

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PEPTÍDEOS DE FRUTOS DE *Capsicum chinense* Jacq.

MARIANA CARVALHO DE LIMA AGUIEIRAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MAIO - 2022

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PEPTÍDEOS DE FRUTOS DE *Capsicum chinense* Jacq.

MARIANA CARVALHO DE LIMA AGUIEIRAS

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: Valdirene Moreira Gomes

Coorientadora: Érica de Oliveira Mello

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

A282

Aguieiras, Mariana Carvalho de Lima.

Caracterização e atividade antimicrobiana de peptídeos de frutos de *Capsicum chinense* Jacq / Mariana Carvalho de Lima Aguieiras. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

72 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022.

Orientadora: Valdirene Moreira Gomes.

Coorientadora: Erica de Oliveira Mello.

1. Defensina. 2. AMP. 3. Fungos. 4. *Candida*. 5. Pimenta. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PEPTÍDEOS DE FRUTOS DE *Capsicum chinense* Jacq.

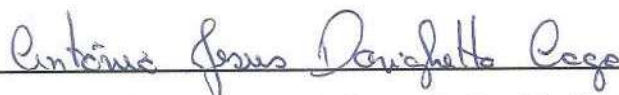
MARIANA CARVALHO DE LIMA AGUIEIRAS

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 30 de maio de 2022.



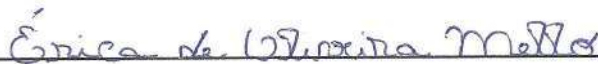
Prof.ª Antônia Elenir Amâncio Oliveira (D. Sc. Biociências e Biotecnologia) – UENF



Dr. Antônio Jesus Dorighetto Cogo (D. Sc. Biociências e Biotecnologia) – UFRJ



Prof. Celso Shiniti Nagano (D. Sc. Bioquímica e Biologia Molecular) – UFC



Prof.ª Érica de Oliveira Mello (D. Sc. Biociências e Biotecnologia) – UENF

Co-orientadora



Prof.ª Valdirene Moreira Gomes (D. Sc. Ciências – Biologia Molecular) – UENF

Orientadora

AGRADECIMENTOS

Deus: a ti agradeço pela minha vida, minha saúde nesse momento tão difícil que passamos e por ser meu confidente nos momentos mais difíceis que não foram poucos.

Agradeço à UENF, o programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e aos órgãos de fomento FAPERJ e UENF pela bolsa e financiamento da pesquisa.

À minha orientadora, professora Valdirene Moreira Gomes por ter me guiado durante essa pesquisa, por ter auxiliado na publicação do meu artigo e por ter oferecido suporte nas mais diversas necessidades ao longo deste período. E à minha coorientadora, professora Érica de Oliveira Mello, por estar sempre disponível para me auxiliar com ideias e me dado foco necessário nos momentos de incerteza.

Agradeço ao Dr. Antônio Jesus Dorighetto Cogo, a professora Dr.^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira e o professor Dr. Celso Shiniti Nagano por terem se disponibilizado e gentilmente aceitado participar desse momento tão importante para mim, compondo a banca da dissertação de mestrado.

Agradeço a todos do LFBM pela simpatia, boa convivência e solicitude, sem restrição. Aos técnicos Luiz, Valéria e Noil que convivi diariamente e disponibilizaram através de seus serviços o que eu precisava para realizar minha pesquisa. Aos alunos dos grupos da Prof^a. Valdirene e do Prof. André por serem solícitos quando eu precisava de ajuda e principalmente assim que entrei e precisava aprender de tudo um pouco.

Agradeço minha amiga Thaynã que foi a pessoa que mais me orientou na bancada, sempre solícita, me ajudando até com coisas simples nos dias mais difíceis e que me deu apoio sempre que necessário. Mais uma vez, não sei como teria finalizado esse trabalho sem você. Ao Gabriel por ter sido solícito e se disponibilizado para me ajudar nas microscopias de fluorescência e os ensinamentos passados. Ao Fabrício e o professor Dr. Thiago Motta Venâncio por toparam sem qualquer hesitação realizarem uma colaboração fazendo análises de bioinformática que enriqueceram esse estudo. Agradeço a professora Dr.^a Maura da Cunha por ceder um notebook para que eu finalizasse a escrita desta dissertação, foi muito importante em um momento muito necessário. Ao professor Jorge Petreski por ter gentilmente cedido um coletor de frações para cromatografia e disponibilizado outros equipamentos de seu laboratório, tornando minha pesquisa mais eficiente e dinâmica, além de estar presente nos momentos mais estressantes e me ajudado, seja com uma conversa ou um chá. À Lucinha, Rodrigo e Kíssila por ajudarem quando precisei e por tornarem o ambiente de trabalho mais divertido. À Larissa por estar solícita para esclarecer dúvidas e por ter sido minha parceira de pesquisa. Agradeço à Layrana e Marciele, por estarem sempre dispostas a tirar dúvidas.

Agradeço à minha família por me dar o suporte e apoio necessário desde sempre. Espero que estejam orgulhosos do que alcancei até então, amo vocês. Aos amigos Amanda, Douglas, Jéssica, Laura, Luana e Thaynã por estarem disponíveis para ouvir meus desabaços e também para me lembrarem que vida social existe. Aos amigos que fiz nos mais diversos lugares que me alegraram e me ouviram nos momentos mais difíceis desse período de reclusão. Ao Ícaro por ser um ótimo namorado, se preocupar, me ouvir e ajudar no que podia. Por fim, todos que ajudaram na minha formação pessoal e acadêmica registro a minha gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS, ESQUEMAS E TABELAS	10
ABREVIATURAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Doenças causadas por fungos e a resistência fúngica	13
1.2. Peptídeos antimicrobianos de plantas	15
1.3. Defensinas de plantas	16
1.3.1. Características estruturais	17
1.3.2. Atividade biológica	18
1.3.3. Mecanismos de ação	20
1.4. Gênero <i>Capsicum</i>	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. METODOLOGIA	25
3.1. Materiais Biológicos	25
3.1.1. Sementes	25
3.1.2. Microrganismos	25
3.2. Obtenção de mudas e cultivos de plantas	25
3.3. Extração proteica de frutos de <i>Capsicum chinense</i>	25
3.4. Cromatografia de troca aniônica DEAE – Sepharose	27
3.5. Cromatografia de exclusão molecular Sephadex® G50 fine Sigma	27
3.6. Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC	28
3.7. Quantificação de proteínas	28
3.8. Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS	28
3.9. Identificação dos aminoácidos por espectrometria de massas	29
3.10. Modelagem de estrutura terciária	29
3.11. Previsão <i>in silico</i> do potencial de penetração celular	29
3.12. Ensaio de inibição da atividade α -amilásica	30
3.13. Ensaio de inibição de crescimento de fungos filamentosos dos gêneros <i>Colletotrichum</i> e <i>Fusarium</i>	30

3.14.	Inibição do crescimento de leveduras.....	31
3.15.	Efeito das frações proteicas sobre a permeabilização de membrana das células fúngicas.....	31
3.16.	Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células fúngicas	32
3.17.	Análise de viabilidade celular	32
3.18.	Análise estatística	32
4.	RESULTADOS	34
4.1.	Fracionamento de peptídeos do extrato total de frutos de <i>C. chinense</i>	34
4.2.	Fracionamento de peptídeos da fração não retida D1 obtida na cromatografia de troca aniônica	34
4.3.	Análise da sequência de aminoácidos presente na fração F3.....	35
4.4.	Fracionamento de peptídeos da fração F3 obtida na cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC	36
4.5.	Análise da sequência de aminoácidos presente na fração H8	37
4.6.	Modelo da estrutura terciária de CcDef3.....	38
4.7.	Predição do potencial de interação com membranas	38
4.8.	Ensaio de inibição da atividade de α -amilase salivar.....	38
4.9.	Efeito da fração F3 sobre o crescimento fúngico dos fungos filamentosos dos gêneros <i>Fusarium</i> e <i>Colletotrichum</i>	39
4.10.	Efeito da fração F3 sobre a permeabilização de membranas e viabilidade celular	40
4.11.	Efeito da fração F3 sobre o aumento da produção endógena de ROS em fungos filamentosos	42
4.12.	Efeito da fração F3 sobre o crescimento fúngico de leveduras	42
4.13.	Efeito da fração F3 sobre a permeabilização de membranas de leveduras	45
4.14.	Efeito da fração F3 sobre o aumento da produção endógena de ROS em leveduras	49
4.15.	Análise de viabilidade celular	52
5.	DISCUSSÃO	54
6.	CONCLUSÕES	61
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) de plantas apresentam grande potencial antimicrobiano, amplo espectro de atividade inibitória, baixa citotoxicidade nas células de mamíferos e ação sinérgica com outros peptídeos e antibióticos convencionais. Nos últimos anos, devido à seleção de um número cada vez maior de patógenos resistentes a diversos compostos, esses peptídeos têm despertado a atenção de muitos pesquisadores na tentativa de se desenvolver novos agentes de controle de doenças. O objetivo principal deste trabalho é avaliar a atividade antifúngica dos peptídeos de frutos de *Capsicum chinense* Jacq. (acesso UENF 1751), bem como determinar o seu possível mecanismo de ação sobre fungos fitopatogênicos e leveduras. Inicialmente os peptídeos foram purificados através de processos cromatográficos sucessivos e uma defensina foi caracterizada a partir da fração F3 através da espectrometria de massas. A sequência da defensina nomeada CcDef3 (defensina 3 de *C. chinense*) foi utilizada em análises de bioinformática, sua estrutura terciária foi obtida e realizada predição sobre seu efeito nas membranas celulares que indicou que a defensina não consegue permeabilizar membranas. Em seguida foi realizado teste da atividade amilásica na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a fração F3 inibiu a enzima α -amilase da saliva humana em 100%. Posteriormente, foram dedicados testes para a atividade antifúngica com a amostra F3 utilizando fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum* e *Fusarium*. Uma maior inibição do crescimento foi visualizada para o fungo *C. lindemuthianum* de 51% e 60,9% nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ensaio de permeabilização de membrana e de indução de ROS endógena com a fração F3 na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ mostraram que apenas *F. solani* apresentou indução de ROS endógeno. Também foi analisada a capacidade da fração F3 de inibir o crescimento de leveduras do gênero *Candida*. As leveduras *C. bracarensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. parapsilosis* e *C. pelliculosa* foram testadas e apresentaram inibição significativa na presença da fração F3 de 95,4; 76,5; 95,4; 12,7 e 73,7% nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e inibição de 97,5; 99,7; 98,2; 88,4 e 91,6% na de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. No ensaio de permeabilização de membrana, *C. bracarensis* obteve o melhor resultado causando permeabilização em até 55,5% das células testadas, sendo que destas 48,1% foram marcadas como células necróticas. No ensaio de ROS não houve resultado significativo nas células testadas. A análise de viabilidade celular indicou que a fração F3 estudada é fungicida e as leveduras *C. nivariensis* e *C. bracarensis* tiveram maior perda de viabilidade, 93,8% e 79,6% respectivamente.

Palavras-chaves: Defensina, pimenta, atividade antifúngica, AMP.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) from plants have great antimicrobial potential, broad spectrum of inhibitory activity, low cytotoxicity in mammalian cells and synergistic action with other peptides and conventional antibiotics. In recent years, due to the selection of an increasing number of pathogens resistant to different compounds, these peptides have attracted the attention of many researchers in an attempt to develop new disease control agents. The main objective of this work is to evaluate the antifungal activity of peptides from fruits of *Capsicum chinense* Jacq. (UENF accession 1751), as well as to determine its possible mechanism of action on phytopathogenic fungi and yeasts. Initially the peptides were purified through successive chromatographic processes and a defensin was characterized from the F3 fraction through mass spectrometry. The defensin sequence named CcDef3 (*C. chinense* defensin 3) was used in bioinformatics analyses, its tertiary structure was obtained and a prediction was made about its effect on cell membranes, which indicated that defensin was not able to permeabilize membranes. Amylase activity test was then performed at a concentration of 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, the F3 fraction inhibited the α -amylase enzyme of human saliva by 100%. Subsequently, tests were dedicated to the antifungal activity with the sample, using phytopathogenic fungi of the genus *Colletotrichum* and *Fusarium*. A greater inhibition of growth was seen for the fungus *C. lindemuthianum* of 51% and 60.9% at concentrations of 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Membrane permeabilization and endogenous ROS induction assays with the F3 fraction at a concentration of 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ showed that only *F. solani* showed endogenous ROS induction. The ability of the F3 fraction to inhibit the growth of *Candida* yeasts was also analyzed. The yeasts *C. braccarensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. parapsilosis* and *C. pelliculosa* were also tested and showed significant inhibition in the presence of the F3 fraction of 95.4; 76.5; 95.4; 12.7 and 73.7% at concentrations of 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and inhibition of 97.5; 99.7; 98.2; 88.4 and 91.6% at 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. In the membrane permeabilization assay, *C. braccarensis* obtained the best result causing permeabilization in up to 55.5% of the cells tested, of which 48.1% were marked as necrotic cells. In the ROS assay, there was no significant result in the cells tested. The cell viability analysis indicated that the F3 fraction studied is fungicidal and the yeasts *C. nivariensis* and *C. braccarensis* had a greater loss of viability, 93.8% and 79.6% respectively.

Keywords: Defensin, pepper, antifungal activity, AMP.

LISTA DE FIGURAS, ESQUEMAS E TABELAS

Figura 1. Representação das classes estruturais de defensinas.

Figura 2. Modelos de mecanismos de ação utilizados pelas defensinas. Os dois principais modelos: Modelo de carpete e modelo poro toroidal estão exemplificados na imagem.

Figura 3. Frutos de *Capsicum chinense* (acesso UENF 1751).

Figura 4. Cromatografia DEAE-Sepharose da extração proteica *C. chinense* e Eletroforese das frações D1 e D2.

Figura 5. Cromatograma obtido após cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G50 e visualização eletroforética do gel de tricina na presença de SDS das frações obtidas após precipitação com nitrato de prata.

Figura 6. Atividade de α -amilase salivar humana na presença e ausência de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração F3.

Figura 7. Alinhamento de resíduos de aminoácidos do peptídeo de aproximadamente 6,5 kDa da fração F3 obtido por cromatografia de exclusão molecular.

Figura 8. Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em HPLC e perfil eletroforético do gel de tricina na presença de SDS dos picos coletados.

Figura 9. Alinhamento de resíduos de aminoácidos do peptídeo de aproximadamente 6,5 kDa da fração H8B obtido por cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC.

Figura 10. Predição *in silico* da estrutura terciária da defensina CcDef3 gerada pelo Mol*Viewer.

Figura 11. Efeito da inibição do crescimento fúngico na ausência (controle) e na presença da fração F3 obtida de frutos de *C. chinense* (acesso UENF 1751) nas concentrações de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, registrada após 48 horas nos fungos filamentosos.

Figura 12. Imagens das células dos fungos filamentosos *Colletotrichum lindemuthianum* (A) e *Fusarium solani* (B) após ensaio de permeabilização de membrana com a sonda fluorescente SYTOX Green e de viabilidade celular com Iodeto de propídio (IP).

Figura 13. Imagem das hifas de fungos filamentosos de *Colletotrichum lindemuthianum* (A) e *Fusarium solani* (B) após ensaio para detecção de aumento endógeno de ROS.

Figura 14. Efeito da inibição do crescimento de leveduras na ausência (controle) e na presença da fração F3 obtida de frutos de *C. chinense* (Acesso UENF 1751) nas concentrações de 100 µg.mL⁻¹ e 200 µg.mL⁻¹.

Figura 15. Imagens das células das leveduras *C. braccarensis* (A) e *C. glabrata* (B) após ensaio de permeabilização de membrana com a sonda fluorescente SYTOX Green e de viabilidade celular com iodeto de propídio (IP).

Figura 16. Imagens das células das leveduras *C. nivariensis* (A) e *C. parapsilosis* (B) após ensaio de permeabilização de membrana com a sonda fluorescente SYTOX Green e de viabilidade celular com iodeto de propídio (IP).

Figura 17. Imagens das células das leveduras *C. pelliculosa* após ensaio de permeabilização de membrana com a sonda fluorescente SYTOX Green e de viabilidade celular com iodeto de propídio (IP).

Figura 18. Imagem das células das leveduras *C. braccarensis* (A) e *C. glabrata* (B) após ensaio para detecção de aumento endógeno de ROS com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA).

Figura 19. Imagem das células das leveduras *C. nivariensis* (A) e *C. parapsilosis* (B) após ensaio para detecção de aumento endógeno de ROS com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA).

Figura 20. Imagem das células da levedura *C. pelliculosa* após ensaio para detecção de aumento endógeno de ROS com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA).

Figura 21. Viabilidade celular das leveduras do gênero *Candida*.

Esquema 1. Etapas do processo de extração proteica dos frutos de *C. chinense* (acesso UENF 1751).

Tabela 1. Lista de defensinas e seus patógenos suscetíveis.

Tabela 2. Porcentagem de células fluorescentes na presença das sondas SYTOX Green (SG) e iodeto de propídio (IP) das amostras obtidas após ensaio de permeabilização da membrana plasmática.

Tabela 3. Porcentagem de células fluorescentes na presença da sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) das amostras obtidas após ensaio de aumento da produção endógena das espécies reativas de oxigênio (ROS).

ABREVIATURAS

AMPs - Peptídeos antimicrobianos

Bisacrilamida - N',N'-metileno bisacrilamida

BOD - Do inglês, biochemical oxygen demand (BOD), câmara especial para analisar e incubar testes de longa duração

CcDef3 - Defensina 3 de *Capsicum chinense*

DEAE - Dietilaminoetil

DIC - Contraste de interferência diferencial

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

F3 - Fração proveniente da cromatografia de exclusão molecular a partir da fração D1 obtida da cromatografia de troca aniônica obtida de frutos maduros de *C. chinense*

H8 - Fração obtida na cromatografia de fase reversa em HPLC a partir da fração F3

H10 - Fração obtida na cromatografia de fase reversa em HPLC a partir da fração F3

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

H₂DCFDA - 2',7'-diclorofluoresceína diacetato

IP - Iodeto de propídio

kDa - Quilodaltons

LTP - Proteína transferidora de lipídeos

µg - Microgramas

µL - Microlitros

mL - Mililitros

M - Molar

nm - Nanômetro

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SG - SYTOX Green

TFA - Ácido trifluoroacético

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

UFC - Unidade formadora de colônia

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças causadas por fungos e a resistência fúngica

As doenças fúngicas têm um enorme impacto nas plantas, animais e seres humanos. Eles destroem as culturas agrícolas (PENNISI, 2010), ameaçam a extinção da vida selvagem (FISHER et al., 2012) e se tornaram uma séria ameaça à saúde humana (PARISI et al., 2019). O aumento da resistência antimicrobiana aos medicamentos convencionais está se expandindo globalmente, representando uma séria ameaça às atuais estratégias empregadas no tratamento de doenças infecciosas. Isso é causado por dois grandes problemas: (1) o uso indevido e excessivo de medicamentos antimicrobianos e (2) prescrição descontrolada, onde até 50% dos medicamentos prescritos são desnecessários (CDC, 2013; LAXMINARAYAN et al., 2013; WHO, 2014; HOLMES et al., 2016). As infecções causadas por fungos vêm aumentando rapidamente em todo o mundo. Atualmente, mais de 300 milhões de pessoas são infectadas com algum tipo de fungo todos os anos, levando a 1.350.000 mortes anualmente (COWEN et al., 2015).

Embora as infecções causadas por *Candida albicans* sejam as mais frequentemente diagnosticadas, outras espécies, como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, estão surgindo com taxas crescentes de incidência letal. *C. glabrata* é o segundo patógeno mais prevalente responsável por candidemia em diferentes centros médicos, principalmente nos EUA, Canadá e norte da Europa (CORTEGIANI; MISSERI; CHOWDHARY, 2019). Nesse sentido, os AMPs naturais são moléculas promissoras, seja como substitutos ou auxiliares nestes tratamentos. (LIMA et al., 2020)

Além disso, a mortalidade associada a doenças fúngicas, de aproximadamente 1,6 milhão, é semelhante à da tuberculose e 3 vezes mais que a malária. Características socioeconômicas, geoecológicas e o crescente número de populações em risco são os principais determinantes das variações na incidência e prevalência de doenças fúngicas em todo o mundo. A pandemia de HIV / AIDS, tuberculose, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma e a crescente incidência de cânceres são os principais fatores causadores de infecções fúngicas nos países desenvolvidos e em desenvolvimento em todo o mundo (BONGOMIN et al., 2017).

O advento e a disseminação de fungos resistentes a medicamentos convencionais sugerem que as estratégias atuais para tratar infecções fúngicas não serão mais eficazes em alguns anos (OLIVEIRA et al., 2019). Atualmente, o arsenal terapêutico aprovado de medicamentos para o tratamento de micoses é restrito a alguns

antifúngicos, e a maioria deles apresenta limitações como baixa eficácia e alta toxicidade. Além disso, o fato de algumas espécies de fungos serem resistentes aos medicamentos disponíveis é apontado como um obstáculo ao tratamento dessas infecções. Assim, os pesquisadores têm procurado maneiras de lidar com esses problemas, uma vez que a identificação de novos compostos antifúngicos ou novos protocolos terapêuticos é uma necessidade urgente. Portanto, existe um grande interesse em novos agentes antimicrobianos que sejam novas alternativas no combate de doenças fúngicas. Anticorpos monoclonais, imunoterapia com citocinas, vacinas e peptídeos antimicrobianos (AMPs) são novos biofarmacêuticos que surgiram para prevenir ou tratar infecções fúngicas (NICOLA et al., 2019).

