

GENIANA DA SILVA GOMES

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE INIBIDORES DE CARBOXIPEPTIDASE DE
Solanum melongena (ICP-SMEL) E *Solanum tuberosum* (PCI) PARA
CONTROLE DE FITOPATÓGENOS: ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO,
ESTRUTURAIS, FILOGENÉTICOS E ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria Cristina Baracat-Pereira

Coorientadores: Leandro Grassi de Freitas
Tiago Antônio O. Mendes
Renato Lima Senra

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G633p
2023
Gomes, Geniana da Silva, 1993-
Potencial biotecnológico de inibidores de carboxipeptidase de *Solanum melongena* (ICP-SMEL) e *Solanum tuberosum* (PCI) para controle de fitopatógenos: estudos de caracterização, estruturais, filogenéticos e antimicrobianos / Geniana da Silva Gomes. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (222 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Cristina Baracat Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.593>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Carboxipeptidase - Inibidores. 2. Solanácea - Doenças e pragas - Controle. 3. Agentes antiinfecciosos. I. Pereira, Maria Cristina Baracat, 1962-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.76

GENIANA DA SILVA GOMES

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE INIBIDORES DE CARBOXIPEPTIDASE DE
Solanum melongena (ICP-SMEL) E *Solanum tuberosum* (PCI) PARA
CONTROLE DE FITOPATÓGENOS: ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO,
ESTRUTURAIS, FILOGENÉTICOS E ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 22 de agosto de 2023

Assentimento:

Geniana da Silva Gomes
Autora



Documento assinado digitalmente

MARIA CRISTINA BARACAT PEREIRA

Data: 28/09/2023 09:45:40-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Maria Cristina Baracat-Pereira
Orientadora

*Eu dedico esse trabalho à minha mãe Ema
por todo seu suporte e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por cada oportunidade em minha vida pessoal e acadêmica, e por me dar a força e sabedoria para persegui-las. E que me guiou em todo o percurso durante esses longos anos de Doutorado.

Sou grata à Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de concluir o Doutorado e contribuição para meu desenvolvimento profissional. Além disso, agradeço aos Laboratórios de Proteômica e Bioquímica de Proteínas, do CCBII e BIOAGRO/UFV, pela disponibilidade de equipamentos e materiais.

Um grande agradecimento à minha Orientadora e Mestra Professora Maria Cristina Baracat-Pereira pelos ensinamentos, conhecimentos, e oportunidades valiosas ao longo desses anos de orientação acadêmica. E aos colegas e amigos de laboratório, que sempre ajudaram nos problemas do dia a dia, foram sempre parceiros ao longo da caminhada e ótimas companhias.

Aos meus coorientadores professor Tiago A. O. Mendes, professor Leandro G. de Freitas e Dr. Renato L. Senra, deixo o meu muito obrigado, pelo apoio e ajuda com o desenvolvimento dos Projetos de Pesquisa, bem como aos Laboratórios parceiros em que desenvolvi parte do trabalho, Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides (Bionema) e Laboratório de Biotecnologia Molecular I e II (LBM).

Um agradecimento especial a Técnica Cássia Gondim que auxiliou no desenvolvimento dos experimentos envolvendo nematoides e à aluna Paula C. Espósito que tive a oportunidade de orientar e também me auxiliou no decorrer de um ano com o desenvolvimento do trabalho. Adicionalmente, sou grata ao professor Rafael J. Borges e a Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) de Botucatu pela colaboração para o desenvolvimento das análises de bioinformática.

Ao meu comitê de defesa, que generosamente contribuiu com conhecimento e expertise para este trabalho.

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Por último, a minha família, amigos, namorado, e especialmente a minha mãe Ema Gomes, que sempre me apoiaram e me ajudaram a realizar meus sonhos.

“Tudo posso naquele que me fortalece”
(Filipenses 4:13)

RESUMO

GOMES, Geniana da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Potencial biotecnológico de inibidores de carboxipeptidase de *Solanum melongena* (ICP-SMEL) e *Solanum tuberosum* (PCI) para controle de fitopatógenos: estudos de caracterização, estruturais, filogenéticos e antimicrobianos.** Orientador: Maria Cristina Baracat-Pereira. Coorientadores: Leandro Grassi de Freitas, Tiago Antônio de Oliveira Mendes e Renato Lima Senra.

A crescente necessidade de estratégias sustentáveis para o controle de fitopatógenos impulsionou a pesquisa sobre moléculas de defesa em plantas. Dentre essas moléculas, os inibidores de carboxipeptidases (ICPs) presentes em solanáceas receberam atenção devido à sua habilidade de inibir proteases produzidas por patógenos e à sua atividade antimicrobiana. Este estudo investigou a prospecção e caracterização desses ICPs, com foco nas solanáceas *Solanum melongena* e *Solanum tuberosum*, como potenciais agentes de defesa e para controle de fitopatógenos. O primeiro capítulo se concentrou na caracterização dos ICPs da família *Solanaceae*. Diversas metodologias, incluindo análises de bioinformática, potencial antimicrobiano e análises filogenéticas, foram utilizadas para explorar a distribuição e conservação desses ICPs. As relações filogenéticas foram estabelecidas dentro da família *Solanaceae*, revelando uma presença marcante em gêneros como *Capsicum*, *Nicotiana* e *Solanum*. Características físico-químicas indicaram semelhanças com peptídeos antimicrobianos, enquanto estudos funcionais demonstraram sua atividade contra diversos patógenos. A inserção dos ICPs em uma nova subclasse (PR-6) das proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) proporcionou novas perspectivas sobre suas funções como agentes de defesa. O segundo capítulo enfocou a caracterização do ICP derivado de *Solanum melongena* (ICP-SMEL). Métodos como extração de folhas, purificação por cromatografia e análises espectrométricas foram empregados para identificar e caracterizar o ICP-SMEL. Detalhes foram fornecidos sobre sua atividade antimicrobiana, estabilidade estrutural e inibição específica de metalocarboxipeptidases. A eficácia comprovada do ICP-SMEL contra bactérias e nematoides ressaltou seu potencial como agente de defesa vegetal. No terceiro capítulo, a interação entre o ICP-SMEL e metalocarboxipeptidases (MCPs) foi examinada detalhadamente. Simulações de docking e dinâmica molecular foram empregadas para compreender o mecanismo de

inibição. A expansão gênero-específica dos ICPs nas solanáceas foi evidenciada, e o estudo demonstrou como o ICP-SMEL inibiu as MCPs de maneira estável, com interações precisas nos subsítios catalíticos. Esses resultados reforçaram a eficácia dos ICPs como moléculas de defesa das solanáceas. O quarto capítulo ampliou o escopo para considerar a importância dos ICPs no controle de fitonematoides. A expressão heteróloga dos ICPs foi investigada, validando sua atividade antimicrobiana e estrutura enovelada. A pesquisa destacou a relevância central das metaloproteases (MPs) na virulência vegetal. A análise das interações ICP-MCP revelou insights sobre o mecanismo de inibição competitiva, enfatizando o potencial dos ICPs como alvos promissores no combate aos fitonematoides. Em conclusão, este estudo explorou a prospecção e caracterização dos inibidores de carboxipeptidases (ICPs) nas solanáceas, com ênfase especial em *Solanum melongena* e *Solanum tuberosum*. Os resultados revelaram o potencial antimicrobiano e de defesa dos ICPs, destacando padrões de conservação de sequências, estabilidade estrutural e inibição específica de metalocarboxipeptidases. As interações ICP-MCP e sua relevância na virulência vegetal também foram enfatizadas. Essas descobertas contribuem para a compreensão das estratégias de controle de fitopatógenos e oferecem perspectivas valiosas para o desenvolvimento de abordagens sustentáveis na proteção de culturas agrícolas. Os ICPs emergem como alvos estratégicos para pesquisas biotecnológicas futuras, visando o controle de pragas vegetais e a segurança dos produtos agrícolas.

Palavras-chave: Inibidores de carboxipeptidase. Solanáceas. Potencial antimicrobiano. Defesa de plantas. Controle de fitopatógenos.

ABSTRACT

GOMES, Geniana da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2023. **Biotechnological potential of carboxypeptidase inhibitors from *Solanum melongena* (ICP-SMEL) and *Solanum tuberosum* (PCI) for phytopathogen control: characterization, structural, phylogenetic and antimicrobial studies.** Adviser: Maria Cristina Baracat-Pereira. Co-advisers: Leandro Grassi de Freitas, Tiago Antônio de Oliveira Mendes and Renato Lima Senra.

The escalating need for sustainable strategies in phytopathogen control has propelled the investigation into plant defense molecules. Among these molecules, carboxypeptidase inhibitors (ICPs) found in solanaceous plants have garnered attention due to their ability to inhibit proteases produced by pathogens and their antimicrobial activity. This study delved into the prospection and characterization of these ICPs, with a focus on solanaceous species such as *Solanum melongena* and *Solanum tuberosum*, as potential defense agents and tools for phytopathogen control. The first chapter centered on the characterization of ICPs within the *Solanaceae* family. Diverse methodologies, including bioinformatic analyses, antimicrobial potential assessments, and phylogenetic studies, were employed to explore the distribution and conservation of these ICPs. Phylogenetic relationships were established within the *Solanaceae* family, revealing a prominent presence in genera such as *Capsicum*, *Nicotiana*, and *Solanum*. Physico-chemical characteristics indicated similarities to antimicrobial peptides, while functional studies demonstrated their activity against various pathogens. The insertion of ICPs into a new subclass (PR-6) of pathogenesis-related (PR) proteins provided new insights into their roles as defense agents. The second chapter focused on the characterization of ICP derived from *Solanum melongena* ('ICP-SMEL'). Methods such as leaf extraction, chromatographic purification, and spectroscopic analyses were employed to identify and characterize ICP-SMEL. Details were provided on its antimicrobial activity, structural stability, and specific inhibition of metallo-carboxypeptidases (MCPs). The established efficacy of ICP-SMEL against bacteria and nematodes underscored its potential as a plant defense agent. In the third chapter, the interaction between ICP-SMEL and MCPs was meticulously examined. Docking simulations and molecular dynamics were employed to comprehend the inhibition mechanism. The genus-specific expansion of ICPs in solanaceous plants was revealed, and the study demonstrated how ICP-SMEL stably

inhibited MCPs, with precise interactions at the catalytic subsites. These results reinforced the efficacy of ICPs as defenders of solanaceous plants. The fourth chapter expanded the scope to consider the importance of ICPs in phytonematode control. The heterologous expression of ICPs was investigated, validating their antimicrobial activity and folded structure. The research highlighted the central relevance of metalloproteases (MPs) in plant virulence. The analysis of ICP-MCP interactions revealed insights into the competitive inhibition mechanism, emphasizing the potential of ICPs as promising targets in combating phytonematodes. In conclusion, this study explored the prospection and characterization of carboxypeptidase inhibitors (ICPs) in solanaceous plants, with a special emphasis on *Solanum melongena*. The results unveiled the antimicrobial and defensive potential of ICPs, accentuating their conservation in sequence patterns, structural stability, and specific inhibition of MCPs. ICP-MCP interactions and their relevance in plant virulence were also underscored. These findings contribute to the understanding of phytopathogen control strategies and offer valuable perspectives for the development of sustainable approaches to safeguard agricultural crops. ICPs emerge as strategic targets for future biotechnological research, aiming to control plant pests and ensure the safety of agricultural products.

Keywords: Carboxypeptidase inhibitors. *Solanaceae*. Antimicrobial potential. Plant defense. Phytopathogen control.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AE	Extrato Aquoso <i>Aqueous Extract</i>
AEP1	Extrato Aquoso Pool 1 da cromatografia de exclusão molecular <i>Aqueous Extract Pool 1 of molecular exclusion chromatography</i>
AMP (s)	Peptídeo antimicrobiano (s) <i>Antimicrobial peptide (s)</i>
AP	Pool aniônico da cromatografia de troca iônica
Clf	Cloranfenicol
CEM	Cromatografia de exclusão molecular
CFR	Cromatografia de fase reversa
CP	Pool catiônico da cromatografia de troca iônica
CP (s)	Carboxipeptidase (s) <i>Carboxypeptidase (s)</i>
CPA	Carboxipeptidase A
CPB	Carboxipeptidase B
CpD	Carboxipeptidase D (domínio de proteína)
CPI (s)	<i>Carboxypeptidase inhibitor (s)</i>
CTI	Cromatografia de troca iônica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FL	Fluorescência
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
ICP (s)	Inibidor de carboxipeptidase (s)
ICP-SMEL	Inibidor de carboxipeptidase de <i>Solanum melongena</i> (berinjela) <i>Carboxypeptidase inhibitor of Solanum melongena (eggplant)</i>
IC50	Concentração necessária para atingir 50% de inibição <i>Concentration required to achieve 50% inhibition</i>
LB	Meio de cultivo para bactérias
LC-MS-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LTPs	Proteínas de transferência de lipídios
M14	Metalocarboxipeptidases da família 14 (domínio de proteína)

MCP (s)	Metalocarboxipeptidase (s) <i>Metallocoxypeptidase (s)</i>
MCPA	Metalocarboxipeptidase A
MD	Dinâmica molecular
MIC	Concentração inibitória mínima para atingir 100% de inibição <i>Minimum inhibitory concentration required to achieve 100% inhibition</i>
MLE	<i>Maximum Likelihood Estimation</i>
MP (s)	Metalopeptidase (s) Metaloprotease (s) <i>Metallopeptidase (s)</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
P10	Extrato do cultivo de <i>Leishmania tarentolae</i> (selvagem)
PCI	Inibidor de carboxipeptidase de <i>Solanum tuberosum</i> (batata) <i>Potato carboxypeptidase inhibitor</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PI (s)	<i>Protease inhibitors</i>
PMEC	Pool da cromatografia de exclusão molecular
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
Pool 1	Fração 1 da cromatografia de exclusão molecular <i>Pool 1 of molecular exclusion chromatography</i>
PPI (s)	<i>Plant protease inhibitor (s)</i>
PR (s)	Proteínas relacionadas à patogênese de plantas <i>Plant pathogenesis related proteins</i>
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis</i>
Q-TOF	Espectrômetro de massa
RMSD	Desvio Médio Quadrático
RMSF	Flutuação Média Quadrática
RP	Fase reversa
SDS-PAGE	Eletroforese de proteínas
ShKT	Toxina (domínio de proteína)
SMEL	Extrato do cultivo de <i>Leishmania tarentolae</i> (expressando ICP-SMEL)
TFA	Ácido tricloroacético
TUB	Extrato do cultivo de <i>Leishmania tarentolae</i> (expressando PCI)
Wt	Selvagem

