Porcentagem de células permeabilizadas quantificada pelo número de células em cinco campos aleatórios do DIC e visualizações de fluorescência da amostra.....	41
--	----

Tabela 4: Porcentagem de indução de ROS quantificada pelo número de células em cinco campos aleatórios do DIC e visualizações de fluorescência da amostra.....	42
---	----

ABREVIATURAS

AMPs- Peptídeos antimicrobianos

DAB- diaminobenzidina

DIC- Contraste de interferência diferencial

DP- Desvio padrão

EDTA- Ácido etilenodiamino tetracético

EPS- Extrato proteico de sementes

HCl- Ácido clorídrico

H₂DCFDA- 2',7' diclorofluoresceína diacetato

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

KCl- Cloreto de Potássio

KH₂PO₄- Fosfato de potássio

LTPs- Proteínas transferidoras de lipídeos

NaCl- Cloreto de sódio

Na₂HPO₄- Fosfato de sódio dibásico

NaH₂PO₄- Fosfato de sódio monobásico

PBS- Solução salina tamponada com fosfato

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SDS- Sulfato dodecil de sódio

TRIS- (Hidroximetil) aminometano

1.INTRODUÇÃO

1.1. Peptídeos Antimicrobianos de Plantas

As plantas desenvolveram moléculas específicas em seus tecidos, que expressam respostas após o contato com patógenos e pragas (Santos-silva et al., 2020; Li et al., 2021). Como mecanismo de defesa, as plantas permitem montar um sistema eficaz contra agentes nocivos, como, bactérias, fungos, nematoides, insetos e herbívoros (Campos et al., 2018). Dentre essas moléculas estão inclusos os peptídeos antimicrobianos, do inglês *Antimicrobial Peptides* (AMPs), que também se encontram presentes em todos os seres vivos como moléculas de defesa do sistema imunológico (Ageitos et al., 2017).

Essas moléculas apresentam algumas características comuns, como ilustrado na figura 1. Como por exemplo, seu tamanho pequeno, possui de 12 a 100 resíduos de aminoácidos, com massa molecular entre 3 e 10 kDa. A maioria possui carga líquida positiva, sendo anfipáticas com uma região hidrofílica e outra hidrofóbica permitindo a associação com cargas negativas na membrana microbiana. Sua estrutura pode ser linear ou cíclica (contém uma ou mais pontes dissulfetos), sendo ricos em resíduos de cisteína (Cys) que promove maior estabilidade devido a formação de pontes dissulfetos. Além dessas características, são resistentes a degradações decorrentes à alta temperatura, alteração de pH e ações proteolíticas (Ageitos et al., 2017; Divyashree et al., 2019; Santos-silva et al., 2020).

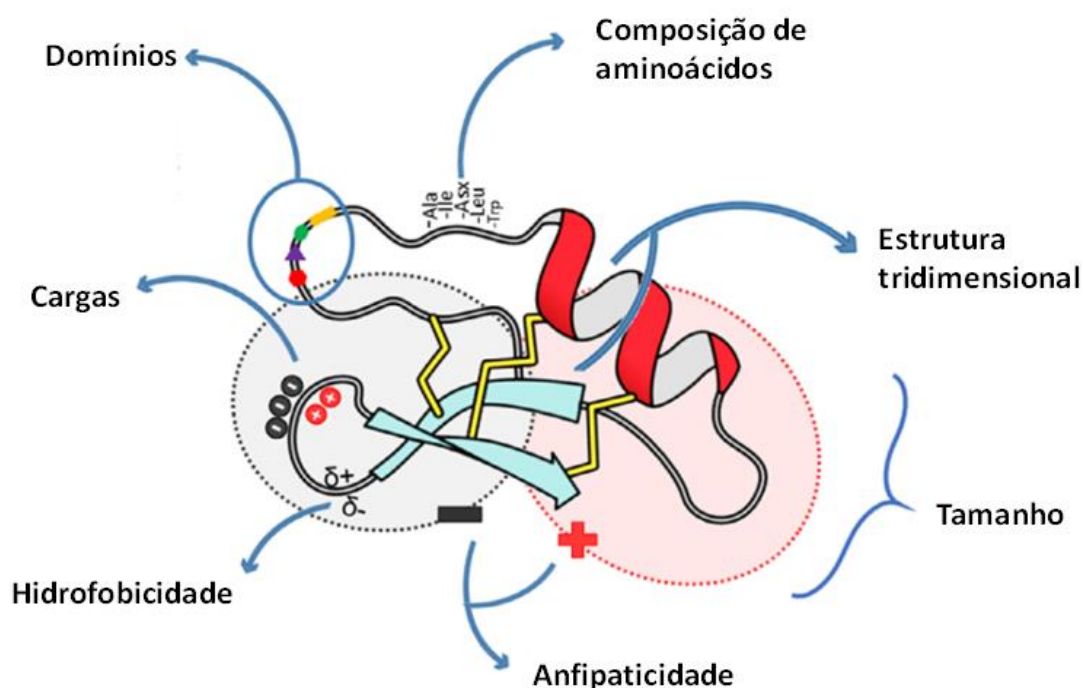


Figura 1: Características comuns de AMP de plantas (Corrêa et al., 2019).

Os AMPs apresentam potencial no controle de doenças e seu diversificado mecanismo de ação é uma das razões cruciais para controlar doenças causadas por microrganismos multirresistentes (Divyashree et al., 2019). A princípio, ocorre uma interação eletrostática do AMP com regiões carregadas dos fosfolipídios da membrana citoplasmática que se acumulam sob essa superfície. Na sequência, a característica hidrofóbica dos AMPs favorece a inserção destes pela membrana (Ahmed et al., 2018; Ageitos et al., 2017). Os peptídeos que interagem na membrana são catiônicos e causam rupturas na membrana celular. Já os não membranares são capazes de realizar translocação sem danificar a membrana citoplasmática, e dessa forma, eles atuam em alvos intracelulares inibindo a síntese de DNA e de proteínas. Existem diferentes formas de inserção desses peptídeos na membrana que ainda não foram completamente elucidados, sendo eles, relacionados à concentração e natureza do AMP (Boparai et al., 2020; Corrêa et al., 2019).

Os AMPs encontrados em plantas são classificados de acordo com seu mecanismo de ação e estruturas tridimensionais que apresentam. As famílias mais comuns são as tioninas, defensinas, heveínas, knotinas, peptídeos ricos em glicina, ciclotídeos, inibidores de proteinases, snakinas e as proteínas de transferências lipídicas (Parisi et al., 2019).

1.2. Proteínas Transferidoras de Lipídeos

As proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) foram assim denominadas devido a capacidade e facilidade de transferir lipídeos entre as membranas, incluindo substâncias gordurosas, fosfolipídios, acil-coenzima A. (Diz et al., 2011; Carvalho et al., 2007; Tam et al., 2015).

Devido algumas propriedades, como as citadas acima, o primeiro nome gerado aos peptídeos dessa família foi proteínas de troca de fosfolipídios, ao observar que a troca de fosfolipídios não funciona por proporção de doador e receptor. Mais tarde seu nome foi modificado para proteínas transferidoras de fosfolipídios. Porém, ao continuar os estudos desses peptídeos, notaram que eles também podem transportar moléculas relacionadas a diferentes lipídeos. Por isso, seu nome foi mais uma vez redefinido para proteínas transferidoras de lipídeos. Desde então, a busca com pesquisas sobre as LTPs em diferentes órgãos vegetais vem sendo realizada. Apesar de ainda não ter determinado completamente os papéis dessas proteínas, sabe-se que ela apresenta várias funções (Carvalho et al., 2007).

Essas proteínas (LTPs) possuem capacidade de ligação com vários lipídeos, como os esteróis, derivados de acil da coenzima A (CoA), ácidos graxos entre outros.

Dessa forma, elas atuam em funções fisiológicas como auxílio no transporte de lipídeos intracelular, na deposição de cera e cutina nas paredes celulares, resposta ao estresse abiótico e defesa contra estresses bióticos, podendo desta forma estar envolvidas na permeabilização de membranas de fitopatógenos (Odintsova et al., 2019).

A primeira LTP foi isolada em tubérculos de batata por Kader et al. (1975) e desde então foi identificada em diversas espécies de plantas (Santos-Silva et al., 2020). As LTPs estão presentes nas sementes e em todos os órgãos das plantas (Finkina et al., 2016). As funções apresentadas ainda permanecem com questões não bem elucidadas na literatura, existem evidências acumuladas que sugerem tais papéis, porém se faz necessário as crescentes pesquisas para a descoberta das variáveis funções dessas proteínas em plantas (Edqvist et al., 2018). As LTPs de plantas também estão relacionadas às reações alérgicas, frequentemente causadas em humanos. Clinicamente, também não está claro como ocorre a sensibilização a essa proteína (Asero et al., 2017). Esses peptídeos constituem uma das classes mais importantes de alérgenos vegetais (Finkina et al., 2016).

Em relação as suas características, são peptídeos catiônicos que apresentam de 70-100 resíduos de aminoácidos, com massas moleculares entre 7 a 10 kDa, alto pontos isoelétricos (pI), e presença de 8-10 resíduos de cisteínas com 4-5 pontes dissulfetos. As LTPs podem ser classificadas em duas subclasses em plantas de angiospermas (LTP1 e LTP2) de acordo com sua massa molecular (Diz et al., 2006; Odintsova et al., 2019).

As LTPs do tipo 1 (Fig. 2A) possuem massa molecular de 9-10 kDa, são básicas, com pI entre 9 e 10. Essas LTPs possuem de 90-95 resíduos de aminoácidos, apresentam 4 α -hélices paralelas. Suas estruturas formam um túnel com grandes e pequenas entradas (Fig. 2B). As LTPs tipo 2 possuem massa molecular aproximadamente de 7 kDa com alto pI. Entretanto, é composto em média por 70 aminoácidos, apresentam estruturas com 3 α -hélices (Fig. 2C) formando uma cavidade com estrutura triangular (Fig. 2D) (Carvalho et al., 2007).

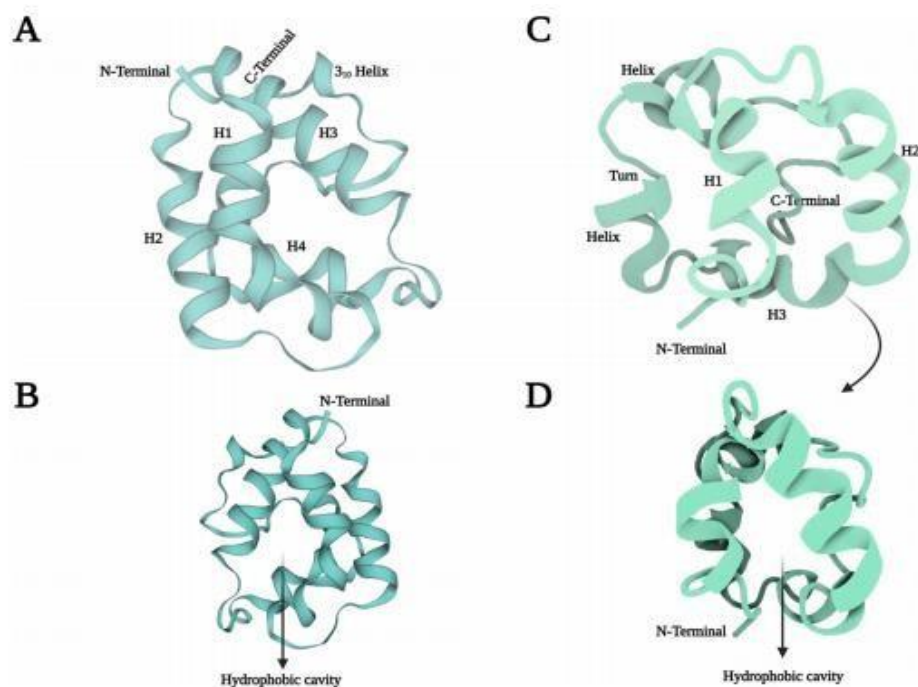


Figura 2: Estruturas das subclasses de LTP, **A** e **B** representam a subclasse LTP1; **C** e **D** representam a subclasse LTP2 (Maximiano et al., 2021).

Como descrito anteriormente, uma das funções mais relatadas para LTPs é a participação na defesa da planta contra patógenos. Esse mecanismo de defesa, envolve a secreção de LTPs no apoplasto, permitindo que essas proteínas se liguem a moléculas lipídicas. Após essa ligação, elas interagem com receptores que contêm um domínio extracelular de repetição rico em leucina. Com essa interação é ativado uma transdução de sinal mediada por um segundo mensageiro versátil gerando uma cascata de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Amador et al., 2021).

1.3. Principais LTPs caracterizadas na literatura

Aproximadamente a 46 anos atrás foi descoberta a primeira LTP em plantas, definida por suas propriedades facilitadoras de transferir fosfolipídios entre as membranas. Dessa forma, foi demonstrada a troca de fosfolipídios *in vitro* em tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*), onde explicaram que esse órgão vegetal contém uma fração de proteína ativa que estimula a troca de fosfolipídios entre mitocôndrias e frações microssomais (Kader et al., 1975). Posteriormente, Kader et al. (1984) analisaram em extrato de folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) contendo outra proteína de transferência de fosfolipídios e a purificou. Assim, concluiu que, essa proteína é capaz de transferir fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol e fosfatidiletanolamina de lipossomas para mitocôndrias.

A partir da década de 1990, após os trabalhos de Jean-Claude Kader, é apresentado vários relatos com o isolamento de LTPs em diferentes espécies essas LTPs atuam com especificidade em diferentes tecidos. Terras et al. (1992) e colaboradores, identificaram em sementes de rabanete (*Raphanus sativus*) um peptídeo com similaridade a LTPs que pertence a classe LTP2. Essa proteína foi denominada Radish ns-LTP, mostrando sua atividade de inibição contra os fungos *Alternaria brassicola*, *Ascochyta pisi*, *Botrytis cinera*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum fsp. Pisi*, *F. oxysporum fsp. Lycopersici*, *Nectria haematococca*, *Phoma betae*, *Pyricularia oryzae*, *Trichoderma hamatum* e *Verticillium dahliae*.

Molina et al. (1993) isolaram em folhas de cevada estioladas (*Hordeum vulgare*) quatro frações homogêneas (CW₁₈, CW₂₀, CW₂₁, CW₂₂), que apresentaram a inibição do crescimento do patógeno *Clavibacter michiganensis*. A sequência de aminoácidos de CW₁₈ e CW₂₁ foi determinadas e consideradas homólogas a LTPs de plantas. As proteínas também inibiram o crescimento do patógeno *Pseudomonas solanacearum* e *Fusarium solani*. Além disso, purificaram uma proteína (CW₄₁) homóloga a folha de milho (*Zea mays*) verificando propriedades inibitórias contra os mesmos patógenos.

Segura et al. (1993) obtiveram duas proteínas com sequências de aminoácidos N-terminais idênticas com LTPs, assim, foram denominadas de LTP-a1 e LTP-a2. De forma semelhante obtiveram na purificação de folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) duas proteínas denominadas como LTP-s1 e LTP-s2. Essas proteínas apresentaram inibição contra os patógenos *P. solanacearum* e *C. michiganensis*.

Depois, Cammue et al. (1995) isolaram em sementes de cebola (*Allium cepa* L.) uma proteína antimicrobiana chamada Ace-AMP1, sendo homóloga a LTPs de plantas, todos os patógenos testados nesse trabalho foram inibidos por essa proteína, entre eles as bactérias *Bacillus megaterium* e *Sarcina lutea* e os fungos *A. brassicola*, *Ascochyta pisi*, *B. cinera*, *C. lindemuthianum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum fsp. Pis*, *F. oxysporum fsp.*, *Lycopersici*, *N. haematococca*, *P. betae*, *Pyrenopkora tritici-repentis*, *P. oryzae* e *V. dahliae*.

A partir do fluido de lavagem intercelular de folhas de beterraba sacarina (*Beta vulgaris*) Kristensen et al. (2000), verificaram uma LTP caracterizada como IWF5, sendo a mesma idêntica a IWF1 (antifúngico isolado de folhas de beterraba). Essa proteína apresenta uma forte atividade antifúngica *in vitro* contra *Cercospora beticola* e inibe o crescimento fúngico em determinadas concentrações.

Uma das LTPs mais descrita entre as décadas de 90 e 2000 foi a HáAP10, uma proteína antifúngica de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) caracterizada por

Regente et al. (2000), que possui sua sequência de N-terminal homologa a algumas LTPs de plantas. Ao caracterizar essa proteína, os pesquisadores realizaram testes antifúngicos mostrando que exerce efeito fungistático, inibindo completamente a germinação de esporos do patógeno *F. solani* f. sp. *Eumartii*. No mesmo ano, Carvalho et al. (2001), purificaram e isolaram em sementes de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) dois peptídeos antimicrobianos. Entre os peptídeos havia uma LTP denominada Vu-LTP1 detectada em eixos embrionários, cotilédone, parede celular e nos compartimentos citosólicos. Os peptídeos mostraram impedir o desenvolvimento dos fungos *F. oxysporum* e *F. solani* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, Vu-LTP1 mostrou atividade de inibição da α -amilase.

Em sementes de feijão (*Phaseolus mungo*) Wang et al. (2004) isolaram um peptídeo de transferência de lipídeos (Mungbean-nsLTP). Esse peptídeo exerceu ação antifúngica contra *F. solani*, *F. oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* e *Sclerotium rolfsii* e ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.

Uma proteína designada LJ-AMP2, foi purificada por Yang et al. (2006), a partir de sementes de uma erva medicinal (*Leonurus japonicus* Houtt). Nesse trabalho foi realizado ensaios *in vitro*, mostrando que a proteína possui inibição para o crescimento de uma variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Entre os fungos inibidos são, *F. oxysporum*, *Penicillium digitatum* e *S. cerevisiae*.

O primeiro relato de uma LTP em sementes da espécie *Brassica campestris* (nabo), foi realizada por Lin et al. (2007), denominada de Bc - nsLTP. O peptídeo antifúngico inibiu o crescimento micelial em *F. oxysporum* e *Mycosphaella arachidicola*.

Em sementes de plantas aromáticas da espécie *Cuminum cyminum*, foi caracterizada uma LTP1 por Zaman et al. (2009) chamada de Cumin- nsLTP1.