Um desafio sem precedentes é o da resistência antimicrobiana, segundo a OMS, "A resistência aos antimicrobianos não parece tão urgente como uma pandemia, mas é igualmente perigosa" (OPAS, 2020). Paradoxalmente, apesar do uso crescente de agrotóxicos, há um aumento nas doenças de plantas causadas por fungos que estão se tornando mais resistentes aos fungicidas atualmente disponíveis (XUAN et al., 2003; MAHLO; MCGAW; ELOFF, 2006; PANE et al., 2014). Práticas modernas de intensificação agrícola, com plantio de vastas faixas de safras geneticamente uniformes, protegidas por um ou dois genes de resistência (R) endogâmicos e o uso de antifúngicos de alvo único aceleraram o surgimento de novos produtos virulentos e cepas resistentes a fungicidas (FISHER et al., 2020).

Doenças fúngicas de plantas levam a perdas econômicas anuais que excedem 200 bilhões de dólares americanos em processos pré e pós-colheita. É evidente que os patógenos fúngicos causam muitos e variados problemas com um enorme impacto potencial na produção de plantas (SHUPING; ELOFF, 2017). Doenças pós-colheita e deterioração de alimentos causadas por patógenos fúngicos de plantas podem ocorrer durante várias fases do processamento, como colheita, manuseio, armazenamento, embalagem e transporte, nas mãos do consumidor (AGRIOS, 2005). Patógenos fúngicos são o principal agente causal da podridão de frutas frescas e vegetais em processos pós-colheita (SHUPING; ELOFF, 2017). Espécies de fungos como *Fusarium*, *Geotrichum* e *Aspergillus* são alguns dos agentes de decomposição de frutas e vegetais causando perdas econômicas significativas e características indesejáveis das *commodities* vegetais (AGRIOS, 2005). *Fusarium oxysporum* é um fungo ascomiceto patogênico transmitido pelo solo que afeta muitas plantas no mundo, causando murcha de fusarium, que é uma síndrome vascular letal nas plantas. A doença resulta em sintomas variados que incluem amarelecimento das folhas, escurecimento dos tecidos vasculares, retardo do crescimento e a morte da planta. Espécies de *F. oxysporum* matam uma ampla variedade de plantas, por exemplo, as pertencentes à família

Solanaceae, que compreende *Solanum lycopersicum* (tomate), *S. tuberosum* (batata), plantas do gênero *Capsicum* (pimenta e pimentões) e *S. melongena* (berinjela), causando enormes perdas nas colheitas (JOSHI, 2018). *Colletotrichum* é um dos gêneros mais comuns e importantes de fungos fitopatogênicos. Praticamente todas as culturas cultivadas em todo o mundo são suscetíveis a uma ou mais espécies de *Colletotrichum*. Esses fungos causam antracnose, uma doença que causa apodrecimento dos frutos antes e depois da colheita. Membros desse gênero causam grandes prejuízos a safras economicamente importantes, sendo uma das doenças mais destrutivas na produção de pimentas em todo o mundo (DEAN et al., 2012; SUN et al., 2015).

Os AMPs têm grande potencial agrônômico, para serem empregados no desenvolvimento de novas metodologias que buscam a resistência de plantas às doenças, de modo a superar as perdas em produtividade e qualidade (HOLASKOVA et al., 2014; CHUNG; KHANUM, 2017). Segundo Campos et al. (2018) é razoável especular que a otimização artificial dos AMPs de plantas representará em breve uma estratégia rápida e econômica para desenvolver novos pesticidas naturais projetados para combater pragas e patógenos de relevância agrônômica.

1.2. Peptídeos antimicrobianos de plantas

As plantas são uma importante fonte de diversas moléculas com potencial farmacológico. Estas possuem vários mecanismos de defesa exclusivos, incluindo barreiras físicas à invasão de patógenos, além de uma ampla variedade de metabólitos secundários e moléculas proteicas, como os peptídeos antimicrobianos (AMPs) (PARISI et al., 2019). Os AMPs são componentes essenciais do sistema imunológico inato de vertebrados e do sistema inespecífico de defesa de plantas, fungos e invertebrados. Essas pequenas moléculas geralmente compreendem de 6 a 100 resíduos de aminoácidos e têm massa molecular aproximada de 2 a 10 kDa (WATKINS; BONOMO, 2016; DA CUNHA et al., 2017; SEYFI et al., 2020).

Os AMPs servem como um mecanismo de defesa bioquímico e são um componente-chave na imunidade inata das plantas (VIEGA DE ANDRADE et al., 2020). Existem várias classes estruturais de AMPs que conferem a defesa das plantas, e estes são representados principalmente pelos grupos das defensinas, tioninas, proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs), peptídeos circulares conhecidos como ciclotídeos e snakinas (BERROCAL-LOBO et al., 2002; BENKO-ISEPPON et al., 2010).

Como os AMPs são os componentes de defesa por excelência, as plantas os elaboram em quase todas as suas partes ou órgãos (PATEL; AKHTAR, 2017). As

principais atividades biológicas dos AMPs de plantas são antifúngicas, antibacterianas, contra oomicetos e insetos herbívoros. Além disso, também exibem atividades de inibição enzimática (NGAI; NG, 2004) e têm papel na tolerância a metais pesados (MIROUZE et al., 2006), estresse abiótico (KOIKE et al., 2002) e na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas (ALLEN et al., 2008). Além disso, estudos recentes indicaram que os pequenos peptídeos catiônicos têm capacidade de direcionar células cancerígenas e podem ser usados como agentes terapêuticos contra o câncer (GASPAR; SALOMÉ VEIGA; CASTANHO, 2013; FIGUEIRA et al., 2017; SEYFI et al., 2020).

AMPs possuem mecanismos de ação multifacetados que reduzem potencialmente a suscetibilidade ao efeito da resistência microbiana e, associados a baixa toxicidade para as células de mamíferos, os tornam uma fonte rica para a descoberta de novos medicamentos em potencial (KOEHBACH; CRAIK, 2019; OLIVEIRA et al., 2019). Atualmente, vários AMPs estão sendo avaliados em ensaios clínicos como novos anti-infecciosos, mas também como novos agentes farmacológicos para modular a resposta imune, promover a cicatrização de feridas e prevenir adesões pós-cirúrgicas (MAHLAPUU et al., 2016), além da sua potente atividade antimicrobiana.

1.3. Defensinas de plantas

As primeiras defensinas de plantas foram identificadas em sementes de trigo e cevada por Mendez e colaboradores (COLILLA; ROCHER; MENDEZ, 1990; MÉNDEZ et al., 1990), foram originalmente denominadas γ -tioninas, com base em sua similaridade em massa molecular, sequência de aminoácidos e número de resíduos de Cys (CARVALHO; GOMES, 2011). Entretanto, estudos adicionais revelaram a existência de diferenças no padrão das pontes dissulfeto, demonstrando que essas duas famílias de peptídeos não estavam relacionadas (BRUIX et al., 1993) e são estruturalmente diferentes das demais tioninas. Esse grupo de peptídeos antimicrobianos passou a ser conhecido como defensinas de plantas, por causa de sua semelhança estrutural e funcional com AMPs previamente caracterizados encontrados em insetos e mamíferos chamados defensinas (TERRAS et al., 1995). As defensinas possuem representantes em vertebrados, invertebrados, plantas e fungos, sugerindo que são anteriores à divergência evolutiva em eucariotos (DE CONINCK; CAMMUE; THEVISSSEN, 2013).

1.3.1. Características estruturais

As defensinas de plantas são uma notável família de peptídeos caracterizados pela massa molecular de aproximadamente 5 kDa e carga líquida positiva em pH fisiológico. Possuem cerca de 45 a 54 resíduos de aminoácidos na estrutura primária que é intrinsecamente variada. Essa variabilidade pode ser explicada pelo fato de que os AMPs são moléculas em rápida evolução devido à pressão imposta a eles pela competição entre patógenos no curso co-evolutivo (CARVALHO; GOMES, 2009; BLEACKLEY et al., 2020). Entretanto, sua estrutura terciária é fortemente conservada, as defensinas de plantas são definidas por uma estrutura tridimensional que consiste em três folhas β antiparalelas e uma única α -hélice estabilizada por quatro ligações dissulfeto formando uma dobra conhecida como motivo alfa-beta estabilizada com cisteína (CS $\alpha\beta$)(PARISI et al., 2019). Os oito resíduos de cisteína se unem em pares específicos, formando quatro pontes dissulfeto, que são responsáveis pela estabilização de sua estrutura tridimensional (CARVALHO; GOMES, 2011; WONG et al., 2012). A ligação dissulfeto confere outra característica comum às defensinas: sua alta estabilidade à temperatura, pH e proteólise (SHAFEE et al., 2016a). A estrutura secundária, disposição e orientação das pontes dissulfeto indicam duas superfamílias independentes de defensinas, com uma divisão clara entre cis- e trans-defensinas (Figura 1). Enquanto as trans-defensinas estão presentes principalmente em vertebrados, as cis-defensinas estão presentes em invertebrados, fungos e plantas e, mais recentemente, também foram descritas em bactérias (SHAFEE et al., 2016b).

Uma outra característica das defensinas de plantas sua predominância estando presente nos genomas de diversas espécies de plantas, em alguns casos, existem centenas de sequências de defensinas em um único genoma da planta (BLEACKLEY et al., 2020). As variações em suas estruturas primárias são refletidas por pequenas variações na exibição espacial das alças e certamente contribuem para a ampla gama de atividades biológicas observadas (CARVALHO; GOMES, 2009). Outra região importante na defensina é o γ -core que tem a sequência conservada (GXCX₃₋₉C, onde X pode ser qualquer resíduo de aminoácido) e está relacionada com as propriedades antimicrobianas de algumas defensinas (CARVALHO; GOMES, 2011; MUÑOZ et al., 2014). A região definida pelas alças 4-7 (Figura 1A) é conhecida como γ -core, uma região conservada descrita por Yount e Yeaman (2004) que está presente em peptídeos antimicrobianos ricos em cisteína. Esta região, particularmente a alça flexível 5 (Figura 1AB), contém frequentemente aminoácidos essenciais para a atividade das defensinas de plantas. Como demonstrado por De Samblanx et al. (1997), modificações da região do γ -core com remoção e substituição de aminoácidos, na defensina de *Raphanus*

sativus (RsAFP2), reduziu a atividade biológica de RsAFP2. Estudos realizados por Sagaram et al. (2011) sobre a atividade antifúngica de MsDef1 e MtDef4 (defensinas de *Medicago sativa* e *Medicago truncatula*, respectivamente) foram determinantes para constatar que a atividade antimicrobiana destas defensinas estava relacionada a região do γ -core.

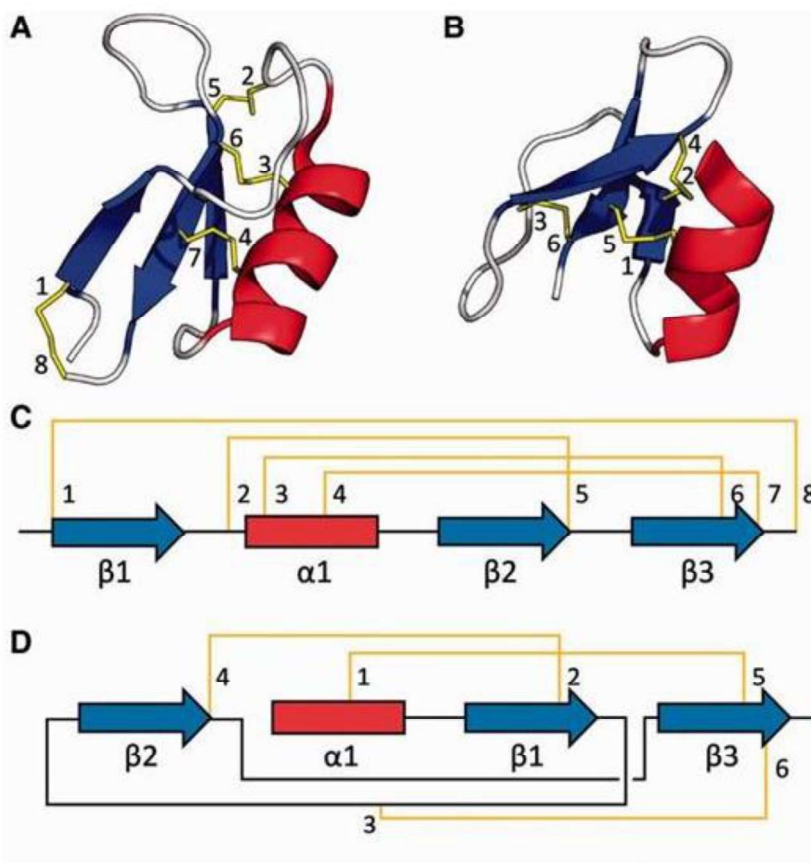


Figura 1. Representação das classes estruturais de defensinas. (A) Cis-defensinas tipificado pela defensina de planta NaD1 de *Nicotiana alata* (PDB:1MR4). (B) Trans-defensinas tipificado pela β -defensina humana (*Homo sapiens*) HBD1 (PDB:IJV). (C) defensinas do primeiro grupo “Cis” e (D) β -defensinas do segundo grupo “Trans”. α -hélices indicadas em vermelho, β -fitas em azul e dissulfetos em amarelo. A estrutura secundária e as cisteínas são numeradas por sua ordem de sequência (SHAFEE et al., 2016b).

1.3.2. Atividade biológica

Muitas das defensinas de plantas que foram caracterizadas funcionalmente têm diferentes atividades biológicas (SHAFEE et al., 2016a). A atividade mais bem caracterizada nas defensinas de plantas é a atividade antimicrobiana contra fungos (THEVISSSEN; TERRAS; BROEKAERT, 1999; CARVALHO; GOMES, 2011; MELLO et

al., 2011). Alguns oomicetos também sucumbem à atividade das defensinas. Em relação a atividade inibitória contra bactérias é bem menos pronunciada e é observada de um modo geral contra bactérias Gram-positivas (CARVALHO; GOMES, 2011). As defensinas de plantas com atividade antifúngica potente e os patógenos que as afetam estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de defensinas e seus patógenos suscetíveis. Obtida e traduzida de (PARISI et al., 2019).

Lista de defensinas e patógenos suscetíveis			
Nome da defensina	Espécies de planta	Tecidos	Atividade em fungos patogênicos
NsD1	<i>Nicotiana glauca</i>	flores	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Colletotrichum graminicola</i> , <i>Cryptococcus gattii</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Puccinia coronata</i> , <i>P. sorghi</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Thielaviopsis basicola</i> , <i>Verticillium dahliae</i>
RsAFP2	<i>Raphanus sativus</i>	sementes	<i>Alternaria longipes</i> , <i>A. solani</i> , <i>A. brassicicola</i> , <i>Ascochyta pisi</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Cercospora beticola</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i> , <i>Mycosphaerella fijiensis</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Septoria nodorum</i> , <i>Septoria tritici</i> , <i>Trichoderma hamatum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Verticillium albo-atrum</i> , <i>V. dahliae</i> , <i>Venturia inaequalis</i>
PsD1	<i>Plum sativum</i>	sementes	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Avicularia versicolor</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>F. moniliformae</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>T. mentagrophytes</i>
HsAFP1	<i>Heuchera sanguinea</i>	sementes	<i>A. flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i> , <i>N. crassa</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Septoria tritici</i> , <i>Verticillium albo-atrum</i> , <i>T. viride</i>
PvD1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	sementes	<i>C. albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>S. cerevisiae</i>
MsDef1	<i>Medicago sativa</i>	sementes	<i>F. graminearum</i> , <i>N. crassa</i> , <i>V. dahliae</i>
MtDef4	<i>Medicago truncatula</i>	sementes	<i>F. graminearum</i> , <i>N. crassa</i> , <i>Puccinia tritici</i>
DmAMP1	<i>Dahlia merckii</i>	sementes	<i>Alternaria brassicicola</i> , <i>A. flavus</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. sphaerospermum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>L. maculans</i> , <i>N. crassa</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. tritici</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>V. albo-atrum</i>
NsD1, NsD2	<i>Nigella arvensis</i>	sementes	<i>A. niger</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Bipolaris sorokiniana</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i>
PhD1, PhD2	<i>Petunia hybrida</i>	flores	<i>B. cinerea</i> , <i>F. oxysporum</i>
Zm-ESR6	<i>Zea mays</i>	sementes	<i>B. cinerea</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Plectosphaerella cucumerina</i>
PTH1	<i>Solanum tuberosum</i>	tubérculo	<i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>F. solani</i> , <i>Pseudomonas solanacearum</i>
TvD1	<i>Tephrosia villosa</i>	folha	<i>Alternaria helianthi</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Curvularia sp.</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Pneumocystis carinii</i>
Vv-AMP1	<i>Vitis rotundifolia</i>	baga	<i>Alternaria longipes</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>V. dahliae</i>

Sathoff et al. (2018) demonstraram que a região γ -core dos peptídeos MsDef1, MtDef4, MtDef5, RsAFP-2 e So-D2 apresentou atividade antifúngica contra *Phytophthora medicaginis* e *Fusarium solani* em baixas concentrações, além de inibir a germinação de esporos, crescimento micelial e causando alongamento do tubo germinativo. A região γ -core também apresentou ação antibacteriana contra *E. coli*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Sinorhizobium meliloti* e *X. alfalfae* subsp. *alfafa*.

No entanto, existem casos de defensinas de plantas com outras funções biológicas, incluindo papéis na reprodução de plantas, sinalização, tolerância a metais, atividade antibacteriana, atividade inseticida e inibidores de enzimas hidrolíticas (VAN DER WEERDEN; ANDERSON, 2013; ISHAQ; BILAL; IQBAL, 2019). Defensinas também apresentaram atividade antibacteriana, em determinados casos conjuntamente com a atividade antifúngica (PARISI et al., 2019). Várias defensinas de plantas reduzem *in vitro* a atividade da transcriptase reversa do HIV1 (CARVALHO; GOMES, 2009, 2011). Muito ainda precisa ser estudado, para entender outras atividades biológicas que inclui também a inibição do crescimento de protozoários, como foi o caso da defensina PvD₁ capaz de inibir *Leishmania amazonensis* (DO NASCIMENTO et al., 2015). Essa mesma defensina também já exibiu um efeito de atividade antiproliferativa contra células cancerígenas (FIGUEIRA et al., 2017).

Devido ao seu alto potencial de biocompatibilidade, biodegradabilidade moderada e baixa resistência desenvolvida em microrganismos alvo, as defensinas podem vir a ser uma nova classe de antibióticos com aplicação em vários campos. As defensinas também podem ser usadas para controlar infecções fúngicas e bacterianas em humanos (MIRAKHORLI et al., 2019).

1.3.3. Mecanismos de ação

O mecanismo de ação das defensinas ainda não está totalmente elucidado, na atividade antifúngica na qual é mais estudada, sugere-se um mecanismo de múltiplas etapas envolvendo alvos extracelulares (parede celular e membrana) e intracelulares (CARVALHO; GOMES, 2011). Os peptídeos catiônicos, como as defensinas, são atraídos eletrostaticamente por moléculas carregadas negativamente, como fosfolipídios aniônicos, lipopolissacarídeos (LPS) e ácido teicóico, que se localizam assimetricamente na estrutura da membrana e causam a morte celular (NIZET, 2006; PELEGRINI et al., 2011; MIRAKHORLI et al., 2019).

Eles podem ser divididos em dois grupos; aqueles que atravessam a parede celular e a membrana plasmática e entram no citoplasma e aqueles que parecem mediar seus efeitos tóxicos sem entrar na célula (PARISI et al., 2019). No primeiro caso, existem dois principais modelos que foram apresentados para explicar o mecanismo de ação da defensina. Um é o modelo de carpete e o outro é o modelo de poro toroidal (Figura 2). Em ambos os modelos, é comum a interação da defensina com a membrana carregada negativamente, o que causa aumento da permeabilidade da membrana celular e seu extravasamento causando a morte celular. De acordo com o modelo do

tapete, pequenos poros são formados devido ao movimento para dentro dos lados hidrofóbicos das moléculas de AMPs na superfície da membrana celular, enquanto o último mostra que os peptídeos primeiro formam oligômeros que, então, criam múltiplos poros na membrana celular (SHER KHAN et al., 2019). De acordo com outra hipótese, as defensinas interagem apenas com a membrana celular e causam aumento da permeabilidade iônica e acesso ao transporte para o meio intracelular. As defensinas também podem acelerar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, portanto, ativar a morte celular programada (PCD) (LACERDA et al., 2014).

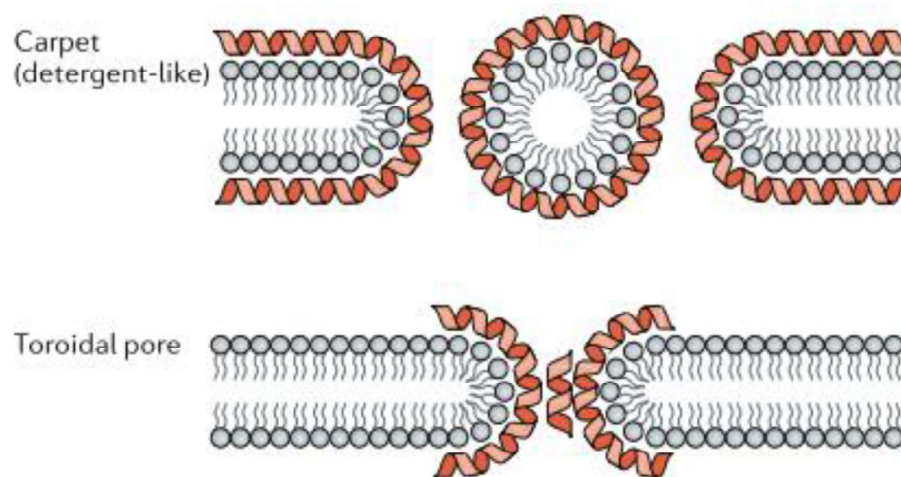


Figura 2. Modelos de mecanismos de ação utilizados pelas defensinas. Os dois principais modelos: Modelo de tapete e modelo poro toroidal estão exemplificados na imagem.