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
REVISÃO DE LITERATURA	20
Peptídeos antimicrobianos (AMPs)	20
AMPs em plantas	23
AMPs das solanáceas	24
ICPs das solanáceas	25
Fitonematoides.....	26
Meloidogyne ssp.....	28
Carboxipeptidases de <i>Meloidogyne incognita</i>	31
REFERÊNCIAS.....	32
Capítulo 1 – Inibidores de Carboxipeptidase de Solanáceas como uma nova subclasse de peptídeos relacionados à patogênese visando alvos biotecnológicos para a defesa de plantas.....	40
1. INTRODUCTION.....	42
2. MATERIAL AND METHODS	44
2.1. Database research.....	44
2.2. Phylogeny and conservation analysis	45
2.3. Physico-chemical and antimicrobial potential analysis	45
2.4. Structural feature analysis.....	45
2.5. Systematic literature search	46
3. RESULTS.....	46
3.1. CPIs sequence characterization.....	46
3.2. CPIs' distribution	49
3.3. CPIs physico-chemical standards	50
3.4. CPI's structural features and mechanism of action	52
3.5. CPIs' potencial as antimicrobial and defense agents	56

4. DISCUSSION	60
5. CONCLUSION	64
6. REFERENCES.....	65
Capítulo 2 – ICP-SMEL: Um novo peptídeo de <i>Solanum melongena</i> 'Florida Market' caracterizado como inibidor de carboxipeptidase antimicrobiano e nematicida	70
1. INTRODUÇÃO	72
2. MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1. Material Vegetal	73
2.2. Microrganismos.....	73
2.3. Extração de Peptídeos.....	74
2.4. Cromatografia de troca iônica	74
2.5. Cromatografia de exclusão molecular.....	75
2.6. Eletroforese em gel Tricina – SDS-Tricina-PAGE.....	75
2.7. Cromatografia de fase reversa.....	75
2.8. Análise por espectrometria de massas	76
2.9. Sequenciamento de aminoácidos	76
2.10. Teste antimicrobiano	76
2.11. Teste nematicida.....	77
2.12. Caracterização de sequência.....	77
2.13. Filogenia.....	78
2.14. Caracterização estrutural	78
3. RESULTADOS	79
3.1. Extração, purificação, identificação e caracterização da sequência ICP-SMEL de folhas de berinjela.....	79
3.2. Caracterização estrutural de ICP-SMEL	84
3.3. Testes antibacterianos	87
3.4. Teste contra nematoides.....	89

4. DISCUSSÃO	90
5. CONCLUSÃO.....	93
6. REFERÊNCIAS.....	93
Capítulo 3 – Mecanismo de ação de ICP-SMEL de <i>Solanum melongena</i> embasado na expansão gênero-específica de novos inibidores de carboxipeptidases das solanáceas	99
1. INTRODUÇÃO	101
2. MATERIAL E MÉTODOS	102
2.1. Prospecção de sequências ICPs em genomas das solanáceas	103
2.2. Análises de conservação e filogenia	103
2.3. Docking molecular e mapeamento de interações	104
2.4. Dinâmica molecular (MD).....	105
2.5. Caracterização do perfil de interação físico-químico dos ICPs em MCPs....	106
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106
3.1. Identificação de ICPs nos genomas das solanáceas	106
3.2. Características de conservação dos novos ICPs das solanáceas	110
3.3. Relações filogenéticas dos novos ICPs das solanáceas.....	112
3.4. Mecanismo de inibição ICP-SMEL.....	117
3.5. Perfil geral da interação de ICPs com MCPs baseado nas características físico-químicas dos aminoácidos.....	125
4. CONCLUSÃO.....	129
5. REFERÊNCIAS.....	129
CAPÍTULO 4 – Explorando o potencial dos inibidores de carboxipeptidase (ICPs) das solanáceas como alvos para o controle de fitopatógenos: foco na interação ICPs-fitonematoide com ênfase em ICP-SMEL de <i>Solanum melongena</i> e PCI de <i>Solanum tuberosum</i>	138
1. INTRODUÇÃO	140
2. MATERIAL E MÉTODOS	142
2.1. Revisão sistemática	142

2.2. Avaliação das propriedades físico-químicas e potencial antimicrobiano novos ICPs das solanáceas	142
2.3. Expressão heteróloga de ICP-SMEL de <i>S. melongena</i> e PCI de <i>S. tuberosum</i> em sistema eucarioto de <i>Leishmania tarentolae</i>	143
2.3.1. Teste de toxicidade em <i>Leishmania tarentolae</i>	143
2.3.2. Desenho de oligo primers	144
2.3.3. Organismos	145
2.3.4. Técnicas de biologia molecular.....	145
2.3.5. Clonagem	145
2.3.6. Transfecção e seleção clonal em <i>L. tarentolae</i>	147
2.3.7. Preparo amostras para eletroforese de proteínas.	147
2.3.8. Eletroforese em gel Tricina - SDS-PAGE	148
2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana de PCI comercial e clones ICP-SMEL e PCI expressos em <i>L. tarentolae</i>	148
2.4.1. Microrganismos.....	148
2.4.2. Cultivo ICP-SMEL e PCI em <i>L. tarentolae</i> e purificação parcial ICPs.	149
2.4.3. Avaliação da inibição em <i>Meloidogyne incognita</i> utilizando PCI comercial e clones de ICP-SMEL e PCI expressos em <i>L. tarentolae</i>	150
2.4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos clones de ICP-SMEL e PCI expressos em <i>L. tarentolae</i> contra bactérias e leveduras por difusão em ágar	152
2.4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana dos clones de ICP-SMEL e PCI expressos em <i>L. tarentolae</i> contra bactérias e leveduras por curva de crescimento	152
2.4.6. Análise estatística	153
2.5. Caracterização MCPs do gênero <i>Meloidogyne</i> de interesse para estudo....	153
2.5.1. Busca de sequências e Filogenia	154
2.5.2. Modelagem MCPs	155

2.6. Docking e dinâmica molecular interação ICP-SMEL e MCPs de <i>M. hapla</i> e <i>M. incognita</i>	155
2.6.1. Docking molecular	156
2.6.2. Dinâmica molecular complexo SMEL-MCP g6640 <i>M. incognita</i>	157
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	157
3.1. Metaloproteases como alvos para o controle de fitopatógenos	157
3.2. Potencial antimicrobiano de novos ICPs prospectados a partir dos genomas das solanáceas	160
3.3. Expressão de ICP-SMEL de <i>Solanum melongena</i> e PCI de <i>Solanum tuberosum</i> no sistema eucarioto de <i>Leishmania tarentolae</i>	165
3.4. Atividade antimicrobiana de ICP-SMEL de <i>Solanum melongena</i> e PCI de <i>Solanum tuberosum</i>	175
3.5. Caracterização MCPs de <i>Meloidogyne hapla</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	183
3.6. Interação ICP-SMEL com metalocarboxipeptidases do gênero <i>Meloidogyne</i>	186
4. CONCLUSÃO.....	191
5. REFERÊNCIAS.....	192
CONCLUSÃO GERAL	200
APÊNDICE	201
APÊNDICE A: Material Suplementar Capítulo 1	201
APÊNDICE B: Material Suplementar Capítulo 2	205
APÊNDICE C: Material Suplementar Capítulo 3	208
APÊNDICE D: Material Suplementar Capítulo 4	214
APÊNDICE E: Scripts análises bioinformática	220
ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo submetido na Revista Frontiers in Molecular Biosciences.....	222

INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a cada ano, aproximadamente 40% da produção global de culturas vegetais é perdida devido à ação de pragas que afetam as plantas. Isso resulta em prejuízos econômicos estimados em cerca de \$220 bilhões de dólares anualmente. Essas perdas estão primariamente associadas a 137 patógenos que incidem majoritariamente sobre culturas cruciais como arroz, trigo, milho, batata e soja, ocasionando uma redução média de pelo menos 20% na produção, o que tem um impacto significativo na segurança alimentar (SAVARY et al., 2019). Diante desse cenário, a pesquisa voltada para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle para fitopatógenos se torna de extrema relevância para o setor agrícola.

Nos últimos anos, tem ocorrido um notável aumento na busca por compostos naturais com aplicações nas áreas medicinais, industriais e agronômicas. Essas substâncias bioativas, originárias de plantas, apresentam a notável capacidade de interagir com múltiplos alvos biológicos, tornando-as promissoras para a descoberta de novos agentes terapêuticos e estratégias de manejo para fitopatógenos (COTABARREN et al., 2020).

A preocupação global em relação à segurança dos produtos agrícolas tem sido uma questão de destaque nos dias atuais, principalmente quando relacionada aos microrganismos patogênicos (HOU et al., 2022; PASCALE et al., 2020). Adicionalmente, os altos custos e a toxicidade dos pesticidas sintéticos para o meio ambiente e organismos vivos têm impulsionado a busca por métodos alternativos de controle de fitopatógenos. Embora tecnologias como a transgenia e o controle biológico apresentem possibilidades para o aprimoramento das culturas, outras abordagens continuam sendo cruciais para alcançar estratégias eficazes no manejo integrado de patógenos vegetais. Nesse contexto, a realização de estudos voltados ao desenvolvimento de práticas de manejo não-químicas e ecologicamente sustentáveis assume um papel de extrema importância (ORMANCEY et al., 2023; ZHANG et al., 2023).

Dentre as muitas moléculas bioativas provenientes dos metabolismos primário e secundário das plantas, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos, terpenos, polifenóis e carotenoides, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) se destacam. Atualmente, os AMPs têm sido objeto de intensa pesquisa devido ao seu amplo

espectro de ação, à sua função nos sistemas de defesa das plantas e à sua habilidade de inibir o crescimento de diversos fitopatógenos (bactérias, fungos e parasitas), os quais causam um alto impacto na agricultura (COTABARREN et al., 2020; DATTA; ROY, 2020).

A família *Solanaceae* emerge como uma notável fonte de interesse dentre as famílias de plantas estudadas em relação aos AMPs. Diversos gêneros dessa família, como *Capsicum*, *Datura* e *Solanum*, têm sido identificados por possuírem AMPs e extratos ricos em peptídeos em suas sementes, folhas, frutos e tubérculos (AFROZ et al., 2020). As atividades reportadas para esses AMPs incluem propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais significativas contra cepas fitopatogênicas e patogênicas humanas. Os AMPs extraídos das solanáceas abrangem diversas categorias, como peptídeos aniônicos e catiônicos, bem como diferentes tipos de inibidores de protease, incluindo inibidores de carboxipeptidase (ICPs) e inibidores de tripsina (SARNTHIMA; KHAMMUANG, 2014; MOULIN et al., 2014; MOLESINI et al., 2017; MUHAMMAD et al., 2019; AFROZ et al., 2020). Isso reforça a posição proeminente da família *Solanaceae* como uma potencial fonte para a identificação de novos AMPs aplicáveis na medicina, indústria e agricultura.

Destacando-se entre os AMPs presentes nas solanáceas, os ICPs emergem como alvos promissores para investigações futuras. Estes inibidores possuem a capacidade de reprimir as carboxipeptidases (CPs), que se classificam como metaloproteases (MPs) desempenhando funções vitais em todos os organismos vivos. No entanto, o mecanismo molecular subjacente à interação entre os ICPs e as CPs dos patógenos ainda requer um entendimento mais aprofundado (CASTAGNONE-SERENO et al., 2011; MOLESINI et al., 2017).

As MPs são divididas em 106 famílias, a família M14 engloba as CPs que são alvo os ICPs, essas proteínas são distribuídas entre as subfamílias A e B e são caracterizadas por terem como cofator o Zn^{2+} e por clivarem proteínas na região carboxiterminal em resíduos de aminoácidos aromáticos (CPA) e em resíduos positivos (CPB) (AULD, 2013). Além disso, as MCPs desempenham papéis essenciais na interação entre patógenos e plantas, as quais são produzidas por patógenos para degradar proteínas vegetais e facilitar sua invasão (GODBOLE; KHARAT, 2022). Essas proteases têm se mostrado promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de fitopatógenos (CHANDRASEKARAN et al., 2016; FIGAJ et al., 2019).

Portanto, a análise minuciosa da interação entre os ICPs e suas enzimas-alvo nos patógenos é de suma importância, orientando estratégias voltadas para essas enzimas como alvos de controle de fitopatógenos. Dessa forma, os ICPs presentes nas solanáceas demonstram ser alvos promissores para pesquisas, uma vez que atuam sobre as CPs, as quais desempenham papel fundamental como proteínas efetoras na interação entre fitopatógenos e plantas. Essa ação contribui para evitar respostas imunológicas, facilitando a penetração e a digestão de tecidos no hospedeiro (CASTAGNONE-SERENO et al., 2011; FIGAJ et al., 2019).

Nesse contexto, os estudos voltados para os ICPs das solanáceas no âmbito da biotecnologia apresentam grande promessa. Essas moléculas podem fornecer novas abordagens para o controle de fitopatógenos, contribuindo para práticas sustentáveis de manejo agrícola. O trabalho em questão aborda, de maneira abrangente, os ICPs das solanáceas, visando seu potencial para aplicações sustentáveis no manejo agrícola, com foco em ação sobre alguns fitopatógenos.

No decorrer deste trabalho, cada capítulo traçou uma abordagem diferenciada, resultando em uma compreensão aprofundada e integral dos ICPs das solanáceas. No primeiro capítulo, a literatura foi minuciosamente explorada, revelando o potencial desses inibidores como agentes antimicrobianos e peptídeos de defesa. Essa análise abrangente estabeleceu uma base sólida, ampliando as perspectivas para aplicações biotecnológicas.

Os capítulos seguintes aprofundaram a investigação. No segundo e terceiro capítulo, o foco recaiu na caracterização de um novo ICP derivado da berinjela, nomeado ICP-SMEL. Por meio de prospecção de novos ICPs, análises filogenéticas, de docking e dinâmica molecular, o mecanismo de ação molecular de ICP-SMEL foi elucidado, bem como novas perspectivas de ação de outros ICPs por conservações estruturais e de sequências, direcionando conhecimento para desenvolvimento de estratégias potenciais, orientadas por mecanismos moleculares para o manejo eficaz de patologias agrícolas.

O último capítulo focou na validação experimental e aplicação prática dos ICPs no controle de fitopatógenos, com ênfase na interação ICP-fitonematoide, uma questão crucial na agricultura. Investigou-se como ICP-SMEL de *Solanum melongena* e PCI de *Solanum tuberosum* afetam o nematoide *Meloidogyne incognita*, e sua relação com as MCPs do nematoide. Esses ICPs têm potencial para oferecer soluções

que possam ser utilizadas no manejo dos fitonematoides, contribuindo para práticas agrícolas mais sustentáveis e eficazes.

REVISÃO DE LITERATURA

Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

Os AMPs são constituintes dos mecanismos de defesa de quase todos os organismos vivos, incluindo microrganismos, artrópodes, plantas e animais. Essas moléculas são potentes antibióticos, de amplo espectro de ação, agindo contra bactérias patogênicas (gram-negativas e gram-positivas), fungos, e outros parasitas como os nematoides (ALMEIDA et al., 2008; ROCHA et al., 2015; TANG et al., 2018; MOUSSA et al., 2020). Em 2016, Zhang e Gallo relataram que mais de 2.500 AMPs já estavam depositados em banco de dados específicos para essas moléculas. Muitos desses peptídeos são menores que 10 kDa, possuem carga líquida positiva, e são constituídos por pelo menos 50% de aminoácidos hidrofóbicos (FJELL; HANCOCK; CHERKASOV, 2007).