Alguns peptídeos em sementes de capim- arroz (*Echinochloa crus-galis*) foram encontrados por Rogozhin et al. (2012) e colaboradores. Dentre os peptídeos estava presente uma LTP denominada EcLTP que possui atividade definida na inibição do desenvolvimento de *Phytophthora infestans*. Ao testar sua inibição contra bactérias (gram positivas e gram negativas), verificaram que ele é capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas como a *Pseudomonas syringae*.

Uma proteína com atividade inibitória contra α -amilase foi detectada e denominada de Cc-LTP1 em sementes de café (*Coffea canephora*) por Zottich et al. (2011). Entretanto, apresentou também, forte atividade antifúngica contra *Candida albicans* e promoveu modificações morfológicas em *Candida tropicalis*. Bard et al. (2015) identificaram e isolaram também em sementes de *C. canephora* uma nova LTP

denominada Cc-LTP2. Assim, relataram que possui atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos e bactéria, entre eles, fitopatogênicos *C. lindemuthianum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *F. solani*, *F. lateritium* e *Colletotrichum* sp e *Xanthomonas euvesicatoria*. Além disso, indicaram que essa proteína estava localizada nas paredes celulares, no parênquima paliádico e principalmente em vacúolos.

No ano de 2016, uma proteína foi purificada a partir de sementes de noni (*Morinda citrifolia* L.) denominada McLTP por Campos et al. (2016). Esta proteína provou resistência à digestão de pepsina, tripsina e quimiotripsina, além de, causar inibição da resposta de contorção induzida pelo ácido acético em camundongos.

Nawrot et al. (2017) isolaram e caracterizaram uma LTP no látex da raiz de quelidônia-maior (*Chelidonium majus* L.) sendo denominada de CmLTP 9.5. Testes de inibição foram realizados com a proteína, onde apresentou forte atividade antibacteriana contra *Campylobacter jejuni* (Gram-negativa), *Listeria greyi* (Gram-positiva) e *Clostridium perfringens*.

Além de folhas e sementes, em um estudo avaliativo do conteúdo proteico do néctar de nabo (*Brassica rapa*) realizado por Schmitt et al., 2018, revelou a presença de uma LTP conhecida como BrLTP2.1. Mediante a descoberta, os pesquisadores sugerem que a proteína pode prevenir o crescimento microbiano em néctares, ao verificarem que inibem uma extensa gama de fitopatógenos, particularmente eficaz contra fungos necrotróficos.

Nazeer et al. (2019) purificaram em sementes de ajwain (*Trachyspermum ammi*) a ajwain LTP1. Existem diversas proteínas LTPs já identificadas em diferentes espécies de vegetais, mas ainda se faz necessário pesquisas em busca do modo de ação desses peptídeos para possíveis futuras aplicações biotecnológicas. Vale ressaltar, que já foram isoladas e identificadas algumas LTPs no gênero *Capsicum* o que torna esse gênero promissor nas buscas por novos peptídeos para estudos. Em pimentas da espécie *Capsicum annuum*, foi caracterizado por Diz et al. (2006, 2011) a LTP Ca-LTP1, que estava localizada dentro de vesículas das sementes. Além disso, este apresentou atividade antifúngica contra *C. lindemuthianum* e *C. tropicalis* e foi capaz de inibir atividade da α -amilase de mamífero *in vitro*.

Tabela 1: Principais LTPs caracterizadas na literatura

Nome	Espécie	Órgão	Microrganismos alvo	Referência
LTP	<i>Solanum tuberosum</i>	Tubérculo	-	kader et al., 1975
LTP	<i>Spinacia oleracea</i>	Extrato de folhas	-	Kader et al., 1984
Radish ns-LTP	<i>Raphanus sativus</i>	Sementes	<i>Alternaria brassicola</i> , <i>Ascochyta pisi</i> , <i>Botrytis cinera</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium oxysporum fsp. Pisi</i> , <i>Fusarium oxysporum fsp. Lycopersici</i> , <i>Nectria haematococca</i> , <i>Phoma betae</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Trichoderma hamatum</i> e <i>Verticillium dahliae</i>	Terras et al.,1992
Cw ₁₈ e Cw ₂₁	<i>Hordeum vulgare</i>	Folhas	<i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Pseudomonas solanacearum</i> e <i>Fusarium solani</i> .	Molina et al., 1993
LTP-a1 e LTP-a2	<i>Spinacia oleracea</i>	Folhas	<i>Pseudomonas solanacearum</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i>	Segura et al., 1993
Ace-AMP1	<i>Allium cepa</i> L.	Sementes	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>Alternaria brassicola</i> , <i>Ascochyta pisi</i> , <i>Botrytis cinera</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium oxysporum fsp. Pis</i> , <i>Fusarium oxysporum fsp.</i> , <i>Lycopersici</i> , <i>Nectria haematococca</i> , <i>Phoma</i>	Cammue et al., 1995

			<i>betae, Pyrenopkora tritici-repentis, Pyricularia oryzae e Verticillium dahliae.</i>	
IWF5	<i>Beta vulgaris</i>	Folhas	<i>Cercospora beticola</i>	Kristensen et al., 2000
HáAP10	<i>Helianthus annuus</i>	Sementes	<i>Fusarium solani f. sp. Eumartii</i>	Regente et al., 2000
Vu-LTP1	<i>Vigna Unguiculata</i>	Sementes	<i>Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Saccharomyces cerevisiae</i>	Carvalho et al., 2001
Mungbean-nsLTP	<i>Phaseolus mungo</i>	Sementes	<i>Fusarium oxysporum, Penicillium digitatum e Saccharomyces cerevisiae</i>	Wang et al., 2004
LJ-AMP2	<i>Leonurus japonicus Houtt</i>	Sementes	<i>Fusarium oxysporum, Penicillium digitatum e Saccharomyces cerevisiae.</i>	Yang et al., 2006
Bc - nsLTP	<i>Brassica campestris</i>	Sementes	<i>Fusarium oxysporum e Mycospharella arachidicola</i>	Lin et al., 2007
Cumin- nsLTP1	<i>Cuminum cyminum</i>	Sementes	-	Zaman et al., 2009
EcLTP	<i>Echinochloa crus-pavonis</i>	Sementes	<i>Phytophthora infestans e Pseudomonas syringae</i>	Rogozhin et al., 2012

Cc-LTP1	<i>Coffea canefora</i>	Sementes	<i>Candida albicans</i> , modificações morfológicas em <i>Candida tropicalis</i>	Zottich et al., 2011
Cc-LTP2	<i>Coffea canefora</i>	Sementes	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>Colletotrichum</i> sp e <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	Bard et al., 2015
McLTP	<i>Morinda citrifolia</i> L.	Sementes	-	Campos et al., 2016
CmLTP 9.5	<i>Chelidonium majus</i> L.	Latéx da raiz	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Listeria greyi</i> e <i>Clostridium perfringens</i>	Nawrot et al., 2017
BrLTP2.1	<i>Brassica rapa</i>	Néctar	<i>Alternaria solani</i> , <i>Colletotrichum trifolii</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Bipolaris oryzae</i> e <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Shmitt et al., 2018
Ajwain LTP1	<i>Trachyspermum ammi</i>	Sementes	-	Nazeer et al., 2019
Ca-LTP1	<i>Capsicum annuum</i>	Sementes	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e <i>Candida tropicalis</i>	Diz et al., 2006, 2011

1.4. Gênero *Capsicum*

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae e possui grande importância social, econômica, agrônômica e culinária, sendo um grupo diversificado composto por pimentas e pimentões. (Dias et al., 2013). Desde os primórdios da civilização ocidental (aproximadamente 7500 a.c) as pimentas do gênero *Capsicum* são conhecidas e amplamente utilizadas (Smozinski et al., 2019). Devido à versatilidade para usos culinários, práticas médicas, produtos biotecnológicos as pimentas são uma das olerícolas mais importantes do mundo (Silvar et al., 2017). Além disso, elas são de importância econômica e social uma vez que grande parte da sua produção é realizada pela agricultura familiar e de integração do pequeno agricultor com a agroindústria (Smozinski et al., 2019).

Atualmente, esse gênero é composto por 38 espécies, sendo cinco domesticadas, são elas: *Capsicum chinense* Jacq. (exemplo: pimenta de cheiro ou pimenta biquinho), *C. annuum* L. (ex: pimentão), *C. frutescens* L. (ex: pimenta malagueta e pimenta tabasco), *C. pubescens* Ruiz & Pav. e *C. baccatum* L. (ex: pimenta dedo de moça). As demais trinta e três espécies são silvestres e semidomesticadas (Lima et al., 2017; Smozinski, 2019; Silvar et al., 2017). A pungência do fruto *Capsicum* é devido um grupo de compostos capsaicinóide presentes em diferentes quantidades nas variedades de pimentas (Abdullah et al., 2011).

As sementes e os frutos do gênero *Capsicum* são ricos em diversas moléculas relacionadas a proteção, por isso, são destinadas à defesa da planta como as ameaças de microrganismos. Dessa maneira estudos indicam que as pimentas representam uma grande fonte de AMPs (Dias et al., 2013). Assim, já foram encontradas vários AMPs em *Capsicum* (tabela 2) como: Tionina (Oh et al., 1999; Taveira et al., 2014; Taveira et al., 2016), Defensina (Anaya-López et al., 2006; Maracahipes et al., 2019; Gebara et al., 2020), Proteínas transferidoras de lipídeos (Jung et al., 2003; Liu et al., 2006; Diz et al., 2006; Diz et al., 2011; Cruz et al., 2010; Chen et al., 2011), Inibidores de proteinases (Antcheva et al., 1996; Tamhane et al., 2005; Silva et al., 2017; Moulin et al., 2014), Heveínas (Games et al., 2016) e Vicilinas (Bard et al., 2014).

Em relação a esse gênero, alguns AMPs já foram descritos na espécie de *C. chinense*, sendo relatados em sementes e frutos. Nas sementes já foi descrito uma fração peptídica parcialmente purificada por Brito-Argáez et al. (2009). Essa fração foi denominada de G10P1 e mostrou forte inibição no crescimento de patógenos humanos e de plantas como o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexnerii*, *P. syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium* sp., *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

No trabalho realizado por Dias et al. (2013) três frações ricas em peptídeos foram obtidas a partir de sementes de *C. chinense* (acesso UENF 1755) chamadas de PEF1, PEF2 e PEF3. Essas frações apresentaram efeitos antifúngicos contra diferentes leveduras, entre elas PEF2 apresentou alterações morfológicas, aglomeração celular e formação de pseudo-hifas em *C. tropicalis*. Além disso, a PEF2 e PEF3 provaram ser homólogos à inibidores de serina proteinase, apresentando alta atividade inibitória contra tripsina.

Como continuação desse trabalho Silva et al. (2020) mostraram que a fração PEF2 além de inibir a atividade da enzima tripsina inibe a atividade de α -amilase em larva de *Tenebrio molitor* e o crescimento de *Candida glabrata*, *Candida lindemuthianum* e *Fusarium oxysporum*. Essa fração permeabilizou membranas das células de *F. solani* e induziu ROS em *F. oxysporum* e *F. solani*. Logo PEF2 foi recromatografada obtendo duas frações a PEF2A e PEF2B que inibiram o crescimento de *C. lindemuthianum* e *F. solani*.

Em frutos de pimentas (acesso UENF 1751) foram obtidos frações com baixa massa molecular por Aguiar et al. (2021). Nesse estudo três frações denominadas F1, F2 e F3 apresentaram atividade antifúngica contra leveduras do gênero *Candida*, sendo que F1 inibiu o crescimento de *C. tropicalis* e F2 de *C. guilliermondii*. Essas duas frações promoveram a permeabilização da membrana aumentaram a indução endógena de espécies reativas de oxigênio das leveduras testadas. Na fração F3 foi visualizado duas bandas proteicas, sendo apresentada na de menor massa molecular similaridade com AMPs da família das defensinas, que foi nomeada CcDef3. Essa fração inibiu o crescimento de *C. albicans*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* e também teve inibição na atividade de de larvas de *T. molitor* e de α -amilase salivar humana.

Resende et al. (2021) relataram a obtenção de quatro frações peptídicas, denominadas G1, G2, G3 e G4 também em frutos de *C. chinense* (acesso UENF 1751). Na fração G2 foi apresentado uma banda com similaridade aos inibidores de proteases do tipo II que inibiu atividades de tripsina e α -amilase. Em G3 foi apresentado uma banda com similaridade aos inibidores de protease do gênero *Capsicum* e inibiu o crescimento dos fungos *C. lindemuthianum*, *Fusarium lateritium*, *F. solani* e *F. oxysporum*. Na fração denominada G4, bandas proteicas identificadas por espectrometria de massas mostraram similaridade com LTP do tipo I e com LTP tipo II, sendo esta fração também capaz de inibir atividades glicosídicas e do crescimento de *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum*.

Recentemente Ribeiro et al., 2022 relatou que em extrato de frutos imaturos e maduros de *C. chinense* (acesso UENF 1706) frações peptídicas capazes de inibir o

crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*. Destaca-se a fração denominada HI9 que apresentou uma banda proteica em torno de 6 kDa com similaridade à AMPs da família das defensinas e com propriedade de inibição em torno de 100% das células de *C. albicans* e *C. tropicalis* na concentração de 50 µg/mL.

As pimentas do gênero *Capsicum* aqui ressaltado a espécie de *C. chinense* apresentam grande potencial antimicrobiano como apontado por Oliveira et al. (2022). Porém foi observado que a diversidade de AMPs nessa espécie segue pouco explorada. Nesse contexto essa família de plantas é de extrema importância e interesse para propriedades medicinais e biotecnológicas.

Apesar de alguns desafios serem encontrados na aplicação biotecnológica de AMPs, como sua baixa biodisponibilidade na natureza. As intervenções biotecnológicas, permitem a criação de novos medicamentos para o combate a infecções bacterianas e fúngicas, doenças humanas como obesidade e diabetes tipo II, doenças virais, cancerígenas entre outros (Sinha et al., 2018; Maximiano et al., 2021).

Tabela 2: Meta análise de AMPs e Genes isolados no gênero *Capsicum* (Oliveira et al., 2022)

Família de AMPs e Genes em <i>Capsicum</i>	Número de AMPs e Genes	Referência
Tioninas	3	Oh et al., 1999; Lee et al. 2000, Taveira et al., 2014.
Defensinas	17	Oh et al., 1999, Meyer et al., 1996, Houlné et al., 1998; Do et al., 2004; Maarof et al., 2011; Maracahipes et al., 2019; Nikte et al., 2019; Gebara et al., 2020; Aguiéiras et al. 2021.
Proteínas transferidoras de lipídeos	9	Jung et al., 2003; Liu et al., 2006; Diz et al., 2006; Cruz et al., 2010; Diz et al., 2011; Chen et al., 2011.
Inibidores de Proteases	12	Antcheva et al., 1996; Moura et al., 2001; Antcheva et al., 2001; Tamhane et al., 2005; Mishra et al., 2013; Dias et al., 2013; Bard et al., 2015;

		Ribeiro et al., 2012; Silva et al., 2017.
Outras proteínas	3	Bard et al., 2014; Ribeiro et al., 2012; Games et al., 2016.
Total de AMPs e Genes	44	Oliveira et al., 2022

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Purificar e caracterizar algumas atividades biológicas de AMPs da família das proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) em sementes de *Capsicum chinense* Jaqc., acesso UENF 1751.

2.2. Objetivos Específicos

1. Purificar parcialmente frações ricas em LTPs de sementes de *C. chinense*
2. Identificar por imunodeteção peptídeos da família das LTPs
3. Avaliar o potencial de inibição de frações obtidas em etapas de purificação sobre o crescimento de leveduras do gênero *Candida*;
4. Examinar a viabilidade celular de leveduras tratadas com frações ricas em LTPs;
5. Verificar a permeabilização das membranas citoplasmáticas de leveduras tratadas com a fração rica em LTPs;
6. Avaliar o aumento endógeno de espécies reativas de oxigênio nas células fúngicas tratadas com a fração rica em LTPs;
7. Analisar a atividade de frações ricas em LTPs sobre inibição da atividade enzimática de α -amilases.

3. MATERIAL E MÉTODO

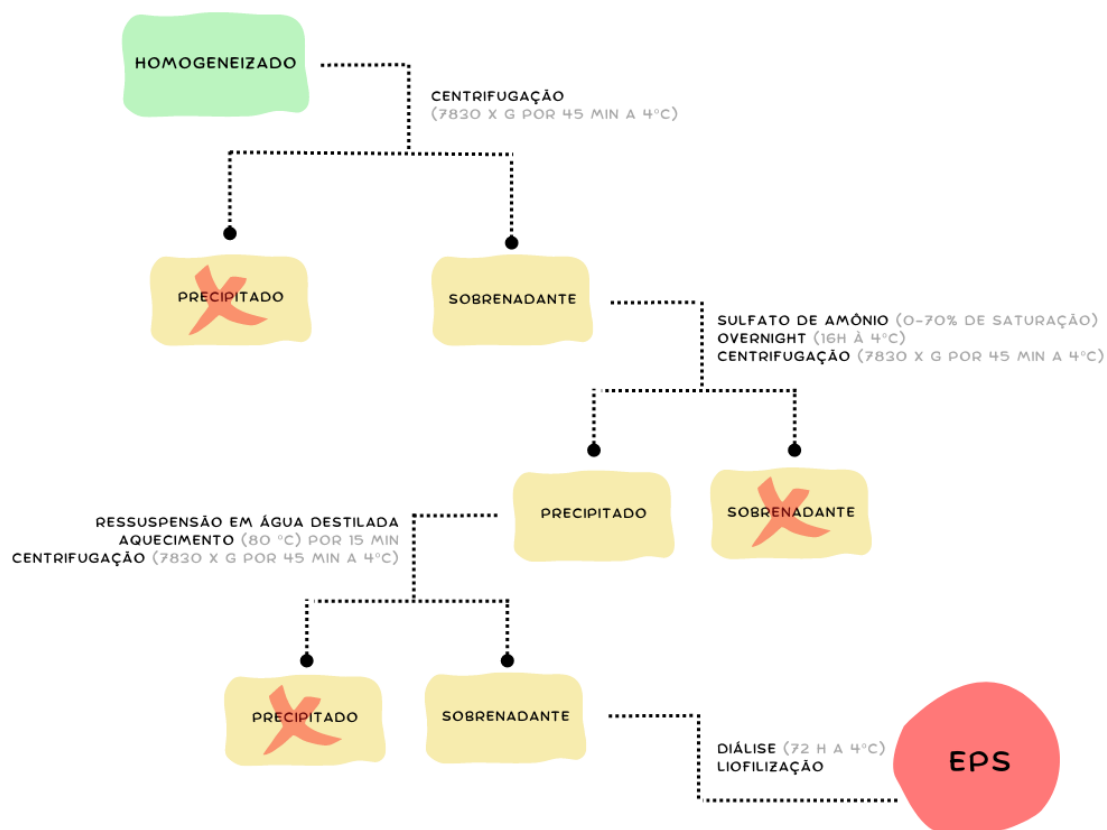
3.1. Cultivo e obtenção de sementes de *Capsicum chinense*

As sementes de *C. chinense* acesso UENF 1751 pertencentes ao banco de germoplasma da UENF foram cedidas pela professora Rosana Rodrigues do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF e foram semeadas em bandejas de isopor de 72 células em substrato comercial organovegetal Vivatto® e

mantidas em câmara de crescimento a 28°C. O transplântio para vasos de 5 litros de terra adubada em casa de vegetação foi realizado quando as mudas apresentaram dois pares de folhas definitivas. As plantas foram irrigadas uma vez ao dia e adubadas de acordo com as necessidades identificadas em avaliações periódicas. Aproximadamente 120 dias iniciou o aparecimento de frutos e o processo de maturação com aproximadamente 55-75 dias. Após a maturação os frutos foram destacados e cortados para a coleta das sementes, que foram expostas ao papel toalha para o processo de secagem.