A partir disso pode-se avaliar que todos levam à ruptura da membrana plasmática, mas isso pode surgir da interação direta com lipídios específicos no folheto interno ou externo da membrana ou perturbação da membrana causada indiretamente por função mitocondrial prejudicada, produção de espécies reativas de oxigênio ou indução de morte celular programada. Os complexos mecanismos de ação das defensinas explicam porque esses peptídeos persistiram como moléculas antifúngicas eficazes ao longo dos milênios e porque são alvos atraentes para o desenvolvimento de agentes antifúngicos na área médica e agrícola (PARISI et al., 2019).

Ainda na tentativa de desvendar os mecanismos de ação, estudos realizados por Lobo et al. (2007), usando a defensina de ervilha, *Psd1*, e através de um sistema duplo híbrido para identificar interações proteína-proteína revelaram que *Psd1* era internalizada. Proteínas alvo, as quais ligavam-se a *Psd1*, foram analisadas dentro do cDNA do fungo e apresentou sequência similar à da ciclina F, que é uma proteína que está envolvida no ciclo celular. Análises microscópicas na análise de *Psd1* conjugado com Isotiocianato fluoresceína (FITC), detectaram a presença dessa defensina *Psd1* no

núcleo, sugerindo também pela primeira vez que defensinas de plantas podem ter alvos nucleares.

1.4. Gênero *Capsicum*

As espécies de *Capsicum*, pertencentes à família Solanaceae, compreendem um grupo altamente diversificado de pimentas originárias dos trópicos do continente americano e têm grande significado social, econômico e agrônomo (LANNES et al., 2007; DIAS et al., 2013). O gênero *Capsicum*, abrange os pimentões e as pimentas e apesar de sua grande importância econômica, nutritiva e farmacológica, seu cultivo é dificultado por agentes patogênicos, como fungos, bactérias e vírus (DIAS et al., 2013).

A pimenta (*Capsicum* spp) é uma das plantas e especiarias mais importantes em todo o mundo devido à sua versatilidade para usos culinários, práticas médicas e uso como um extrato altamente picante em repelentes e inseticidas animais (FAO, 2019; SILVAR; GARCÍA-GONZÁLEZ, 2017). Seus metabólitos secundários (capsaicinoides) têm sido amplamente associados ao sabor quente, mas também às propriedades antimicrobianas e antifúngicas. Nas últimas décadas, foi demonstrado que a planta do gênero *Capsicum* também contém agentes antimicrobianos não relacionados aos capsaicinoides. Esses novos compostos são codificados no genoma da pimenta e mostram forte atividade antimicrobiana *in vivo* e *in vitro* (FERNANDO et al., 2011). Devido a essa atividade antimicrobiana, o gênero *Capsicum* tem sido interesse contínuo de estudo (TAVEIRA et al., 2016, 2018; SANTOS et al., 2017; SILVA et al., 2017, 2021; SILVAR; GARCÍA-GONZÁLEZ, 2017; MARACAHIPES et al., 2019a; GEBARA et al., 2020; RESENDE et al., 2021), inclusive na identificação e caracterização de defensinas (ISLAM et al., 2017; MARACAHIPES et al., 2019b; GEBARA et al., 2020).

O gênero *Capsicum* atualmente abriga 38 espécies, das quais cinco são domesticadas: *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. e *Capsicum chinense* Jacq. (SILVAR; GARCÍA-GONZÁLEZ, 2017). O maior número de espécies está concentrado no Brasil (MOSCONE et al., 2007). *C. annuum* é a espécie mais diversificada e cultivada e é composta de variedades de pimentas e pimentões, incluindo pimentão doce, páprica (também conhecido como colorau) e as variedades de pimentas mexicanas. Contudo, no Brasil, *C. baccatum* e *C. chinense* são as espécies predominantemente comercializadas (LANNES et al., 2007).

Capsicum chinense foi originalmente encontrada na bacia amazônica, mas é cultivada comercialmente por todo o Brasil, devido à sua adaptabilidade a diferentes solos e climas locais e ao seu popular aroma cítrico. A espécie abrange pimentas muito populares no Brasil, como a pimenta-de-cheiro, pimenta de bode, cumari-do-Pará,

pimenta-habanero, murubi e a pimenta biquinho. Os frutos desta espécie mostram uma enorme variabilidade em tamanho e forma, e nas diferentes intensidades de amarelo, laranja, vermelho ou roxo quando maduros (LANNES et al., 2007).

Diferentes famílias de AMPs têm sido isoladas de sementes do gênero *Capsicum*. Um dos primeiros trabalhos foi o realizado por Diz et al. (2006), que isolaram uma fração rica em peptídeos (denominada F1) de sementes de *C. annuum* com alta atividade inibitória sobre o crescimento das leveduras *Schizosaccharomyces pombe*, *Sacharomyces cerevisiae* e *C. albicans*. Dessa fração F1 foi caracterizado um peptídeo pertencente à família das LTPs de plantas e que exibiu atividade antifúngica contra *Coletotrichum lindemuthianum* e *C. tropicalis* (DIZ et al., 2011). Nos anos posteriores foram também isolados peptídeos com similaridades a inibidores de proteinases de sementes e frutos do gênero *Capsicum*. Um inibidor de tripsina denominado CaTI foi isolado de sementes e mostrou ter atividade inibitória contra *S. cerevisiae* e *C. albicans* (RIBEIRO et al., 2007, 2013). Posteriormente o CaTI inibiu o crescimento dos fungos filamentosos *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum* (SILVA et al., 2017). Peptídeos antimicrobianos também foram isolados de frutos, como o relatado por Taveira et al. (2014). Estes autores isolaram um peptídeo que apresentou similaridade com a família das tioninas (CaThi) e atividade inibitória contra diferentes leveduras. Mais recentemente peptídeos antimicrobianos com similaridade a defensinas e com atividade antimicrobiana também foram isolados de frutos de *C. annuum* (GEBARA et al., 2020).

A espécie *Capsicum chinense* Jacq. (acesso UENF 1751) tem sido também estudada pelo nosso grupo. Estudos com sementes já foram realizados (DIAS et al., 2013) avaliando sua atividade antifúngica e inibição de enzima e quimi tripsina e recentemente, a avaliação do potencial antimicrobiano e da inibição da enzima α -amilase de seus frutos (AGUIEIRAS et al., 2021; RESENDE et al., 2021).



Figura 3. Frutos de *Capsicum chinense* (acesso UENF 1751).

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica dos peptídeos de frutos de *Capsicum chinense* Jacq. (acesso UENF 1751), bem como determinar o seu possível mecanismo de ação sobre fungos.

2.2.Objetivos Específicos

1. Isolar e caracterizar peptídeos antimicrobianos de frutos de *C. chinense*;
2. Realizar predição do modelo da estrutura terciária de um ou mais peptídeos caracterizados e de seu potencial de permeabilização de membrana;
3. Analisar a atividade enzimática da fração contra α -amilase salivar humana;
4. Analisar a atividade antifúngica dos peptídeos antimicrobianos sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos e leveduras;
5. Verificar a ação dos peptídeos antimicrobianos sobre a permeabilização de membranas fúngicas;
6. Analisar os efeitos dos peptídeos sobre o aumento da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células fúngicas;
7. Investigar a viabilidade das células de leveduras patogênicas na presença dos peptídeos

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais Biológicos

3.1.1. Sementes

As sementes de *Capsicum chinense* foram fornecidas pela Prof.^a Dr.^a Rosana Rodrigues do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Brasil.

3.1.2. Microrganismos

Os fungos filamentosos *Fusarium oxysporum* (5845), *F. solani* (4014), *Colletotrichum lindemuthianum* (5771) e *C. gloesporioides* (5522) e as leveduras *Candida braccarensis* (ATCC 10154); *C. glabrata* (ATCC 90030); *C. krusei* (ATCC 6258); *C. mogii* (3982); *C. nivariensis* (ATCC 9983); *C. parapsilosis* (CE002) e *C. pelliculosa* (3974) foram cultivados em meio Ágar Sabouraud (1% de peptona, 2% de glicose e 1,7% de agar-agar) (Merck e Kasvi) e mantidos conservados, na geladeira à 4°C, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), do Centro de Biociência e Biotecnologia (CBB), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes- RJ.

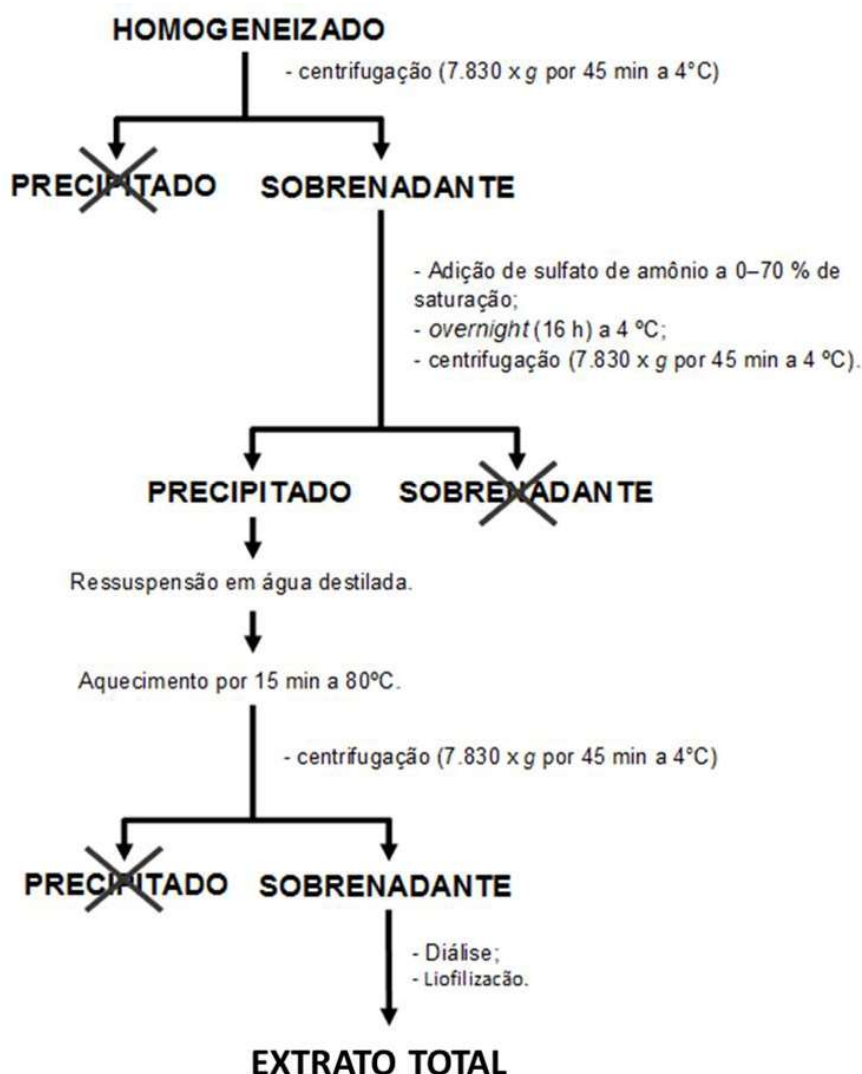
3.2. Obtenção de mudas e cultivos de plantas

Para obtenção de mudas, as sementes de *Capsicum chinense* (acesso UENF 1751) foram semeadas em bandejas de isopor de 72 células em substrato comercial organovegetal Vivatto®, foram depositadas aproximadamente 5 sementes por célula e estas foram mantidas em câmara de crescimento a 28 °C para germinação das sementes. Após à germinação, foi realizada a separação das plântulas deixando apenas uma plântula por célula. O transplântio para vasos em casa de vegetação foi realizado quando as mudas apresentarem dois pares de folhas definitivas. O aparecimento de frutos ocorre aproximadamente 120 dias após o transplântio, a colheita dos frutos foi realizada aproximadamente 50 dias após a frutificação, quando os frutos estavam maduros. As plantas foram irrigadas uma vez ao dia.

3.3. Extração proteica de frutos de *Capsicum chinense*

Para realizar a extração foi necessário retirar as sementes dos frutos previamente armazenados no congelador e pesá-los. Para cada extração utilizamos cerca de 40 g de fruto de *C. chinense*. A extração proteica do fruto foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Taveira et al. (2014), o tampão fosfato de

extração, composto por Na_2HPO_4 0,01 M, NaH_2PO_4 0,015 M, KCl 0,1 M e EDTA 1,5%, em pH 5,4, foi preparado numa proporção de 1:5, ou seja, para 40g de fruto preparamos 200 mL de tampão fosfato e foi mantido sob agitação constante a 4°C por 2 h. O conteúdo já homogeneizado foi submetido a centrifugação a 7830 x g por 45 min a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi filtrado com papel de filtro e em seguida foi adicionado gradativamente o sulfato de amônio 0-70% de saturação, a 4 °C por 16 h. Após esse período, o extrato foi submetido a centrifugação (7830 x g por 45 min a 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado com água destilada. O precipitado foi aquecido no banho-maria por 15 min a 80 °C e centrifugado a 7830 x g por 45 min a 4 °C. Após a centrifugação o precipitado foi descartado e o sobrenadante dialisado por 2 dias em água destilada e liofilizado, concentrando dessa forma a amostra, assim, obtivemos o extrato proteico final, o extrato total.



Esquema 1. Etapas do processo de extração proteica dos frutos de *C. chinense* (acesso UENF 1751). Fonte: (TAVEIRA et al., 2014).

3.4.Cromatografia de troca aniônica DEAE – Sepharose

A cromatografia de troca aniônica foi realizada com a coluna de troca aniônica DEAE-Sepharose (3 cm x 7 cm) montada e preparada de acordo com o fabricante (Sigma-Aldrich), sob ação da gravidade e após estar devidamente empacotada foi lavada sucessiva e respectivamente por água destilada, hidróxido de sódio 0,1 M, água destilada, ácido clorídrico 0,1 M e água destilada. Assim, com a resina devidamente ativada, a coluna foi equilibrada com o tampão de equilíbrio, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, deixando-a preparada para uso. A preparação da amostra consiste em pesar 30 mg do extrato total e dissolvê-lo em 10 mL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0, o extrato rico em peptídeos ($3 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) foi agitado até que estivesse completamente dissolvido e em seguida foi centrifugado a $16.000 \times g$ por 3 min à temperatura ambiente e o sobrenadante então aplicado sobre a resina. Foram coletados 3 mL por tubo, coletando ao todo 60 tubos, no fluxo de $60 \text{ mL}.\text{h}^{-1}$. As proteínas de carga positiva que não interagem com a resina, são chamadas de fração básica. Após a retirada dessa fração, utilizamos uma solução salina de Tris HCl 100 mM + NaCl 1M com o intuito de a partir da eletronegatividade do cloro, promover o desprendimento das proteínas de carga negativas, também chamadas de fração ácida. As frações foram devidamente separadas através da leitura de suas absorvâncias no espectrofotômetro a 280 nm. A fração não retida (D1) foi armazenada para ser utilizada na cromatografia de exclusão molecular.

3.5.Cromatografia de exclusão molecular Sephadex ® G50 fine Sigma-Aldrich

A cromatografia de exclusão molecular foi a etapa seguinte da purificação, cromatografia na qual é realizada a separação proteica por tamanho. Primeiramente, uma coluna de vidro (1,5 cm x 100 cm) foi preparada com 70 mL de resina Sephadex G-50 fine (Sigma-Aldrich) hidratada com água ultrapura. A resina Sephadex G-50 foi empacotada e cerca de 200 mL de solução TFA 0,1% (ácido trifluoroacético) foram eluídos.

Para o preparo da amostra foram pesados 40 mg da fração não retida (D1), e ressuspendida em 1 mL de solução TFA 0,1%. A amostra foi centrifugada a $16.000 \times g$ por 2 min a 18°C . O sobrenadante foi aplicado à coluna Sephadex-G50. O conteúdo eluído da coluna foi coletado no volume de 1 mL por tubo, em um total de 120 tubos, no fluxo de $530 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$. As absorvâncias das frações coletadas foram lidas no espectrofotômetro a 280 nm, em seguida as frações foram separadas e liofilizadas.

3.6.Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

Uma coluna de fase reversa C8/C18, foi acoplada a uma coluna guarda C8 e equilibrada com 0,1% de TFA e empregada sequencialmente ao processo de purificação de peptídeos da fração F3 resultante da cromatografia de exclusão molecular. A fração foi solubilizada na solução A (TFA 0,1%) e injetada na coluna. A corrida foi iniciada com a solução A durante os primeiros minutos, seguido por um gradiente da solução B (0,1% de TFA em propanol) da seguinte forma: a concentração do solvente B aumentou gradualmente de 0% a partir dos 15 minutos de corrida até atingir 100% após 115 minutos. 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 minutos. A eluição das proteínas da coluna foi acompanhada por absorbâncias lidas a 220 nm em um detector de arranjo de diodo (TAVEIRA et al., 2014).

3.7.Quantificação de proteínas

As determinações quantitativas das proteínas foram realizadas como descrito por Smith et al. (1985), utilizando o método do ácido bicinconínico e a albumina sérica bovina (Sigma) foi utilizada como proteína padrão. As absorbâncias foram lidas no leitor de placas a 544 nm.

3.8.Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS

Para determinar a massa molecular dos peptídeos presentes nas frações obtidas, foi realizado um gel de tricina de acordo com Schagger e Von Jagow (1987). Para o preparo da amostra, as frações foram liofilizadas e a estas foram adicionados 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 completaremos o volume final de 20 µL com água ultrapura. Em seguida, as amostras foram aquecidas por 5 min a 100 °C e centrifugadas a 16.000 x g por 5 min, à temperatura ambiente. Foram aplicados 20 µL de cada amostra no gel nas concentrações de 10 µg e 15 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.

Ao final da corrida, o sistema de eletroforese foi desmontado e 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. Em seguida, o gel foi imerso em uma solução de descoloração de ácido acético 10 % em água destilada até a visualização de bandas proteicas presentes no gel.

3.9. Identificação dos aminoácidos por espectrometria de massas

Após SDS-PAGE em gel de tricina, a banda proteica com menor massa molecular (~5 kDa) presente na fração F3 e a banda proteica presente na fração H8 foram extraídas do gel de acordo com a metodologia de (SHEVCHENKO et al., 2007). Foi realizada digestão com tripsina e os peptídeos obtidos foram analisados por LC-MS / MS. O instrumento utilizado foi um espectrômetro de massa híbrido (ESI-Q-ToF) (Synapt HDMS, Waters Corp, MA, EUA). Os parâmetros do instrumento foram ajustados conforme descrito por Carneiro et al. (2013). As sequências dos peptídeos foram comparadas com as sequências relatadas nas bases de dados de aminoácidos do NCBI-BLAST e apresentadas para alinhamento automático utilizando o programa Muscle.

3.10. Modelagem de estrutura terciária

O fragmento peptídico foi pesquisado de acordo com o banco de dados de sequências de proteínas não redundantes usando BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990), que retornou NP_001385266.1 como o melhor resultado (precursor de defensina J1-1). Essa sequência foi pesquisada em comparação ao AlphaFold DB (JUMPER et al., 2021) usando a ferramenta EBI Protein Similarity Search (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fastal/>), resultando em uma combinação perfeita para Q43413, uma defensina de *Capsicum annuum* cuja estrutura foi prevista pelo AlphaFold.

3.11. Previsão *in silico* do potencial de penetração celular

Para aumentar a confiança, usamos três abordagens independentes baseadas em aprendizado de máquina que preveem o potencial de penetração celular de peptídeos: BChemRF-CPPred (DE OLIVEIRA et al., 2021), MLCPP (MANAVALAN et al., 2018) e CellPPD-Mod (KUMAR et al., 2018). Além disso, realizamos uma pesquisa no BLAST para peptídeos homólogos penetrantes de células conhecidos no banco de dados CPPsite 2.0 (AGRAWAL et al., 2016) usando Q43413 como consulta com um limite de valor E de $1e^{-10}$. As previsões do potencial de penetração celular da defensina foram realizadas em três cenários: sequência peptídica madura, γ -core e γ -core mais

dois resíduos *upstream* e *downstream*, com base em evidências de atividade antimicrobiana de um trabalho anterior (MELLO et al., 2019).

3.12. Ensaio de inibição da atividade α -amilásica

Para o ensaio de inibição α -amilásica, amostras de α -amilase salivar humana (500 μ L) foram coletadas e centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4 ° C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante sujeito a quantificação de proteínas de acordo com Smith et al. (1985) e armazenado no freezer a -20 °C até sua utilização. Os ensaios de inibição da α -amilase salivar humana com as frações proteicas foram realizados na concentração de 50 μ g.mL⁻¹, o volume foi pipetado e acrescido de 3 μ L da α -amilase salivar (volume determinado através da realização de uma curva da enzima, 10 U de amilase). Em seguida, foi pipetado o volume de 25 μ L de amido 1% e água ultrapura para completar o volume final de 100 μ L, as amostras foram incubadas no banho-maria a 37 °C por 30 min. Após o banho-maria, foram adicionados 400 μ L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e as amostras foram fervidas a 100 °C por 5 min. Em seguida, 400 μ L de água ultrapura foram utilizados para diluir cada amostra. A hidrólise do substrato pela enzima foi determinada após leitura da absorbância a 540 nm. O procedimento foi realizado em triplicata e o desvio padrão (DP) calculado para cada experiência. Uma unidade de amilase é definida como uma variação de 0,1 de absorbância a 540 nm por 30 min de reação, como descrito por Bernfeld (1955) com modificações.