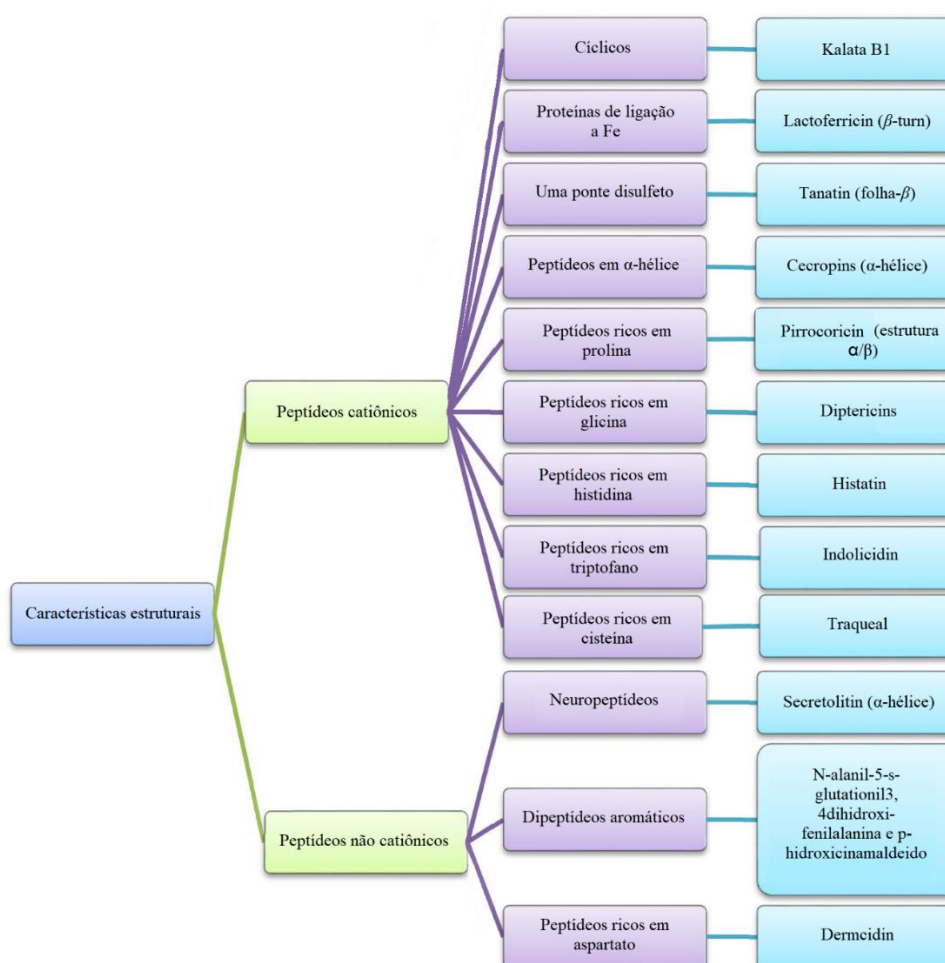


Figura 1. Características estruturais dos AMPs. (Adaptado de DIAMOND et al., 1991; HUANG et al., 2009; PUSHPANATHAN; GUNASEKARAN; RAJENDHRAN, 2013; LI et al., 2014; DATTA; ROY, 2020).

Esses antimicrobianos podem ser classificados em vários grupos (**Figura 1**) baseados em seu tamanho, carga, estrutura secundária e terciária, e na presença ou ausência de ligações dissulfeto (ZHANG; GALLO, 2016; BOPARAI; SHARMA, 2019; DATTA; ROY, 2020). As estruturas secundárias desses peptídeos incluem: α -hélice, folhas β devido à presença de duas ou mais ligações dissulfeto, *hairpin* β devido à presença de uma única ligação dissulfeto e ou ciclização da cadeia peptídica, entre outras estruturas (BOPARAI; SHARMA, 2019; DATTA; ROY, 2020).

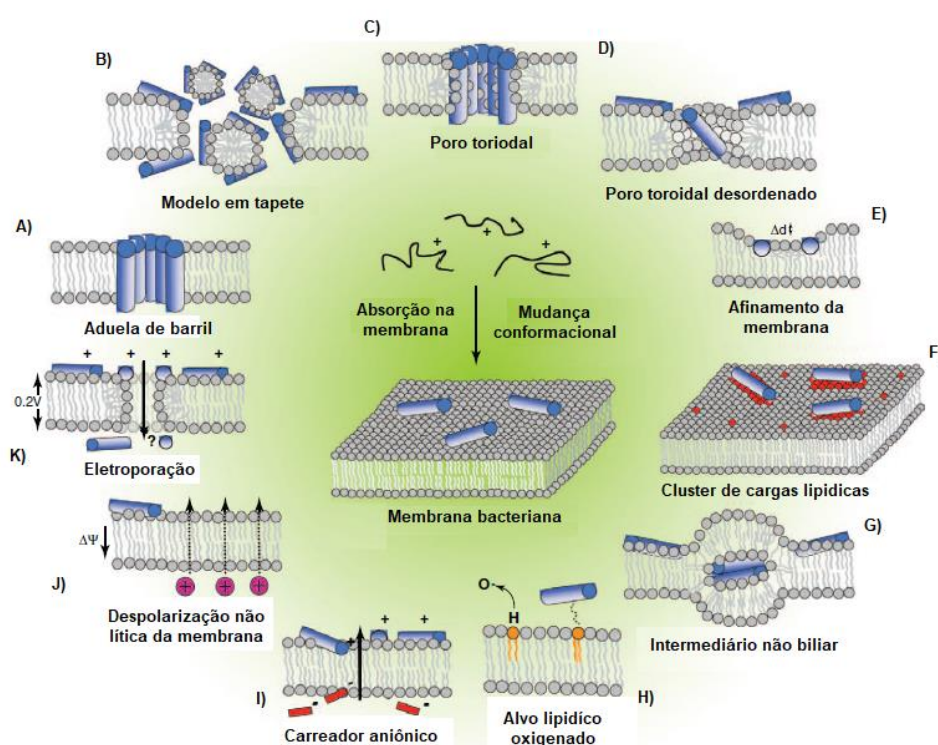


Figura 2. Visão geral de alguns dos mecanismos de ação propostos para os peptídeos antimicrobianos nas membranas celulares: **A)** Modelo aduela de barril. **B)** Modelo em tapete. **C)** Modelo polo toroidal. **D)** Modelo polo toroidal desordenado. **E)** Modelo por afinamento de membrana (jogada afundando). **F)** Modelo cluster de cargas lipídicas. **G)** Modelo de intermediário não biliar. **H)** Modelo por alvo lipídico oxigenado. **I)** Modelo por carreador aniônico. **J)** Modelo da despolarização não lítica da membrana. **K)** Modelo por eletroporação (Adaptado de NGUYEN et al., 2011).

Os mecanismos de ação pelos quais os AMPs agem são variados. Para atuarem, os AMPs interagem com as membranas celulares por interações eletrostáticas, sofrem adsorção pela membrana e alteração conformacional. Após a ligação do peptídeo à membrana celular do organismo-alvo, o peptídeo pode completar a sua atividade usando um dos mecanismos, conforme descrito na **Figura 2**. O resultado dessa ação pode levar à apoptose ou ao rompimento das membranas das células (NGUYEN et al., 2011).



Figura 3. Aplicações multidimensionais dos AMPs. Os peptídeos antimicrobianos podem ser aplicados em diferentes áreas atuando como agentes antitumorais, entregadores moleculares de fármacos, anticancerígenos, imunomoduladores, sinalizadores celulares, contraceptivos, antimicrobianos e mitogênicos (Adaptado de DATTA; ROY, 2020).

Os AMPs têm uma variedade de propriedades que os tornam alvos de pesquisas em diversas áreas, atuando como agentes mitogênicos, contraceptivos, antitumorais, antibacterianos, antifúngicos, sinalizadores celulares, constituintes da defesa inata das plantas, entre outros como é evidenciado na **Figura 3** (DATTA; ROY, 2020). O alto potencial biotecnológico e terapêutico dos AMPs é bem exemplificado por aqueles encontrados nas plantas. Nos vegetais essas moléculas são constituintes da barreira de defesa, estão presentes em ampla diversidade de gêneros e espécies, podem ser extraídos de vários tecidos ou órgãos como raízes, sementes, flores, folhas e caules, e também são envolvidos em atividades patogênicas contra vários microrganismos, incluindo aqueles que são patogênicos para humanos (MONTESINOS, 2007; DATTA; ROY, 2020).

AMPs em plantas

As plantas têm mecanismos de defesa complexos que são pré-formados ou ativados em resposta ao contato de patógenos. Os AMPs como constituintes da defesa dos vegetais são exemplos de moléculas que têm resposta protetora a percepção de predadores nas plantas como bactérias, fungos, nematoides e insetos, e também são moléculas constitutivas (GARCÍA-OLMEDO et al., 1998; NAWROT et al., 2014). Os AMPs encontrados nas plantas são distribuídos em diferentes classes, de acordo com seu tipo de carga, ligações dissulfeto presentes, estruturas e mecanismo de ação, como cita Afroz et al., (2020).

De acordo com Hancock et al. (1998), os AMPs de plantas são catiônicos, contendo de 12 a 90 resíduos de aminoácidos, com carga líquida positiva, sendo eles constitutivos ou induzidos. Existem 10 famílias de AMPs de plantas já classificadas, sendo elas: Tioninas, Defensinas, Proteínas de Transferência de Lipídios (LTPs), Peptídeos similares a heveina, Peptídeos similares a *knottin*, MBP1, Ib-AMPs, Snakinas, Sheferdinas e Peptídeos macro cíclicos (**Tabela 1**) (GARCÍA-OLMEDO et al., 2001; SELS et al., 2008).

Tabela 1. Famílias de AMPs de Plantas (Adaptado de GARCÍA-OLMEDO et al., 2001)

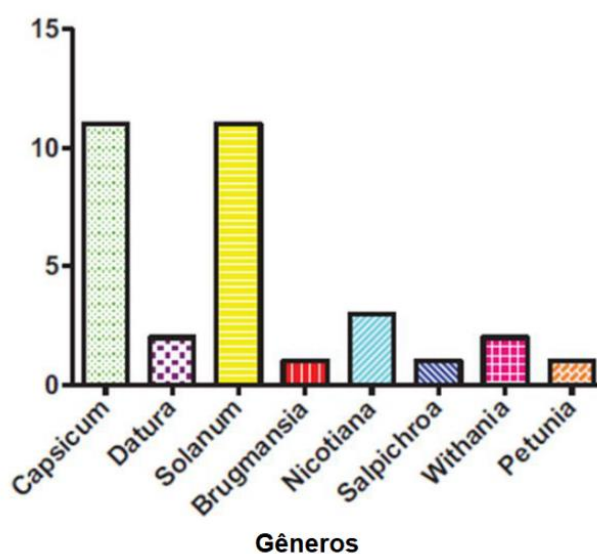
Famílias de AMPs	Número de resíduos	Pontes dissulfeto	Subfamílias	Atividade contra
LTPs	90 a 95	3 a 4	I-II	bactéria e fungo
Snakinas (GASA)	61 a 70	6	I-III	bactéria e fungo
Defensinas	45 a 54	4	I-IV	bactéria e fungo
Tioninas	45 a 47	3 a 4	I-IV	bactéria e fungo
Heveina-like	43	4	I	bactéria gram (+) e fungo
<i>Knottin-like</i>	36 a 37	3	I	bactéria gram (+) e fungo
Sheferdinas	28 a 38	0 (linear)	I-II	bactéria e fungo
MBP-1	33	2	I	bactéria e fungo
Peptídeos macro cíclicos	29 a 31	3	I-III	bactéria gram (+)
Ib-AMPs	20	2	I	bactéria gram (+) e fungo

Os AMPs provenientes das plantas são relatados por possuírem baixa toxicidade, serem estáveis em várias condições, serem encontrados em diferentes tecidos e órgãos das plantas (folhas, raízes, sementes, flores e caules) e demonstrarem atividade significativa contra patógenos humanos e fitopatógenos, tornando-os excepcionais candidatos para o desenvolvimento de novos agentes

biotecnológicos (MONTESINOS, 2007; BENKO-ISEPPON et al., 2010; BARBOSA PELEGRINI et al., 2011; NAWROT et al., 2014; BONDARYK et al., 2017). Como exemplo é possível citar as moléculas kalata B1 e B2 e peptídeos tioninas e tioneinas, que atualmente estão envolvidos no desenvolvimento de novas drogas em ensaios clínicos ou pré-clínicos (SALAS et al., 2015; MOLCHANOVA; HANSEN; FRANZYK, 2017; GRÜNDEMANN; STENBERG; GRUBER, 2019).

Uma família de plantas que se destaca em relação à pesquisa sobre AMPs é família *Solanaceae*, essas plantas desempenham um papel essencial na medicina tradicional e nutrição humana, as espécies são ricas em metabólitos bioativos e possuem muitos AMPs relatados com atividade antimicrobiana descrita na literatura (AFROZ et al., 2020). Sendo assim, essas plantas podem ser uma fonte promissora para descoberta de novos AMPs que possam ser utilizados para aplicações biotecnológicas, biomédicas, e também agrônômicas.

AMPs das solanáceas



9

Figura 4. AMPs relatados de diferentes gêneros da família Solanaceae (Adaptado de AFROZ et al., 2020).

Os AMPs das solanáceas são distribuídos em vários gêneros dessa família, os quais são apresentados na **Figura 4**. Segundo Afroz et al. (2020) esses AMPs possuem atividades inibitórias significativas contra bactérias, fungos e vírus fitopatogênicos. Além disso, essas moléculas são encontradas nas sementes, folhas, frutos e tubérculos dessas plantas e pertencem a diferentes categorias, incluindo AMPs do tipo ácido, básico, inibidor de protease, inibidores de carboxipeptidases e inibidores de tripsina (SARNTHIMA; KHAMMUANG, 2014; MOULIN et al., 2014;

MOLESINI et al., 2017; MUHAMMAD et al., 2019; AFROZ et al., 2020). Muhammad et al. (2019) relataram que a atividade antibacteriana de AMPs encontrados nas solanáceas pode ser relacionada a alterações na permeabilização da membrana e Maracahipes et al (2019) reportaram que a atividade antifúngica pode envolver a inibição do crescimento de fungos e formação de hifas.