3.2. Preparação dos extratos de sementes ricos em peptídeos

As sementes secas foram maceradas em nitrogênio líquido com ajuda de um almofariz e pistilo até a obtenção de uma farinha bem fina segundo metodologia descrita por Diz et al. (2006), com algumas modificações. Após pesar 5mg de farinha, ela foi adicionada em solução fosfato (Na_2HPO_4 0,01 M, NaH_2PO_4 0,015 M, KCl 0,1 M e EDTA 1,5%) pH 5,4 na proporção de 1:4 (farinha: solução fosfato) e agitado por 2 h a 4 °C. O homogeneizado foi submetido à centrifugação a 7830 x g por 45 min a 4 °C. Em seguida o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi filtrado com papel de filtro e adicionado gradativamente o sulfato de amônio a 0-70% de saturação. Após a adição do sulfato de amônio o extrato foi deixado *overnight* por 16h para o processo de precipitação. No outro dia o extrato foi submetido a centrifugação a 7830 x g por 45 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado permanecendo com o precipitado que foi ressuspendido em água destilada (20 mL). O precipitado foi aquecido em banho maria por 15 min a 80 °C e centrifugado a 7830 x g por 45 min a 4 °C. Posteriormente foi descartado o precipitado permanecendo com o sobrenadante. O extrato foi então dialisado durante 72 h em água destilada e em seguida concentrado por liofilização. O extrato obtido ao final do processo de extração foi chamado extrato proteico de sementes (EPS) representado no esquema 1.



Esquema 1: Diagrama da extração proteica de sementes (EPS) de *C. chinense* (acesso UENF 1751).

3.3. Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose

Uma coluna de vidro (3 cm x 7 cm) empacotada com 50 mL de resina DEAE-Sepharose (Sigma-Aldrich) montada e preparada de acordo com o fabricante, sob ação da gravidade foi lavada com 200 mL de água destilada, 150 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, novamente com 200 mL água destilada, 150 mL de ácido clorídrico 0,1 M e 200 mL de água destilada. Com a resina ativada, a coluna foi equilibrada com tampão Tris HCl 100 mM pH 8,0. Para a preparação da amostra foi pesado 50 mg do EPS e adicionado 10 mL do tampão Tris HCl 100 mM pH 8,0. O extrato proteico de sementes em pó foi solubilizado e centrifugado a 16.000 x g por 3 min à temperatura ambiente e o sobrenadante foi aplicado na coluna sobre a resina. Em uma estante com 70 tubos de ensaio de vidro foram coletados 3 mL em cada no fluxo de 60 mL/ h. Nos primeiros tubos as proteínas não retidas foram coletadas e a fração retida permaneceu na resina. Após a coleta da fração não retida e a partir do tubo 36 foi utilizado a solução salina de Tris HCl 100 mM + NaCl 1M para o desprendimento das proteínas ácidas que ficaram retidas na resina. Assim, os tubos foram separados com as frações através da leitura de suas absorbâncias no espectrofotômetro a 280 nm e em seguida liofilizados.

3.4. Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

Os peptídeos da fração não retida obtidas em cromatografia de troca iônica foram purificados através de cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando uma coluna C18 (HIBAR LiChrosorb[®] RP 18, 5 µm de tamanho de partícula, L × I.D. 25 cm × 4,6 mm, MERCK) acoplada a uma coluna guarda C18 (Pelliguard LC-18 Replacement Cartridges 2 cm, Supelco), equilibrada com Solução A (0,1% de Ácido trifluoroacético - TFA). A partir da fração não retida (C1) obtida na cromatografia de troca iônica, foi solubilizada em água ultrapura e injetada na coluna. A seguir iniciou a corrida com a solução A durante os primeiros 15 min, na qual a eluição das amostras foi realizada em gradiente de Propanol e TFA (Solução B) da seguinte forma: a concentração do solvente B aumentou gradualmente de 0% a partir dos 15 min de corrida até atingir 50% após 115 min. Em seguida, a concentração do solvente B foi reduzida a 0% e mantida a esta concentração até o final da corrida que ocorreu em 120 min. A eluição das proteínas da coluna foi acompanhada por absorvâncias lidas a 220 nm em um detector de arranjo de diodo, sendo desenvolvida com um fluxo de 500 µL/min, em temperatura de 40 °C. As frações coletadas em tempo real foram liofilizadas.

3.5. Recromatografia de fase reversa em sistema HPLC

A fração P10 obtida em cromatografia de fase reversa em sistema HPLC foi submetida a recromatografia utilizando uma coluna C18 (LC, Shim-pack VP-ODS 5 µm, 4,6 x 250 mm, SHIMADZU) acoplada a uma coluna guarda C18 (Pelliguard LC-18 Replacement Cartridges 2 cm, Supelco), equilibrada em Solução A (0,1% de Ácido trifluoroacético - TFA). A fração foi solubilizada em água ultrapura e injetada na coluna. A seguir iniciou a corrida com a solução A durante os primeiros minutos, na qual a eluição das amostras foi realizada em gradiente de propanol e TFA (Solução B), da seguinte forma: a concentração do solvente B aumentou gradualmente de 0% a partir dos 5 min de corrida até atingir 50% após 85 min. Em seguida a concentração do solvente B foi reduzida a 0% e mantida a esta concentração até o final da corrida que ocorreu em 90 min. A eluição das proteínas da coluna foi acompanhada por absorvâncias lidas a 220 nm em um detector de arranjo de diodo, sendo desenvolvida com um fluxo de 500 µL/min, em temperatura de 40 °C. As frações coletadas em tempo real foram liofilizadas.

3.6. Quantificação de Proteínas

Para determinar a quantificação de proteínas foi realizado o método do ácido bicínconínico descrito por Smith et al. (1985). A proteína padrão utilizada foi a albumina

sérica bovina (Sigma), sendo as absorbâncias lidas no leitor de placas (Hidex chameleon-Multilabel Microplate Reader) a 544 nm.

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo tricina

A visualização do perfil cromatográfico do extrato rico em peptídeos e das frações obtidas em diferentes etapas de purificação foi realizada por técnica de eletroforese descontínua sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida descrita por Schagger e Von Jagow et al. (1987). Para o preparo da amostra, as frações liofilizadas foram adicionadas em 5 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 2,5%; sacarose 15%; azul de bromofenol 0,25%), 1 µL de β-mercaptoetanol 5% e para o volume final de 20 µL foi completado com água ultrapura. Como controle positivo do experimento seguinte (*western blotting*), foi utilizado uma LTP purificada por Diz et al. (2007), com aproximadamente 9 kDa na eletroforese. Dando sequência as amostras foram aquecidas por 5 min a 100 °C e centrifugadas a 16.000 x g por 5 min, à temperatura ambiente. Com o gel pronto foram aplicados 20 µL de cada amostra com concentração de 10 µg e foi utilizado o marcador da Sigma® (MW-SDS-17S) no volume de 7 µL com as seguintes massas de proteínas, em kDa: 26,6; 17,0; 14,2; 6,5; 3,2 e 1,06. O sistema de corrida do gel foi montado e foram adicionados o tampão anodo (Tris-HCl 0,2 M pH 8,9; SDS 0,2%) na parte externa e o tampão catodo (Tricina 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M pH 8,3; SDS 0,1%) na parte interna do sistema. A eletroforese foi realizada na voltagem de 20 V por aproximadamente 16 h.

Após a corrida o gel foi colocado em solução de fixação (metanol 40 % e ácido acético 10 %) por 30 min e posteriormente imerso em uma solução de coloração (*Coomassie Blue G* 0,025 % e ácido acético 10 % em água destilada) em agitação constante por aproximadamente 1 h. Adiante foi adicionado no gel uma solução decolorante de ácido acético 10 % em água destilada até a visualização de bandas proteicas.

3.8. Western blotting

A técnica de *Western blotting* foi realizada para identificação da(s) LTP(s) conforme descrito por Towbin et al. (1979). Após separação de proteínas das frações cromatográficas por eletroforese SDS-PAGE-Tricina as bandas de proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose sob uma corrente constante de 1 mA/cm² por 2 h no sentido gel-membrana. Como controle positivo, foi utilizado uma LTP purificada por Diz et al. (2007), com aproximadamente 9 kDa. Em seguida a membrana foi corada com ponceuau (0,1%) para verificação da eficiência do processo. Ao verificar

as bandas a membrana foi lavada em água ultrapura e incubada com uma solução bloqueadora de PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -10 mM, KCl-3 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -1,5 mM, NaCl-140 mM) com leite desnatado (Molico) 2% e tween 20 - 0,05% por 1h. Logo, a membrana foi imersa no tampão bloqueador (sem o tween 20) contendo anticorpo primário anti-LTP de pimenta (1:2000), deixado em *overnight* (16h a 4°C). No outro dia, a membrana foi lavada 10 X por 5 min em cada lavagem com PBS e após foi imersa em tampão bloqueador (sem tween 20) contendo anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:2000), deixado no período de 2h à temperatura ambiente. Após a membrana foi novamente lavada em PBS por 10 X a cada 5 min. Em seguida, a membrana foi revelada por reação com diaminobenzidina (DAB).

A revelação por DAB se fez pela imersão da membrana em uma solução reveladora contendo Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, DAB 1mg/mL, imidazol 100 mM e peróxido de hidrogênio 0,03 %, até a visualização das bandas marcadas. A reação é interrompida com água destilada.

3.9. Espectrometria de massas

Após separação por eletroforese SDS-PAGE-Tricina a banda de proteína de interesse foi extraída e digerida com tripsina. O peptídeo digerido por tripsina foi analisado por espectrometria de massa por ionização electrospray (ESI) quadrupolo time-of-flight (Q-TOF). Os espectros foram interpretados utilizando o programa Mascot, e os peptídeos sequenciados, submetidos a alinhamento local, utilizando a ferramenta NCBI-BLASTp. As sequências com alto valor de e-value e percentual de identidade foram escolhidas e submetidas a alinhamento múltiplo, utilizando o programa CLUSTAL Multiple Sequence Alignment by MUSCLE (3.8).

3.10. Ensaio de inibição da atividade de α -amilase

A propriedade de inibição da atividade da enzima α -amilase foi determinada pela medição da atividade hidrolítica residual de α -amilase do intestino do *T. molitor* (larva amarela do trigo) como descrito por Silva et al. (2018), com adaptações.

Para determinar a atividade de inibição da enzima, as frações P1-P10 (na concentração de 50 mg/mL) e as frações R1-R3 (na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$), foram incubados a 37 °C por 30 min, 1 μL de α -amilase intestinal extraído por Resende et al., (2020) (volume determinado através da realização de uma curva da enzima, 10 U de amilase) e 25 μL de amido a 1% (Sigma-Aldrich) para um volume final de 100 μL a ser completado com água. Em seguida foi adicionado 400 μL de solução DNS (4,5 % hidróxido de sódio, 3,5- ácido dinitrosalicílico, 1 % tartarato duplo de sódio, 45 g de

potássio e 2 g de fenol cristalino) e aquecidas a 100°C por 5 min. Logo, em temperatura ambiente, as amostras foram lidas no espectrofotômetro (Spectroquant Pharo 100 Merck), a 540nm sendo determinado a hidrólise do substrato pela enzima. Essa técnica foi realizada em triplicata sendo o desvio padrão (DP) calculado para cada amostra. A unidade de amilase é definida como uma variação de 0,1 de absorbância a 540nm por 30min de reação como descrito por Franco et al. (2000). Para o cálculo da porcentagem de inibição, foi realizado o controle positivo com ácido etilenodiamino tetra-acético como (EDTA) na concentração de 5 mM no volume de 5 µL como parâmetro, considerando 100% da inibição da atividade. A albumina de soro bovino (BSA), foi utilizada como controle negativo na concentração de 10 µg.

3.11. Ensaio de inibição do crescimento de leveduras

O ensaio de inibição do crescimento de leveduras foi realizado com *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Em placa de Petri inóculos dessas leveduras foram estriadas para o crescimento, sendo mantidas em estufa (BOD) na temperatura de 30°C por 24 h. Após o tempo de 24h inóculos foram transferidos para o meio líquido (caldo Sabouraud) e homogeneizados. Logo, foi retirada uma alíquota para visualização e quantificação na câmara de Neubauer no microscópio óptico (Axioplan, Zeiss, versão 29 4.0). Ao obter a quantificação, seguiu-se o processo incubando as leveduras (1×10^4 células. mL⁻¹) em 100 µL de caldo sabouraud para realização do controle e do teste com as células tratadas com os peptídeos na concentração de 100 µg/mL. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços), em temperatura de 28°C por um período de 24 h. Após o período, foi realizado a determinação da densidade ótica a 620nm. Todo o procedimento do ensaio foi procedido sob condições de assepsia em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert et al. (1990). O efeito do tratamento sobre crescimento das leveduras foi registrado com fotos do fundo do poço da placa de 96 poços. As porcentagens de fluorescência foram calculadas assumindo que o número de células em DIC (nDIC) representou 100% de acordo com a fórmula ($nFLU \times 100 / nDIC$), onde nFLU foi a média das contagens de células fluorescentes das amostra tratada com fração P10 em 24 h.

3.12. Efeito sobre a permeabilização de membranas dos microrganismos

A permeabilização da membrana das células tratada foi avaliada através da utilização do corante fluorescente *SYTOX Green*, segundo metodologia descrita por Thevissen et al. (1999). *SYTOX Green* é um corante que possui alta afinidade por ácidos nucleicos e penetra as células apenas quando sua membrana plasmática está

comprometida. Sendo assim, após o ensaio de inibição de crescimento, alíquotas dessas células foram incubadas ao abrigo da luz e sob agitação constante de 500 rpm por 15 min, com o corante fluorescente *SYTOX Green*, na concentração de 1 μ M de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. No controle positivo foi realizado o aquecimento por 10 segundos após adicionar a sonda. Após o preparo da amostra, as células fúngicas foram analisadas no microscópio óptico (Axioplan, Zeiss) acoplado a uma câmera Axio Can MR5 (Zeiss) e as imagens foram analisadas no software Axiovision, versão 4.0. As imagens com fluorescência foram realizadas através do conjunto de filtros fluorescentes para detecção de fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 – 490 nm e emissão de 500 nm) acoplados ao microscópio.

3.13. Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio intracelular

A indução da produção endógena de ROS em células de fúngicas tratadas foram avaliadas através da utilização do corante fluorescente 2',7' diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA), segundo metodologia descrita por Mello et al. (2011), para avaliar se o mecanismo de ação do(s) peptídeo(s) envolve a indução do estresse oxidativo. Para medir a produção de ROS, após o ensaio de inibição de crescimento as células foram incubadas com a sonda na concentração de 20 μ M. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 2 h sob agitação constante. No controle positivo foi utilizado ácido acético a 500 μ M, incubado acrescentado com a sonda. As células fúngicas foram analisadas no microscópio óptico (Axioplan, Zeiss) equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção de fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 – 490 nm e emissão de 500 nm).

3.14. Análise da viabilidade celular após incubação com peptídeos

Após o ensaio de inibição do crescimento de *C. albicans*, a análise da viabilidade celular foi realizada segundo a metodologia adaptada de Gebara et al. (2020). As células retiradas do ensaio foram lavadas e diluídas 1.000 vezes. Uma alíquota de 100 μ L da diluição foi espalhada com uma alça de drigalsky 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 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. Os cálculos do desvio-padrão e análise estatística foram realizados com software Prisma (versão 8.0).

3.15. Análise estatística

Os dados dos experimentos foram obtidos em triplicata. Para a avaliação foi utilizado a análise de variância unidirecional ANOVA. As diferenças médias foram consideradas significativas em $p < 0,05$, utilizando como modelo para análises estatísticas o software GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows).

4. RESULTADOS

4.1. Perfil eletroforético e *western blotting* do extrato proteico de sementes de *Capsicum chinense*

O perfil eletroforético do extrato proteico de sementes (EPS) de *C. chinense*, é apresentado na figura 3A. Sendo possível observar a presença de bandas majoritárias entre 6,5 kDa e 26,6 kDa, bem como abaixo de 6,5 kDa. O *western blotting* (figura 3B) foi realizado para a detecção da presença da LTP no EPS, utilizando como controle positivo uma LTP de 9 kDa purificada por Diz et al. (2007). Como parâmetro do controle positivo foi detectado a presença de uma LTP no EPS de *C. chinense* também de aproximadamente 9 kDa.