3.13. Ensaio de inibição de crescimento de fungos filamentosos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*

Para realizar o ensaio de inibição de crescimento os fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* e *Fusarium* foram colocados para crescer em placas de Petri contendo ágar Sabouraud por aproximadamente 15 dias a 30 °C. Após esse período, 10 mL de caldo Sabouraud foram vertidos sobre a placa contendo os fungos e os esporos foram liberados com o auxílio de uma alça de Drigalski. Essa suspensão foi filtrada em gaze para evitar a passagem de restos miceliais que possam estar em solução juntamente com os esporos. Esses esporos foram quantificados em câmara de Neubauer, na presença de um microscópio óptico (Axioplan, Zeiss). Após a quantificação, o ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços estéril onde os esporos dos fungos filamentosos (1×10^4 esporos/mL) foram incubados em 200 μ L de caldo Sabouraud contendo diferentes concentrações da fração proteica obtida no processo de

purificação. O ensaio foi incubado a 30 °C por um período de 48 h. Para a observação da inibição do crescimento dos fungos, foi determinada a densidade óptica calculada a partir de leituras em um leitor de microplacas a 620 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert et al. (1990).

3.14. Inibição do crescimento de leveduras

O ensaio de inibição do crescimento foi realizado com as leveduras *Candida bracarensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. pelliculosa* e *C. parapsilosis* que inicialmente foram colocadas para crescer em placas de Petri. Inóculos dessas leveduras foram transferidos para uma nova placa onde foram realizadas estrias com o intuito de obter um crescimento homogêneo, as placas estriadas foram mantidas em estufa BOD na temperatura de 30 °C por 24 h. Inóculos das leveduras crescidas nessas condições foram transferidos com o auxílio da alça de semeadura para meio líquido (caldo Sabouraud), onde foram devidamente homogeneizados. Em seguida, foi retirada uma alíquota para visualização e quantificação na câmara de Neubauer no microscópio óptico (Axioplan, Zeiss). Após a quantificação, o ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços estéril onde as células das leveduras (1×10^4 células.mL⁻¹) foram incubadas em 100 µL de caldo Sabouraud para realização do controle e do teste com as células tratadas com a fração F3 na concentração de 100 µg.mL⁻¹. Em seguida a placa foi mantida por 24 h na estufa a 30 °C. Para observação da inibição do crescimento fúngico, a placa foi lida 24 h depois, no leitor de microplacas, a 620 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert et al., (1990).

3.15. Efeito das frações proteicas sobre a permeabilização de membrana das células fúngicas

A permeabilização da membrana plasmática das células fúngicas foi mensurada através da utilização do SYTOX Green, segundo metodologia descrita por Thevissen; Terras; Broekaert, (1999). Para analisar a capacidade de permeabilização de membranas, após o tempo de incubação das células fúngicas com a fração proteica (24 h para leveduras e 48 h para fungos filamentosos), 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, a uma concentração final de 0,2 µM e o corante de iodeto de propídio na concentração de 1 µM de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. O mesmo procedimento foi realizado com as células do controle. 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.

3.16. Ensaio de determinação da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células fúngicas

Após ensaio de inibição de crescimento, para medir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, as células fúngicas tratadas e não tratadas com a fração proteica foram incubadas com a sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) na concentração de 20 µM. As amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 2 h sob agitação constante. 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) (MELLO et al., 2011).

3.17. Análise de viabilidade celular

A fração F3 também foi utilizada para analisar seu efeito sobre a viabilidade celular das leveduras do gênero *Cândida*. Para essa análise foi preciso realizar o ensaio de inibição do crescimento das leveduras, após 24 h, o volume presente nos poços de controle na microplaca foram ressuspensos e diluídos 10.000 vezes para realização da contagem celular. Uma alíquota (2×10^2 células.mL⁻¹) foi espalhada juntamente com 50 µL de meio líquido Sabouraud com o auxílio da alça de Drigalski sobre a superfície de uma placa de Petri contendo agar Sabouraud e cultivadas a 30 °C em BOD durante 48 h. O procedimento foi realizado com a triplicata do controle e com as leveduras tratadas com a fração F3, tendo sido retirado o mesmo volume de alíquota. Nos intervalos de tempo de 24 h e 48 h as unidades formadoras de colônias foram determinadas para cada espécie, e as placas de Petri, foram fotografadas (TAVEIRA et al., 2016). Os resultados são mostrados assumindo que o controle representa 100% de viabilidade celular. Os cálculos do desvio-padrão e teste T foram feitos com software Prism (versão 6.0).

3.18. Análise estatística

Todos os dados analisados foram obtidos a partir de experimentos realizados em triplicata. Os dados do ensaio de inibição do crescimento fúngico e do ensaio de

inibição da atividade de α -amilase foram avaliados utilizando a análise de variância unidirecional ANOVA. As diferenças médias foram consideradas significativas em $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows).

4. RESULTADOS

4.1. Fracionamento de peptídeos do extrato total de frutos de *C. chinense*

O extrato total proveniente da extração proteica foi submetido a uma cromatografia de troca aniônica em resina e foram obtidas, primeiramente, a fração D1 (não retida) na eluição no tampão de equilíbrio da coluna Tris HCl 100 mM, pH 8,0 e em seguida, a fração D2 (retida), eluída no tampão de equilíbrio Tris HCl 100 mM + NaCl 1M (Figura 4A). Com as frações foi posteriormente realizada uma eletroforese em gel de tricina-SDS-PAGE e foram visualizadas a presença de bandas proteicas nas frações D1 e D2 com massas moleculares majoritárias entre 6,5 e 26,6 kDa (Figura 4B).

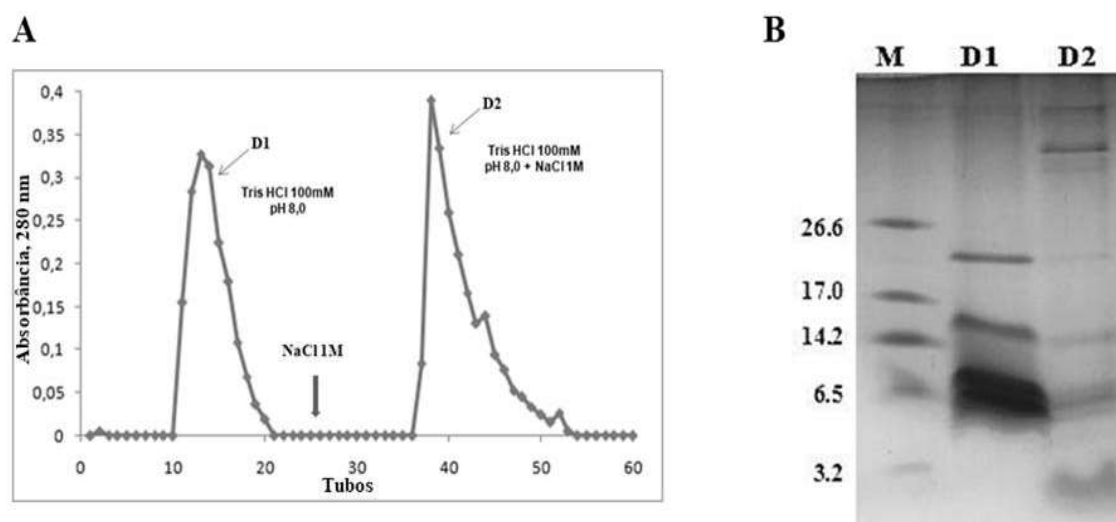


Figura 4. Cromatografia DEAE-Sepharose da extração proteica *C. chinense* e Eletroforese das frações D1 e D2. A) Cromatograma obtido após cromatografia de troca aniônica em resina DEAE-Sepharose. A fração não retida (D1) foi eluída em Tris HCl 100 mM, pH 8,0; a fração retida (D2) foi eluída em Tris HCl 100 mM, pH 8,0 acrescido de NaCl 1M. B) Visualização eletroforética do gel de tricina na presença de SDS, das frações obtidas em cromatografia DEAE-Sepharose. M – marcador de baixa massa molecular (kDa); D1 – fração não retida; D2 – fração retida.

4.2. Fracionamento de peptídeos da fração não retida D1 obtida na cromatografia de troca aniônica

A fração não retida D1, obtida na cromatografia de troca aniônica, foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex-G50, eluída no tampão TFA 0,1% e foram obtidas três frações proteicas denominadas F1, F2 e F3 (Figura 5A). As frações obtidas na cromatografia foram analisadas através da eletroforese em gel de tricina-SDS-PAGE na concentração de 20 µg/mL, onde foi possível observar que as três frações apresentaram bandas proteicas com massas moleculares majoritárias entre 6,5 a 14,2 kDa. Exceção feita a fração F1 que também apresentou bandas majoritárias

acima de 14,2 kDa (Figura 5B). As bandas foram melhor visualizadas após o gel ter sido precipitado com nitrato de prata.

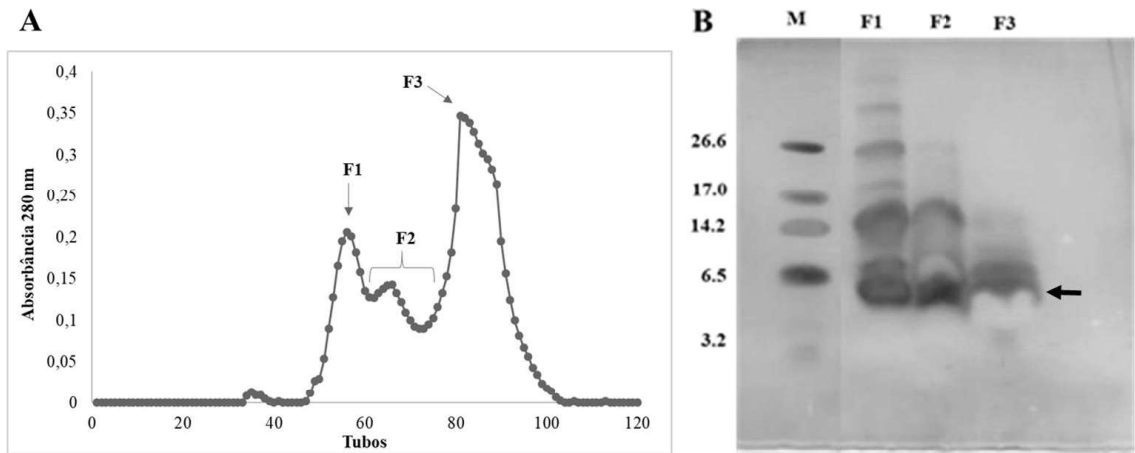


Figura 5. A) Cromatograma obtido após cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G50. As frações foram eluídas em tampão TFA 0,1%. B) Visualização eletroforética do gel de tricina na presença de SDS das frações obtidas em cromatografia Sephadex - G50 após precipitação com nitrato de prata. M – marcador de baixa massa molecular (kDa); F1, F2, F3 – frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular. Seta indicando na fração F3 a banda proteica de menor massa molecular.

4.3. Análise da sequência de aminoácidos presente na fração F3

A banda proteica de menor massa molecular (indicada por seta na Figura 5B) da fração F3 foi extraída do gel e foi identificada como uma defensina nomeada CcDef3 que possui 100% de similaridade com defensinas de *Capsicum frutescens* e *Capsicum annuum* (Figura 6).

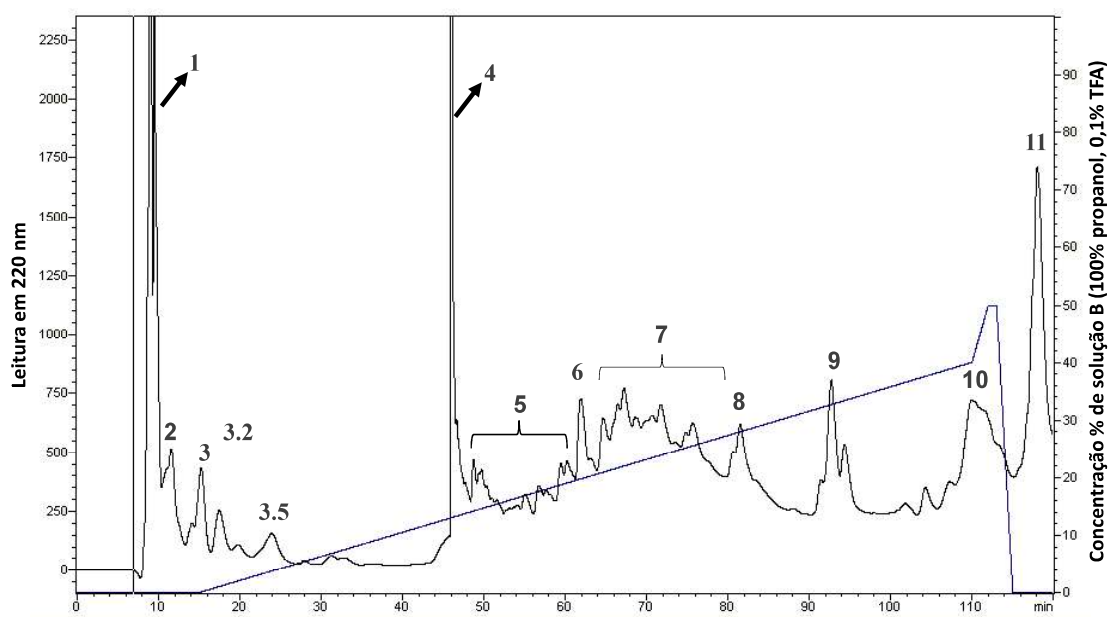
Identificação	10	20	30	40	P (%)	I (%)
CcDef3	-----EGFTDGSCIGFR-----					
Defensina (<i>C. frutescens</i>)	KICEALSGNFKGLCLSSRNCGKVCRR	EGFTDGSCIGFRLQCFCTKPC	100	100		
Defensina J1-1 (<i>C. annuum</i>)	KICEALSGNFKGLCLSSRDGNCVCR	EGFTDGSCIGFRLQCFCTKPC	100	100		
Defensina MtDef4.5 (<i>M. truncatula</i>)	RKCLSQSHSFKGLCLSDQNCATVCL	TEGFTDGRRCRGFRQRCFC	83	83		
Defensina SD2 (<i>C. annuum</i>)	RKCESQSHRFKGPCVRKSNCASVCQ	TEGFTGGHCRGFRRCFC	75	75		

Figura 6. Alinhamento de resíduos de aminoácidos do peptídeo de menor massa molecular da fração F3 obtido por cromatografia de exclusão molecular. As sequências foram obtidas no Blast e alinhadas pelo Clustal Omega. O peptídeo denominado CcDef3 com aproximadamente 6,5 kDa apresentou similaridade com as seguintes sequências: Defensina de *C. frutescens* (Sequência ID: ACM50880.1); Defensina J1-1 de *C. annuum* (ID de sequência: XP_016537483.1); Defensina MtDef4.5 de *Medicago truncatula* (ID de sequência: AET03808.1); e Defensina SD2 de *Capsicum annuum* (ID de sequência: KAF3650437.1). P% indica a porcentagem de resíduos positivos (que apresentam as mesmas características físico-bioquímicas). I% indica a porcentagem de resíduos idênticos e são escritos em cinza. Espaços (-) foram introduzidos para melhor alinhamento

4.4. Fracionamento de peptídeos da fração F3 obtida na cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC

Após a obtenção das frações F1, F2 e F3, a fração F3 obteve os melhores resultados na inibição de leveduras (AGUIEIRAS et al., 2021) e foi escolhida para ser fracionada na cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC. O cromatograma mostra que a fração F3 foi fracionada em 11 picos (Figura 7A). No perfil eletroforético obtido é possível visualizar bandas proteicas principalmente nas frações mais apolares denominadas de fração H7 a H11 (Figura 7C). As amostras das frações H8 e H10 foram nomeadas: H8a para banda proteica de maior massa molecular e H8b para a banda de menor massa molecular e H10 para a banda proteica de menor massa molecular. Essas bandas, como descrito logo abaixo, foram escolhidas para caracterização da determinação de seus aminoácidos por espectrometria de massas, entretanto H10 não apresentou perfil eletroforético para a realização da metodologia.

A



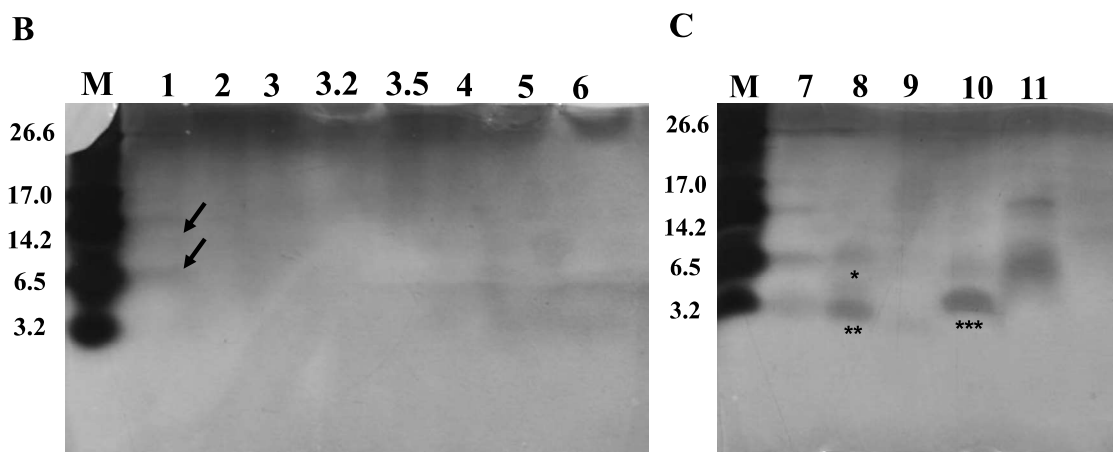


Figura 7. (A) Cromatograma obtido após cromatografia de fase reversa em HPLC. Coluna C8/C18. Amostras eluídas nas soluções A (0,1% TFA) e B (100% propanol, 0,1% TFA). (B) Perfil eletroforético do gel de tricina na presença de SDS dos picos 1 até o 6 coletados na cromatografia de HPLC após precipitação com prata. (C) Perfil eletroforético do gel de tricina na presença de SDS dos picos 7 até o 11 coletados na cromatografia de HPLC após precipitação com prata. M – marcador de baixa massa molecular (kDa); 1-11 - frações obtidas na cromatografia em HPLC. *H8a; **H8b; ***H10.

4.5. Análise da sequência de aminoácidos presente na fração H8

O perfil eletroforético resultante da cromatografia de fase reversa em HPLC possibilitou visualizar peptídeos do fracionamento de F3. A partir de uma análise desses resultados, resolvemos selecionar as bandas majoritárias e de menores massas moleculares das frações 8 e 10, para identificação dos aminoácidos desses peptídeos (Figura 7C). Para a amostra H8b obtivemos um resultado, no qual a identificação dos aminoácidos revelou que essa banda proteica era a mesma caracterizada anteriormente na fração F3 (Figura 6). No sequenciamento da banda H8b, obtivemos um fragmento dessa defensina com alguns resíduos a mais (Figura 8). É possível visualizar uma parte da região γ -core, a sequência conservada que fica localizada em GXCX₃₋₉C, onde X pode ser qualquer resíduo de aminoácido.

Identificação	10	20	30	40	50	P (%)	I (%)
CcDef3	-----REGFTDGSCIGFRL-----						
Defensina (<i>C. frutescens</i>)	MMAEAKICEALSGNFKGLCLSSRNCGKVCRREGFTDGSCIGFRLQCFCTKPCA--					100	100
Defensina J1-1 (<i>C. annuum</i>)	MMAEAKICEALSGNFKGLCLSSRDGCVCRREGFTDGSCIGFRLQCFCTKPCA--					100	100
Defensina J1-2-like (<i>C. maxima</i>)	MVAEARLCETPSANFRGLCFSSNNCGHVCKGEGFNDGACRGFRLRCLCSKQVC--					92	76,9
Defensina MtDef4.5 (<i>M. truncatula</i>)	MVVEARKCLSQSHSFKGLCLSDQNCATVCLTEGFTDGRGFRQRCFCSKPCLKV					85	83,3
Defensina Ec-AMP-D1-like isoform X1 (<i>L. rigidum</i>)	QVALARECQAQSHSFKGVCSVDTCNASVCQTEGFTGGKICIGFRQRCFCTRNC---					85	83,3

Figura 8. Alinhamento de resíduos de aminoácidos da banda proteica de menor massa molecular - H8b. As sequências foram obtidas no Blast e alinhados pela Clustal Omega. O peptídeo denominado CcDef3 com aproximadamente 6,5 kDa apresentou similaridade com as seguintes sequências: Defensina de *C. frutescens* (Sequência ID: ACM50880.1); Defensina J1-1 de *C. annuum* (ID de sequência: XP_016537483.1); Defensina J1-2-like *Cucurbita máxima* (ID de sequência: XP_022992939.1); Defensina MtDef4.5 de *Medicago truncatula* (ID de sequência:

AET03808.1) e defensina EC-AMP-D1-like isoforma X1 de *Lolium rigidum* (ID de sequência: XP_047061452.1). P% indica a porcentagem de resíduos positivos (que apresentam as mesmas características físico-bioquímicas). I% indica a porcentagem de resíduos idênticos e são escritos em cinza. Espaços (-) foram introduzidos para melhor alinhamento.

4.6. Modelo da estrutura terciária de CcDef3

A determinação de parte da sequência de aminoácidos da defensina obtida da amostra do HPLC e agora denominada CcDef3, possibilitou explorar melhor este peptídeo e visualizá-lo em sua estrutura terciária (Figura 9). A estrutura apresenta 3 fitas β antiparalelas, entre a fita $\beta 2$ (representada em azul claro) e a fita $\beta 3$ (representada em azul escuro) está localizada a alça que é parte da região do γ -core. Também apresenta uma α -hélice (representada em rosa) como parte integrante da defensina.