Dentre os gêneros das solanáceas com maiores informações sobre AMPs, estão os gêneros *Capsicum*, *Solanum* e *Nicotiana* (**Figura 4**). Afroz et al. (2020) cita os trabalhos de Sarnthima e Khammuang (2014) e Guzmán-Ceferino et al. (2019) em que extratos ricos em peptídeos das folhas de *Solanum stramonifolium* Jacq. e sementes de *Solanum marginatum* L.f. apresentaram inibição bacteriana contra diferentes cepas patogênicas humanas, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) variando de 0,1 a 100 µg/mL. Outros trabalhos também citados por Afroz et al. (2020) reportaram que extratos de folhas e sementes ricos em peptídeos de diferentes espécies de *Capsicum* apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica significativas por meio da inibição do crescimento bacteriano e da formação de hifas (GAMES et al., 2013; MARACAHIPES et al., 2019). Lay et al. (2003) e Dracatos et al. (2016) citados também em Afroz et al. (2020) reportaram que diferentes peptídeos do tipo defensina foram encontrados em *Nicotiana alata* e inibiram a germinação e o crescimento de hifas de fungos.

Uma outra classe de AMPs encontrados nas solanáceas que mostram-se potenciais alvos para novas pesquisas são os ICPs, esses peptídeos já são identificados para algumas espécies dessa família, eles inibem carboxipeptidases, que são proteases que desempenham funções fisiológicas essenciais em todos os organismos vivos, e o mecanismo de ação molecular que envolvem a interação desses ICPs com as carboxipeptidases ainda não é totalmente entendido, potencializando dessa forma novos estudos que visam entender como essas moléculas interagem com a proteína alvo (CASTAGNONE-SERENO et al., 2011; MOLESINI et al., 2017; AFROZ et al., 2020).

ICPs das solanáceas

Alguns ICPs encontrados nas solanáceas são descritos como pertencentes a classe de AMPs *cystine-knot* (nó-cistina), que são caracterizados por serem ricos em resíduos de cisteína com ligações dissulfeto conservadas, possuem pequena massa molecular (< 10kDa) e tamanho variando entre 39 e 75 aminoácidos (TAM et al., 2015;

MOLESINI et al., 2017). Estudos indicam que esses ICPs inibem MCPs da subfamília A/B e que os quatro últimos resíduos na região C-terminal dos ICPs são determinantes no mecanismo de inibição em MCP (MARINO-BUSLJE et al., 2000; AROLAS et al., 2005).

Algumas espécies de solanáceas já têm ICPs identificados e caracterizados, são elas: *Capsicum annum* (pimentão), *Hyoscyamus niger* (meimendo), *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Solanum tuberosum* (batata). Na literatura, Cotabarren et al. (2018) relata a inibição de uma MCP bovina pelo ICP de *C. annum*. Sobre o ICP de *S. tuberosum*, que é o mais estudado, artigos relatam diferentes atividades desse inibidor, ele atua agindo como antagonista do fator de crescimento epidermal (EGF), apresentando propriedades antitumorais, atua também como agente antimalárico e antitrombótico, e sua atividade antifúngica já foi estudada *in vitro* (SITJÀ-ARNAU et al., 2005; WANG et al., 2006; QUILIS et al., 2007; QUILIS et al., 2014; LUFRANO et al., 2015; COTABARREN et al., 2018). Molesini et al. (2017) reportaram a atividade inibitória em exopeptidases do ICP de *S. lycopersicum*, a atividade inibitória do crescimento de células cancerígenas pelo ICP de *N. tabacum* e a atividade antiangiogênica do ICP de *H. niger*. Esses trabalhos ressaltam os diferentes tipos de função dos ICPs, demonstrando que eles têm grande valor para o desenvolvimento de novos agentes de defesa, bem como para pesquisas que visam estudar mais a fundo a interação desses peptídeos com MCPs de patógenos que podem ser alvos interessantes para controle

Fitonematoides

Os nematoides parasitas de plantas são microrganismos que perfazem aproximadamente 15% das espécies descritas dentro do filo *Nematoda*. Eles agem causando lesões e produzindo infecções secundárias nas plantas, o que facilita a entrada de outros microrganismos como bactérias e fungos, gerando enormes prejuízos na agricultura (FERRAZ; BROWN, 2016; SIKANDAR et al., 2020). Estima-se que esses fitoparasitas são responsáveis por uma perda anual na produção de culturas vegetais que compreende de 9 a 15% da produção mundial, e prejuízos de cerca de 157 bilhões de dólares por ano (D'ADDABBO et al., 2019; SIKANDAR et al., 2020).

Esses parasitas exibem uma ampla variedade de interações com seus hospedeiros. Todos possuem estiletos que são utilizados para alimentação e ou para

entrada no hospedeiro. Alguns nematoides são ectoparasitas migratórios que nunca entram no hospedeiro, migrando através do solo, usando raízes como fonte de alimento. Outros são endoparasitas migratórios que entram no hospedeiro e migram através dos tecidos causando danos extensos. Os classificados como semiendoparasitas penetram parcialmente na planta hospedeira para se alimentar em um estágio do seu ciclo de vida. No entanto, os fitonematoides que são economicamente mais importantes, os gêneros *Heterodera* (nematóide dos cistos) e *Meloidogyne* (nematóide das galhas), são biotróficos e induzem estruturas alimentares complexas nas raízes dos seus hospedeiros que fornecem a eles uma fonte alimentar rica e duradoura (JONES et al., 2013).

Dentre os fitonematoides que são mais destrutivos para as plantas estão os dos gêneros *Heterodera*; *Meloidogyne*; *Rotylenchulus*; *Helicotylenchus*; *Tylenchorhynchus*; *Pratylenchus*; *Ditylenchus*; *Xiphinema*; e *Longidorus* (SIKANDAR et al., 2020). O gênero *Meloidogyne* spp., é considerado o mais destrutível e responsável pela maioria das perdas nas culturas vegetais. As espécies desse gênero causam baixo crescimento das plantas, reduzem o rendimento e a qualidade das culturas, diminuem a resistência das plantas a outros estresses bióticos e abióticos e são de difícil controle (D'ADDABBO et al., 2019).

No controle tradicional desses fitoparasitas, eram utilizados tratamentos no solo com nematicidas sintéticos, mas em função do alto custo e da toxicidade destes compostos, ocorreu uma desativação progressiva do uso desses produtos. Isso resultou, atualmente, em uma intensificação pela busca e implementação de estratégias de controle baseadas em mecanismos alternativos, como o uso de microrganismos, plantas resistentes, agentes bioativos e produtos naturais (ROCHA et al., 2015; FERRAZ; BROWN, 2016; D'ADDABBO et al., 2019).

Os produtos derivados de materiais naturais, hoje em dia, são importantes alvos nas pesquisas relacionadas ao manejo de fitonematoides, por serem considerados uma ferramenta efetiva para o aumento da produtividade das culturas. No mercado comercial, já existem produtos utilizados no manejo que têm como princípio ativo extratos de plantas e de microrganismos (D'ADDABBO et al., 2019). Ressaltando nesse sentido, as pesquisas com materiais naturais podem gerar novas estratégias no manejo desses parasitas e um novo meio de reduzir prejuízos no setor agrônomo.

Meloidogyne ssp.

Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, são parasitas obrigatórios de plantas, distribuídos em todo o mundo. O gênero consiste em 98 espécies e parasitam quase todas as plantas vasculares. Seu nome comum vem das galhas induzidas por esses fitoparasitas nas raízes da planta hospedeira (**Figura 5**). As espécies mais importantes são as tropicais *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*, e a da região temperada *Meloidogyne hapla* (JONES et al., 2013).



Figura 5. Galhas geradas por *Meloidogyne incognita* em tomate (*Solanum lycopersicum*) na Etiópia (JONES et al., 2013 – Fotografia cortesia de Seid Awol, Universidade de Ghent, Ghent).

Entre as principais espécies da região tropical, o nematoide *M. incognita* destaca-se por ele ser capaz de infectar as raízes de quase todas as plantas cultivadas e ser possivelmente o patógeno de cultivo mais prejudicial do mundo. *M. incognita* é caracterizado como um endoparasita sedentário obrigatório que desenvolveu uma interação complexa com seus hospedeiros. Os juvenis de segundo estágio invadem a raiz das plantas na zona de alongamento e migram intracelularmente para o cilindro vascular, onde estabelecem o local de alimentação permanentes. Nesse cilindro as fêmeas adultas induzem a rediferenciação das células radiculares em células especializadas das quais se alimentam continuamente. (CASTAGNONE-SERENO et al., 2011).

O ciclo de vida de *M. incognita* consiste em cinco fases diferentes; ovo, juvenis J2, J3, J4 e adultos (**Figura 6**). A fêmea presente nas raízes das plantas bota ovos, que se desenvolvem em juvenis J2 (estágio infeccioso), esse por sua vez infecta as raízes do hospedeiro e completa os outros próximos estágios de desenvolvimento nos locais de alimentação. Os juvenis J3 e J4 têm natureza sedentária e J4 muda para fêmea ou macho. Após a fertilização, as fêmeas permanecem nas raízes das plantas e reproduzem por partenogênese mitótica produzindo massas de ovos (SIKANDAR et al., 2020). Os principais sintomas que aparecem nas culturas infectadas por esse fitoparasita são aparecimento de raízes axiais, tubérculos e galhas, além de retardo de crescimento, murcha e amarelamento das folhas, o que prejudica e reduz os valores econômicos e qualitativos das hortaliças e de outras culturas, em geral. (ALI et al., 2021).

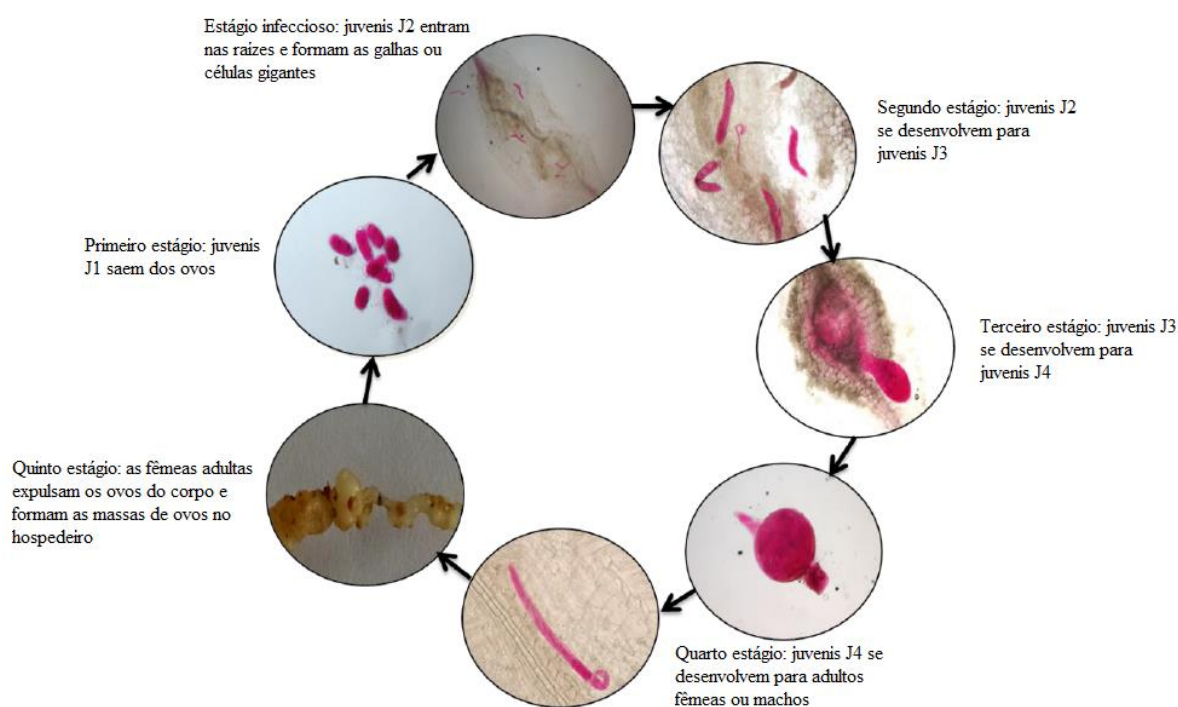


Figura 6. Ciclo de vida do *Meloidogyne incognita* (Adaptado de SIKANDAR et al., 2020).

Dentre as principais estratégias de manejo para o controle de *M. incognita* estão: aplicação de pesticidas químicos no solo, criação de cultivares resistentes, controle biológico, esterilização do solo, rotação de culturas, aplicação de pesticidas botânicos naturais, entre outros como pode ser observado na **Figura 7** (ALI et al., 2021). O controle de *M. incognita* muitas vezes é difícil para os produtores em muitas regiões do mundo, a maioria dos nematicidas químicos atualmente são proibidos devido à sua toxicidade intrínseca, a resistência natural das plantas é uma alternativa

segura, mas é limitada pela disponibilidade de genes de resistência e o controle biológico fornece outra alternativa. Contudo, ainda são necessárias aplicações de mais práticas de manejo que visem resultados consistentes, robustos de longo prazo e em grande escala, o que atualmente ainda é restringido em situações altamente gerenciadas. Nesse sentido, novas opções de controle são urgentemente necessárias, para fornecer aos produtores novas estratégias de controle alternativas, permitindo-lhes ajudar a melhorar a produção global das culturas vegetais (TRUONG et al., 2015).

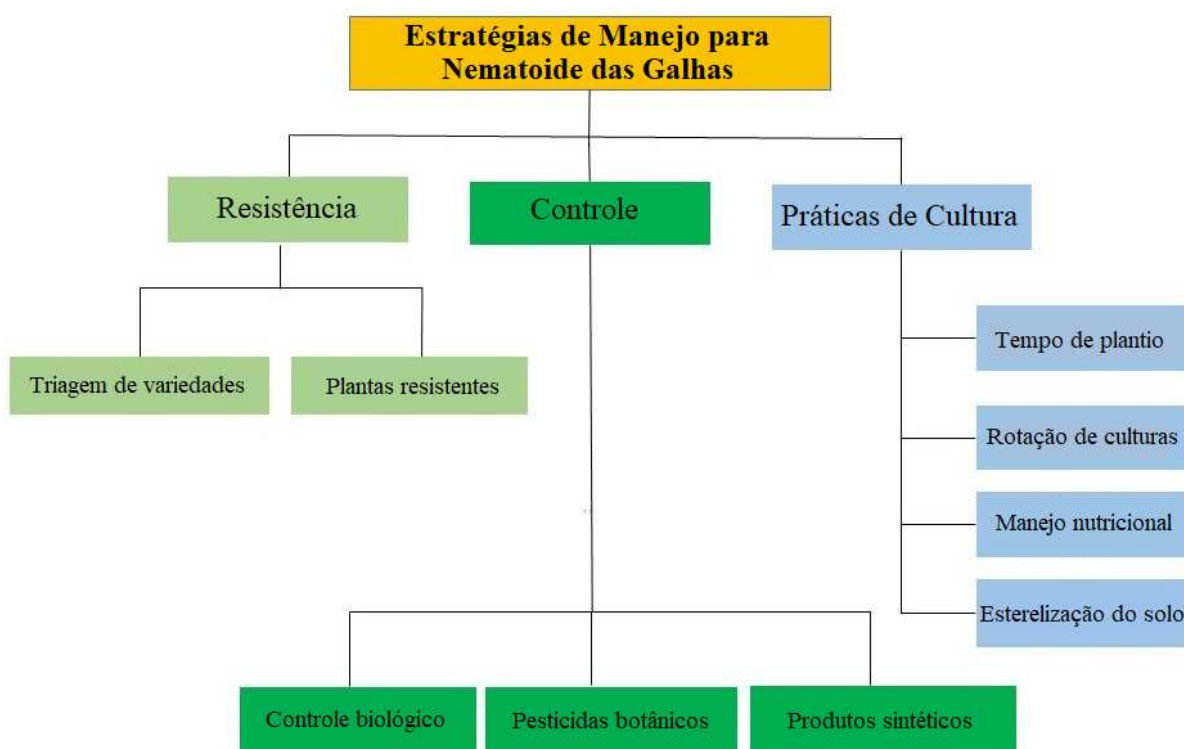


Figura 7. Estratégias de manejo do nematoide das galhas. Resistência: triagem de variedades e plantas resistentes. Controle: controle biológico, pesticidas botânicos e pesticidas sintéticos. Práticas de cultura: tempo de plantação, rotação de culturas, manejo nutricional e esterilização do solo (Adaptado de ALI et al., 2021).