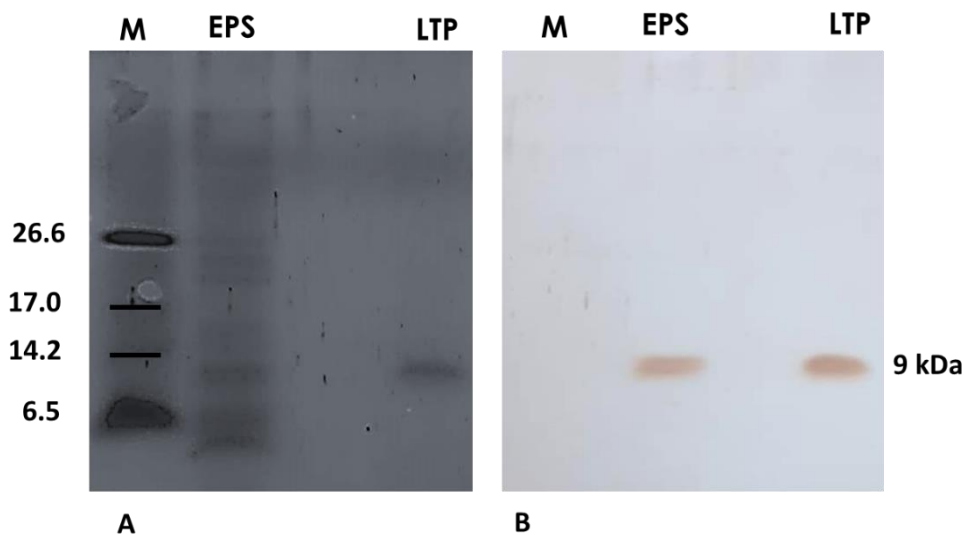


Figura 3: (A)- Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo tricina do extrato proteico de sementes. **M-** Marcador de massa molecular (kDa); **EPS-** Extrato proteico de sementes; **LTP-** Proteínas transferidoras de lipídeos (controle positivo). **(B)-** Detecção por *western blotting* do extrato proteico de sementes de *C. chinense* acesso UENF 1751.

4.2. Fracionamento do extrato proteico de sementes por cromatografia de troca iônica

Após a extração proteica das sementes de *C. chinense*, (50 mg/mL) do extrato, foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna DEAE- Spharose, onde obteve-se duas frações que foram denominadas C1 (fração não retida) e C2 (fração retida) representado na figura 4A. O gráfico (figura 4A) representa o perfil de eluição cromatográfico sendo C1 eluido no tampão de equilíbrio da coluna Tris HCl 100 mM, pH 8,0 e em seguida, a fração C2, eluida no tampão de equilíbrio Tris HCl 100 mM + NaCl 1M. A partir das frações obtidas na cromatografia (C1 e C2), foi realizado o perfil eletroforético para visualização das bandas proteicas entre 6,5 kDa e 14,2 kDa (figura 4B) seguindo com o *western blotting* (figura 4C) para detecção da proteína LTP. Uma LTP foi detectada na fração C1, próximo a LTP de 9 kDa (controle positivo).

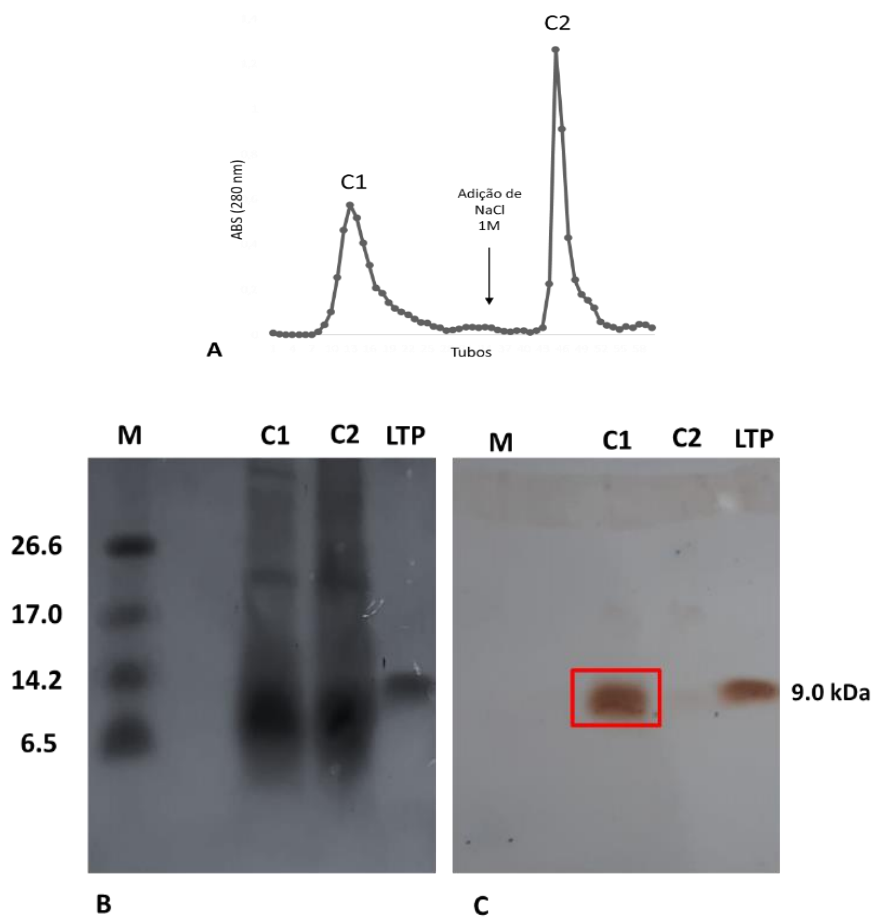


Figura 4: Cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephrose da extração proteica de sementes de *C. chinense*. **(A)**- Cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephrose; **C1**- Fração não retida eluída em Tris HCl 100mM, pH 8,0; **C2**- Fração retida eluída em Tris HCl 100 mM, pH 8,0, acrescida de NaCl 1M. **(B)**- Visualização eletroforética do gel de poliacrilamida contendo tricina com as frações obtidas na cromatografia; **M** – Marcador de massa molecular em kDa; **C1**- Fração não retida; **C2**- Fração retida; **LTP**- Proteínas transferidoras de lipídeos. **(C)**- *Western blotting* das frações obtidas na cromatografia de troca iônica.

4.3. Efeitos das frações peptídicas C1 e C2 sobre o crescimento de leveduras do gênero *Cândida*

Após realizar a cromatografia de troca iônica, as frações C1 e C2 foram submetidas na concentração de 100 µg/mL ao ensaio de inibição do crescimento de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Observa-se na figura 5 que as células tratadas com 100 µg/mL das frações C1 e C2 apresentam inibição tanto para *C. albicans* (figura 5A) quanto para *C. tropicalis* (figura 5B). Visto que para *C. albicans* a fração C1 obteve um resultado mais significativo com 75% de inibição. Já para *C. tropicalis* C2 foi o resultado mais significativo com 56,8% de inibição.

Diante dos resultados obtidos por *western blotting* e pelo teste de inibição, os próximos experimentos foram realizados com a fração C1 e com a levedura *C. albicans*, devido a presença da LTP e por ter apresentado um maior valor significativo de inibição do crescimento comparado com *C. tropicalis*. A fração C2 foi armazenada para futuras pesquisas.

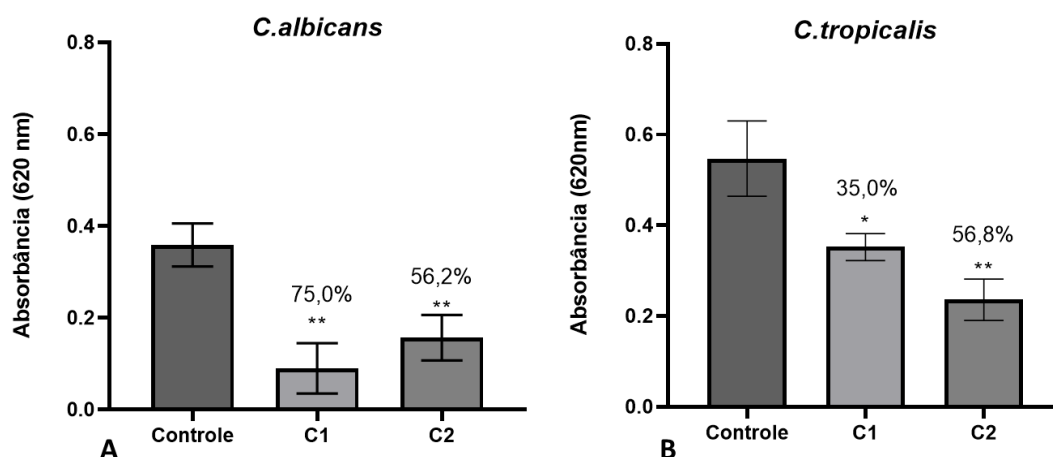


Figura 5: Efeitos das frações obtidas em cromatografia de troca iônica sobre inibição do crescimento de *C. albicans* (A) e *C. tropicalis* (B), após 24 h de incubação com 100 µg/mL; (%) - Porcentagem de inibição causada pelas frações; (*) - Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle pelo teste de Dunnett.

4.4. Fracionamento da fração não retida (C1) por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

A fração não retida (C1) obtida na cromatografia de troca iônica, foi submetida a cromatografia de fase reversa em sistema HPLC em coluna C18. Ao realizar a corrida foram obtidas dez diferentes frações denominadas de P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10 (figura 6A). O perfil eletroforético está apresentado na figura 6B. O perfil eletroforético das frações P1, P2, P3 e P4 não apresentou bandas proteicas pelo método utilizado (figura 6B) sendo essas frações armazenadas para futuras pesquisas. Na figura

6C podem ser observadas bandas proteicas nas frações P5 a P10. As frações P5, P6, P7 apresentam bandas majoritárias em torno de 6,5 e 14,2 kDa. O P8, apresentou duas bandas majoritárias entre 6,5 e 14,2 kDa. O P9 apresenta uma única banda em torno de 6,5 kDa. O P10 apresenta pelo menos três bandas majoritárias com massas moleculares em torno de 6,5 kDa, outra entre 6,5 e 14,2 kDa e uma entre 14,2 e 17,0 kDa.

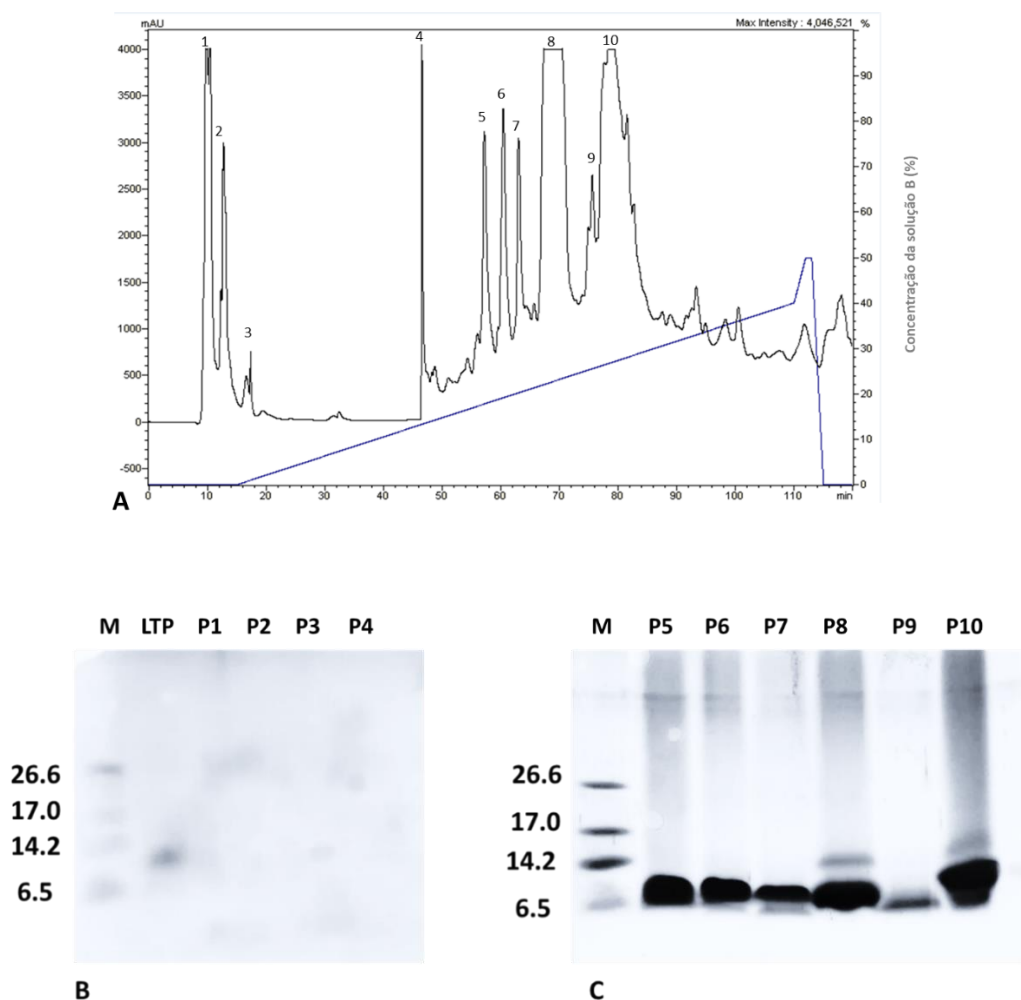


Figura 6: (A)- Cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC (coluna μ RP C18), a partir da fração não retida (C1) da cromatografia de troca iônica do extrato de sementes de *C. chinense*. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida foi realizada com TFA 0,1% (Solvente A) e a amostra foi eluída usando-se um gradiente linear de propanol (Solvente B) **(B)-** Visualização eletroforética do gel de poliácridamida contendo tricina com as frações obtidas na cromatografia de fase reversa; **M** – Marcador de massa molecular em kDa; **LTP**- Proteínas transferidoras de lipídeos; **1, 2, 3 e 4**- Frações dos picos obtidos pelo cromatograma; **(C)-** Visualização eletroforética do gel de poliácridamida contendo tricina com as frações obtidas na cromatografia de fase reversa; **M** – Marcador de massa molecular em kDa; **5, 6, 7, 8, 9 e 10**- Frações dos picos obtidos pelo cromatograma.

4.5. Western blotting das frações obtidas em fase reversa

Posteriormente foi utilizada a técnica de *western blotting* para a detecção da presença da LTP nas 10 frações obtidas. Como controle positivo foi utilizado o EPS obtido de *C. chinense* que apresentou uma banda molecular aproximadamente de 9

kDa. Foi detectado apenas na fração P10 a presença de LTP por imunodeteção, com massa molecular entre 6.5 e 14.2 kDa (figura 7B). Nas demais frações não foram visualizados reações contra o anticorpo anti-LTP.

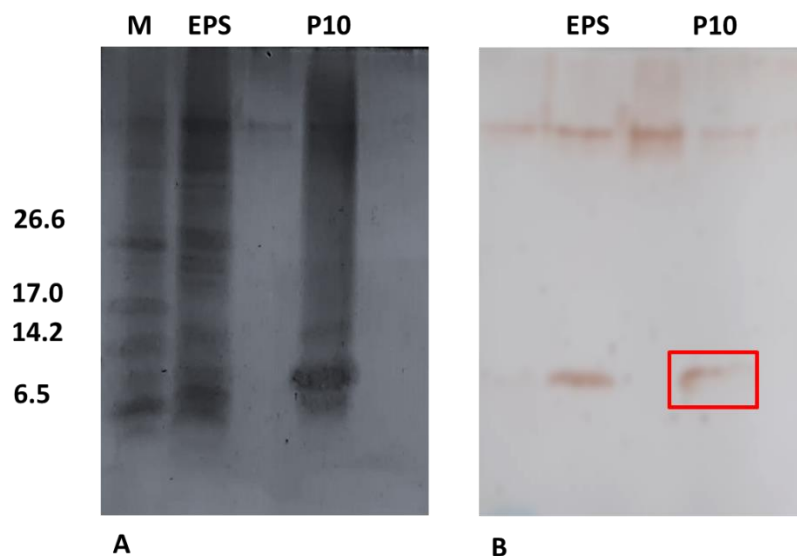


Figura 7: (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo tricina; **M**– Marcador de massa molecular em kDa; **EPS**- Extrato proteico de sementes; **P10**- Fração obtida do pico 10 na cromatografia de fase reversa **(B)**- Western blotting com a presença de uma LTP na fração do P10 após fase reversa.

4.6. Análise da sequência de aminoácidos da fração P10

A partir da visualização do perfil eletroforético e da detecção da LTP presente no P10 (figura 7), a banda de interesse acima de 6,5 kDa e abaixo de 14,2 kDa foi submetida a análise de peptídeos presentes na fração. Como resultado da análise, o alinhamento dos aminoácidos revelou similaridade com as subfamílias das LTPs com as seguintes sequências: LTP do tipo I *C. annuum* (ID de sequência: XP_016544907.1), *C. annuum* (ID de sequência: KAF3657887.1), *C. annuum* (ID de sequência: XP_016544929.2) e *C. annuum* (ID de Sequência: XP_016544918.2). LTP do tipo II *C. annuum* (ID de Sequência XP_016570198.1) *C. annuum* (ID de Sequência KAF3615994.1) *C. baccatum* (ID de Sequência PHT56658.1) e *C. chinense* (ID de Sequência PHU06864.1) (figura 8).