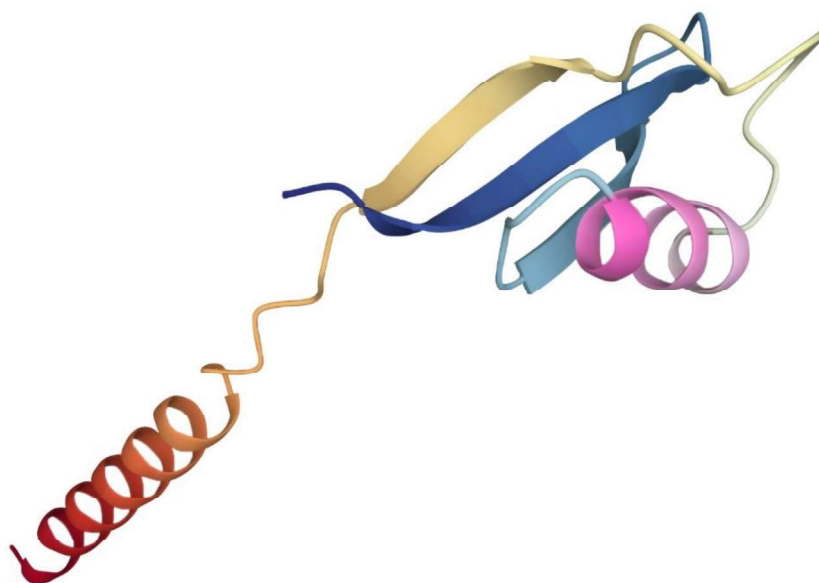


Figura 9. Predição *in silico* da estrutura terciária da defensina CcDef3 gerada pelo Mol*Viewer.

4.7. Predição do potencial de interação com membranas

Usamos os algoritmos de aprendizado de máquina BChemRF-CPPred, MLCPP e CellPPD-Mod para prever o potencial de penetração celular dos peptídeos purificados. Todos os algoritmos previram que a defensina CcDef3 é incapaz de penetrar nas membranas celulares (pontuação de probabilidade no MLCPP de 0,2515, pontuação de probabilidade no BChemRF-CPPred de 0,9543 e pontuação de -0,54 no CellPPD-MOD). Da mesma forma, a pesquisa do BLAST no banco de dados CPPsite 2.0 não retornou correspondências.

4.8. Ensaio de inibição da atividade de α -amilase salivar

Com o intuito de descobrir mais sobre o potencial da inibição da enzima α -amilase pela fração F3, a qual mostrou possuir capacidade de inibição da atividade α -amilásica em larvas de *Tenebrio molitor* (AGUIEIRAS et al., 2021), realizamos um

ensaio com a α -amilase salivar humana. Como mostrado na Figura 10, a fração F3 inibiu a α -amilase salivar humana em 100% na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

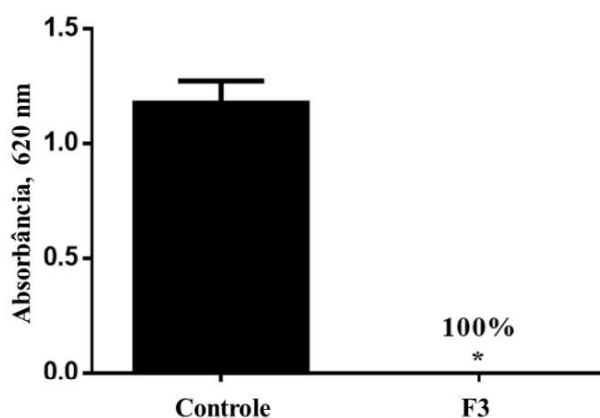


Figura 10. Atividade de α -amilase salivar humana na presença e ausência de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração F3. Os valores são a média ($\pm$ DP) de triplicados. * Indica significância pela ANOVA - ($p < 0,05$).

4.9. Efeito da fração F3 sobre o crescimento fúngico dos fungos filamentosos dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum*

A amostra F3, resultante da cromatografia de exclusão molecular, foi testada sobre o crescimento de fungos filamentosos dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum* após ser identificada como uma fração de interesse em pesquisas anteriores, indicando sua capacidade de inibição de leveduras de interesse médico do gênero *Candida*, incluindo *C. albicans* (AGUIEIRAS et al., 2021). Uma curva de crescimento foi realizada, visualizando através do leitor de placas na técnica de leitura de absorbância em um intervalo de 6 em 6 horas por um período de 48 horas. A fração F3 obteve resultado mais significativo nos fungos do gênero *Colletotrichum*. No *C. lindemuthianum* foi observada uma inibição de 51% e 60,9% nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. No *C. gloeosporioides* ocorreu uma inibição de 21,2% na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 7% na de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nos ensaios com *Fusarium*, *F. oxysporum* teve o crescimento inibido em 18,3% e 22,6% e *F. solani* ocorreu inibição 10,4% e 14,3% nas concentrações utilizadas de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 11).

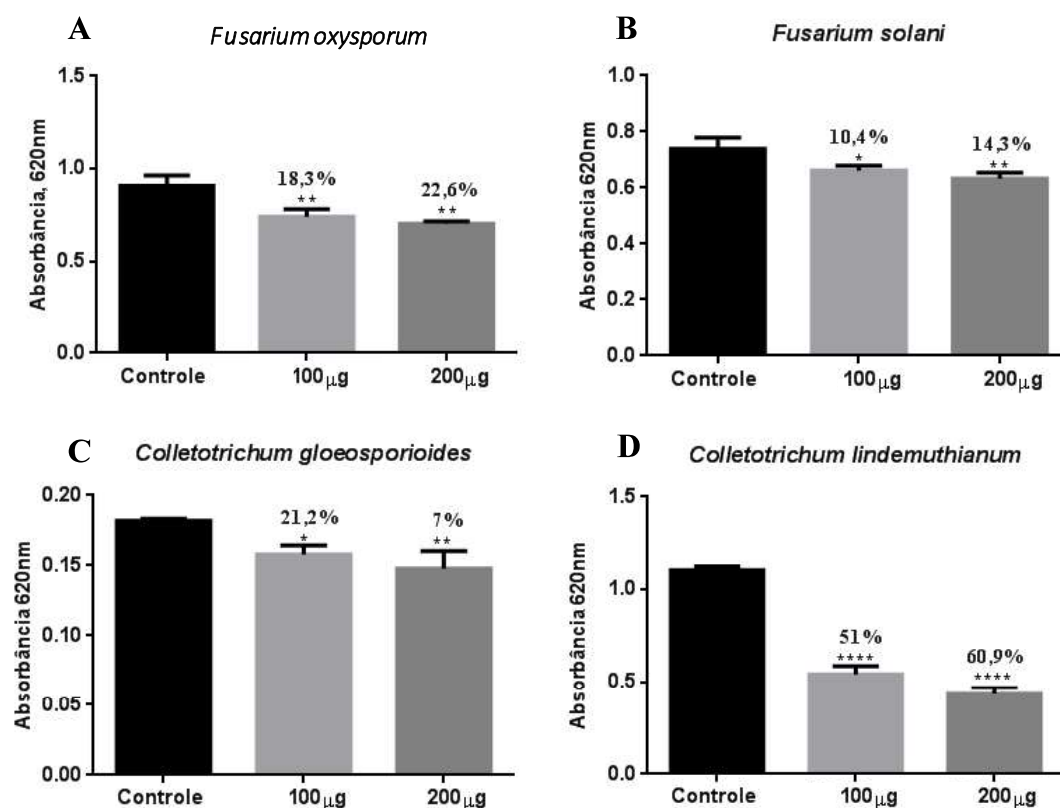


Figura 11. Efeito da inibição do crescimento fúngico na ausência (controle) e na presença da fração F3 obtida de frutos de *C. chinense* (acesso UENF 1751) nas concentrações de 100 µg.mL⁻¹ e 200 µg.mL⁻¹, registrada após 48 horas nos fungos filamentosos (A) *Fusarium oxysporum*, (B) *Fusarium solani*, (C) *Colletotrichum gloeosporioides* e (D) *Colletotrichum lindemuthianum*. Legenda: ● Controle; ■ F3 100 µg.mL⁻¹; ▲ F3 200 µg.mL⁻¹. Os experimentos foram realizados em triplicata. * Indica significância pelo teste ANOVA – (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (****) p < 0,0001.

4.10. Efeito da fração F3 sobre a permeabilização de membranas e viabilidade celular

Após os ensaios de inibição, os fungos *C. lindemuthianum* e *F. solani* foram selecionados e foram realizados testes de permeabilização de membranas através do uso da sonda SYTOX Green e de morte celular usando iodeto de propídio (IP) para identificar células necrosadas. Em nenhum dos fungos testados, foi possível observar a marcação significativa das células pelas sondas utilizadas (Figura 12).

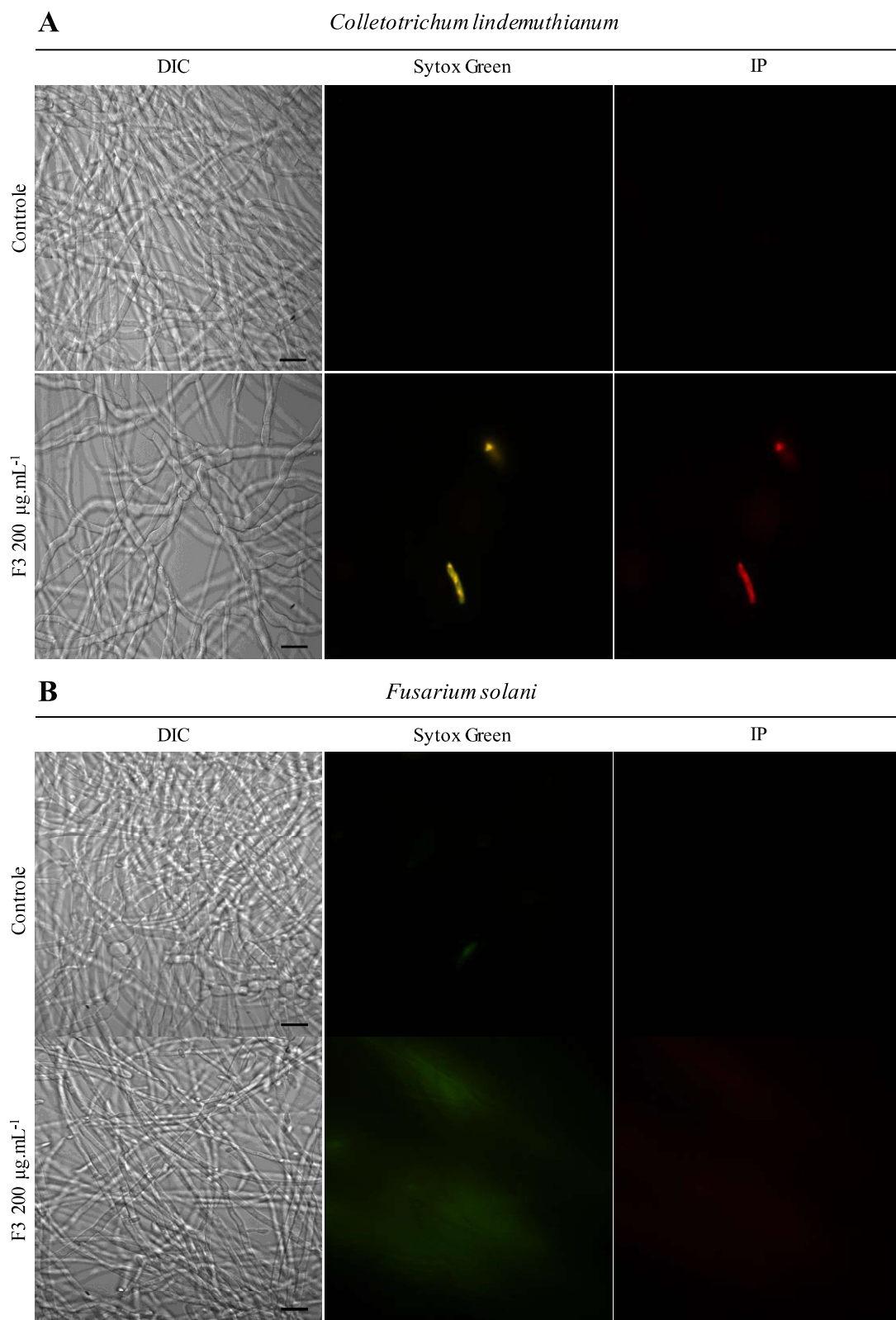


Figura 12. Imagens das células dos fungos filamentosos *C. lindemuthianum* (A) e *F. solani* (B) após ensaio de permeabilização de membrana com a sonda fluorescente SYTOX Green e de viabilidade celular com Iodeto de propídio (IP). As células foram visualizadas por DIC e por microscopia de fluorescência. Barra de 20 μm .

4.11. Efeito da fração F3 sobre o aumento da produção endógena de ROS em fungos filamentosos

Ensaio para avaliar o aumento da produção endógena das espécies reativas de oxigênio (ROS) utilizando a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) foram realizados na presença da fração F3 na concentração de 200 µg.mL⁻¹. No ensaio realizado com o fungo filamentoso *C. lindemuthianum* não foi possível observar a fluorescência e consequentemente o aumento de ROS (Figura 13A), enquanto que no ensaio realizado com *F. solani* houve um aumento da produção endógena de ROS como indicado pela fluorescência nas imagens da microscopia (Figura 13B) mostrando que mesmo não ocorrendo inibição significativa, a fração causa estresse oxidativo nesta espécie de fungo testada.

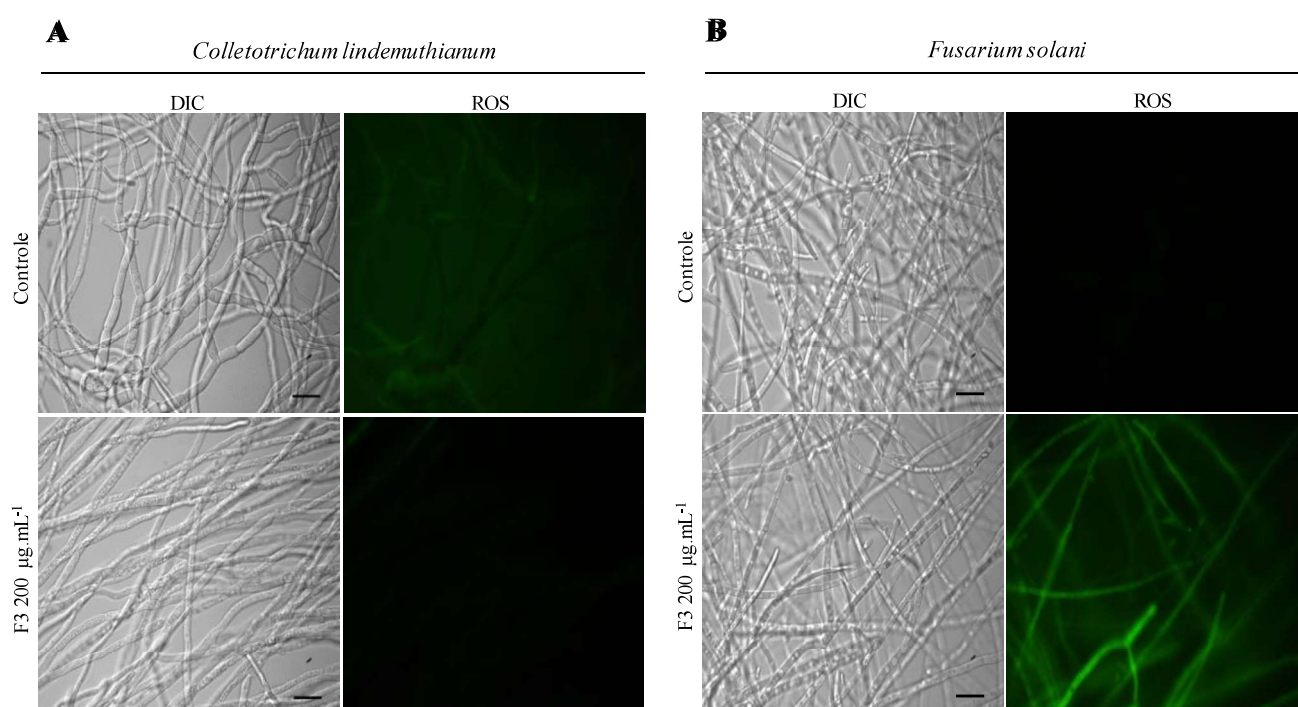


Figura 13. Imagem das hifas de fungos filamentosos de *C. lindemuthianum* (A) e *F. solani* (B) após ensaio para detecção de aumento endógeno de ROS com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) na concentração de 200 µg.mL⁻¹. As células fúngicas foram visualizadas por DIC e por fluorescência. Barra de 20 µm.

4.12. Efeito da fração F3 sobre o crescimento fúngico de leveduras

A amostra F3 também foi utilizada para realizar ensaio de inibição do crescimento de diversas espécies de leveduras, já que a amostra tinha obtido um resultado significativo com outras leveduras anteriormente descritas por Aguiéiras et al. (2021). Os resultados mais relevantes foram obtidos com as leveduras *C. braccarensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. pelliculosa* e que ocorreu inibição na presença da fração F3 utilizando as concentrações de 100 µg.mL⁻¹ e 200 µg.mL⁻¹. *C. braccarensis* inibiu

95,4% na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 97,5% com F3 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o que indica uma pequena diferença de inibição entre as concentrações utilizadas. *C. glabrata* inibiu 76,5% e 99,7% nas concentrações analisadas respectivamente. *C. nivariensis* teve uma inibição de 95,4% e 98,2% quando testado com F3, uma inibição que assim como *C. braccarensis* não possui grande diferença percentual nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. *C. pelliculosa* por sua vez, inibiu 73,7% e 91,6% respectivamente. A levedura *C. parapsilosis* também teve resultado positivo inibindo 88,4% na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo mais expressivo que a inibição de 12,7% de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Essas cinco leveduras que obtiveram resultado mais expressivo foram selecionadas para realizar outros experimentos. É interessante ressaltar que *C. mogii* também teve inibição de 45,6% na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 78,5% na de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, que é menor em relação as outras leveduras citadas. Nenhum resultado significativo foi observado para *C. krusei* (Figura 14).

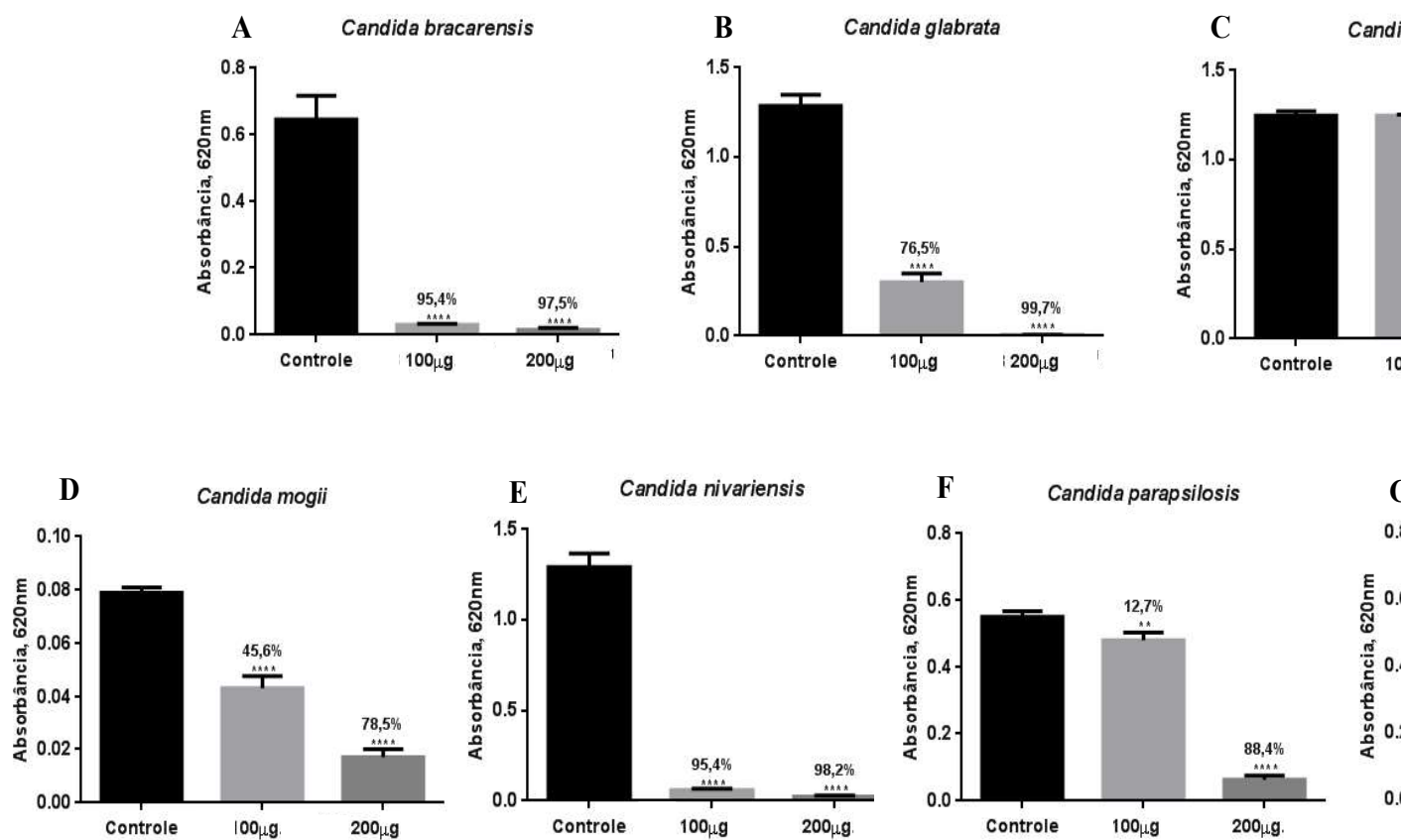


Figura 14. Efeito da inibição do crescimento de leveduras na ausência (controle) e na presença da fração F3 obtida de 1751 nas concentrações de 100 µg.mL⁻¹ e 200 µg.mL⁻¹, após 24 horas nas leveduras (A) *Candida bracarensis*; (B) *Candida glabrata*; (C) *Candida guilliermondii*; (D) *Candida mogii*; (E) *Candida nivariensis*; (F) *Candida parapsilosis* e (G) *Candida pelliculosa*. Legenda: ● Controle; ■ F3. Os experimentos foram realizados em triplicata. * Indica significância pelo teste ANOVA - (*) p < 0.05; (**) p < 0,01; (****) p < 0,0001.