Atualmente novas práticas de manejo não-químicas e ambientalmente amigáveis são importantes e pesquisas com pesticidas botânicos naturais são interessantes alvos para novas pesquisas. Mais de 100 espécies de plantas já foram testadas quanto às suas propriedades nematicidas, algumas das quais mostraram resultados promissores para matar os nematoides de galhas, as plantas *Calotropis procera*, *Euphorbia caducifolia*, *Nerium oleander* e *Azadirachta indica* exibiram efeitos inibitórios contra juvenis de *M. incognita* (ZUREEN; KHAN, 1984; QAMAR et al., 1989; ALI et al., 2021).

Algumas espécies de solanáceas, como *Solanum melongena* são reconhecidas por serem resistentes a infecção de fitonematoides, como *M. incognita* e também são descritas por terem mais de 500 tipos de genes de resistência caracterizados (BOITEUX; CHARCHAR, 1996; YANG et al., 2014). Essas características tornam essas plantas bons alvos para busca de novas moléculas para serem aplicadas no controle de *M. incognita* bem como de outros patógenos. Os ICPs que ainda tem seu potencial como agentes de defesa pouco explorados entre as solanáceas, podem ser bons alvos para novas pesquisas que visam estudar por exemplo a interação desses inibidores com MCPs de *Meloidogyne* e de outros fitoparasitas, visando entender mais a fundo a interação envolvendo ICP-fitonematoide. As proteases de nematoides têm papéis importantes em uma variedade de processos fisiológicos, como embriogênese, remodelação da cutícula e também são envolvidas em vários aspectos do estilo de vida do parasita como a penetração, digestão dos tecidos e evasão do sistema imunológico do hospedeiro (CASTAGNONE-SERENO et al., 2011).

Carboxipeptidases de *Meloidogyne incognita*

No geral as CPs de nematoides ainda são pouco estudadas, raros são os trabalhos publicados que estudam especificamente sobre elas, o trabalho de Huang et al. (2017), clonou e caracterizou a primeira serino carboxipeptidase de um fitonematoide, esse trabalho demonstrou que ao silenciar a expressão da serino carboxipeptidase de *Radopholus similis*, o nematoide foi reduzido em número e patogenicidade, mostrando pela primeira vez que essas proteínas desempenham papéis importantes no ciclo de vida e na interação desse parasita com seu hospedeiro.

Sobre as CPs de *M. incognita* não existe nenhuma até o presente momento com estrutura tridimensional predita ou depositada em banco de dados para proteína. Castagnone-Sereno et al. (2011) estudaram todo o degradoma de proteases de *M. incognita* por análises de bioinformática em genômica e proteômica, o artigo mostrou que as metalo e cisteíno proteases são as mais abundantes em *M. incognita*, com 136 e 106 membros, respectivamente e que as metalo proteases perfazem quase 50% do total de peptidases encontradas no nematoide das galhas e em outras cinco espécies de nematoides, como pode ser observado na **Figura 8**. Além disso, dentre as famílias de metalo proteases retratadas nesse estudo, aquelas proteínas pertencentes à família M14 destacam-se por serem caracterizadas como CPs das subfamílias A e B

e o gene Minc17742 que codifica para uma M14 carboxipeptidase é classificado como um dos vinte genes expressos com mais frequência em ovos de *M. incognita*.

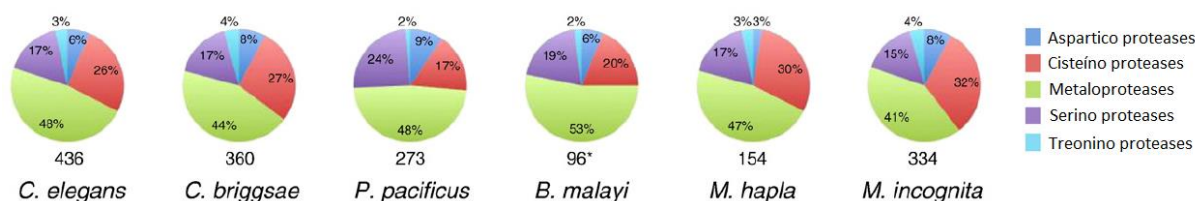


Figura 8. Distribuição relativa das cinco classes catalíticas de proteases em genomas de nematoides. Para cada nematóide, é indicado o número total de proteases. O asterisco (*) indica que a anotação do genoma de *Brugia malayi* é provavelmente incompleta (Adaptado de CASTAGNONE-SERENO et al., 2011).

Na literatura também são encontradas evidências de que MCPs de *M. incognita* podem ser moléculas efetoras na invasão e patogenicidade desse nematóide nas plantas, trabalhos já reportaram que MCPs desse nematóide são produzidas em órgãos secretores e previstas no envolvimento do parasitismo em plantas (HUANG et al. 2003; JAOUANNET et al. 2012; TRUONG et al., 2015). Por exemplo, os trabalhos de Huang et al. (2003) e Jaouannet et al. (2012) relataram que genes expressos nas células da glândula esofágica de juvenis J2 (estágio infeccioso) de *M. incognita* codificam para zinco MCPs. Esses estudos salientam que essas proteínas podem ser importantes na interação de *M. incognita* com as plantas e que trabalhos que estudem mais a fundo o papel delas no parasitismo desse fitonematóide são interessantes para novas pesquisas.

Assim, considerando a importância dos fitonematoides e de outros patógenos que possam utilizar metalocarboxipeptidases em seus mecanismos de infecção nas plantas, os ICPs encontrados nas solanáceas, como moléculas que inibem MCPs, surgem como alvos promissores para pesquisas visando a inibição desses fitoparasitas. Em resumo, o uso desses ICPs apresenta uma nova abordagem em potencial para o controle de fitonematoides e outros patógenos, oferecendo a possibilidade de reduzir os danos na agricultura por meio de métodos sustentáveis. Nesse contexto, este estudo se propôs a explorar o potencial biotecnológico dos inibidores de carboxipeptidase das solanáceas (ICPs), concentrando-se nos ICPs de *Solanum melongena* (ICP-SMEL) e *Solanum tuberosum* (PCI), e sua ação sobre *Meloidogyne incognita*.

REFERÊNCIAS

AFROZ, Mohasana; AKTER, Sanzida; AHMED, Asif; ROUF, Razina; SHILPI, Jamil A.;

TIRALONGO, Evelin; SARKER, Satyajit D.; GÖRANSSON, Ulf; UDDIN, Shaikh Jamal. Ethnobotany and Antimicrobial Peptides From Plants of the *Solanaceae* Family: An Update and Future Prospects. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 11, n. May, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.00565.

ALI, Tauheed; MUBEEN, Mustansar; JAMIL, Yasha; AHMAD, Usama. An overview of root-knot nematodes and their management. [S. l.], n. January, 2021.

ALMEIDA, Hebréia Oliveira; TEIXEIRA, Felipe Roberti; ROMEIRO, Reginaldo Da Silva; DA SILVA, Derly José Henriques; PEREIRA, Paulo Roberto Gomes; FONTES, Elizabeth Pacheco Batista; BARACAT-PEREIRA, Maria Cristina. Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Summa Phytopathologica**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 62–64, 2008. DOI: 10.1590/S0100-54052008000100012.

AROLAS, Joan L.; LORENZO, Julia; ROVIRA, Ana; CASTELLÀ, Joaquim; AVILES, Francesc X.; SOMMERHOFF, Christian P. A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: Isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 280, n. 5, p. 3441–3448, 2005. DOI: 10.1074/jbc.M411086200.

AULD, David S. Catalytic Mechanisms for Metallopeptidases. In: **Handbook of Proteolytic Enzymes**. [s.l.] : Elsevier, 2013. v. 1p. 370–396. DOI: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00078-8.

BARBOSA PELEGRINI, Patrícia; DEL SARTO, Rafael Perseghini; SILVA, Osmar Nascimento; FRANCO, Octávio Luiz; GROSSI-DE-SA, Maria Fátima. Antibacterial peptides from plants: What they are and how they probably work. **Biochemistry Research International**, [S. l.], v. 2011, 2011. DOI: 10.1155/2011/250349.

BENKO-ISEPPON, Ana Maria; LINS GALDINO, Suely; CALSA JR., Tercilio; AKIO KIDO, Ederson; TOSSI, Alessandro; CARLOS BELARMINO, Luis; CROVELLA, Sergio. Overview on Plant Antimicrobial Peptides. **Current Protein & Peptide Science**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 181–188, 2010. DOI: 10.2174/138920310791112075.

BOITEUX, L. S.; CHARCHAR, J. M. Genetic resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in eggplant (*Solanum melongena*). **Plant Breeding**, [S. l.], v. 115, n. 3, p. 198–200, 1996. DOI: 10.1111/j.1439-0523.1996.tb00902.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0523.1996.tb00902.x>.

BONDARYK, Małgorzata; STANISZEWSKA, Monika; ZIELIŃSKA, Paulina; URBAŃCZYK-LIPKOWSKA, Zofia. Natural antimicrobial peptides as inspiration for design of a new generation antifungal compounds. [s.l.: s.n.]. v. 3 DOI: 10.3390/jof3030046.

BOPARAI, Jaspreet Kaur; SHARMA, Pushpender Kumar. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. **Protein & Peptide Letters**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 4–16, 2019. DOI: 10.2174/0929866526666190822165812.

CASTAGNONE-SERENO, Philippe; DELEURY, Emeline; DANCHIN, Etienne G. J.; PERFUS-BARBECH, Laetitia; ABAD, Pierre. Data-mining of the *Meloidogyne incognita* degradome and comparative analysis of proteases in nematodes.

Genomics, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 29–36, 2011. DOI: 10.1016/j.ygeno.2010.10.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.10.002>.

CHANDRASEKARAN, Murugesan; THANGAVELU, Boopathi; CHUN, Se Chul; SATHIYABAMA, Muthukrishnan. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. **Journal of General Plant Pathology**, SHIROYAMA TRUST TOWER 5F, 4-3-1 TORANOMON, MINATO-KU, TOKYO, 105-6005, JAPAN, v. 82, n. 5, p. 233–239, 2016. DOI: 10.1007/s10327-016-0672-9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-8498286331-3&doi=10.1007%2Fs10327-016-0672-9&partnerID=40&md5=cbc14a172842f90acf1f3089518d6242>.

COTABARREN, J.; LUFRANO, D.; PARISI, M. G.; OBREGON, W. D. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **PLANT SCIENCE**, Univ Nacl La Plata, Ctr Invest Proteínas Vegetales CIProVe, Dept Ciencias Biol, CICPBA, Fac Ciencias Exactas, 47 & 115 S-N, B1900AVW, La Plata, Buenos Aires, Argentina, v. 292, 2020. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110398 WE - Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED).

D'ADDABBO, Trifone; LAQUALE, Sebastiano; PERNIOLA, Michele; CANDIDO, Vincenzo. Biostimulants for plant growth promotion and sustainable management of phytoparasitic nematodes in vegetable crops. **Agronomy**, [S. l.], v. 9, n. 10, 2019. DOI: 10.3390/agronomy9100616.

DATTA, Shreeja; ROY, Arpita. Antimicrobial Peptides as Potential Therapeutic Agents: A Review. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [S. l.], n. August, 2020. DOI: 10.1007/s10989-020-10110-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10989-020-10110-x>.

DIAMOND, Gill; ZASLOFF, Michael; ECK, Howard; BRASSEUR, Michael; LEE MALOY, W.; BEVINS, Charles L. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: Peptide isolation and cloning of a cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 88, n. 9, p. 3952–3956, 1991. DOI: 10.1073/pnas.88.9.3952.

DRACATOS, Peter M.; PAYNE, Jennifer; DI PIETRO, Antonio; ANDERSON, Marilyn A.; PLUMMER, Kim M. Plant defensins NaD1 and NaD2 induce different stress response pathways in fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 17, n. 9, 2016. DOI: 10.3390/ijms17091473.

FERRAZ, Luiz Carlos C. Barbosa; BROWN, Derek John Finlay. **NEMATOLOGIA DE PLANTAS: fundamentos e importância**. 1. ed. Manaus: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2016.

FIGAJ, D.; AMBROZIAK, P.; PRZEPIORA, T.; SKORKO-GLONEK, J. The role of proteases in the virulence of plant pathogenic bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, J. Skorko-Glonek, Department of General and Medical Biochemistry, Faculty of Biology, University of Gdansk, Wita Stwosza 59, Gdansk, Poland, v. 20, n. 3, 2019. DOI: 10.3390/ijms20030672. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L2001558568&from=export>.

FJELL, Christopher D.; HANCOCK, Robert E. W.; CHERKASOV, Artem. AMPer: A

database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 23, n. 9, p. 1148–1155, 2007. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm068.

GAMES, P. D.; KOSCKY-PAIER, C. R.; ALMEIDA-SOUZA, H. O.; BARBOSA, M. O.; ANTUNES, P. W. P.; CARRIJO, L. C.; PEREIRA, P. R. G.; BARACAT-PEREIRA, M. C. In vitro anti-bacterial and anti-fungal activities of hydrophilic plant defence compounds obtained from the leaves of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, [S. l.], v. 88, n. 5, p. 551–558, 2013. DOI: 10.1080/14620316.2013.11513005.

GARCÍA-OLMEDO, Francisco; RODRÍGUEZ-PALENZUELA, Pablo; MOLINA, Antonio; ALAMILLO, Josefa M.; LÓPEZ-SOLANILLA, Emilia; BERROCAL-LOBO, Marta; POZA-CARRIÓN, César. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defence. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 498, n. 2–3, p. 219–222, 2001. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02456-5.

GODBOLE, Sangeeta A.; KHARAT, Sopan N. Review on Plant Protease Inhibitors as Therapeutic Molecules. **The Journal of Plant Science Research**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 277–288, 2022. DOI: 10.32381/JPSR.2022.38.01.30.