LTP-I				
Espécie			P (%)	I (%)
<i>Capsicum chinense</i>	-----TINSLAK-----TACNCLK-----CGVQLSVPISR-----			
<i>Capsicum annuum</i>	-----AVTCGQVDANLAPCVFFLTQGGEPGAACCSGVKTLNSLAKSTDERRTT CNCA AAANRYPNLKDDAAQSLPSK CG VTLNVPISR TINC DTIS		87	80
<i>Capsicum annuum</i>	-----AVTCGQVDANLAPCVFFLTQGGEPGAACCSGVKTLNSLAKSTDERRTT CNCA AAANRYPNLKDDAAQSLPSK CG VTLNVPISR TINC DT--		87	80
<i>Capsicum annuum</i>	ARLDEQWGITCGQVDANVAPCVSYLTQGGEPGAACCSGVKTL SGLAK STDERR TACNCL KAAANRYPNLKDDAAQALPSK CG VALNVPISR TINC DTVS		92	80
<i>Capsicum annuum</i>	GRLEQQTGITCGQVDANLAPCVSFLTQGGEPSAACCSGVKTL SGLAQ STDERR TACNCL KAAANRYANLKDDAAQALPGK CG VALNVPISR TINC DTVS		92	75
	* ** * *** *		*** * *****	
LTP-II				
<i>Capsicum chinense</i>	-----QYVNSPNAR-----			
<i>Capsicum annuum</i>	VTC SV TELSSCAGAITSSQPPSSVCCAKLREQKPCLCGYLQNP NLR PYVNSPNARRVASTCGV RT PS C		88	90
<i>Capsicum annuum</i>	VTCNPSQLSPCLGALRSGSAPSQDCCARLKGQ QS CLCGYMKDPNMKQYVNSPNARKVVGQCGV SV PNC		100	100
<i>Capsicum baccatum</i>	ATCNASQLSPCLGALRSGSAPSQDCCARLKGQ QS CLCGYMKDPNMKQYVNSPNARKVVGQCGV TL PNC		100	100
<i>Capsicum chinense</i>	VTC SV TELSSCAGAITSSQPPSSKCCAKLREQKPCLCGYLQNP NLR QYVNSPNARRVASTCGV PT PRC		100	100

Figura 8: Alinhamento dos resíduos de aminoácidos do peptídeo de sementes de *C. chinense* (acesso UENF 1751) da amostra P10. As sequências foram obtidas no BLAST e alinhadas pelo Clustal Omega. (A) O peptídeo P10 denominado com aproximadamente 9 kDa apresentou semelhança com as seguintes sequências: Proteína transferidoras de lipídeos não específica I (ns-LTP) de *Capsicum annuum* (ID de sequência: XP_016544907.1), *C. annuum* (ID de sequência: KAF3657887.1), *C. annuum* (ID de sequência: XP_016544929.2) e *C. annuum* (ID de Sequência: XP_016544918.2). Proteína de transferência de lipídeos não específica II (ns-LTP) de *C. annuum* (ID de Sequência XP_016570198.1) *C. annuum* (ID de Sequência KAF3615994.1) *C. baccatum* (ID de Sequência PHT56658.1) e *C. chinense* (ID de Sequência PHU06864.1). **P%** indica a porcentagem de resíduos positivos (que apresentam as mesmas características físico-bioquímicas) e estão escritos em cinza. **I%** indica a porcentagem de resíduos idênticos e são escritos em itálico. **Gaps (-)** foram introduzidos para melhor alinhamento.

4.7. Efeitos das frações peptídicas dos picos obtidos em fase reversa sobre atividade de α -amilase

O ensaio de inibição da atividade enzimática de α -amilase intestinal das larvas do *T. molitor*, foi realizada com 50 μ g/mL das frações obtidas após cromatografia de fase reversa. Na figura 9 pode ser observado todas as frações testadas, sendo as frações P3, P4, P7 e P10 capazes de inibir significativamente a atividade de α -amilase ($p < 0.05$) com 78,7%, 85,8%, 77% e 99,3% respectivamente, de acordo com o teste Dunnett.

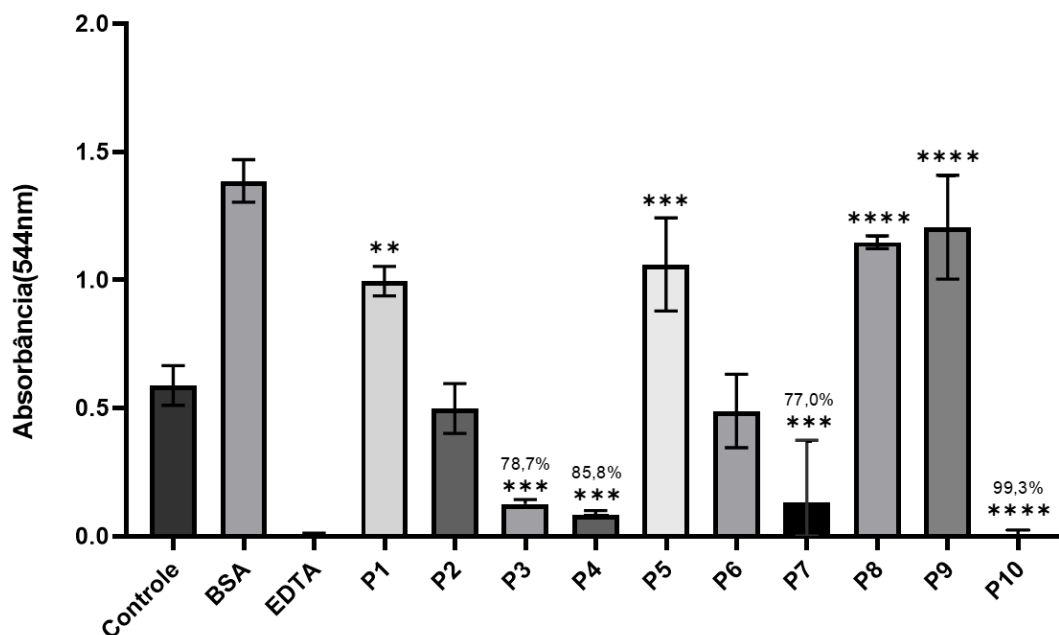


Figura 91: Efeito inibitório das frações P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10 obtidas por cromatografia de fase reversa da fração C1 de sementes de *Capsicum chinense* sobre a atividade de α -amilases. (Controle)- α -amilase. No controle positivo da α -amilase, foi utilizado EDTA 5 mM. Os valores são a média ($\pm$ SD) dos triplicados. Porcentagem de inibição da atividade enzimática causada por frações. Os asteriscos indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Dunnett.

4.8. Efeitos das frações peptídicas dos picos obtidos em fase reversa sobre o crescimento de *Candida albicans*

As dez frações obtidas em fase reversa foram submetidas ao teste de inibição do crescimento de *C. albicans* na concentração de 100 μ g/mL. Na figura 10 observa-se o gráfico dos efeitos sobre o crescimento da levedura após a incubação de 24h. As frações P1, P2, P3, P5, P6, P7, P8 e P10 apresentaram inibição do crescimento, sendo os valores mais significativos, de acordo com a análise estatística, P1 com inibição de 91,3%. O P2 apresentou uma inibição de 68%, o P5 com inibição de 66,6% e o P8 com inibição de 49,9%. O P3, P6, P7 e P10 apresentaram inibição significativa respectivamente a 34,3%, 44,2%, 49,2 % e 40,9%. O P4 e P9 não apresentaram

inibição significativa. Abaixo do gráfico estão as fotos do fundo do poço da placa após 24h para visualização e comparação do crescimento de *C. albicans*.

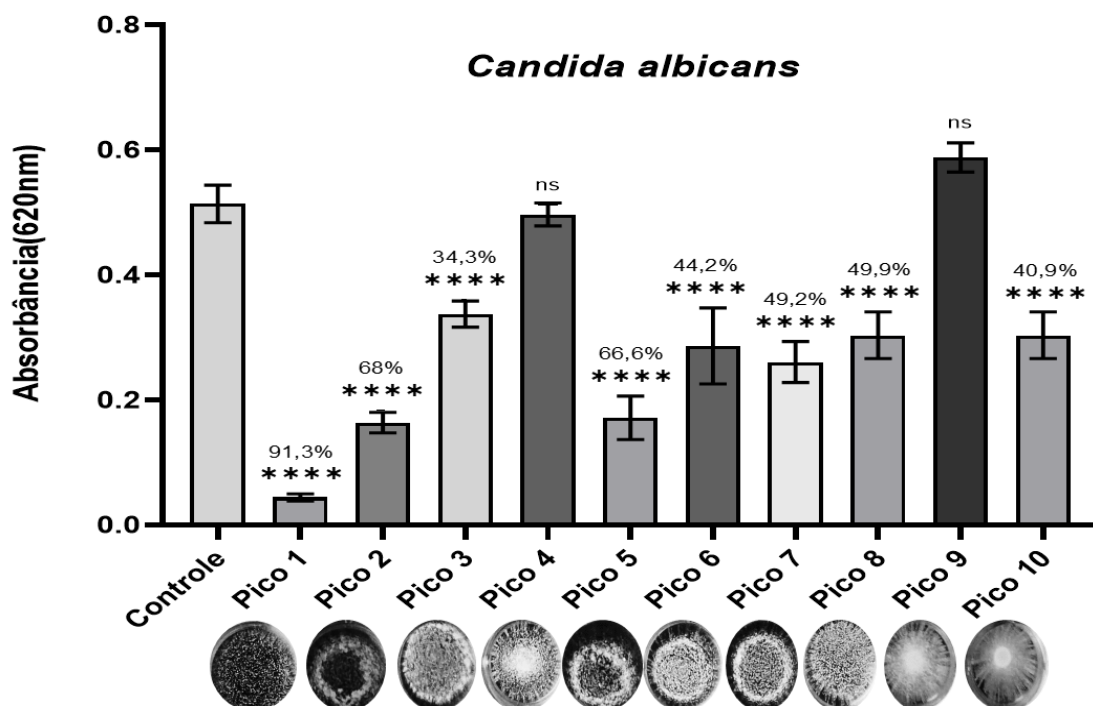


Figura 10: Efeitos das frações da cromatografia de fase reversa sobre inibição do crescimento da *C. albicans* após 24 horas de incubação com 100 µg/mL. (%) - Porcentagem de inibição causada pelas frações cromatográficas; (*) - Os asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre o tratamento experimental e controle pelo teste de Dunnett.

4.9. Efeitos das frações peptídicas obtidos em fase reversa na análise de viabilidade celular

Após o teste de inibição do crescimento de *C. albicans*, foi realizado a análise de viabilidade celular. Todas as dez frações foram utilizadas na concentração de 100 µg/mL. As que mais apresentaram reduções de unidades formadoras de colônias (UFC) foram o P1 e o P5 no tempo de 36h. Observa-se para a concentração de 100 µg/mL uma diminuição de viabilidade das frações P1, P3, P4, P5, P6, P7 e P10 respectivamente à 53,64%, 38,43%, 14,64%, 81,89%, 25,86%, 34,2% e 8,79%. As frações P2, P8 e P9 não induziram perda de células viáveis.

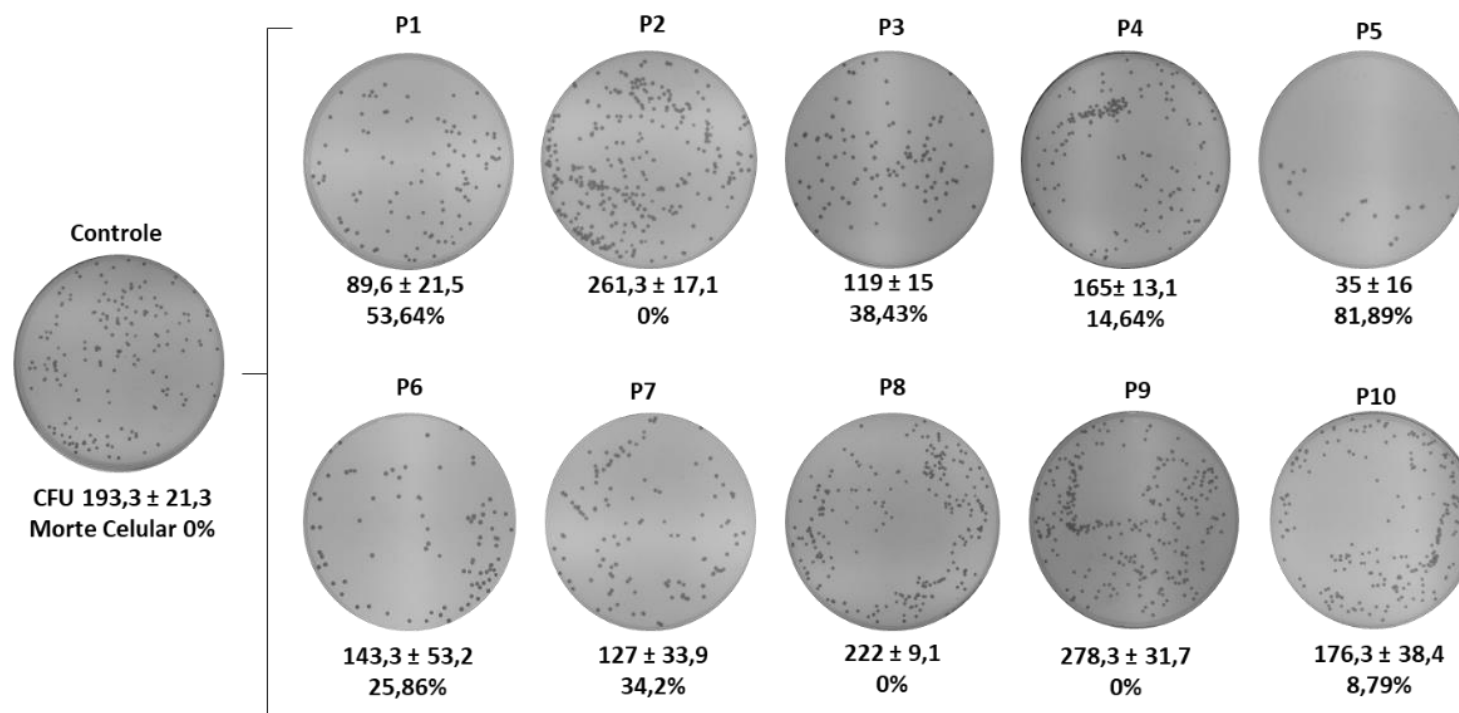


Figura 11: Efeito das frações da cromatografia de fase reversa (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10 na concentração de 100 µg/mL) na viabilidade de célula de levedura *Candida albicans*. Após 36 h a viabilidade celular foi medida por contagem direta de unidades formadoras de colônias (UFC). A porcentagem de morte celular foi calculada em relação ao controle (viabilidade celular 100%). Os resultados apresentados são valores médios obtidos ao longo do experimento sendo realizado em triplicata.

4.10. Efeito da fração P10 sobre a permeabilização de membranas em *Candida albicans*

Devido a presença da LTP detectada na fração P10, células de *C. albicans* tratadas com este pico foram submetidas a incubação com a sonda SYTOX Green. Na figura 12, podemos visualizar que não há marcações significativas da sonda fluorescente SYTOX Green. Para quantificar estatisticamente, foi elaborada a tabela 1, onde apresenta a contagem de células de cinco campos aleatórios de DIC do controle e do P10 na concentração de 100 µg/mL.

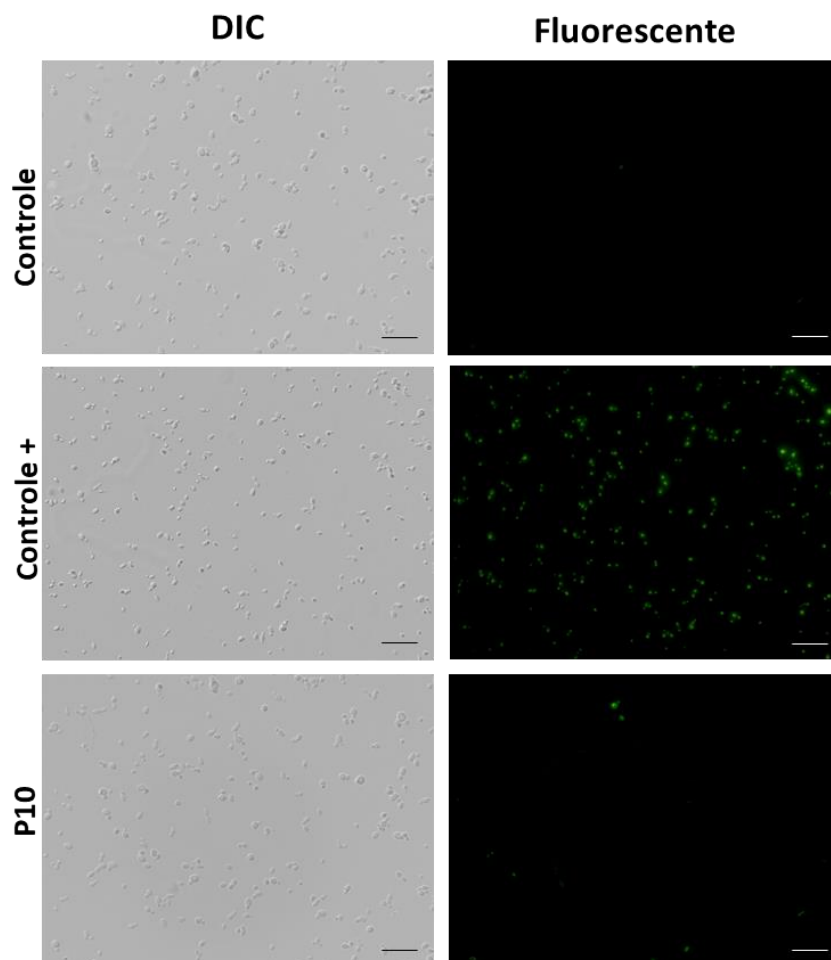


Figura 12: Microscopia de fluorescência do ensaio de detecção da permeabilização de membrana induzido pela fração P10 em células de leveduras *C. albicans*. As células foram visualizadas por microscopia óptica utilizando o DIC e por microscopia de fluorescência. Barra de 20 μm .

Tabela 3: Porcentagem de células permeabilizadas quantificada pelo número de células em cinco campos aleatórios do DIC e visualizações de fluorescência da amostra, sendo o número de células no DIC da amostra e dos controles considerado como 100%. (*) diferenças significativas por comparação one-way ANOVA, $p < 0,05$.

<i>Espécie</i>	<i>Amostra</i>	<i>Número de células em DIC</i>	<i>Número de células Fluorescentes</i>	<i>% de células permeabilizadas (SYTOX Green)</i>
<i>Candida albicans</i>	Controle	$263 \pm 14,61$	$0,800 \pm 0,836$	0,30 ****
	Controle +	$378,4 \pm 24,44$	$358,6 \pm 25,86$	94,76
	P10	$330,4 \pm 8,54$	$3,800 \pm 3,271$	1,15 ****

4.11. Efeito da fração P10 sobre o aumento endógeno de ROS em *Candida albicans*

Após 24h do ensaio de inibição do crescimento de *C. albicans* na presença do P10, as células foram tratadas com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (ROS). O resultado visualizado na figura 13 revela que P10 não apresenta marcações fluorescentes significativas nas células. Na tabela 2 está apresentado a quantificação estatística de cinco campos aleatórios de DIC do controle e do P10 na concentração de 100 µg/mL.