4.13. Efeito da fração F3 sobre a permeabilização de membranas de leveduras

Após o ensaio de inibição de crescimento, as células das leveduras tratadas com a fração F3 apresentaram-se marcadas pela sonda fluorescente SYTOX Green, indicando que a membrana plasmática dessas células estava comprometida. Nas leveduras *C. braccarensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis* e *C. pelliculosa* é possível visualizar a fluorescência para iodeto de propídio, inclusive, nota-se uma correspondência, em sua maioria, nos campos visualizados entre as células marcadas por SYTOX Green e iodeto de propídio (Figuras 15A-17). A levedura *C. parapsilosis* não apresentou marcação celular pela sonda de Iodeto de propídio, na presença da fração F3 (Figura 16B). Observamos também que a levedura *C. pelliculosa* apresentou, em especial, a formação de pseudo-hifas nas células tratadas (Figura 17).

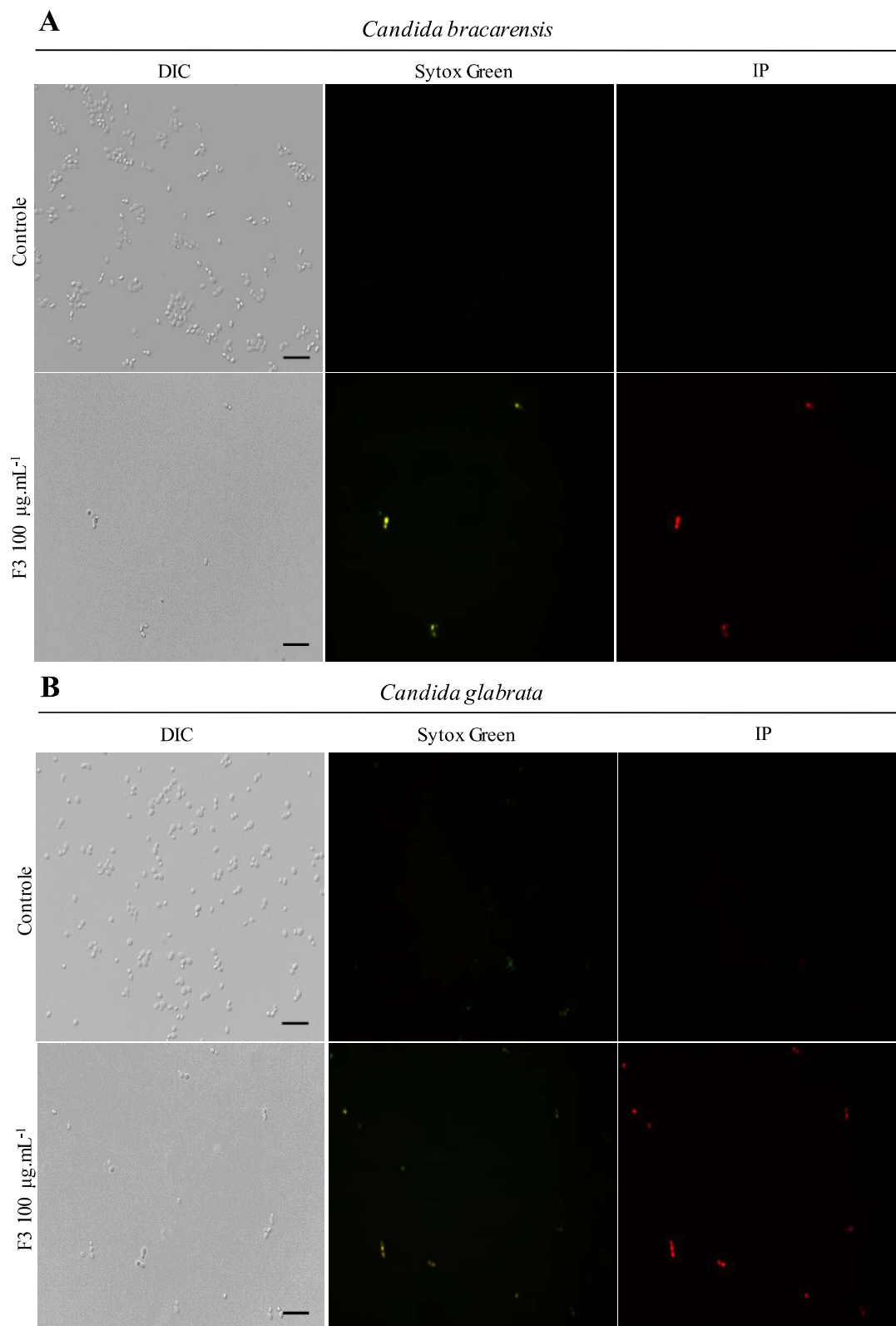


Figura 15. Imagens das células das leveduras *Candida braccarensis* (A) e *Candida glabrata* (B) após ensaio de permeabilização de membrana com a sonda fluorescente SYTOX Green e de viabilidade celular com Iodeto de propídio (IP). As células foram visualizadas por DIC e por microscopia de fluorescência. Barra de 20 μm .

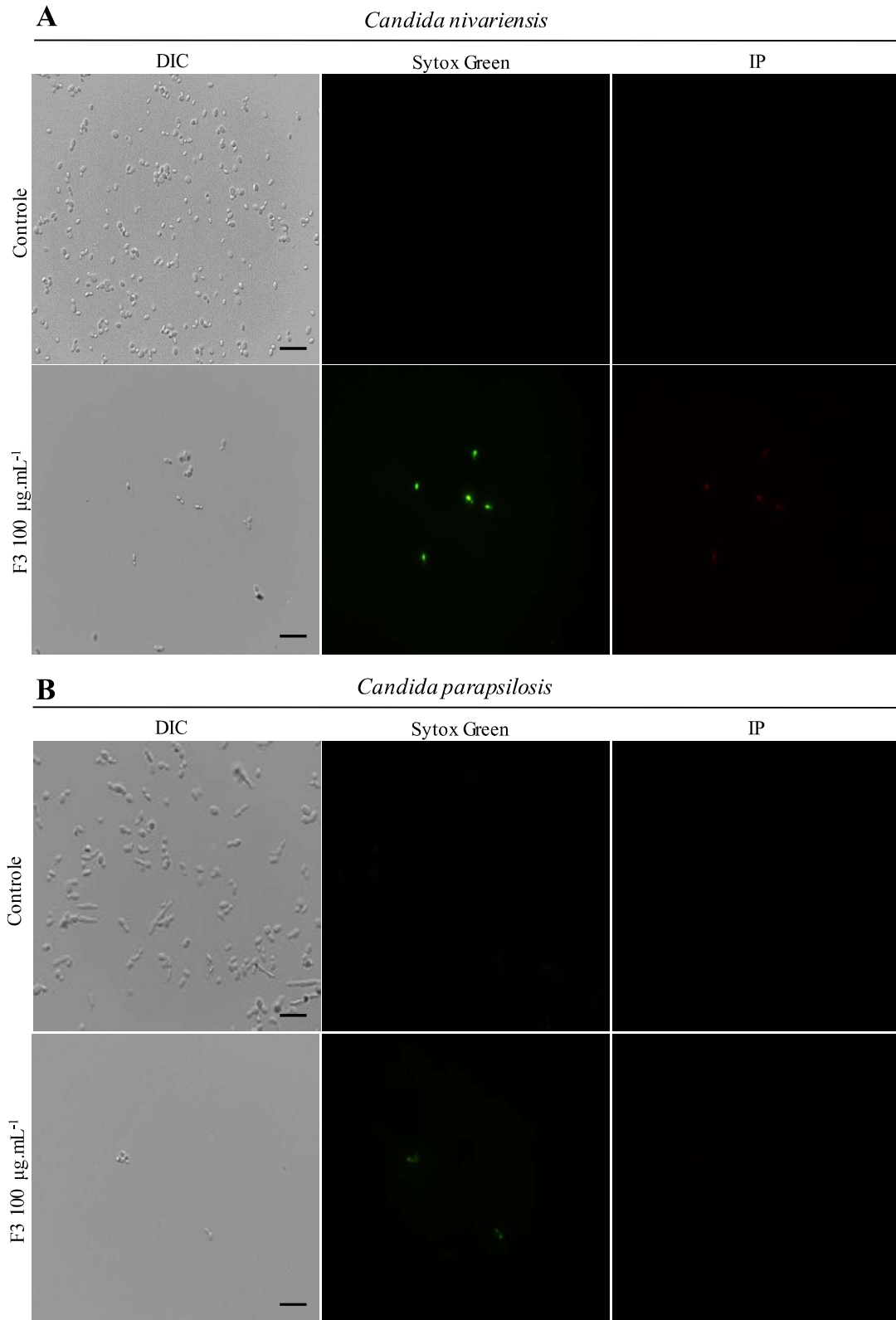


Figura 16. Imagens das células das leveduras *Candida nivariensis* (A) e *Candida parapsilosis* (B) após ensaio de permeabilização de membrana com a sonda fluorescente SYTOX Green e de viabilidade celular com Iodeto de propídio (IP). As células foram visualizadas por DIC e por microscopia de fluorescência. Barra de 20 μm .

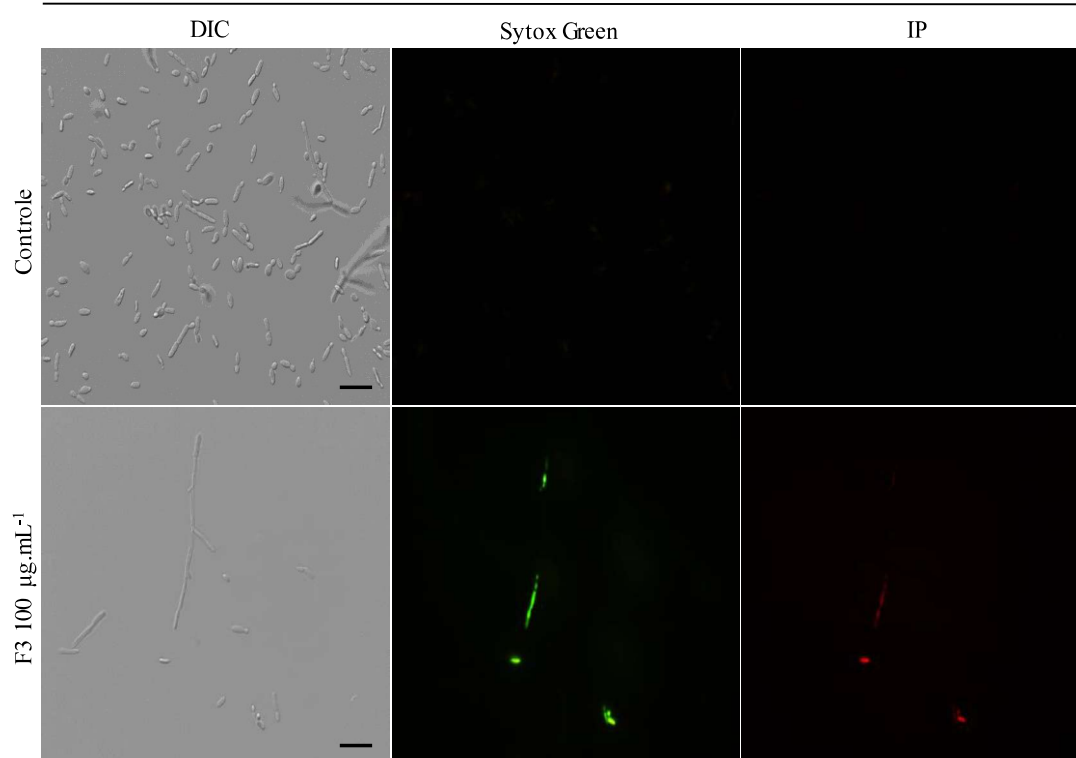


Figura 17. Imagens das células das leveduras *Candida pelliculosa* após ensaio de permeabilização de membrana com a sonda fluorescente SYTOX Green e de viabilidade celular com Iodeto de propídio (IP). As células foram visualizadas por DIC e por microscopia de fluorescência.

Para melhor visualização do resultado obtido nas imagens de microscopia, foi realizada uma contagem de células de cinco campos aleatórios de DIC do controle e do teste com F3 na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em todas as leveduras testadas. É possível notar uma diminuição expressiva do número de células do controle em relação às tratadas com F3 em todas as leveduras testadas. O melhor resultado obtido foi com *C. braccarensis* que 55,5% das células demonstraram fluorescência com a sonda SYTOX Green, indicando que essas células na presença de F3 tiveram a membrana comprometida e 48,1% das células também apresentaram fluorescência com a sonda de iodeto de propídio que marca células necróticas, sendo essa a porcentagem de células com membrana comprometida e necrosadas, respectivamente. *C. glabrata* também obteve um resultado similar, apresentando 47,6% de células com comprometimento na membrana e 44,5% destas células tiveram morte celular. *C. nivariensis*, *C. parapsilosis* e *C. pelliculosa* tiveram uma porcentagem menor de células com fluorescência em relação ao número total, sendo *C. parapsilosis* a que possui maior discrepância entre a porcentagem de células coradas com SYTOX Green em relação as que tiveram fluorescência com IP, apenas 3,2% (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação de células e porcentagem de células fluorescentes na presença das sondas SYTOX Green (SG) e Iodeto de propídio (IP)

Espécies de leveduras	Amostra	Nº de células visualizadas em DIC	Nº de células visualizadas em SG	% de células fluorescentes em SG	Nº de células visualizadas em IP	% de células fluorescentes em IP
<i>C. braccarensis</i>	controle	176,4 ± 28,4	0	0	0	0
	F3	2,7 ± 2	1,5 ± 1,6	55,5	1,3 ± 1,4	48,1
<i>C. glabrata</i>	controle	151 ± 20,3	6,2 ± 5,4	4,1	1,2 ± 1,3	0,8
	F3	25,6 ± 3	12,2 ± 5,2	47,6	11,4 ± 5,1	44,5
<i>C. nivariensis</i>	controle	295 ± 26,3	0	0	0	0
	F3	25,6 ± 7,3	7,9 ± 4,3	30,8	5,7 ± 3,8	22,3
<i>C. parapsilosis</i>	controle	165,3 ± 15,9	7 ± 7,9	4,2	2,8 ± 4,1	1,7
	F3	9,3 ± 4,7	1,9 ± 2,2	20,4	0,3 ± 0,8	3,2
<i>C. pelliculosa</i>	controle	183 ± 23,1	0	0	0	0
	F3	21,5 ± 4,6	4 ± 2,8	18,6	3,2 ± 2,6	14,8

As amostras foram obtidas do ensaio de permeabilização da membrana plasmática. O número de células foi determinado por contagem de cinco campos aleatórios do DIC. O número total de células em DIC de cada levedura (no controle e teste) foi assumido como 100%. Os dados indicam significância pela análise de variância unidirecional ANOVA ($P < 0,05$) entre os experimentos e seus respectivos controles.

4.14. Efeito da fração F3 sobre o aumento da produção endógena de ROS em leveduras

Além de avaliar as membranas celulares na presença da fração F3, realizamos ensaio para averiguar o aumento de ROS endógeno nas leveduras testadas. É possível notar que não há aumento expressivo de ROS, pois, foi visualizada pouca fluorescência nas leveduras testadas com a amostra F3 (Figuras 16A-18). Também foi observada uma redução do número de células nas leveduras na presença de F3 na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se comparado ao controle em todas as leveduras testadas. É válido ressaltar que *C. pelliculosa* apresentou formação de pseudo-hifas na fotomicroscopia (Figura 20), assim como mostrado anteriormente no ensaio de permeabilização de membranas (Figura 17).

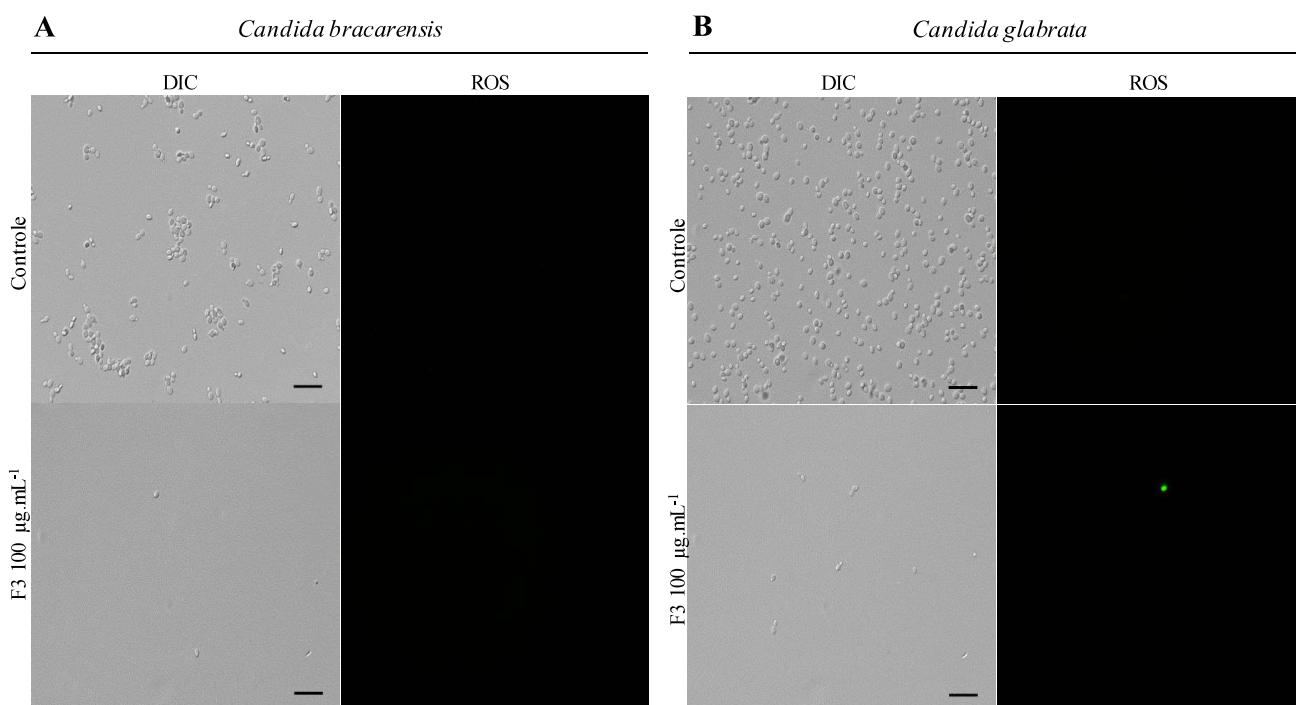


Figura 18. Imagem das células fúngicas de *Candida braccarensis* (A) e *Candida glabrata* (B) após ensaio para detecção de aumento endógeno de ROS com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA). As leveduras foram visualizadas por DIC e por fluorescência. As células foram tratadas com F3 por 24 h e então testadas para detecção de ROS. As células controle foram tratadas apenas com sonda (H_2DCFDA). Barra de 20 μM .

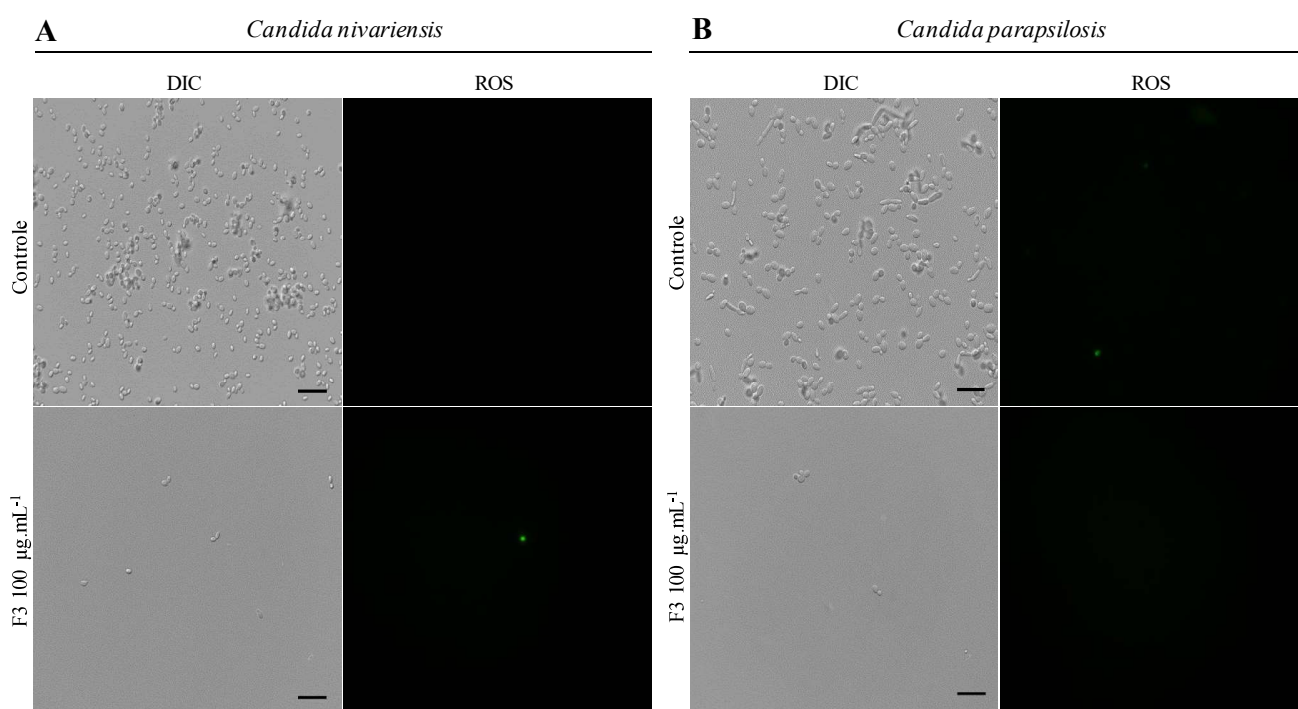


Figura 19. Imagem das células fúngicas de *Candida nivariensis* (A) e *Candida parapsilosis* (B) após ensaio para detecção de aumento endógeno de ROS com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA). As leveduras foram visualizadas por DIC e por fluorescência. As células foram tratadas com F3 por 24 h e então testadas para detecção de ROS. As células controle foram tratadas apenas com sonda (H_2DCFDA). Barra de 20 μM .