GRÜNDEMANN, Carsten; STENBERG, Kjell G.; GRUBER, Christian W. T20K: An Immunomodulatory Cyclotide on Its Way to the Clinic. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 9–13, 2019. DOI: 10.1007/s10989-018-9701-1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10989-018-9701-1>.

GUZMÁN-CEFERINO, J.; COBOS-PUC, L. ...; SIERRA-RIVERA, C. ...; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. ...; DURÁN-MENDOZA, T.; SILVA BELMARES., S. ... CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA FRACCIÓN PROTEICA POTENCIALMENTE BIOACTIVA DE *Solanum marginatum* L. f. **Polibotánica**, [S. l.], v. 0, n. 46, p. 137–151, 2019. DOI: 10.18387/polibotanica.47.10.

HOU, Tianyu; SANA, Siva Sankar; LI, Huizhen; XING, Yun; NANDA, Anima; NETALA, Vasudeva Reddy; ZHANG, Zhijun. Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 47, n. April, p. 101716, 2022. DOI: 10.1016/j.fbio.2022.101716. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101716>.

HUANG, Guozhong; GAO, Bingli; MAIER, Tom; ALLEN, R.; DAVIS, Eric L.; BAUM, Thomas J.; HUSSEY, Richard S. A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003. DOI: 10.1094/MPMI.2003.16.5.376.

HUANG, Xin; XU, Chun Ling; CHEN, Wan Zhu; CHEN, Chun; XIE, Hui. Cloning and characterization of the first serine carboxypeptidase from a plant parasitic nematode, *Radopholus similis*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-05093-7.

HUANG, Yen Hua; COLGRAVE, Michelle L.; DALY, Norelle L.; KELESHIAN, Asbed; MARTINAC, Boris; CRAIK, David J. The biological activity of the prototypic cyclotide Kalata B1 is modulated by the formation of multimeric pores. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 284, n. 31, p. 20699–20707, 2009. DOI: 10.1074/jbc.M109.003384.

JAOUANNET, Maëlle et al. A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. **New Phytologist**, [S. l.], v. 194, n. 4, p. 924–931, 2012. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04164.x.

JONES, John T. et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 946–961, 2013. DOI: 10.1111/mpp.12057.

LAY, Fung T.; BRUGLIERA, Filippa; ANDERSON, Marilyn A. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 131, n. 3, p. 1283–1293, 2003. DOI: 10.1104/pp.102.016626.

LI, Wenyi; TAILHADES, Julien; O'BRIEN-SIMPSON, Neil M.; SEPAROVIC, Frances; OTVOS, Laszlo; HOSSAIN, M. Akhter; WADE, John D. Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic-resistant bacteria. **Amino Acids**, [S. l.], v. 46, n. 10, p. 2287–2294, 2014. DOI: 10.1007/s00726-014-1820-1. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-014-1820-1>.

LUFRANO, Daniela; COTABARREN, Juliana; GARCIA-PARDO, Javier; FERNANDEZ-ALVAREZ, Roberto; TORT, Olivia; TANCO, Sebastián; AVILÉS, Francesc Xavier; LORENZO, Julia; OBREGÓN, Walter D. Biochemical characterization of a novel carboxypeptidase inhibitor from a variety of Andean potatoes. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 120, p. 36–45, 2015. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.09.010.

MARACAHIPES, Alan C. et al. Biochemical analysis of antimicrobial peptides in two different Capsicum genotypes after fruit infection by Colletotrichum gloeosporioides. **Bioscience Reports**, [S. l.], v. 39, n. 4, 2019. DOI: 10.1042/BSR20181889. Disponível em: <https://portlandpress.com/bioscirep/article/doi/10.1042/BSR20-181889/110811/Biochemical-analysis-of-antimicrobial-peptides-in>.

MARINO-BUSLJE, Cristina; VENHUDOVÁ, Gabriela; MOLINA, Miguel A.; OLIVA, Baldomero; JORBA, Xavier; CANALS, Francesc; AVILÉS, Francesc X.; QUEROL, Enrique. Contribution of C-tail residues of potato carboxypeptidase inhibitor to the binding to carboxypeptidase A: A mutagenesis analysis. **European Journal of Biochemistry**, E. Querol, Institut de Biologia Fonamental, Dep. de Bioquímica i Biologia Molec., Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain, v. 267, n. 5, p. 1502–1509, 2000. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01150.x.

MOLCHANOVA, Natalia; HANSEN, Paul R.; FRANZYK, Henrik. Advances in development of antimicrobial peptidomimetics as potential drugs. **Molecules**, [S. l.], v. 22, n. 9, 2017. DOI: 10.3390/molecules22091430.

MOLESINI, Barbara; TREGGIARI, Davide; DALBENI, Andrea; MINUZ, Pietro; PANDOLFINI, Tiziana. Plant cystine-knot peptides: pharmacological perspectives. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 63–70, 2017. DOI: 10.1111/bcp.12932.

MONTESINOS, Emilio. Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 270, n. 1, p. 1–11, 2007. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00683.x.

MOULIN, M. M.; RODRIGUES, R.; RIBEIRO, S.; GONÇALVES, L.; BENTO, C. S.; SUDRÉ, C. P.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M. Trypsin inhibitors from

Capsicum baccatum var. *Pendulum* leaves involved in pepper yellow mosaic virus resistance. **Genetics and Molecular Research**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 9229–9243, 2014. DOI: 10.4238/2014.November.7.10.

MOUSSA, Ashaimaa Y.; LAMBERT, Christopher; STRADAL, Theresia E. B.; ASHRAFI, Samad; MAIER, Wolfgang; STADLER, Marc; HELALY, Soleiman E. New Peptaibiotics and a Cyclodepsipeptide from *Ijuhya vitellina*: Isolation, Identification, Cytotoxic and Nematicidal Activities. **Antibiotics**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 132, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9030132.

MUHAMMAD, Surayya Mustapha; SABO, Ibrahim A.; GUMEL, Ahmed Mohammed; ALKALI, Fatima I. Extraction and Purification of Antimicrobial Proteins from *Datura Stramonium* Seed. **Journal of Advances in Biotechnology**, [S. l.], v. 8, p. 1073–1077, 2019. DOI: 10.24297/jbt.v8i0.8221.

NAWROT, Robert; BARYLSKI, Jakub; NOWICKI, Grzegorz; BRONIARCZYK, Justyna; BUCHWALD, Waldemar; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, Anna. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiologica**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 181–196, 2014. DOI: 10.1007/s12223-013-0280-4.

NGUYEN, Leonard T.; HANEY, Evan F.; VOGEL, Hans J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011.

ORMANCEY, Mélanie et al. Complementary peptides represent a credible alternative to agrochemicals by activating translation of targeted proteins. **Nature Communications**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–13, 2023. DOI: 10.1038/s41467-023-35951-0.

PANOSA, C. et al. Analysis of the effect of potato carboxypeptidase inhibitor pro-sequence on the folding of the mature protein. **Journal of Biological Chemistry**, G. D. Leikauf, Department of Environmental and Occupational Health, Graduate School of Public Health, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, United States, United States, v. 5, n. 1, p. 78–86, 2003. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.03130.x.

PASCALE, Alberto; PROIETTI, Silvia; PANTELIDES, Iakovos S.; STRINGLIS, Ioannis A. Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: The Basis for Targeted Disease Suppression and Plant Growth Promotion. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 10, n. January, p. 1–23, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2019.01741.

PUSHPANATHAN, Muthuirulan; GUNASEKARAN, Paramasamy; RAJENDHRAN, Jeyaprakash. Antimicrobial peptides: Versatile biological properties. **International Journal of Peptides**, [S. l.], v. 2013, n. Table 1, 2013. DOI: 10.1155/2013/675391.

QUILIS, Jordi; LÓPEZ-GARCÍA, Belén; MEYNARD, Donaldo; GUIDERDONI, Emmanuel; SAN SEGUNDO, Blanca. Inducible expression of a fusion gene encoding two proteínase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, B. San Segundo, v. 12, n. 3, p. 367–377, 2014. DOI: 10.1111/pbi.12143.

QUILIS, Jordi; MEYNARD, Donaldo; VILA, Laura; AVILÉS, Francesc X.; GUIDERDONI, Emmanuel; SAN SEGUNDO, Blanca. A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 537–553, 2007. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2007.00264.x.

ROCHA, Raquel O. et al. Proteome of Soybean Seed Exudates Contains Plant Defense-Related Proteins Active against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. [S. l.], 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01109.

SALAS, Carlos E.; BADILLO-CORONA, Jesus A.; RAMÍREZ-SOTELO, Guadalupe; OLIVER-SALVADOR, Carmen. Biologically active and antimicrobial peptides from plants. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/102129.

SARNTHIMA, Rakrudee; KHAMMUANG, Saranyu. Antibacterial Activities of *Solanum stramonifolium* Seed Extract. **J. Agric. Biol.**, [S. l.], n. March, 2014.

SAVARY, Serge; WILLOCQUET, Laetitia; PETHYBRIDGE, Sarah Jane; ESKER, Paul; MCROBERTS, Neil; NELSON, Andy. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology and Evolution**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019. DOI: 10.1038/s41559-018-0793-y.

SELS, Jan; MATHYS, Janick; DE CONINCK, Barbara M. A.; CAMMUE, Bruno P. A.; DE BOLLE, Miguel F. C. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 46, n. 11, p. 941–950, 2008. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011.

SIKANDAR, A.; ZHANG, M. Y.; WANG, Y. Y.; ZHU, X. F.; LIU, X. Y.; FAN, H. Y.; XUAN, Y. H.; CHEN, L. J.; DUAN, Y. X. Review article: *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode) a risk to agriculture. **Applied Ecology and Environmental Research**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1679–1690, 2020. DOI: 10.15666/aeer/1801_16791690.

SITJÀ-ARNAU, Marta et al. Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) as an EGF blocker. **Cancer Letters**, Univ Girona, Fac Ciències, Dept Biol, Unitat Bioquim, Girona 17071, Spain, v. 226, n. 2, p. 169–184, 2005. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.01.025. Drecord&id=L41039085&from=export.

TAM, James P.; WANG, Shujing; WONG, Ka H.; TAN, Wei Liang. Antimicrobial peptides from plants. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 711–757, 2015. DOI: 10.3390/ph8040711.

TANG, Swee-seong; PRODHAN, Zakaria H.; BISWAS, Sudhangshu K.; LE, Cheng-foh; SEKARAN, Shamala D. Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. **Elsevier**, [S. l.], v. 154, n. May, p. 94–105, 2018.

TRUONG, Nhat My; NGUYEN, Chinh-nghia; ABAD, Pierre; QUENTIN, Michaël; FAVERY, Bruno. Function of Root-Knot Nematode Effectors and Their Targets in Plant Parasitism. In: **Advances in Botanical Research**. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2015. v. 73p. 293–324. DOI: 10.1016/bs.abr.2014.12.010.

WANG, X.; SMITH, P. L.; HSU, M. Y.; TAMASI, J. A.; BIRD, E.; SCHUMACHER, W. A. Deficiency in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) protected mice from ferric chloride-induced vena cava thrombosis. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, X. Wang, Department of Thrombosis Biology, Bristol-Myers Squibb Company, 311 Pennington-Rocky Hill Road, Pennington, NJ 08534, United States, v. 23, n. 1, p. 41–49, 2007. DOI: 10.1007/s11239-006-9009-4.

YANG, Xu; CHENG, Yu Fu; DENG, Cao; MA, Yan; WANG, Zhi Wen; CHEN, Xue Hao; XUE, Lin Bao. Comparative transcriptome analysis of eggplant (*Solanum melongena*

L.) and turkey berry (*Solanum torvum* Sw.): Phylogenomics and disease resistance analysis. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 0–12, 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-412.

ZHANG, Ling-juan; GALLO, Richard L. peptides. [S. l.], v. 30, 2016.

ZHANG, Yi Meng; YE, De Xing; LIU, Yan; ZHANG, Xin Yuan; ZHOU, Yuan Lin; ZHANG, Li; YANG, Xin Ling. Peptides, new tools for plant protection in eco-agriculture. **Advanced Agrochem**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 58–78, 2023. DOI: 10.1016/j.aac.2023.01.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aac.2023.01.003>.

ZUREEN, Seema; KHAN, Mohammad I. Nematicidal activity in some plant lattices. **Pakistan Journal of Nematology**. v. 2, p. 69–77, 1984.

Capítulo 1 – Inibidores de Carboxipeptidase de Solanáceas como uma nova subclasse de peptídeos relacionados à patogênese visando alvos biotecnológicos para a defesa de plantas

Esse capítulo é o manuscrito do artigo intitulado “**Carboxypeptidase inhibitors from *Solanaceae* as a new subclass of pathogenesis related peptide aiming biotechnological targets for plant defense**”, o qual foi submetido para publicação na revista “**Frontiers in Molecular Biosciences**”. O capítulo encontra-se em inglês e formatado de acordo com as exigências da revista no qual está em análise para publicação.

O capítulo compreende a junção de resultados de dois trabalhos desenvolvidos nos Laboratórios de Proteômica e Bioquímica de Proteínas, do CCBII e BIOAGRO/UFV, sob a orientação da professora Maria Cristina Baracat-Pereira. Os trabalhos envolvidos são: Iniciação Científica PIBIC/FAMIG da aluna Paula C. Espósito (Set/2020 a Out/2021) e a Tese de Geniana S. Gomes (este documento).

ABSTRACT

Plants possess defense mechanisms, including antimicrobial peptides, to protect against pathogens. Plant protease inhibitors play a crucial role in inhibiting proteases produced by pathogens and have shown inhibitory effects on nematodes, fungi, and insects, making them promising candidates for crop protection. Specifically, carboxypeptidase inhibitors, a subclass of proteínase inhibitors, have been extensively studied in potato and tomato of *Solanaceae* plant family. However, further research is needed to fully understand the functions and biotechnological potential of those inhibitors in plants. This work aimed to study carboxypeptidase inhibitors from *Solanaceae* as potencial antimicrobial and defense agents focused in biotechnological targets. The methodology employed involved search in Uniprot, PDB, KNOTTIN, NCBI, and MEROPS databases for solanaceous carboxypeptidase inhibitors, phylogenetic relationships and conservation patterns analyzes using MEGA-X software and Clustal Omega/MView tools, physico-chemical properties and antimicrobial potential prediction using ProtParam, ToxinPred, iAMPred, and APD3 tools, and structural features prediction using PSIPRED. A systematic literature search was conducted to identify relevant studies on *Solanaceae* carboxypeptidase inhibitors and their activities against pathogens. The selected studies were reviewed and the main findings compiled. The characterization of *Solanaceae* carboxypeptidase inhibitor sequences revealed their distribution, sequence variability, conservation patterns, and proposed consensus motif, supporting their potential as defense agents. Phylogenetic analysis showed evolutionary relationships within the *Solanaceae* family, particularly in *Capsicum*, *Nicotiana*, and *Solanum* genera. Physico-chemical characteristics of those peptides indicated their similarity to antimicrobial peptides. Secondary structures exhibited variations, suggesting a broad spectrum of action and studies had been demonstrated their activities against various pathogens. The propose of carboxypeptidase inhibitors insertion in a new subclass within the plant pathogenesis related proteins 6 provides a focused understanding of their functional roles in plant defense mechanisms. These findings confirm the *Solanaceae* carboxypeptidase inhibitors potential as defense agents and highlight opportunities for their biotechnological applications in pathogen control.