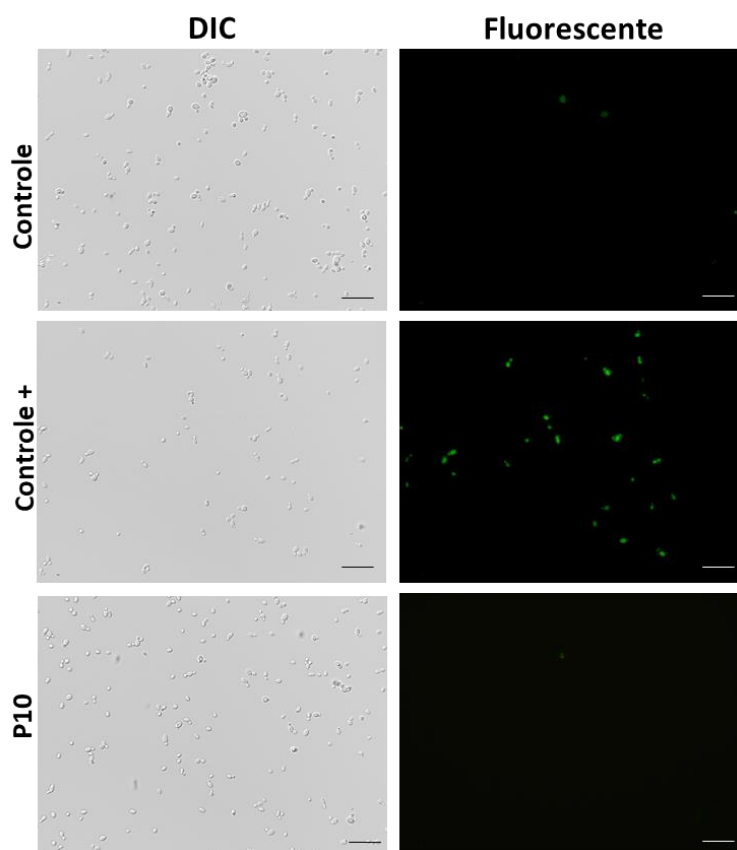


Figura 13: Microscopia de fluorescência do ensaio de detecção do aumento endógeno de ROS induzido pela fração P10 em células de leveduras *C. albicans* com o corante H2DCFDA (2',7' diclorofluoresceína diacetato). As células foram visualizadas por microscopia óptica utilizando o DIC e por microscopia de fluorescência. Barra de 20 µm.

Tabela 4: Porcentagem de indução de ROS quantificada pelo número de células em cinco campos aleatórios do DIC e visualizações de fluorescência da amostra, sendo o número de células no DIC da amostra e dos controles considerado como 100%. (*) diferenças significativas por comparação one-way ANOVA, $p < 0,05$.

<i>Espécie</i>	<i>Amostra</i>	<i>Número de células em DIC</i>	<i>Número de células Fluorescentes</i>	<i>% de indução de ROS nas células (H2DCFDA)</i>
<i>Candida albicans</i>	Controle	154,2 ± 54,98	1,200 ± 1,304	0,77 ****
	Controle +	107,0 ± 7,141	15,80 ± 13,57	14,76 ****
	P10	226,4 ± 14,12	0,4000 ± 0,8944	0,17 ****

4.12. Fracionamento da fração do pico 10 por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

Ao realizar essa técnica foram obtidos três picos diferentes, denominados de R1, R2 e R3 (figura 14A). Foi também realizada uma eletroforese para verificação do perfil proteico e a detecção de LTP por *western blotting* nos picos obtidos da recromatografia. Na figura 14B pode ser observado o perfil eletroforético das bandas presentes nas frações recromatografadas, com duas bandas majoritárias e massas molecular entre 6,5 e 14,2 kDa. A reação positiva para o anticorpo anti-LTP das bandas de R1, R2 e R3 pode ser visualizada na figura 14C.

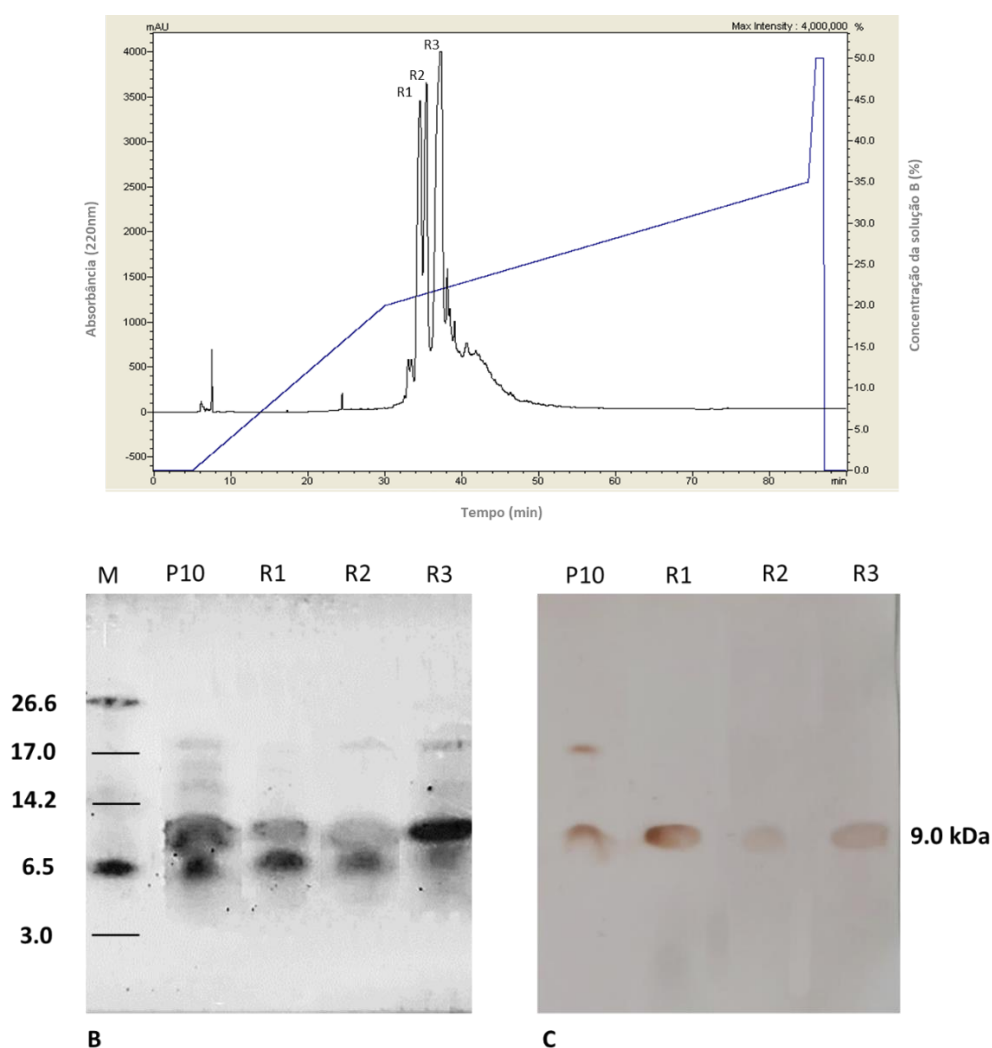


Figura 14: (A) Recromatografia da fração P10 obtida em cromatografia de fase reversa em coluna μ RP C18. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida foi realizada com TFA 0,1% (Solvente A) e a amostra foi eluída usando-se um gradiente linear de propanol (Solvente B). O fluxo foi de 0,5mL.min⁻¹. (B)- Visualização eletroforética do gel de poliácridamida contendo tricina com as frações obtidas na recromatografia; **M** – Marcador de massa molecular em kDa; **P10**- Fração obtida em HPLC a partir da fração C1 (utilizado como controle para o *western blotting*); **R1, R2 e R3**- Frações da recromatografia; (C)- *Western blotting* das frações obtidas na recromatografia em sistema HPLC.

4.13. Efeitos das frações peptídicas obtidas por recromatografia em fase reversa sobre o crescimento de *Candida albicans*

Diante o fracionamento do P10 em sistema HPLC e a visualização do perfil eletroforético, as três frações (R1, R2 e R3) foram submetidas para teste contra o crescimento de *C. albicans* na concentração de 100 µg/mL. Na figura 15 observa-se o gráfico dos efeitos sobre o crescimento da levedura após a incubação de 24h. Ao analisar estatisticamente as frações obtidas não apresentaram inibição de crescimento contra a levedura, podendo ser observado abaixo do gráfico (figura 15) as fotos do fundo de poço que também não apresentaram diferenças visuais em relação ao controle.

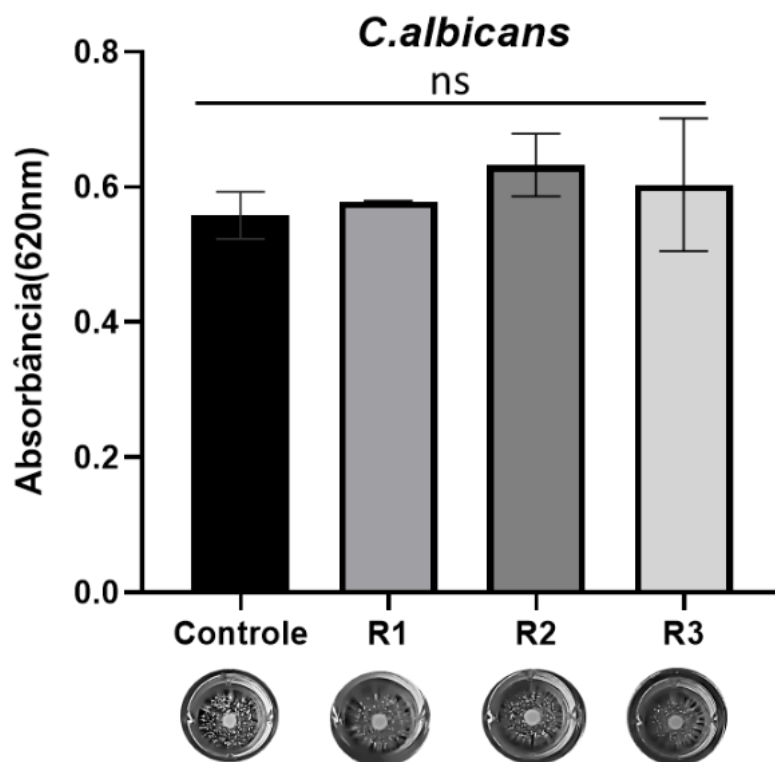


Figura 15: Efeitos das frações obtidas na recromatografia por sistema do HPLC sobre inibição do crescimento da *C. albicans* após 24 horas de incubação com 100 µg/mL; (%) Porcentagem de inibição causada pelos extratos.

4.14. Ensaio de inibição da atividade de α -amilase das frações peptídicas obtidas por recromatografia de fase reversa em sistema HPLC

Visto que as três frações da recromatografia apresentaram a proteína LTP, foi realizado o teste de inibição da atividade enzimática de α -amilase das larvas do *T.molitor*, com 100 µg/mL das frações. No final do ensaio e ao realizar o gráfico da figura 16, é apresentado uma grande inibição significativa ($p < 0.0,5$) de acordo com teste Dunnett de todas as frações. Sendo a porcentagem de inibição de R1, R2 e R3

respectivas à 55% 72% e 93%. Na figura 14 também é apresentado o P10 com 98% de inibição enzimática, podendo comparar o percentual com as frações obtidas.

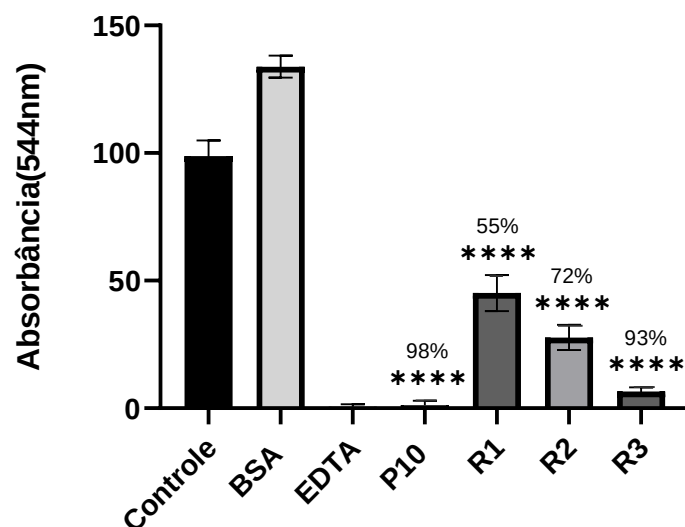


Figura 16: Efeito inibitório das frações P10, R1, R2 e R3 obtidas por cromatografia de fase reversa. **Controle** — α -amilase. No controle positivo da α -amilase, foi utilizado EDTA 5 mM. Os valores são a média ($\pm$ SD) das triplicatas. (%) - Porcentagem de inibição da atividade enzimática causada por frações. (*) - Os asteriscos indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Dunnett.

5. DISCUSSÃO

As atividades biológicas das proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) são exploradas no gênero *Capsicum*, como a formação da camada cuticular em resposta a estresses abióticos e bióticos como o ferimento na planta, sugerindo um possível papel na defesa de plantas contra patógenos fúngicos. Peptídeos relacionados desta família foram isolados de diversas espécies de plantas e de diferentes órgãos, como folhas, sementes e frutos (Carvalho et al., 2007). Os peptídeos dessa família têm demonstrado diversas atividades antimicrobianas e podem ser utilizadas no estudo do controle de microrganismos importantes na área da saúde e na agricultura (Carvalho et al., 2007).

Diz et al. (2006) inicialmente relataram a presença dessa família em diferentes espécies de sementes de *Capsicum*. Porém, ainda poucos estudos estão relacionados a espécie de *C. chinense*, despertando assim o interesse em identificar, purificar e caracterizar peptídeos da família das LTPs em sementes desta espécie.

As proteínas em estudo foram separadas por cromatografia de troca iônica, corroborando alguns trabalhos já publicados na literatura, que mostram a eficiência do uso dessa técnica para separar e purificar parcialmente extratos ricos em peptídeos (Diz et al., 2006; Souza et al., 2013; Ribeiro et al., 2007; Resende et al., 2021; Aguiéiras et al., 2021). Essa técnica permite a separação de peptídeos através de sua carga, resultando em frações ácidas e básicas.

Na tentativa de isolar a LTP detectada no *western blotting*, a fração C1 foi submetida a cromatografia líquida de fase reversa em sistema HPLC, técnica muito utilizada para o isolamento e purificação de peptídeos hidrofóbicos que consiste em uma coluna com resina de interação hidrofóbica. Na aplicação da amostra nessa coluna, as proteínas mais hidrofóbicas vão se ligar na cauda de carbono ligada na resina de sílica, sendo utilizado como eluente um solvente orgânico que na medida do tempo a concentração do solvente orgânico vai aumentando. Logo, o solvente vai competindo com os peptídeos e liberando de acordo com o grau de hidrofobicidade e força de interação com a resina. A partir dessa técnica Segura et al. (1993), Cammue et al. (1995), Kristensen et al. (2000), Liu et al. (2002), Diz et al. (2006), Nazzari et al. (2019) entre outros, isolaram com alta eficiência LTPs de plantas. A partir dos trabalhos encontrados na literatura, e através da cromatografia de fase reversa, obteve-se dez frações denominadas de P1 ao P10. O perfil eletroforético destes picos, em especial as frações P5 ao P10, apresentaram perfis de proteínas com massas moleculares variando entre 6,5 e 14,2 kDa. A fração P10 apresentou três bandas proteicas, na qual uma delas, em torno de 9 kDa, reagiu positivamente ao anticorpo produzido contra uma LTP de *C. annuum*. A banda detectada apresenta a mesma massa molecular de

LTPs presentes na literatura (Terras et al., 1992; Diz et al., 2006; Cruz et al., 2010; Zottich et al., 2011).

Alguns AMPs de plantas apresentam potencial de inibição do crescimento de leveduras do gênero *Candida* (Taveira et al., 2017; Aguiaras et al., 2021; Ribeiro et al., 2022). Esse gênero é composto por espécies responsáveis por causar infecções fúngicas invasivas e sistêmicas sendo elas lideradas no ranking de doenças em ambientes hospitalares (Lamoth et al., 2018; Garcia-Bustos et al., 2021). Dos casos de infecções sanguíneas 34,3% são causadas pelas espécies de *Candida albicans*, 24,1 % *C. parapsilosis*, 15,3% *C. tropicalis* e 10,2% *C. glabrata* (Hung et al., 2012; Elhoufi et al., 2014).

Como proposta inicial de inibição do crescimento de leveduras utilizou-se as frações C1 e C2 para análise da inibição das espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*. A fração C1 apresentou 75% de inibição do crescimento para *C. albicans*, enquanto C2 apresentou 56,2% (figura 5A e 5B). Ao testar as frações com *C. tropicalis* C1 apresentou 35% de inibição e C2 56,8%. Essa diferença de inibição entre as espécies pode ser devido a interação entre a amostra peptídica e o microrganismo alvo. Além de depender da presença de um alvo específico na membrana ou intracelular e da concentração da fração testada, outras variáveis são dependentes como estratégias de sobrevivência microbiana. Sendo por exemplo essas variáveis relacionadas a composição lipídica da membrana, os níveis de saturação de ácidos graxos e a capacidade desses fungos de responder aos efeitos inibitórios (Paege et al., 2019).

Devido a presença de LTP identificada por imunoblotting, e pela forte atividade de inibição do crescimento da levedura *C. albicans*, o trabalho buscou investigar os AMPs presentes na fração C1. Para conhecer os efeitos das frações obtidas na cromatografia em sistema HPLC com propriedade de inibir o crescimento de *C. albicans*, foi realizado o ensaio mostrado na figura 10. De acordo com a análise estatística, as frações apresentaram diferentes valores inibitórios.