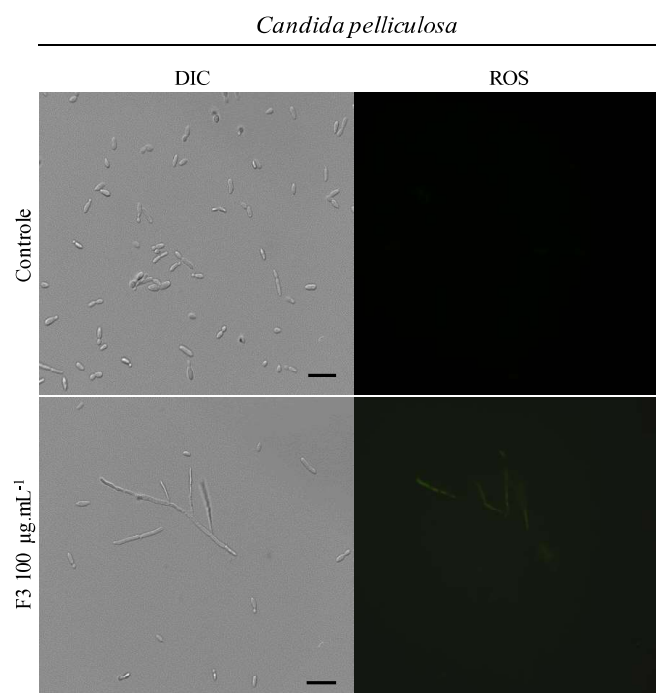


Figura 20. Imagem das células fúngicas de *Candida pelliculosa* após ensaio para detecção de aumento endógeno de ROS com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA). As leveduras foram visualizadas por DIC e por fluorescência. As células foram tratadas com F3 por 24 h e então testadas para detecção de ROS. As células controle foram tratadas apenas com sonda (H₂DCFDA).

Uma tabela foi realizada para melhor compreensão do ensaio do aumento endógeno de ROS. Foram escolhidos cinco campos de DIC aleatórios para contagem e indicação da porcentagem de fluorescência com a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato. É possível observar que não ocorreu um aumento efetivo de ROS endógena nas condições testadas, sendo *C. nivariensis* a levedura que na presença da amostra F3 apresentou maior incidência de células fluorescentes, um percentual de 11,5% em relação ao número total de células em contraste com *C. braccarensis* que não apresentou fluorescência (Tabela 3).

Tabela 3. Quantificação de células e porcentagem de células fluorescentes na presença da sonda H₂DCFDA das amostras obtidas do ensaio de aumento da produção de ROS.

Espécies de leveduras	Amostra	Nº de células visualizadas em DIC	Nº de células visualizadas na fluorescência em ROS	% de células fluorescentes
<i>C. braccarensis</i>	controle	217,8 ± 40,4	0,6 ± 0,5	0,3
	F3	2,2 ± 1,6	0	0
<i>C. glabrata</i>	controle	387,2 ± 59,5	0,2 ± 0,4	0,1
	F3	7,4 ± 1,3	0,8 ± 0,4	10,8
<i>C. nivariensis</i>	controle	464,2 ± 82,9	0	0
	F3	12,2 ± 4,6	1,4 ± 0,5	11,5
<i>C. parapsilosis</i>	controle	281,3 ± 71,2	3 ± 1,7	1,1
	F3	7,5 ± 2,3	0,3 ± 0,8	4
<i>C. pelliculosa</i>	controle	85,8 ± 11	0,4 ± 0,9	0,5
	F3	23,5 ± 4,1	2,2 ± 2,4	9,36

O número de células foi determinado por contagem de cinco campos aleatórios do DIC. O número total de células em DIC de cada levedura (no controle e teste) foi assumido como 100%. Os dados indicam significância pela análise de variância unidirecional ANOVA ($P < 0,05$) entre os experimentos e seus respectivos controles.

4.15. Análise de viabilidade celular

Tendo em vista os resultados anteriores com as leveduras, foi analisada a viabilidade celular. A fração F3 na concentração de 100 µg.mL⁻¹ ocasionou uma redução na quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) em todas as leveduras testadas. Esse experimento indica que a atividade antifúngica de F3 é fungicida, contudo em porcentagens diferentes levando em consideração a levedura analisada. A levedura *C. nivariensis* apresentou UFCs com formatos que não eram circulares, sugerindo que pode ter ocorrido uma modificação morfológica em algumas colônias após 48h (Figura 21A).

Organizamos a contagem das colônias em formato de tabela e observamos uma perda de viabilidade de 93,8% em *C. nivariensis*, sendo este o resultado mais expressivo desse experimento. *C. braccarensis* também apresentou um bom resultado na presença da fração F3, com uma perda de viabilidade de 79,6%. As leveduras *C. glabrata* e *C. pelliculosa* obtiveram resultados satisfatórios de 59,6% e 43,3%, respectivamente. E *C. parapsilosis* teve uma perda de viabilidade de 24,7% (Figura 21B).

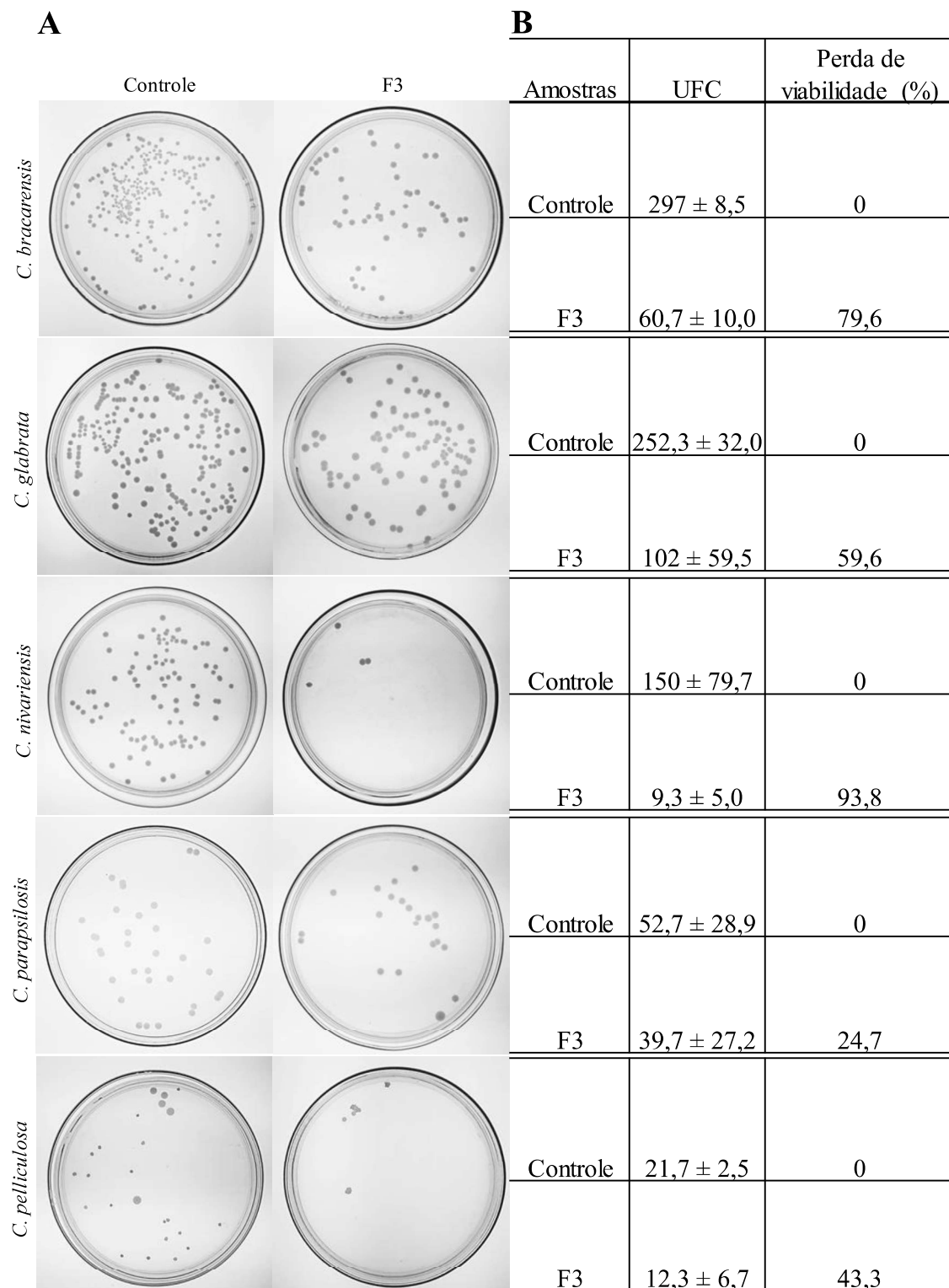


Figura 21. Viabilidade celular das leveduras do gênero *Candida*. (A) Imagens de placa de Petri mostrando o crescimento de colônias no controle (sem adição da fração) e após o tratamento com 100 µg.mL⁻¹ de F3 registradas após 48 h. (B) Quantificação de células e de porcentagem de morte celular de leveduras do gênero *Candida* no controle e após o tratamento com F3 após 48 h.

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo analisamos uma fração proteica denominada F3 proveniente de sucessivas etapas de purificação dos frutos de *C. chinense* (acesso UENF 1751). Essa fração foi recentemente identificada e previamente testada contra algumas leveduras de interesse médico (AGUIEIRAS et al., 2021). Trabalhos realizados pelo nosso grupo vêm identificando diferentes famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas (AMPs), como as tioninas (TAVEIRA et al., 2014), inibidores de protease (DIAS et al., 2013; RESENDE et al., 2021), LTPs (DIZ et al., 2011; ZOTTICH et al., 2014) e defensinas (MELLO et al., 2011; GEBARA et al., 2020). Neste estudo, uma defensina denominada CcDef3, da fração F3, foi identificada e caracterizada.

Vários estudos têm demonstrado o isolamento de AMPs de plantas de pimenta através de técnicas de purificação, como a cromatografia de HPLC. Nosso grupo vem utilizando essa técnica para auxiliar na purificação e identificação dos peptídeos antimicrobianos presentes em frações proteicas de diversas plantas. TAVEIRA et al., 2014, identificou através da espectrometria de massas uma tionina na fração denominada de F1, da sua amostra obtida em HPLC, utilizando extrato de frutos de *C. annuum*. Gebara et al. (2020) a partir do seu extrato proteico de frutos de *C. annuum*, identificou duas defensinas pertencentes às frações F1 e F3 obtidas no HPLC. A fração denominada F3, utilizada neste trabalho, foi obtida após extração proteica e cromatografias de troca aniônica e de exclusão molecular (Figuras 4-5). Inicialmente, uma banda majoritária de aproximadamente 6 kDa foi identificada nesta fração após cromatografia de exclusão molecular e em seguida identificada como pertencente à família das defensinas através de espectrometria de massas (Figura 6). Desta forma foi iniciado todo o procedimento de cromatografia por HPLC objetivando a purificação da defensina inicialmente identificada. A fração F3 gerou diversos picos apresentados no cromatograma (Figura 7) e a fração denominada H8b foi selecionada e apresentou as mesmas características da defensina identificada e nomeada aqui de CcDef3. Porém essa identificação gerou a presença de mais dois resíduos de aminoácidos o que proporcionou mostrar a similaridade de CcDef3 com outras defensinas de plantas como as defensinas de *C. frutescens*, a defensina MtDef4.5 de *Medicago truncatula* e a defensina SD2 de *Capsicum annuum* (Figura 8). Segundo a revisão de Carvalho; Gomes (2011) a região γ -core é uma sequência conservada GXCX₃₋₉C, onde X pode ser qualquer resíduo de aminoácido. Na revisão diversas sequências de defensinas foram alinhadas e demonstrada a região onde ela se localiza e é possível sobrepor a sequência obtida em H8b e notar que parte da γ -core está presente em CcDef3.

Análises de bioinformática revelaram que a defensina CcDef3 é incapaz de penetrar nas membranas celulares como previsto em todos os algoritmos analisados. Essa predição está de acordo com o observado em Aguiéiras et al. (2021), onde um ensaio com o corante SYTOX green revelou que a fração de onde este peptídeo se originou não causou a permeabilização da membrana nas leveduras *Candida albicans*, *C. buinenses* e *C. tropicalis*. Entretanto, no presente trabalho todas as leveduras testadas com F3 tiveram marcação no ensaio de permeabilização de membrana na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24 h (Figuras 15-17 e Tabela 2). As leveduras utilizadas foram diferentes das testadas anteriormente, apesar de pertencerem ao mesmo gênero. E é bem importante destacar que a predição foi realizada com a defensina CcDef3 presente na fração F3, a fração em si possui outra banda proteica de maior massa molecular ainda não identificada. Além disso, a capacidade citotóxica de um AMP depende de fatores como alvos no hospedeiro, a concentração utilizada, a composição lipídica da membrana, os níveis de saturação de ácidos graxos e a capacidade desses fungos de responder aos efeitos inibitórios fortalecendo suas paredes celulares aumentando a síntese de quitina e β -(1,3)-glucano (PAEGE et al., 2019).

Sobre a predição estrutural é importante ressaltar que a estrutura obtida mostrou os mesmos parâmetros que as demais defensinas de plantas, apresentando-se como peptídeos compostos por uma estrutura tridimensional formada por três fitas β antiparalelas e uma α -hélice. Essa estrutura é estabilizada por quatro ligações dissulfeto que formam um motivo de alfa/beta estabilizada com cisteína comum a esses peptídeos (ISHAQ; BILAL; IQBAL, 2019).

Estudos têm demonstrado que as defensinas de plantas possuem atividade inibitória contra diversas espécies de fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Nectria*, *Candida*, entre outros. A atividade inibitória e a concentração necessária para a inibição são dependentes do fungo e da defensina analisada (OSBORN et al., 1995; CARVALHO; GOMES, 2011). No presente trabalho, a fração F3 foi testada primeiramente contra os fungos filamentosos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*, a intenção foi testar a capacidade de inibição desta fração, rica em peptídeos, contra fungos filamentosos, pois, é sabido que AMPs possuem atividade antifúngica também contra esse grupo de patógenos. Silva et al. (2021) obtiveram as frações PEF2A e PEF2B, provenientes de sementes de *C. chinense*, e realizaram testes antifúngicos contra fungos fitopatogênicos. As frações inibiram significativamente o crescimento dos fungos filamentosos, especialmente *C. gloeosporioides*, *C. lindemuntianum* e *F. oxysporum* nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Peptídeos isolados de PEF2A e PEF2B também foram

capazes de inibir o crescimento dos fungos *C. lindemuthianum* e *F. solani*. Nos estudos realizados por Resende et al. (2021) as frações denominadas G3 e G4, provenientes dos mesmos frutos utilizados nessa pesquisa, *C. chinense* (acesso UENF 1751), demonstraram a propriedade de inibição dos fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium* pela primeira vez. A fração G3 apresentou inibição significativa de 48% para o fungo *C. lindemuthianum*, 49% para o fungo *F. lateritium* e 51% para os fungos *F. oxysporum* e *F. solani*. A fração G4 apresentou inibição de 50 e 35% para os fungos *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum*, respectivamente. Importante ressaltar que neste trabalho uma banda proteica de aproximadamente 9 kDa, da fração G4, foi similar à família das LTPs do tipo 1, e uma segunda banda proteica de aproximadamente 6,5 kDa, mostrou similaridade à família das LTPs do tipo 2.

Diante destes resultados obtidos, utilizamos a fração F3, que foi a mais promissora no nosso estudo anterior, para realizar testes antifúngicos com os fungos filamentosos dos gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*. Os fungos utilizados no ensaio de inibição foram *C. gloesporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* e *F. solani*. A fração F3 obteve maior inibição contra *C. lindemuthianum*, inibindo 51% e 60,9% nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente após 48h. *C. gloesporioides*, apesar de ser do mesmo gênero, não obteve inibição tão significativa, apresentando inibição de apenas 21,2% e 7%, respectivamente para as mesmas concentrações da fração F3 (Figura 11). De forma geral, AMPs podem inibir alguns patógenos, mas não outros. Esses resultados dependem das espécies de peptídeos e fungos testados, intervalo de tempo e da concentração utilizada. Sobre o resultado de *C. gloesporioides* é importante considerar que o ensaio de inibição do crescimento é um resultado indireto utilizado para direcionar os microrganismos mais interessantes de aprofundar na pesquisa, os dados são avaliados segundo a absorbância apresentada no leitor de microplacas. Podemos supor que o excesso de emaranhados de hifas formados na presença da fração pode ter levado ao aumento da sua absorbância e essa discordância de resultados entre as concentrações da amostra analisada, sendo possível analisar nas imagens da microscopia realizada (Figuras 12-13).

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que o fungo *C. lindemuthianum* foi o mais susceptível quando testado com a fração F3 e juntamente com *F. solani*, selecionado para comparar e tentar elucidar alguns mecanismos de ação da fração contendo a defensina CcDef3 sobre fungos filamentosos. Portanto, realizamos testes de permeabilização de membrana e morte celular com as sondas SYTOX Green e Iodeto de Propídio. O ensaio não apresentou marcação relevante para indicar permeabilização de membrana e também não apresentou a inibição anteriormente analisada em *C. lindemuthianum* (Figura 12). O que indica que neste intervalo de tempo

analisado, 32 h após o ensaio não há fluorescência significativa. Um exemplo de como a variação do tempo demonstra diferentes períodos de ação do peptídeo na célula foi relatado por Taveira et al. (2017). Estes autores observaram a permeabilização da membrana plasmática de células de *F. solani* após 12 h de incubação com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CaThi (Tionina-like de *C. annuum*), entretanto, a presença da fluorescência da sonda de iodeto de propídio só foi observada após 24 h de incubação, indicando morte celular necrótica de algumas células. Santos et al. (2017) observaram que a fração Fa5, fração rica em proteínas extraídas do fruto de *C. annuum* foi capaz de comprometer a membrana plasmática de *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *F. lateritium* e *F. solani* com 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração após 24 h de incubação, tendo apresentado fluorescência com a sonda SYTOX Green. No ensaio de permeabilização de membrana realizado por Maracahipes et al. (2019b) mostrou que o peptídeo IIFF7Ca foi capaz de causar alterações estruturais na membrana plasmática de *C. gloeosporioides*, resultando na permeabilização das células fúngicas conforme indicado pela fluorescência.

Após ensaios de permeabilização de membrana, foram realizados ensaios de indução endógena de ROS. Este ensaio é realizado para identificar se o peptídeo causa a superprodução de ROS que pode danificar proteínas, DNA e lipídios, levando à morte celular (WANG et al., 2015). Diversos AMPs já demonstraram que causam estresse oxidativo gerado pelo aumento da produção de ROS, isso foi demonstrado no tratamento do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* com a defensina de planta NaD1 que apresentou aumento do acúmulo de ROS (VAN DER WEERDEN; LAY; ANDERSON, 2008). A proteína Cc-LTP2 isolada de *C. canephora* por Bard et al. (2016) aumentou a permeabilidade da membrana e induziu a produção endógena de espécies reativas de oxigênio em todos os fungos fitopatogênicos testados: *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides*, *F. solani*, *F. lateritium* e *Colletotrichum sp* na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24 h. A amostra de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração F3 causou fluorescência e aumento da produção de ROS endógena apenas em *F. solani* após 32 h, indicando estresse oxidativo. *C. lindemuthianum* não obteve fluorescência no ensaio (Figura 13).

Para ampliar o conhecimento sobre a capacidade de inibição da fração F3 foram realizados testes com diferentes leveduras do gênero *Candida*. A fração foi anteriormente testada contra *C. albicans*, *C. buinensis* e *C. tropicalis* e teve potencial inibição em todas as leveduras, principalmente a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24 h, sendo a maior inibição de 86% no crescimento de *C. albicans* (AGUIEIRAS et al., 2021). No trabalho apresentado, a fração F3 inibiu as leveduras *C. bracarensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. parapsilosis* e *C. pelliculosa* nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24 h (Figura 14). Segundo Skalska et al. (2020), a defensina PvD₁ sintética e natural apresentaram a atividade biológica contra quatro espécies diferentes de *Candida* (*C.*

albicans, *C. buinensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) e não apresentou toxicidade *in vivo*. Após 48 h de incubação, sPvD₁ e nPvD₁ inibiram o crescimento de *C. buinensis* em 99,7 e 99,8%, respectivamente, e de *C. tropicalis* em 91,7 e 92,5%, respectivamente. sPvD₁ causou 49,3% de inibição do crescimento em *C. parapsilosis*, com 19,8% encontrados para nPvD₁. No caso de Taveira et al. (2016), CaThi foi capaz de causar 50% de inibição do crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. buinensis* na concentração de 10 µg.mL⁻¹, mas 40 µg.mL⁻¹ foram necessários para atingir a IC₅₀ para *C. pelliculosa*. Importante salientar que também foi observada em microscopia eletrônica de varredura a formação de pseudo-hifas na levedura *C. pelliculosa*, assim como observamos no presente trabalho (Figuras 17, 20-21).