Keywords: *Solanaceae*. Carboxypeptidase inhibitors. Antimicrobial peptides. Plant defense. Characterization. Biotechnology. Pathogen.

1. INTRODUCTION

Plants employ various defense mechanisms to protect themselves against pathogens. They possess inherent barriers such as the cuticle layer and lignin depositions, which serve as physical and chemical obstacles to pathogen invasion (Landa et al., 2002; Chassot et al., 2007; Sels et al., 2008). Additionally, to these preexisting defenses, plants can activate inducible defense mechanisms upon pathogen attack. These mechanisms include reinforcement of the cell wall, initiation of a hypersensitive response, generation of reactive oxygen species, accumulation of secondary metabolites, and production of pathogenesis-related proteins (PR-proteins), including antimicrobial peptides (AMPs) (Durrant and Dong, 2004; Truman et al., 2007; Sels et al., 2008). Antimicrobial peptides, also referred to as plant defense peptides, play a critical role in the innate immune response of plants against pathogens. Many plant AMPs are small, cationic, and amphipathic molecules that exhibit broad-spectrum antimicrobial activity. They are capable of directly interacting with the cell membranes of pathogens, causing damages and eventual cell death (García-Olmedo et al., 2001; Li et al., 2021; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2023). By functioning as potent natural antimicrobials, these peptides contribute to the defense arsenal of plants and provide an effective line of defense against invading pathogens.

AMPs can be classified into various families of plant pathogenesis-related proteins (PR), with some notable classes including thionins (PR-13), defensins (PR-12), lipid transfer proteins (PR-14), hevein-like peptides (PR-3, PR-4, PR-8, and PR-11), knottin-like peptides, and protease inhibitors (PR-6) (García-Olmedo et al., 2001; Sels et al., 2008; Kaur et al., 2022). Extensive research has demonstrated the antimicrobial properties of PR proteins, highlighting their role in plant defense against pathogens. Studies focused on *Solanaceae* plants, such as *Solanum tuberosum* (potato) and *Solanum lycopersicum* (tomato), have revealed the involvement of PR proteins in antimicrobial activity and defense responses against phytopathogenic bacteria, fungi, viruses, and insects. For instance, the overexpression of the antimicrobial potato Snakin-1 in transgenic *Citrangue troyer* resulted in reduced disease symptoms caused by the bacterium *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Conti et al., 2020). In tomato, PR protein expression genes are associated with defense against insects such as *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci*, as well as viruses like *Tobacco mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* (Puthoff et al., 2010; Aseel et al., 2023).

These findings underscore the significance of PR proteins in plant defense mechanisms, particularly in the context of *Solanaceae* plants.

Plant protease inhibitors (PPIs), classified within the PR-6 protein family, have gained significant attention in various research studies due to their crucial roles in plant defense against microbial pathogens. These peptides function by inhibiting the activity of proteases, which are enzymes produced by pathogens to degrade plant proteins and facilitate their invasion. By inhibiting these proteases, plant defense protease inhibitors can disrupt essential physiological processes of pathogens, ultimately leading to their suppression or elimination (Cotabarren et al., 2020; Godbole and Kharat, 2022). Moreover, these protease inhibitors (PIs) have been found to exhibit a wide range of inhibitory effects, including the suppression of nematode infections and the inhibition of growth in various pathogenic fungi (Terras et al., 1993; Urwin et al., 1997; Joshi et al., 1998; Have et al., 2004). Additionally, these inhibitors have demonstrated negative impacts on insect development, highlighting their potential as transgenic resistance factors (Shukle and Wu, 2003). The diverse benefits offered by plant PPIs make them highly promising candidates for biotechnological applications (Cotabarren et al., 2020). Their multifunctional properties, including antimicrobial and insecticidal activities, position them as valuable tools for enhancing crop protection and developing environmentally friendly approaches for pest and pathogen control.

PPIs of the PR-6 family can be further classified into subfamilies, including the tomato/potato class II PIs, Bowman–Birk PIs, and Kunitz-type PIs (Datta and Muthukrishnan, 1999; Haq et al., 2004; Christeller and Laing, 2005; Rodríguez-Sifuentes et al., 2020). These subfamilies have been extensively studied in relation to PPIs and antimicrobial peptide (AMP) research, highlighting their biotechnological applications in this field (Sels et al., 2008; Cotabarren et al., 2020; Godbole and Kharat, 2022). Other noteworthy class of PIs discussed in this context is the metalloproteínase inhibitors, also known as carboxypeptidase inhibitors (CPIs). These metalloprotease inhibitors are characterized by their ability to inhibit carboxypeptidases of A and B subfamilies through the interaction of the C-terminal region of CPIs with the catalytic site of carboxypeptidase (Marino-Buslje et al., 2000; Arolas et al., 2005). CPIs contain three conserved intramolecular disulfide bonds, and their presence has been described in a few plant species, primarily within the *Solanaceae* family, including the

potato and tomato species (Hass and Ryan, 1981; Lufrano et al., 2015; Molesini et al., 2017; Manara et al., 2020).

In plants, the potato CPI is one of the most extensively studied inhibitors within the PPI class. This inhibitor has been associated with various actions in plant defense mechanisms. For instance, research has shown that a potato CPI gene promoted pathogen resistance in transgenic rice (Quilis et al., 2007). In addition, potato CPI has demonstrated antagonist properties against the epidermal growth factor (EGF), displaying antitumor effects. Furthermore, its antifungal activity has been tested and exhibited inhibition growth of *Magnaporthe oryzae* and *Fusarium verticillioides* fungus in 70% and 40%, respectively (Sitjà-Arnau et al., 2005; Quilis et al., 2007, 2014). Despite these advancements, there is still much to explore and understand about CPIs in plants, including their functions and applications in biological processes. Therefore, further investigations are warranted to unravel additional functions and uncover the full biotechnological potential of these peptides. In this context, the aim of this study is to delve deeper into the CPIs as biotechnological targets, characterizing their class and exploring their antimicrobial potential in *Solanaceae* plants, based on a comprehensive literature review and bioinformatics analyses.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Database research

The research for *Solanaceae* carboxypeptidase inhibitors involved a comprehensive search across multiple databases, including Uniprot, PDB, KNOTTIN, NCBI, and MEROPS. Uniprot (Bateman et al., 2021) the search terms "metallocarboxypeptidase inhibitor" and "carboxypeptidase inhibitor" were used to identify CPIs. A similar search was conducted in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). To identify CPI sequences with three-dimensional structures, the CPI sequences deposited in Uniprot were cross-referenced with the Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2007). The KNOTTIN database (<http://knottin.cbs.cnrs.fr>) was utilized specifically for selecting CPIs categorized as metallocarboxypeptidase inhibitors. Additionally, the MEROPS database (Rawlings et al., 2018) was consulted to identify CPI sequences belonging to the I37 metalloproteinase inhibitor family. Only sequences confirmed to be from *Solanaceae* species were selected, while any redundant, incomplete, or uncharacterized sequences were excluded from the analysis. This systematic

approach enabled the comprehensive identification and selection of relevant CPI sequences, ensuring the inclusion of high-quality, characterized data for further analysis (**C1 Supplementary File S1**).

2.2. Phylogeny and conservation analysis

To investigate the phylogenetic relationships of the selected CPIs from the databases (Supplementary Data), a phylogenetic study was performed using the MEGA-X software (Kumar et al., 2018). Sequence alignment was performed using Clustal W. Maximum likelihood phylogeny was carried out using the Jones-Taylor-Thornton (JTT) substitution model and the bootstrap phylogenetic test (Logacheva et al., 2008) with 1000 replicates. The generated tree was edited using the Interactive Tree of Life (iTOL) tool (Letunic and Bork, 2007). To analyze the conservation patterns of the CPI sequences, Clustal Omega, MView and WebLogo tools were employed for alignment and subsequent conservation analysis (Madeira et al., 2019; Crooks et al., 2004).

2.3. Physico-chemical and antimicrobial potential analysis

The physico-chemical properties of CPI sequences were predicted by the software's ProtParam (Gasteiger et al., 2005) for evaluation of isoelectric point (pI), molecular weight and charge and ToxinPred (Gupta et al., 2013) for toxicity based on amino acids characteristics. The CPIs antimicrobial potential evaluation by iAMPred (Meher et al., 2017) for prediction of antimicrobial activity (antiviral, antifungal and antibacterial) and APD3 (Wang et al., 2016) for hydrophobicity and binding potential evaluation. Analyses were realized with CPI sequences cut three amino acids before first cysteine, this pattern was determined by comparison with the functional potato and tomato CPIs sequences that originated their tridimensional structures, PDB codes 1H20 and 2HLG respectively, considering the interest of analyze only functional sequences of selected CPIs.

2.4. Structural feature analysis

The secondary structure standards were predicted using PSIPRED (Buchan and Jones, 2019) software for all selected CPI sequences. The PDB structures of potato (1H20 code) and tomato (2HLG code) CPIs were used to exemplify the structural characteristics of plant CPIs. Furthermore, the PDB structure (4CPA code) of potato CPI interacting with a bovine (*Bos taurus*) metallocarboxypeptidase A

(MCPA) was also used to show the main features involved in plant CPIs mechanism of action. PLIP (Adasme et al., 2021) and Discovery Studio 2021 (Biovia, 2021) software's were used to map interactions.

2.5. Systematic literature search

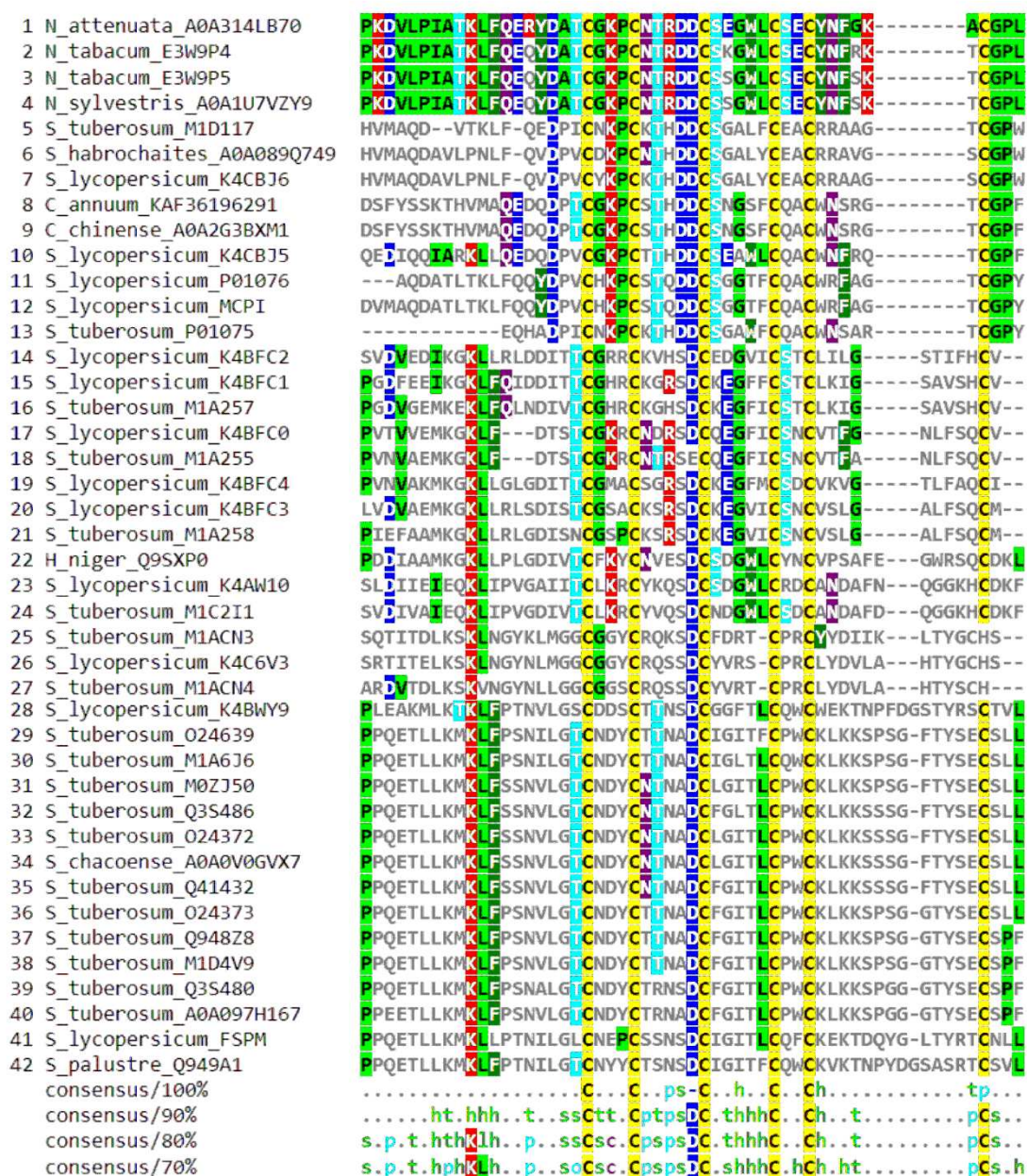
A systematic literature search was conducted to identify relevant studies pertaining to *Solanaceae* CPIs and their activities against pathogens. The databases Web of Science, Scopus, PubMed, and Embase were extensively searched using the main search terms "metallocarboxypeptidase inhibitor," "Solanaceae," and "pathogen." Sub-descriptors of each main term were employed to broaden the search scope. The resulting studies from the four searches were compiled, and any duplicated studies were excluded from the analysis. Furthermore, the reference lists of the identified studies were reviewed to identify additional relevant papers. In the study selection process, certain criteria were applied. Inclusion criteria included studies focused on "*Solanaceae* carboxypeptidase inhibitor," "CPI antimicrobial activity," "CPI resistance action in pathogen infection," "CPI expression in pathogen infection," and "CPI inhibition of pathogen metallocarboxypeptidase." Conversely, exclusion criteria encompassed studies not related to carboxypeptidase inhibitors or their actions in pathogen infection, as well as studies of secondary nature or those investigating other functions of carboxypeptidase. The findings of each included study were carefully tabulated for further analysis. The **C1 Supplementary Figure S1** and **C1 Supplementary Table1** provide detailed information regarding the search strategy. The methodology employed for the literature search adhered to an adapted form of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) guidelines (Grimshaw et al., 2021). This systematic approach ensured a comprehensive and transparent selection of relevant studies to address the research objectives effectively.