Trabalhos vêm mostrando que as LTPs apresentam atividade antifúngica, com IC₅₀ variando entre 2 a 400 ug/mL de acordo com as espécies de fungo testado (Maximiano et al., 2021). Um estudo com a LTP de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) Ha-AP10, mostrou na concentração de 6,5mg, que esta LTP apresentava uma atividade antimicrobiana significativa com 50% de inibição quando testada contra fungos modelos, como o *Fusarium solani*. No entanto, o efeito de inibição não foi significativo quando testado com o fungo *Alternaria alternata* (Regente et al., 2000; Gonorazky et al., 2005). Em outro trabalho foi mostrado uma LTP isolada de sementes

de *Leonurus japonicus* Houtt (erva chinesa) nomeada de LjAMP2, que apresentou atividade contra vários fungos e várias bactérias testadas, porém alguns patógenos testados, tais como *Agrobacterium radiobacter* e *Escherichia coli*, não houve inibição (Yang et al., 2006). A LTP Ca-LTP1 encontrada em sementes de *C. annuum* mostrou um efeito inibitório no crescimento de *C. lindemuthianum*, *C. tropicalis* e *S. cerevisiae* na concentração de 400 µg/mL. A levedura *C. lindemuthianum* foi a mais suscetível em relação às outras (Diz et al., 2011). Esses dados corroboram com os aqui apresentados que mostram que as LTPs, em geral, podem causar inibição em maior ou menor concentração para os fungos testados.

As frações P1, P3, P4, P5, P6, P7 e P10 (figura 11) apresentaram diminuição da quantidade de unidades formadoras de colônias após o tratamento de 24 horas de incubação com as frações, tendo como efeito fungistático em células de *C. albicans* na concentração testada. Muitos AMPs identificados apresentam essa característica. O trabalho de Batista et al. (2014) apresenta uma proteína de ligação à quitina Mo-CBP3 de *Moringa oleifera* com características fungistáticas e fungicidas, pois quando testada na concentração de 0,5 mg/mL apresentou a capacidade de redução do crescimento micelial de *F. solani*, porém na concentração de 1,0 mg/mL ocorreu 100% de inibição micelial desse fungo. A proteína Mo-CBP3 se comporta como proteína fungicida e fungistático dependendo de sua concentração e do estágio de desenvolvimento do fungo *F. solani* (Batista et al., 2014). Em outro trabalho, uma LTP de *C. canephora* apresentou atividade fungicida *in vitro* contra *S. Cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, na concentração de 100 µg/mL (Zottich et al., 2011). Em frações de frutos de *C. chinense* (acesso 1706) foi sugerido o efeito fungistático das frações denominadas HI3, HI8 e HI14 contra *C. albicans* e *C. tropicalis* na concentração de 50 µg/mL (Ribeiro et al., 2022). Nos frutos de *C. annuum* também foi analisado a viabilidade celular na concentração de 100 µg/mL das frações proteicas F2, F3 e F4. As frações F2 e F4 induziram perda de viabilidade e F3 diminuiu o número de células viáveis e para *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* (Gebara et al., 2020). Os trabalhos apresentados, confirmam o efeito fungistático e possibilita a sugestão de testar as frações em outras diferentes concentrações para verificar se possuem efeito fungicida ou apenas fungistático.

A fim de avaliar os possíveis mecanismos de ação dessa LTP, feitos ensaios de permeabilização de membranas para a análise do efeito da LTP sobre a membrana da levedura *C. albicans*. Thevissen et al. (1999) mostraram usando o corante fluorescente de ácidos nucleicos SYTOX Green a permeabilização das membranas de *S. cerevisiae* quando esta encontra-se comprometida pelo tratamento com peptídeos. Em um

trabalho envolvendo uma LTP de girassol purificada (Ha-AP10) foi mostrado que esta quando usada para ensaios contra o patógeno fúngico *F. solani* apresentava também permeabilização de membrana como demonstrado pelo uso do corante SYTOX Green (Regente et al., 2000). Diz et al., (2006) mostraram também a propriedade das LTPs em permeabilizar membranas de células de *C. tropicalis*. Porém nesse trabalho não foi possível visualizar através dessa técnica a permeabilização da membrana fúngica, novos testes serão realizados para a confirmação.

Para a verificação da presença de ROS foi utilizado a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, visto que Bard et al. (2016), analisaram em células de diferentes fungos filamentosos tratadas com a proteína Cc-LTP2 um grande aumento de ROS após o tratamento. Mello et al. (2011) observaram que uma defensina PvD1 induziu a produção endógena de Ros em célula de *C. albicans*. Recentemente Taveira et al. (2022) avaliou o aumento na produção de ROS em células de *C. buinensis* e *C. tropicalis* quando tratadas com o peptídeo CaDef2.1G27-K4. Apesar da fração P10 não ter apresentado permeabilização de membranas e aumento de ROS (figura 12 e 13), pode ser que outros mecanismos de ação tenham efeito, sendo necessário novos testes.

Além da atividade antimicrobiana, as LTPs possuem capacidade inibitória da atividade de α -amilase, característica que auxilia na caracterização dessa família (Bard et al., 2015; Aguiéiras et al., 2021; Resende et al., 2021). Um dos primeiros autores a afirmarem a propriedade inibitória de α -amilase salivar humana da LTP em *Capsicum* foi Diz et al. (2006). Assim os autores sugeriram o papel que a LTP pode ter na defesa da planta contra insetos. Outro trabalho realizado por Silva et al. (2018) relata sobre a proteína LTP de *Vigna unguiculata* denominada de Vu-LTP quando testada com a enzima α -amilase salivar humana, demonstrou os aminoácidos carregados positivamente interagindo com o sítio ativo de α -amilase, sendo responsáveis pela inibição.

A literatura aborda LTPs com função inibitória enzimática, as frações de 1 à 10 foram testadas no ensaio de inibição da atividade de α -amilase do intestino de larvas do *T. molitor*, um inseto modelo de fácil obtenção da α -amilase. De acordo com o resultado do *western blotting* (figura 7) no qual confirma a presença de uma banda reagindo com o anticorpo para a família das LTPs, o valor elevado da atividade enzimática de α -amilase no P10 detectado, reforça que essa família de proteínas apresenta também como característica atividade inibitória para este grupo de enzimas (Diz et al., 2006).

Como parte do processo de purificação da banda detectada como LTP na fração P10, a qual apresentou similaridade com LTP do tipo I e LTP do tipo II de diferentes espécies de *Capsicum*, realizamos uma recromatografia em sistema de HPLC, usando novamente a coluna de fase reversa. A recromatografia resultou em três frações, as quais foram denominadas R1, R2 e R3 e que apresentaram massas moleculares entre 6,5 e 14,2 kDa na eletroforese (figura 14). Ao realizar o blotting foi visto a detecção de LTPs nas três frações, sugerindo que possam ser isoformas de LTPs, presentes nos três picos obtidos. Essas isoformas podem estar em sinergismo, já que ao realizar a atividade antifúngica dessas frações resultou em porcentagens não significativas na inibição do crescimento de *C. albicans*, sendo apresentada atividade antes na fração P10. O efeito sinérgico nas frações, foi descrito também por Diz et al. (2006), ao fracionar F1 com quase 100 % de inibição resultou na fração S3 que não teve atividade inibitória e S4 que mostrou atividade inibitória ao realizar o teste com *S. cerevisiae*. Esse efeito sinérgico pode ser apresentado entre peptídeos e outras proteínas, como exemplo, em tubérculos de batata o peptídeo isolado sanakin-1 (SN1) junto com a defensina (PTH1) de batata foi sinérgica contra a bactéria *Clavibacter michiganensis* (Segura et al., 1999). Uma LTP isolada de folhas de erva estrelada (*Arabidopsis thaliana*) quando combinada com tionina resultou em um efeito sinérgico contra o crescimento de fungos (Segura et al., 1993; Kader et al., 1996). Em outro trabalho foi mostrado a expressão combinada de quitinase de cevada (*Hordeum vulgare*) denominada chi-2 e LTP de trigo (*Triticum*), resultando no aumento da resistência a patógenos fúngicos foliares em plantas (Jayaraj et al., 2007).

Apesar das frações recromatografadas não terem apresentado inibição de crescimento da levedura, realizamos o ensaio de atividade inibitória da enzima α -amilase do intestino de *T. molitor*. As frações recromatografadas obtiveram valores significativos de inibição sendo 55% para R1, 72% para R2 e 93% para R3, ratificando a propriedade de inibição de α -amilase pelas proteínas dessa família (Diz et al., 2006).

Esse estudo possibilita ampliar as aplicações biotecnológicas futuras com a família de LTP.

6. CONCLUSÕES

- A fração obtida no extrato proteico de sementes de *C. chinense* apresentou peptídeos de baixa massa molecular, sendo detectada a presença de LTPs;
- As frações parcialmente purificadas apresentaram peptídeos de baixa massa molecular com inibição no crescimento de *C. albicans* e da atividade de α -amilase;
- A fração P10 apresenta um peptídeo com similaridade a família das LTP do tipo I e LTP do tipo II do gênero *Capsicum*;

- As fração do P10 não demonstrou resultado significativo para permeabilidade de membranas na concentração de 100 µg/mL quando tratadas com SYTOX Green;
- As frações obtidas do P10 não demonstraram resultado significativo de indução de espécies reativas de oxigênio na concentração de 100 µg/mL
- A partir do P10 foram obtidas três novas frações (R1, R2 e R3) as quais apresentavam prováveis isoformas relacionadas a LTPs e com atividade de inibição enzimática de α -amilase.

7. REFERÊNCIAS

- Abdullah, Z., Othman, A., Badjah, Y., Ahmed, H., Habila, M. A. and Ghafar, A. A. (2011). Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum* Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. **Molecules**, 16:8919–8929. <https://doi.org/10.3390/molecules16108919>
- Ageitos, J. M., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P. and Villa, T.G., (2017). Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. **Biochemical Pharmacology**, 133:117–138. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.018>
- Aguieiras, M. C. L., Resende, L. M., Souza T. A. M., Nagano, C. S., Chaves, R. P., Taveira, G. B., Carvalho, A. de O., Rodrigues, R., Gomes, V. M. and Mello, É. de O., (2021). Potent anti-*Candida* fraction isolated from *Capsicum chinense* fruits contains an antimicrobial peptide that is similar to plant defensin and is able to inhibit the activity of different α -amylase enzymes. **Probiotics Antimicrob Proteins**, 13:862–872. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09739-3>
- Ahmed, T. A. E. and Hammani, R., (2018). Recent insights into structure-function relationships of antimicrobial peptides. **Journal of Food Biochemistry**, 4:7. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12546>
- Amador, V. C., Santos-Silva, C. A., Vilela, L. M. B., Oliveira-Lima, M., Rêgo, M. de S., Roldan-Filho, R. S., Oliveira-Silva, R. L., Lemos, A. B., de Oliveira, W. D., Ferreira-Neto, J. R. C., Crovella, S. and Benko-Iseppon, A. M., (2021). Lipid Transfer Proteins (LTPs)—Structure, Diversity and Roles beyond Antimicrobial Activity. **Antibiotics**, 10:1281. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111281>
- Anaya-López, J. L., López-Meza, J.E., Baizabal-Aguirre, V.M., Cano-Camacho, H. and Ochoa-Zarzosa, A., (2006). Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. **Biotechnology Letters**, 28:1101–1108. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9060-4>
- Antcheva, N., Patthy, A., Athanasiadis, A., Tchorbanoy, B., Zakhariev, S., and Pongor S., (1996). Primary structure and specificity of a serine proteinase inhibitor from paprika (*Capsicum annuum*) seeds. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1298:95–101. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(96\)00121-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00121-5)

Asero, R., Piatanida, M., Pinter, E. and Pravettoni, V., (2018). The clinical relevance of lipid transfer protein. **John Wiley and Sons Ltd**, 48:6-18. Doi: 10.1111/cea.13053

Bard, G. C. V., Nascimento, V. V., Oliveira, A. E. A., Rodrigues, R., Cunha, M. Dias, G. B., Vasconcelos, I. M., Carvalho, A. de O. and Gomes, V. M., (2014). Vicilin-like peptides from *Capsicum baccatum* L. seeds are α -amylase inhibitors and exhibit antifungal activity against important yeasts in medical mycology. **Biopolymers**. 102:335-43 <https://doi.org/10.1002/bip>

Bard, G. C. V., Nascimento, V. V., Ribeiro, S. F. F., Rodrigues, R., Perales, J., Teixeira-Ferreira, A., Carvalho, A. de O., Fernandes, K. V. S., and Gomes, V. M., (2015). Characterization of Peptides from *Capsicum annuum* Hybrid Seeds with Inhibitory Activity Against α -Amylase, Serine Proteinases and Fungi. **Protein Journal**, 34:122–129. <https://doi.org/10.1007/s10930-015-9604-3>

Batista, A. B., Oliveira, J. T. A., Gifoni, J. M., Pereira, M. L., Almeida, M. G. G., Gomes, V. M., Da Cunha, M., Ribeiro, S. F. F., Dias, G. B., Beltramini, L. M., Lopes, J. L. S., Grangeiro, T. B. and Vasconcelos, I. M. (2014). New insights into the structure and mode of action of Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein of *Moringa oleifera* seeds. **Plos One**, 9:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111427>

Boparai J. K. and Sharma P. K., (2020). Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. **Protein and Peptide Letters**, 27:4–16. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>

Brito-Argaez, L., Moguel-Salazar, F., Zamudio, F., Gonzalez-Estrada, T. and Islas-Flores, I. (2009). Characterization of a capsicum chinense seed peptide fraction with broad antibacterial activity. **Asian Journal of Biochemistry**, 4: 77-87. Doi:10.3923/ajb.2009.77.87

Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A. and Vanderleyden, J., (1990). An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, 69:55–59. Doi:10.1016/0378-1097(90)90412-J

Cammue, B.P., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I.J., Proost, P., Damme, J. V., Osborn, R.W., Guerbet, F., Kader J. C. and Broekaert, W. F., (1995). A Potent

Antimicrobial Protein from Onion Seeds Showing Sequence Homology to Plant Lipid Transfer Proteins. **Plant Physiology**, 109:445– 455. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.445>

Campos, D. C. O., Costa, A. S., Lima, A. D. R., Silva, F. D. A., Lobo, M. D. P., Moneteiro-Moreira, A. C. O., Moreira, R. A., Leal, L. K. A. M., Miron, D., Vasconcelos, M. I. and Oliveira, H. D. (2016). First Isolation and Antinociceptive Activity of a Lipid Transfer Protein from Noni (*Morinda citrifolia*) Seeds. **International Journal Biological Macromolecules**, 86:71–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.029>

Campos, M. L., Souza, C. M., Oliveira, K. B. S., Dias, S. C. and Franco, L. O., (2018). The role of antimicrobial peptides in plant immunity. **Journal of Experimental Botany**, 69:4997–5011. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery294/5067520>

Carvalho, A. de O. and Gomes, V. M., (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-A concise review. **Peptides**, 28:1144–1153. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.03.004>

Carvalho, A. de O., Machado, O. L. T., Da Cunha, M., Santos, I. S. and Gomes, V. M. (2001). Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, 39:137–146. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01230-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01230-4)

Chen, C., Chen, G., Hao, X., Cao, B., Chen, Q., Liu, S. and Lei, J., (2011). Plant science CaMF2, an anther-specific lipid transfer protein (LTP) gene , affects pollen development in *Capsicum annuum* L . **Plant Science**, 181:439–448. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.07.003>

Corrêa, J. A. F., Evangelista, A. G., Nazaré, T. de M. and Luciano, F. B., (2019). Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. **Materialia**, 8:100494. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2019.100494>

Cruz, L. P., Ribeiro, S. F. F., Carvalho, A. de O., Vasconcelos, I. M., Rodrigues, R., Cunha, M. D., and Gomes, V. M., (2010). Isolation and Partial Characterization of a Novel Lipid Transfer Protein (LTP) and Antifungal Activity of Peptides from Chilli Pepper Seeds. **Protein & Peptide Letters**, 17:311–318. <https://doi.org/10.2174/092986610790780305>

Dias, G. B., Gomes, V. M., Pereira, U. Z., Ribeiro, S. F. F., Carvalho, A. de O., Rodrigues, R., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S., Ferreira, A. T. S., Perales, J. and Cunha, M., (2013). Isolation, Characterization and Antifungal Activity of Proteinase Inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. Seeds. **The Protein Journal**, 32:15–26. <https://doi.org/10.1007/s10930-012-9456-z>

Divyashree, M., Mani, M. K., Reddy, D., Kumavath, R., Ghosh, P., Azevedo, V. and Barh, D., (2019). Clinical Applications of Antimicrobial Peptides (AMPs): Where do we Stand Now?. **Protein and Peptide Letters**, 27:120–134. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190925152957>

Diz, M. S. S., Carvalho, A. de O., Rodrigues, R., Neves-ferreira, A. G. C., Cunha, M.D., Alves, E.W., Okorokova-façanha, A. L., Oliveira, M.A., Perales, J., Machado, O. L. T., and Gomes, V. M., (2006). Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et Biophysica**, 1760:1323–1332. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.04.010>

Diz, M. S., Carvalho, A. de O., Ribeiro, S. F. F., Cunha, M., Beltraminic, L., Rodrigues, R., Nascimento, V. V., Machado, O. L. and Gomes, V. M., (2011). Immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. **Physiologia Plantarum**, 142:233–246. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01464.x>

Do H. M., Lee S. C., Jung H. W., Sohn K. H. and Hwang B. K. (2004) Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. **Plant Science**, 166:1297–1305. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.01.008>

Edqvist, J., Blomqvist, K., Nieuwland, J. and Salminen, T. A., (2018). Plant lipid transfer proteins: are we finally closing in on the roles of these enigmatic proteins?. **Journal of Lipid Research**, 59:1374-1382. <https://doi.org/10.1194/jlr.R083139>

Elhoufi, A., Ahmadi, A., Mohammad, A., Asnaashari, H., Davarpanah, M. A., Bidgoli, B. F., Moghaddam, O. M., Torabi-Nami, M., Abbasi, S., El-Sobky, M., Ghaziani, A., Jarrahzadeh, M.

Finkina, E. I., Melnikova, D. N. and Bogdanov, I. V., (2016). Lipid Transfer Proteins as components of the plant innate immune system : Structure , functions , and applications. **Acta Naturae**, 8:47–61, 2016.