Peptídeos antimicrobianos possuem características anfipáticas, que os permitem interagir com membranas biológicas. Essa interação pode levar à desorganização da membrana e aumento da permeabilização (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). O mecanismo de ação das defensinas está provavelmente em especial relacionado a suas interações com estruturas de membranas de microrganismos, em especial fungos. De acordo com os modelos propostos as defensinas se inter-relacionam preferencialmente com estruturas carregadas negativamente da membrana celular dos patógenos, resultando em um aumento da permeabilidade da membrana e extravasamento celular seguido de morte celular necrótica (ISHAQ; BILAL; IQBAL, 2019). Os AMPs presentes na fração F3 comprovadamente comprometeram as membranas das leveduras testadas na concentração de 100 µg.mL⁻¹ (Figuras 15-17). Segundo analisado na Tabela 2, *C. braccarensis* apresentou 55,5% das células comprometidas, sendo este o melhor resultado, possuindo maior incidência de fluorescência com a sonda SYTOX green (Tabela 2). A tabela também indica uma correlação com as células necrosadas que apresentaram fluorescência com Iodeto de propídio, esta apareceu em menor incidência, porém, muitas vezes de forma correspondente, indicando que as células comprometidas estavam necrosadas após 24 h. É proposto que os peptídeos presentes na fração proteica F3 causem permeabilização da membrana como um dos mecanismos de ação antifúngicos. No trabalho realizado por Taveira et al. (2016) todas as leveduras do gênero *Candida* testadas apresentaram fluorescência positiva para a sonda SYTOX green quando cultivadas por 24 h na presença do IC₅₀ de CaThi.

As espécies reativas de oxigênio são subprodutos naturais do metabolismo normal do oxigênio e possuem importantes funções na sinalização celular e na manutenção da homeostase interna. ROS também são conhecidos como um importante mediador do efeito antifúngico (WANG et al., 2015). O ensaio do aumento endógeno de ROS não apresentou fluorescência relevante, tendo baixa porcentagem de incidência nas leveduras testadas (Figuras 18-20). A levedura *C. nivariensis* apresentou maior

número de células fluorescentes, 11,5% (Tabela 3). O resultado está de acordo com os ensaios realizados com a fração F3 e as leveduras *C. albicans*, *C. buinenses* e *C. tropicalis* (AGUIEIRAS et al., 2021). Foi observado por Oliveira et al. (2019) que Mo-CBP3-PepIII, inspirado em uma proteína antimicrobiana de sementes de *Moringa oleífera*, induziu a formação de poros na membrana plasmática e superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS). Mello et al. (2011) mostraram que a defensina PvD¹ foi capaz de causar permeabilização da membrana nos fungos filamentosos e em leveduras, inclusive do gênero *Candida*. Além disso, PvD₁ também foi capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em células de *C. albicans* e *F. oxysporum*.

As leveduras do gênero *Candida* foram submetidas a ensaio de viabilidade para avaliar a atividade antifúngica da fração analisada. F3 foi capaz de induzir a perda de viabilidade de 93,8%; 79,6%; 59,6% e 43,3% em *C. nivariensis*, *C. bracarensis*, *C. glabrata* e *C. pelliculosa*, respectivamente. *C. parapsilosis* foi menos suscetível e teve uma perda de viabilidade de apenas 24,7%. A LTP denominada de Cc-LTP1, isolada de *C. canephora*, foi capaz de diminuir a viabilidade celular e promover a permeação das membranas das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis* e *S. cerevisiae* (ZOTTICH et al., 2011). Na análise da viabilidade realizada por Taveira et al. (2016), CaThi induziu a perda de viabilidade em todas as células de levedura testadas. As espécies mais suscetíveis ao CaThi foram *C. buinensis*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* com 99,2, 98,9 e 80,3 % de perda de viabilidade, respectivamente, e a menos suscetível foi *C. tropicalis* com 47,9 % de perda de viabilidade. Gebara et al. (2020) analisou a viabilidade celular das frações F2, F3 e F4 obtidas dos frutos de *C. annuum*. A fração F2 induziu uma perda de viabilidade de 73,67%, 96,15% e 99,55% em *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente, enquanto a fração F3 diminuiu o número de células viáveis 100, 100 e 97,04%, respectivamente. A fração F4 também foi capaz de induzir perda de viabilidade celular em 99,34, 29,88 e 91,57% em *C. buinensis*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente. Esses resultados indicaram que o efeito inibitório da fração F3, de *C. chinense*, foi fungicida, o que indica que a fração F3 testada em baixa concentração, possui uma ótima atividade antifúngica, matando as células de leveduras do gênero *Candida* de grande interesse médico. A fração também inibiu o crescimento de fungos fitopatogênicos em menor expressão, mas principalmente em *C. lindemuthianum* e inibiu em 100% a α -amilase salivar humana. Seria interessante aprofundar e identificar a banda proteica de maior massa molecular ainda não identificada na fração F3 utilizada e descobrir se esse efeito tão promissor é fruto do sinergismo.

Por fim, diversos estudos também demonstraram a capacidade de AMPs de diferentes famílias de inibir a α -amilase, tanto de insetos quanto de mamíferos (DIZ et

al., 2011; BARD et al., 2015; AGUIEIRAS et al., 2021; RESENDE et al., 2021). As defensinas são conhecidas por possuírem a capacidade de inibir a enzima α -amilase (PELEGRINI et al., 2008; CARVALHO; GOMES, 2011). Zottich et al. (2011) identificaram duas LTPs, isoladas de grãos de café (*C. canephora*), que foram capazes de inibir a atividade da enzima α -amilase em mamíferos. Anteriormente demonstramos que F3 foi capaz de inibir as enzimas α -amilase das larvas do inseto *Tenebrio molitor* na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a atividade α -amilásica foi inibida em 96%. O teste então foi realizado também com α -amilase salivar humana, na mesma concentração e a inibição foi de 100%. Os peptídeos de *Capsicum chinense* comprovaram serem versáteis, pois, possuem atividades antifúngicas e de inibição enzimática (DIAS et al., 2013; AGUIEIRAS et al., 2021; RESENDE et al., 2021; SILVA et al., 2021). Essas propriedades evidenciam o potencial dessas proteínas como ferramentas biotecnológicas de aplicação na agricultura no controle de patógenos e sua ação em leveduras do gênero *Candida*, indicam potenciais agentes terapêuticos em um momento que a resistência antimicrobiana é preocupante e indica a urgência de novas alternativas de combate aos microrganismos fúngicos (WHO, 2018; NICOLA et al., 2019; OPAS, 2020).

6. CONCLUSÕES

- O fracionamento e caracterização do extrato proteico de frutos de *C. chinense* proporcionaram a obtenção de proteínas entre 6 e 26 kDa;
- Entre os peptídeos caracterizados, obtivemos uma defensina com massa molecular em torno de 6 kDa que foi denominada CcDef3;
- A imagem tridimensional da defensina CcDef3 apresenta em sua estrutura 3 folhas β antiparalelas e 1 α -hélice como outras descritas na literatura;
- A fração denominada F3, rica em moléculas de baixa massa molecular, foi capaz de inibir 100% da α -amilase salivar humana;
- A fração F3 demonstrou ser capaz de inibir de forma muito eficaz as leveduras do gênero *Candida* e em menor proporção os fungos filamentosos;
- Todas as leveduras testadas com a fração F3 apresentaram efeito de permeabilização de membrana, o que não foi observado para os fungos filamentosos;
- No ensaio de ROS não houve resultado significativo da fluorescência nas células testadas com exceção do fungo *F. solani* o qual apresentou indução de ROS endógena na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- A análise de viabilidade celular indicou que a fração F3 é fungicida e as leveduras *C. nivariensis* e *C. braccarensis* tiveram maior perda de viabilidade, de 93,8% e 79,6% quando comparado aos demais fungos testados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P. et al. CPPsite 2.0: A Repository of Experimentally Validated Cell-Penetrating Peptides. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D1098–D1103, jan. 2016.
- AGRIOS, G. N. Plant Pathology 2.0. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 4, p. 315–318, 2005.
- AGUIEIRAS, M. C. L. et al. 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 and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 3, p. 862–872, 2021.
- ALLEN, A. et al. Plant defensins and virally encoded fungal toxin KP4 inhibit plant root growth. **Planta**, v. 227, n. 2, p. 331–339, 2008.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- BARD, G. C. V. et al. Characterization of Peptides from *Capsicum annuum* Hybrid Seeds with Inhibitory Activity Against α -Amylase, Serine Proteinases and Fungi. **Protein Journal**, v. 34, n. 2, p. 122–129, 2015.
- BARD, G. C. V. et al. Purification, biochemical characterization, and antimicrobial activity of a new lipid transfer protein from *Coffea canephora* seeds. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1–16, 2016.
- BENKO-ISEPPON, A. M. et al. Overview on Plant Antimicrobial Peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 11, n. 3, p. 181–188, 2010.
- BERNFELD, P. Amylases, alpha and beta. **Methods in enzymology I**, v. I, n. 540, p. 149–158, 1955.
- BERROCAL-LOBO, M. et al. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. **Plant Physiology**, v. 128, n. 3, p. 951–961, 2002.
- BLEACKLEY, M. R. et al. Histidine-rich defensins from the solanaceae and brasicaceae are antifungal and metal binding proteins. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 1–14, 2020.
- BONGOMIN, F. et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, 2017.
- BROEKAERT, W. F. et al. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition.

FEMS Microbiology Letters, v. 69, n. 1–2, p. 55–59, 1990.

BRUIX, M. et al. Solution Structure of γ 1-H and γ 1-P Thionins from Barley and Wheat Endosperm Determined by ^1H -NMR: A Structural Motif Common to Toxic Arthropod Proteins. **Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 715–724, 1993.

CAMPOS, M. L. et al. The role of antimicrobial peptides in plant immunity. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 21, p. 4997–5011, 2018.

CARNEIRO, R. F. et al. H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 12, p. 2864–2873, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.10.005>>.

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

CARVALHO, A.; GOMES, V. M. Plant Defensins and Defensin-Like Peptides - Biological Activities and Biotechnological Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 38, p. 4270–4293, 2011.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States 2013. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2013.

CHUNG, P. Y.; KHANUM, R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 4, p. 405–410, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>>.

COLILLA, F. J.; ROCHER, A.; MENDEZ, E. γ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. **FEBS Letters**, v. 270, n. 1–2, p. 191–194, 1990.

CORTEGIANI, A.; MISSERI, G.; CHOWDHARY, A. What's new on emerging resistant *Candida* species. **Intensive Care Medicine**, v. 45, n. 4, p. 512–515, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00134-018-5363-x>>.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, 2015.

DA CUNHA, N. B. et al. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 2, p. 234–248, 2017.

DE CONINCK, B.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 109–120, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2012.10.002>>.

DE OLIVEIRA, E. C. L. et al. Predicting cell-penetrating peptides using machine learning algorithms and navigating in their chemical space. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-87134-w>>.

DE SAMBLANX, G. W. et al. Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 1171–1179, 1997.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DIAS, G. B. et al. Isolation, characterization and antifungal activity of proteinase inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. seeds. **Protein Journal**, v. 32, n. 1, p. 15–26, 2013.

DIZ, M. S. et al. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. **Physiologia Plantarum**, v. 142, n. 3, p. 233–246, 2011.

DIZ, M. S. S. et al. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1760, n. 9, p. 1323–1332, 2006.

DO NASCIMENTO, V. V. et al. PvD1 defensin, a plant antimicrobial peptide with inhibitory activity against *Leishmania amazonensis*. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 5, p. 1–7, 2015.

FERNANDO, M. S. et al. A review of a promising therapeutic and agronomical alternative: Antimicrobial peptides from *Capsicum* sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 86, p. 19918–19928, 2011.

FIGUEIRA, T. N. et al. Challenging metastatic breast cancer with the natural defensin Pv D1. **Nanoscale**, v. 9, n. 43, 2017.

FISHER, M. C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186–194, 2012.

FISHER, M. C. et al. Threats Posed by the Fungal Kingdom to Humans, Wildlife, and Agriculture. **mBio**, v. 11, n. 3, p. 1–17, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), WITH INTERNATIONAL FUND FOR AGRICULTURAL DEVELOPMENT (IFAD), UN CHILDREN'S FUND (UNICEF), WORLD FOOD PROGRAM (WFP), and W. H. O. (WHO). *The State of Food Security and Nutrition in the world: Safeguarding Against Economic Slowdowns and Downturns*. [s.l: s.n.]

GASPAR, D.; SALOMÉ VEIGA, A.; CASTANHO, M. A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. **Frontiers in Microbiology**, 2013. .

GEBARA, R. da S. et al. Identification and Characterization of Two Defensins from *Capsicum annuum* Fruits that Exhibit Antimicrobial Activity. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2020.

HOLASKOVA, E. et al. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1005–1023, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.007>>.

HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176–187, 2016.

ISHAQ, N.; BILAL, M.; IQBAL, H. Medicinal Potentialities of Plant Defensins: A Review with Applied Perspectives. **Medicines**, v. 6, n. 1, p. 29, 2019.

ISLAM, K. T. et al. A novel bi-domain plant defensin MtDef5 with potent broad-spectrum antifungal activity binds to multiple phospholipids and forms oligomers. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-16508-w>>.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JOSHI, R. A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 6, n. 3b, p. 112–115, 2018.

JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, n. May, p. 1–12, 2021.

KOEHBACH, J.; CRAIK, D. J. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 40, n. 7, p. 517–528, jul. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614719300896>>.

KOIKE, M. et al. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced

during cold acclimation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, n. 1, p. 46–53, 2002.

KUMAR, V. et al. Prediction of Cell-Penetrating Potential of Modified Peptides Containing Natural and Chemically Modified Residues. **Frontiers in Microbiology**, 2018.

LACERDA, A. F. et al. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–10, 2014.

LANNES, S. D. et al. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 112, n. 3, p. 266–270, 2007.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057–1098, 2013.

LIMA, P. G. et al. Anticandidal activity of synthetic peptides: Mechanism of action revealed by scanning electron and fluorescence microscopies and synergism effect with nystatin. **Journal of Peptide Science**, v. 26, n. 6, p. 1–13, 2020.

LOBO, D. S. et al. Antifungal Pisum sativum defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. **Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 987–996, 2007.

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–12, 27 dez. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2016.00194/full>>.

MAHLO, S. M.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. **Crop Protection**, v. 29, n. 12, p. 1529–1533, 2006.

MANAVALAN, B. et al. Machine-Learning-Based Prediction of Cell-Penetrating Peptides and Their Uptake Efficiency with Improved Accuracy. **Journal of proteome research**, v. 17, n. 8, p. 2715–2726, ago. 2018.

MARACAHIPES, Á. C. et al. Biochemical analysis of antimicrobial peptides in two different *Capsicum* genotypes after fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 4, p. 1–14, 2019a.

MARACAHIPES, Á. C. et al. Characterization and antifungal activity of a plant peptide expressed in the interaction between *Capsicum annuum* fruits and the anthracnose fungus. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 12, p. 1–12, 2019b.

MELLO, É. de O. et al. Improved smallest peptides based on positive charge increase

of the γ -core motif from PvD 1 and their mechanism of action against *Candida* species. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 407–420, 2019.

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

MÉNDEZ, E. et al. Primary structure of ω -hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems. **European Journal of Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 67–73, 1990.

MIRAKHORLI, N. et al. Multi-function plant defensin, antimicrobial and heavy metal adsorbent peptide. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 43–49, 2019.

MIROUZE, M. et al. A putative novel role for plant defensins: A defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. **Plant Journal**, v. 47, n. 3, p. 329–342, 2006.

MOSCONE, E. A. et al. The evolution of chili peppers (*Capsicum* -Solanaceae): A cytogenetic perspective. **Acta Horticulturae**, v. 745, n. March, p. 137–169, 2007.

MUÑOZ, A. et al. Specific domains of plant defensins differentially disrupt colony initiation, cell fusion and calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. **Molecular Microbiology**, v. 92, n. 6, p. 1357–1374, 2014.

NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A napin-like polypeptide from dwarf Chinese white cabbage seeds with translation-inhibitory, trypsin-inhibitory, and antibacterial activities. **Peptides**, v. 25, n. 2, p. 171–176, 2004.

NICOLA, A. M. et al. Antifungal drugs: New insights in research & development. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 195, p. 21–38, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.10.008>>.

NIZET, V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 11–26, 2006.

OLIVEIRA, J. T. A. et al. Mo-CBP 3 -PepI, Mo-CBP 3 -PepII, and Mo-CBP 3 -PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. **Biochimie**, v. 157, p. 10–21, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.016>>.

OPAS. *Número recorde de países contribui com dados que revelam taxas preocupantes*

de resistência antimicrobiana. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6187:numero-recorde-de-paises-contribui-com-dados-que-revelam-taxas-preocupantes-de-resistencia-antimicrobiana&Itemid=812>. Acesso em: 19 jan. 2021.

OSBORN, R. W. et al. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae* and *Saxifragaceae*. **FEBS Letters**, v. 368, n. 2, p. 257–262, 1995.

PAEGE, N. et al. Species-Specific Differences in the Susceptibility of Fungi to the Antifungal Protein AFP Depend on C-3 Saturation of Glycosylceramides. **mSphere**, v. 4, n. 6, 2019.

PANE, C. et al. Effects of compost tea treatments on productivity of lettuce and kohlrabi systems under organic cropping management. **Italian Journal of Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 153–156, 2014.

PARISI, K. et al. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 88, p. 107–118, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.004>>.

PATEL, S.; AKHTAR, N. Antimicrobial peptides (AMPs): The quintessential ‘offense and defense’ molecules are more than antimicrobials. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. September, p. 1276–1283, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.042>>.

PELEGRI, P. B. et al. Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 73, n. 3, p. 719–729, 2008.

PELEGRI, P. B. et al. Antibacterial peptides from plants: What they are and how they probably work. **Biochemistry Research International**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

PENNISI, E. Armed and dangerous. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 804–805, 2010.

RESENDE, L. M. et al. Inhibition of Serine Protease, α -Amylase and Growth of Phytopathogenic Fungi by Antimicrobial Peptides from *Capsicum chinense* Fruits. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, n. 0123456789, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12602-021-09865-6>>.

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

- RIBEIRO, S. F. F. et al. New small proteinase inhibitors from *Capsicum annuum* seeds: Characterization, stability, spectroscopic analysis and a cDNA cloning. **Biopolymers**, v. 100, n. 2, p. 132–140, 2013.
- SAGARAM, U. S. et al. Structure-activity determinants in antifungal plant defensins msdef1 and mtdef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.
- SANTOS, L. de A. et al. Purification and characterization of peptides from *Capsicum annuum* fruits which are α -amylase inhibitors and exhibit high antimicrobial activity against fungi of agronomic importance. **Protein Expression and Purification**, v. 132, p. 97–107, 2017.
- SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987.
- SEYFI, R. et al. Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 1451–1463, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10989-019-09946-9>>.
- SHAFEE, T. M. A. et al. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 4, p. 663–682, 2016a.
- SHAFEE, T. M. A. et al. The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 9, p. 2345–2356, set. 2016b.
- SHER KHAN, R. et al. Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. **3 Biotech**, v. 9, n. 5, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1725-5>>.
- SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007.
- SHUPING, D. S. S.; ELOFF, J. N. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 14, p. 120–127, 2017.
- SILVA, M. S. et al. 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**, v. 97, n. 11, p. 3790–3801, ago. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.8243>>.

SILVA, M. S. et al. Bifunctional Inhibitors from *Capsicum chinense* Seeds with Antimicrobial Activity and Specific Mechanism of Action Against Phytopathogenic Fungi. **Protein & Peptide Letters**, v. 28, n. 2, p. 149–163, 2021.

SILVAR, C.; GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A. Screening old peppers (*Capsicum* spp.) for disease resistance and pungency-related traits. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 249–257, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.037>>.

SKALSKA, J. et al. Synthesis, Structure, and Activity of the Antifungal Plant Defensin PvD1. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 17, p. 9391–9402, 2020.

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

SUN, C. Y. et al. Resistances to anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) of *Capsicum* mature green and ripe fruit are controlled by a major dominant cluster of QTLs on chromosome P5. **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 81–88, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.033>>.

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

TAVEIRA, G. B. et al. Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: Mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species Applied microbiology. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0626-6>>.

TAVEIRA, G. B. et al. Antimicrobial activity and mechanism of action of a thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits and combinatorial treatment with fluconazole against *Fusarium solani*. **Biopolymers**, v. 108, n. 3, 1 maio 2017.

TAVEIRA, G. B. et al. Programmed cell death in yeast by thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits involving activation of caspases and extracellular H⁺ flux. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 2, p. 1–12, 2018.

TERRAS, F. R. G. et al. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. **Plant Cell**, v. 7, n. 5, p. 573–588, 1995.

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

VAN DER WEERDEN, N. L.; ANDERSON, M. A. Plant defensins: Common fold, multiple functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 121–131, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2012.08.004>>.

VAN DER WEERDEN, N. L.; LAY, F. T.; ANDERSON, M. A. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14445–14452, 2008.

VIEGA DE ANDRADE, E. K. et al. Identification, biochemical characterization and biological role of defense proteins from common bean genotypes seeds in response to *Callosobruchus maculatus* infestation. **Journal of Stored Products Research**, v. 87, 2020.

WANG, K. et al. Antimicrobial peptide protonectin disturbs the membrane integrity and induces ROS production in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 10, p. 2365–2373, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.07.008>>.

WATKINS, R. R.; BONOMO, R. A. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 313–322, 2016.

WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. **World Health Organization**, 2014.

WHO. *WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption: 2016-2018 early implementation*. [s.l.: s.n.]

WONG, J. H. et al. A defensin-like peptide from *Phaseolus vulgaris* cv. “King Pole Bean”. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 408–414, 2012.

XUAN, T. D. et al. Kava root (*Piper methysticum* L.) as a potential natural herbicide and fungicide. **Crop Protection**, v. 22, n. 6, p. 873–881, 2003.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 19, p. 7363–7368, 2004.

ZOTTICH, U. et al. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1810, n. 4, p. 375–383, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.12.002>>.

ZOTTICH, U. et al. The Toxicity of a Lipid Transfer Protein (Cc-LTP1) from *Coffea canephora* Seeds on the Larval Development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Protein Journal**, v. 33, n. 5, p. 422–431, 2014.