Franco, O. L., Rigden, D.J., Melo, F. R., Bloch Jr, C., Silva, C. P. and de Sá, M.F.G., (2000). Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, 267:2166–2173, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01199.x>

Games, P. D., da Silva, E. Q. G., Barbosa, M. de O., Almeida-Souza, H. O., Fontes, P. P., Magalhães Jr, M. J., Pereira, P. R. G., Prates, M. V., Franco, G.R., Faria-Campos, A., Campos, S. V. A. and Baracat-Pereira, M. C., (2016). Computer aided identification of a Hevein-like antimicrobial peptide of bell pepper leaves for biotechnological use. **BMC Genomics**, 17:999. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3332-8>

Garcia-Bustos, V., Cabanero-Navalon, M. D., Ruiz-Saurí, A., Ruiz-Gaitán, A. C., Salavert, M., Tormo, M. and Pemán, J., (2021). What do we know about candida auris? State of the art, knowledge gaps, and future directions. **Microorganisms**, 9:1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102177>

Gebara, R. da S., Taveira, G. B., dos Santos, L. de A., Calixto, S. D., Simão, T. L. V., Kaia, E. L., Muzitano, M. F., Teixeira- Ferreira, A., Peales, J., Rodrigues, R. Carvalho, A. de O. and Gomes, V. M., (2020). Identification and Characterization of Two Defensins from *Capsicum annuum* Fruits that Exhibit Antimicrobial Activity. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09647-6>

Gonorazky, A. G., Regente, M. C. and De La Canal, L., (2005). Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. **Journal of Plant Physiology**, 162:618–624. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.10.006>

H., Shahrami, R., Shirazian, F., Soltani., Yazdinejad, H. and Zand, F., (2014). Invasive candidiasis in critical care setting, updated recommendations from “Invasive Fungal Infections-Clinical Forum”, Iran. **World Journal of Critical Care Medicine**, 3:102–113. <https://doi.org/10.5492/wjccm.v3.i4.102>

Houlné G., Meyer B. and Schantz R. (1998) Alteration of the expression of a plant defensin gene by exon shuffling in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **Molecular Genetics and Genomics**, 259:504–510. <https://doi.org/10.1007/s004380050841>

Hung, C. Y., Kao, K., Wang, P., Hu, H., Hsieh, M., Fu, Y., Chang, C., Li, L. F., Huang, C., Tsai, Y. and Yang, C., (2012). Invasive fungal infection among hematopoietic stem cell transplantation patients with mechanical ventilation in the intensive care unit. **BMC Infectious Diseases**, 1471:12-44. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-44>

Jayaraj, J., and Punja, Z. K. (2007). Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. **Plant Cell Reports**, 26: 1539–1546. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0368-x>

Jung, H. W., Kim, W., and Hwang, B. K., (2003). Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. **Plant, Cell and Environment**, 26:915–928. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01024.x>

Kader, J. C. (1996). Lipid- transfer proteins in plants. **Plant Physiology**, 47:627-54.

Kader, J. C., (1975). Proteins and the intracellular exchange of lipids. **Biochimica et Biophysics Acta**, 380:31-44.

Kader, J. C., Julienne, M. and Vergonolle, C., (1984). Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. **European Journal Biochemistry**, 134:411-416. doi: 10.1111/j.14321033.1984.tb08020.x

Kristensen, A.K., Brunstedt J., Nielsen, K. K., Roepstorff, P. and Mikkelsen, J. D., (2000). Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. **Plant Science**, 155:31– 40. Doi: 10.1016/s0168-9452(00)00190-4

Lamoth, F., Lockhart, S. R., Berkow, E. L. and Calandra, T., (2018). Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 73: i4–i13. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx444>

Lee S.C., Hong J.K., Kim K.D. and Hwang B.K. (2000) Pepper gene encoding thionin is differentially induced by pathogens, ethylene and methyl jasmonate. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 56:207–216. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0269>

Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C. and Yang, X., (2021). Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. **Botanical Studies**, 62. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>

Lima, M. F., S.I.C. Carvalho, C.F. Ragassi, L.B. Bianchetti, F.G. Faleiro and F.J.B. Reifschneider (2017). Characterization of a pepper collection (*Capsicum frutescens* L .) from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 16:1–18.

Lin, P., Xia, L., and Nga, T. B., (2007). First isolation of an antifungal lipid transfer peptide from seeds of a *Brassica* species. **Peptides**, 28:1514–1519. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.06.028>

Liu, K., Jiang, H., Watkins, S. L. M. C. B. and Jahn, M. M., (2006). Isolation and characterization of a lipid transfer protein expressed in ripening fruit of *Capsicum chinense*. **Plant**, 223:672–683. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0120-0>

Liu, Y-J., Samuel, D., Lin, C-H. and Lyu, P-C., (2002). Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 294:535-540. Doi: 10.1016/S0006-291X(02)00509-0

Maarof E., Harun S., Mohamed-Hussein Z. A., Ismail E., Jumali S. and Zainal Z. (2011) Cloning and heterologous expression of CDefl, a ripening induced defensin from *Capsicum annuum*. **Australian Journal of Crop Science**, 5:271-276.

Maracahipes, Á. C., Taveira, G. B., Mello, É. de O., Carvalho, A. de O., Rodrigues, R., Perales, J., Teixeira-Ferreira, A., Silva, M. S., Rocha, G. L., Fernandes, K. V. S. and Gomes, V. M., (2019). Biochemical analysis of antimicrobial peptides in two different *Capsicum* genotypes after fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Bioscience Reports**, 39. <https://doi.org/10.1042/BSR20181889>

Maximiano, M. R., Mello, É. De O., Aguiéiras, M. C. de L., Nagano, C. S., Chaves, R. P., Taveira, G. B., Silva, M. S., Carvalho, A. de O., Rodrigues, R. and Gomes, M. V., (2021) Peptides Biotechnological applications of versatile plant lipid transfer proteins (LTPs). **Peptides**, 140. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170531>

Mello, E. O., Ribeiro, S. F.F., Carvalho, A. O., Santos, I. S., Cunha, M., Santa-Catarina, C. and Gomes, V. M., (2011). Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in 16 fungi cells. **Current Microbiology**, 62:1209–1217. Doi: 10.1007 / s00284-010-9847-3

Meyer B., Houlne G., Pozueta-Romero J., Schantz M. L. and Schantz R. (1996) Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper: Upregulation during ripening and upon wounding. **Plant Physiology**, 112:615–622. <https://doi.org/10.1104/pp.112.2.615>

Mishra M., Joshi R.S., Gaikwad S., Gupta V.S. and Giri AP (2013) Structural-functional insights of single and multi-domain *Capsicum annuum* protease inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 430:1060–1065. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.038>

Molina, A., Segura, A. and García-Olmedo, F., (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. **FEBS Lett**, 316:119–22. Doi: 10.1016/0014-5793(93)81198-9

Moulin, M. M., Rodrigues, R., Ribeiro, S., Gonçalves, L., Bento, C. S., Sudré, C. P., Vasconcelos, I. M. and Gomes, V. M., (2014). Trypsin inhibitors from *Capsicum baccatum* var. Pendulum leaves involved in pepper yellow mosaic virus resistance. **Genetics and Molecular Research**, 13:9229–9243. <https://doi.org/10.4238/2014>.

Nawrot, R., Józefiak, D., Sip, A., Kuzma, D., Musidlak, O. and Gozdzicka-Józefiak, A., (2018). Isolation and Characterization of a Non-Specific Lipid Transfer Protein from *Chelidonium majus* L. Latex. **International Journal of Biological Macromolecules**, 104:554–563. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.057

Nazeer, M., Waheed, H., Said, M., Ali, S. Y., Choudhary, M. I., Ui-Haq, Z and Ahmed, A., (2019). Purification and Characterization of a Nonspecific Lipid Transfer Protein 1 (NsLTP1)

from Ajwain (*Trachyspermum ammi*) Seeds. **Scientific Reports**, 9:4148. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40574-x>

Nikte S., Gahankari S., Mulla J., Sengupta D., Joshi M. and Tamhane V. (2019) *In vitro* and *in silico* studies on membrane interactions of diverse *Capsicum annuum* flower γ -thionin peptides. **Proteins**, 88:227–236, 2019. <https://doi.org/10.1002/prot.25791>

Odintsova, T. I., Slezina, M. P., Istomina, A. E., Korostylev, T. V., Kovtun, A. S., Kasianov, A. S., Shcherbakova, L. A. and Kudryavtsev, A. M., (2019). Non-Specific Lipid Transfer Proteins in *Triticum kiharae* Dorof. et Migush.: Identification, Characterization and Expression Profiling in Response to Pathogens and Resistance Inducers. **Pathogens**, 8:221. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040221>

Oh, B. J., Ko, M. K., Kostenyuk, I., Shin, B. and Kim K. S., (1999). Coexpression of a defensin gene and a thionin-like gene via different signal transduction pathways in pepper and *Colletotrichum gloeosporioides* interactions. **Plant Molecular Biology**, 41:313–319. <https://doi.org/10.1023/A:1006336203621>

Oliveira, A. P. B. F., Resende, L. M., Rodrigues, R., Mello, É. de O., Taveira, G. B., de Oliveira Carvalho, A., & Gomes, V. M., (2022). Antimicrobial peptides of the genus *Capsicum*: a mini review. **Horticulture Environment and Biotechnology**, 63:453–466. <https://doi.org/10.1007/s13580-022-00421-x>

Paege, N., Warnecke, D., Zäuner, S., Hagen, S., Rodrigues, A., Baumann, B., Thiess, M., Jung, S., & Meyer, V., (2019). Species-Specific Differences in the Susceptibility of Fungi to the Antifungal Protein AFP Depend on C-3 Saturation of Glycosylceramides. **MSphere**, 4:1–15. <https://doi.org/10.1128/msphere.00741-19>

Parisi, K., Shafee, T. MA., Quimbar, P., Weerden, N, L., Bleakley, M. R. and Anderson M. A., (2019). The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 88:107–118. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.02.004>

Regente, M. C. and De la Canal, L., (2000). Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Physiologia Plantarum**, 110: 158–163. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.110203.x>

Resende, L. M., Mello, É. De O., Aguiéiras, M. C. L., Nagano, C. S., Chaves, R. P., Taveira, G. B., da Silva, M. S., Carvalho, A. de O., Rodrigues, R. and Gomes, V. M., (2021). Inhibition of Serine Protease, α -Amylase and Growth of Phytopathogenic Fungi by Antimicrobial Peptides from *Capsicum chinense* Fruits. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09865-6>

Ribeiro, M. C., Gebara, R. S., Taveira, G. B., Carvalho, A. de O., Rodrigues, R., Mello, É. de O., Nagano, C. S., Chaves, R. P., and Gomes, V. M., (2022). Anti-Candida Potential of Peptides from Immature and Ripe Fruits of *Capsicum chinense* Jacq. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09968-8>

Ribeiro, S. F. F., Agizzio, A. P., Machado, O. L. T., Neves-Ferreira, A. G. C., Oliveira, M. A., Fernandes, K. V. S., Carvalho, A. O., Perales, J., and Gomes, V. M., (2007). A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: Partial characterization and antifungal activity. **Scientia Horticulturae**, 111:399–405. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.11.004>

Ribeiro, S. F. F., Taveira, G. B., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., Rodrigues, R., and Gomes, V. M. (2012). Antifungal and Other Biological Activities of Two 2S Albumin-Homologous Proteins Against Pathogenic Fungi. **The Protein Journal**, 31:59–67. <https://doi.org/10.1007/s10930-011-9375-4>

Rogozhin, E. A., Ryazantsev, D. Y., Grishin, E.V., Egorov, T. A. and Zavriev, S.K., (2012). Defense peptides from barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* L.) seeds. **Peptides**, 38: 33–40, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.009>

Santos-silva, C. A., Zupin, L., Oliveira-lima, M., Vilela, L. M. B., Bezerra-neto, J. P., Ferreira-neto, J. R., Ferreira, J. D. C., Oliveira-silva, R. L., Pires, C. de J., Aburjaile, F. F., de Oliveira, M. F., Kido, E. A., Crovella, S., and Benko-iseppon, A. M., (2020). Plant Antimicrobial Peptides : State of the Art , In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era. **Bioinformatics and Biology Insights**, 14:1–22. <https://doi.org/10.1177/1177932220952739>

Schägger, H. and Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, 166:368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)

Schmitt, A. J., Sathoff, A. E., Holl, C., Bauer, B., Samac, D. A. and Carter, C. J. (2018). The major nectar protein of *Brassica rapa* is a non-specific lipid transfer protein, BrLTP2.1, with strong antifungal activity. **Journal of Experimental Botany**, 69:5587–5597. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery319>

Segura, A., Moreno, M. and García-Olmedo, F., (1993). Purification and Antipathogenic Activity of Lipid Transfer Proteins (LTPs) from the Leaves of *Arabidopsis* and Spinach. **FEBS Letters**, 332:243–246. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80641-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80641-7)

Silva, F. C. V., Nascimento, V. V., Machado, O. L. T., Pereira, L. S., Gomes, V. M and Carvalho, A. de O., (2018). Insight of the α -Amylase Inhibitory Activity of Plant Lipid Transfer Proteins. **Journal of Chemical information and modeling**. Doi: 10.1021/acs.jcim.8b00540

Silva, M. S., Gomes, V. M., Taveira, G. B., dos Santos, L. A., Maracahipes, Á. C., Rodrigues, R., Carvalho, A de O., Fernandes, K. V. S., and Oliveira, A. E. A., (2020). Bifunctional Inhibitors from *Capsicum chinense* Seeds with Antimicrobial Activity and Specific Mechanism of Action Against Phytopathogenic Fungi. **Protein and Peptide Letters**, 28:149–163. <https://doi.org/10.2174/0929866527666200617124221>

Silva, M. S., Ribeiro, S. F. F., Taveira, G. B., Rodrigues, R., Fernandes, K. V. S., Carvalho, A. de O., Vasconcelos, I. M., Mello, É, de O. and Gomes, V. M. (2017). Application and bioactive properties of CaTI, a trypsin inhibitor from *Capsicum annuum* seeds: membrane permeabilization, oxidative stress and intracellular target in phytopathogenic fungi cells. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97:3790–3801. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8243>

Silvar, C., and García-González, C. A., (2017). Scientia Horticulturae Screening old peppers (*Capsicum* spp.) for disease resistance and pungency-related traits. **Scientia Horticulturae**, 218:249–257. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.037>

Smith, P. K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk D. C., (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, 150:76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

Sinha, R. and Shukla, P. (2018). Antimicrobial Peptides: Recent Insights on Biotechnological

Interventions and Future Perspectives. **Protein and Peptide Letters**, 26:79–87. <https://doi.org/10.2174/0929866525666181026160852>

Souza, G. S., do Nascimento, V. V., de Carvalho, L. P., de Melo, E. J. T., Fernandes, K. V., Machado, O. L. T., Retamal, C. A., Gomes, V. M. and Carvalho, A. de O. (2013). Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, 135:116–125. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.005>

Tam, J., Wang, S., Wong, K. H., and Tan, W. L., (2015). Antimicrobial Peptides from Plants. **Pharmaceuticals**, 8:711–757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>

Tamhane, V. A., Chougule, N. P., Giri, A. P., Dixit, A. R., Sainani, M. R. and Gupta, V. S., (2005). *In vivo* and *in vitro* effect of *Capsicum annuum* proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteinases. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1722:156–167. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.12.017>

Taveira, G. B., Carvalho, A. de O., Rodrigues, R., Trindade, F. G., Cunha, M. and Gomes, V. M., (2016). Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species. **BMC Microbiology**, 16:1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0626-6>

Taveira, G. B., Da Motta, O. V., Machado, O. L. T., Rodrigues, R., Carvalho, A. de O., Teixeira-Ferreira, A., Perales, J., Vasconcelos, I. M. and Gomes, V. M., (2014). Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. **Biopolymers - Peptide Science Section**, 102:30–39. <https://doi.org/10.1002/bip.22351>

Taveira, G. B., Mello, É. De O., Carvalho, A. de O., Regente, M., Pinedo, M., La Canal, L., Rodrigues, R. and Gomes, V. M., (2017). Antimicrobial activity and mechanism of action of a thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits and combinatorial treatment with fluconazole against *Fusarium solani*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 108. Doi: 10.1002 / bip.23008.

Taveira, G. B., Mello, É. de O., Simão, T. L. B. V., Cherene, M. B., de Oliveira Carvalho, A., Muzitano, M. F., Lassounskaia, E., Pireda, S., de Castro Miguel, E., Basso, L. G. M., Da Cunha, M., da Motta, O. V., and Gomes, V. M., (2022). A new bioinspired peptide on defensin from *C. annuum* fruits: Antimicrobial activity, mechanisms of action and therapeutical potential. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 1866.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130218>

Terras, F. R. G., Goderis, I. J., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. and Broekaert, W. F. (1992). In Vitro antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus* L) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins. **Plant Physiology**, 100:1055–1058. <https://doi.org/10.1104/pp.100.2.1055>

Thevissen, K., Terras, F. R. G. and Broekaert, W. F., (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, 65:5451–5458. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.12.5451-5458.1999>

Towbin, H. and Gordon, J., (1984). Immunoblotting and dot immunobinding- Current status and outlook. **Journal of Immunological Methods**, 72:313-340. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(84\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(84)90001-2)

Wang, S.Y., Wu, J. H., Ng, T. B., Ye, X. Y. and Rao, P. F., (2004). A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. **Peptides**, 25:1235–42. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.06.004>

Yang, X., Li, J., Li, X., She, R., Pei. Y., (2006). Isolation and characterization of a novel thermostable nonspecific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. **Peptides**, 27:3122–3128. Doi: 10.1016/j.peptides.2006.07.019

Zaman, U., and Abbasi, A., (2009). Purification and Characterization of a Nonspecific Lipid 2 Transfer Protein from *Cuminum cyminum*. **Phytochemistry**, 70:979–987. Doi: 10.1016/j.phytochem.2009.04.021

Zottich, U., Da, M., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Silva, N. C. M., Santos, I. S., Viviane, V., Miguel, E. C., Machado, O. L. T. and Gomes, V. M. (2011). Biochimica et Biophysica Acta Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. **BBA - General Subjects**, 1810:375–383. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.12.002>