3. RESULTS

3.1. CPIs sequence characterization

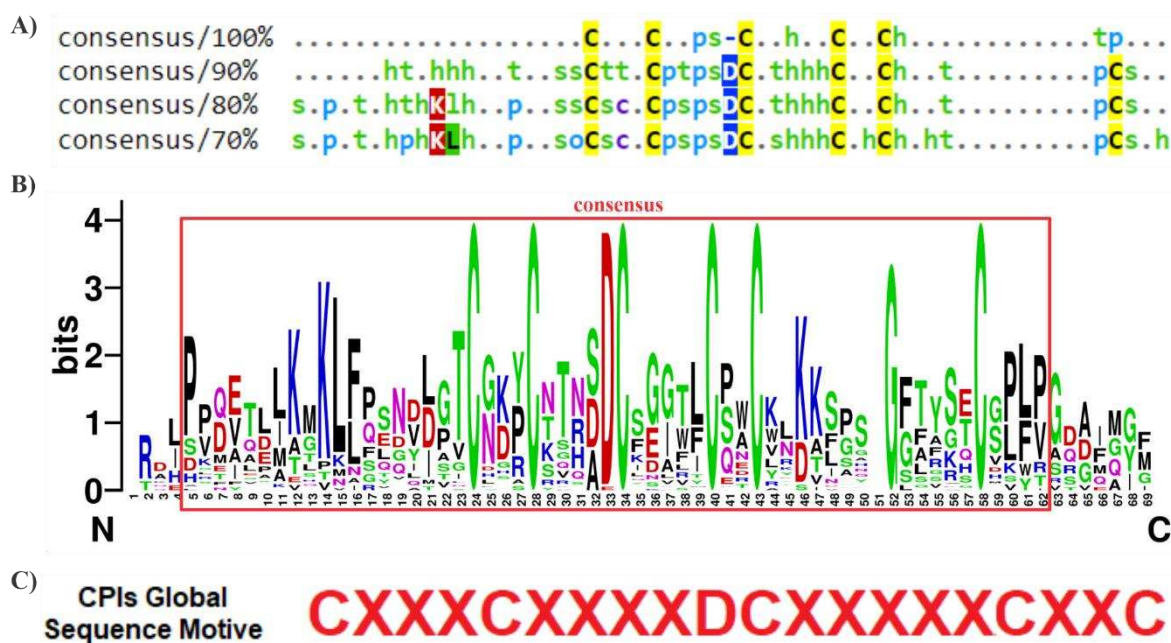
The database search for CPI sequences within the *Solanaceae* plant family yielded a total of 42 deposited sequences. These sequences were primarily distributed among the *Solanum*, *Capsicum*, and *Nicotiana* genera, spanning across nine different species. Specifically, the species included *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*,

Hyoscyamus niger, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum palustre*, and *Solanum tuberosum*. Among these sequences, the CPIs from potato and tomato exhibited the highest occurrence, displaying significant sequence variability. Conversely, the carboxypeptidase inhibitors found in *Nicotiana* and *Capsicum* species were less frequently observed and demonstrated greater conservation (C1 Figure 1).



C1 Figure 1. Consensus alignment of *Solanaceae* CPI sequences selected from databases. Global alignment was generated in Clustal Omega and visualized in MView software (MView 1.63, Copyright © 1997-2018 Nigel P. Brown). The consensus 100%, 90%, 80% and 70% evidence the conservation between aligned sequences. The MView color map shows the amino acid (aa) similarity patterns by its chemical characteristics: h (hydrophobic aa); o (alcohol aa); p (polar aa); s (small aa); t (turnlike aa).

The conservation patterns related to CPI sequences characterization in *Solanaceae* plants are depicted in the consensus alignment of selected sequences obtained from databases (**C1 Figure 1**). The consensus alignment reveals a high degree of conservation in cysteine residues and the distances between C-C disulfide bonds. Specifically, the positions and spacing of the first three cysteine residues are conserved, while the positions and spacing between Cys 4, 5, and 6 exhibit variability. Additionally, the consensus analysis (90%) describes the conservation of amino acid chemical characteristics in the region between Cys I-VI. Notably, different chemical features are observed in the interspace of C-C bonds. For instance, between Cys I-II, turn-like amino acids are prevalent, while polar, small, and turn-like residues dominate between Cys II-III. Hydrophobic residues are mainly found between Cys III-IV, and there is no specific amino acid preference between Cys IV-V. Moreover, the presence of an aspartic acid residue (D) before the third cysteine is conserved in about 90% of the sequences. This alignment position is consistently represented by a negatively charged amino acid in 100% of the aligned sequences. Furthermore, the consensus analyses at 80% and 70% thresholds reveal other interesting patterns, such as the appearance of hydrophobic residues in the carboxy terminal region (C-terminal) (**C1 Figure 1, C1 Figure 2A**).



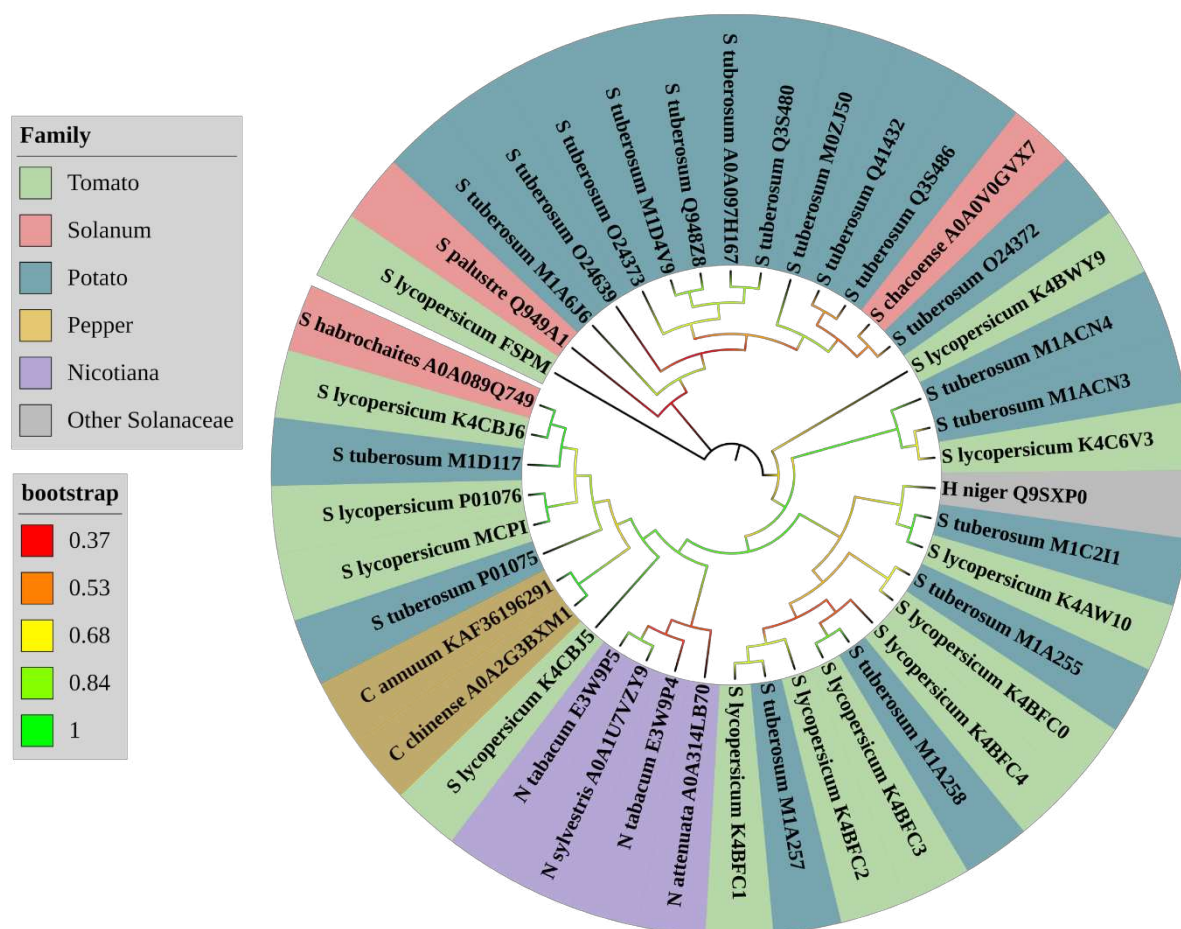
C1 Figure 2. Conservation patterns of *Solanaceae* CPI sequences from databases. **(A)** Consensus standards of aligned sequences generated by MView software (MView 1.63, Copyright © 1997-2018 Nigel P. Brown) showing amino acids similarities. The MView color map classifies amino acids by their chemical characteristics: h (hydrophobic aa); o (alcohol aa); p (polar aa); s (small aa); t (turnlike aa). **(B)** Logo generated by WebLogo software of *Solanaceae* CPIs multiple alignment. The WebLogo graph

indicates the relative frequency of the most common amino acids in each position of the alignment (<https://weblogo.berkeley.edu/>). Alignment consensus region is marked in red. The numbering of each amino acid position in the alignment is shown on the horizontal axis, where N indicates the N-terminus corresponding to the beginning of the alignment and C the C-terminus corresponding to the end of the alignment. In vertical axis, the bits ranging from 0 to 4 are indicated, which correspond to the frequency of the amino acids in each position. WebLogo color map shows the conserved amino acids colored in different colors according to the classification of amino acids by physico-chemical characteristics. **(C)** Global characterization motive of *Solanaceae* CPI sequences proposed according to conservation standards of consensus alignment and distances between cysteines.

The CPIs from the *Solanaceae* family focused in this study, exhibited a consensus in terms of amino acid characteristics (**C1 Figure 1, C1 Figure 2A**). The generated logo (**C1 Figure 2B**) provides a visual representation of the variation and frequency of amino acids at each position, further supporting the consensus of physico-chemical features along the CPI sequences. Specially, there is a prominent occurrence of six cysteine residues, as well as an aspartic acid residue at position 33 and hydrophobic amino acids in the C-terminal consensus region. Taking into account the conservation of amino acid standards within the region between C:I-V, a consensus motif of CXXXCXXXXDCXXXX-XXCXXC was proposed as a global characterization of CPIs, where "X" represents any amino acid. Remarkably, this consensus motif was observed in 90% of the analyzed CPIs (42 sequences) (**C1 Figure 2C**).

3.2. CPIs' distribution

The phylogenetic analysis of CPIs from nightshades (**C1 Figure 3**) revealed their distribution across six phylogenetic families, based on the species and genera of *Solanaceae* in which CPIs were found. The analysis demonstrated significant bootstrap values (ranging from 0.53 to 1) in the majority of the tree branches, indicating robust support for the phylogenetic relationships. Remarkably, the phylogenetic tree displayed a closer evolutionary proximity and sequence similarity within genera, as evident from the clustering of CPIs from *Capsicum*, *Nicotiana*, and *Solanum* species. In contrast, each clade of the tree contained at least one CPI from the potato and/or tomato families, indicating their evolutionary proximity to the other five solanaceous families. This suggests that potato and tomato CPIs differentiated early in the evolutionary adaptation of carboxypeptidase inhibitor expression in plants, which can be attributed to their higher genetic variability. The presence of these CPIs in multiple clades further underscores their evolutionary significance within the *Solanaceae* family.



C1 Figure 3. Phylogeny of database *Solanaceae* CPI sequences. Maximum likelihood phylogenetic tree was constructed by MEGA X software using the bootstrap phylogenetic test. The tree shows the phylogenetic relationships of *Solanaceae* CPI sequences selected from databases. CPIs are colored according to six families that were classified into *Solanaceae* species and genera. The families are tomato, potato, pepper, *Solanum*, *Nicotiana* and other *Solanaceae*. The Bootstrap variation (0.37-1) is showed in different colors.

3.3. CPIs physico-chemical standards

C1 Table 1. Physico-chemical properties of *Solanaceae* CPIs.

Species	Code	ProtParam			ToxinPred
		pI*	molecular weight	charge	toxicity
<i>Capsicum annum</i>	KAF36196291	5.30	3638.97 Da	-1	toxic
<i>Capsicum chinense</i>	A0A2G3BXM1	5.30	3638.97 Da	-1	toxic
<i>Hyoscyamus niger</i>	Q9SXP0	6.26	6470.36 Da	0	toxic
<i>Nicotiana attenuata</i>	OIT383771	4.23	4301.85 Da	-3	toxic
<i>Nicotiana glauca</i>	A0A1U7VZY9	4.36	4337.90 Da	-2	toxic
<i>Nicotiana glauca</i>	E3W9P4	6.16	4490.19 Da	0	toxic
<i>Nicotiana glauca</i>	E3W9P5	4.36	4337.90 Da	-2	toxic
<i>Solanum chacoense</i>	A0A0V0GVX7	6.08	4451.11 Da	0	toxic
<i>Solanum habrochaites</i>	A0A089Q749	4.82	4291.72 Da	-2	toxic
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BWY9	4.04	4600.05 Da	-3	toxic
<i>Solanum lycopersicum</i>	FSPM	4.78	4376.00 Da	-1	toxic
<i>Solanum lycopersicum</i>	MCPI	6.78	4397.01 Da	0	nontoxic**

<i>Solanum lycopersicum</i>	K4CBJ6	6.71	4325.83 Da	0	toxic
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4CBJ5	4.66	3876.36 Da	-2	nontoxic**
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC2	6.87	3671.31 Da	0	toxic
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC1	8.68	3635.24 Da	+3	toxic
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC0	5.78	3724.16 Da	0	toxic
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC4	6.08	3566.20 Da	0	toxic
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC3	7.77	3489.06 Da	+1	nontoxic**
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4AW10	7.79	6838.50 Da	+1	toxic
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4C6V3	7.60	3849.35 Da	+1	toxic
<i>Solanum palustre</i>	Q949A1	7.76	4601.21 Da	+1	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	P01075	6.87	4913.56 Da	0	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A6J5	6.08	4479.17 Da	0	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	M1D117	7.79	4357.92 Da	+1	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A257	8.34	3580.21 Da	+2	nontoxic**
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A255	7.48	3738.23 Da	+1	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A258	7.77	3528.10 Da	+1	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	M1C2I1	5.45	6058.75 Da	-1	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	M1ACN3	8.27	4001.59 Da	+2	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	M1ACN4	7.79	3712.20 Da	+1	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	O24639	6.08	4482.17 Da	0	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A6J6	6.08	4479.17 Da	0	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	M0ZJ50	6.08	4461.15 Da	0	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	Q3S486	6.08	4485.13 Da	0	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	O24372	6.08	4451.11 Da	0	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	O24373	6.08	4392.04 Da	0	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	Q948Z8	6.08	4410.02 Da	0	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	M1D4V9	6.08	4410.02 Da	0	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	Q3S480	7.76	4451.07 Da	+1	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	Q41432	6.08	4485.13 Da	0	toxic
<i>Solanum tuberosum</i>	A0A097H167	7.76	4435.07 Da	+1	toxic

*pI – isoelectric point

**Nontoxic CPIs are marked in gray color

According to physico-chemical analysis the *Solanaceae* CPIs (**C1 Table 1**) exhibit a molecular mass ranging between 3.5 and 6.8 kDa. The isoelectric point (pI) of CPIs varies between 4 and 8, influenced by their charge. The charge itself varies not only within genera but also between them, spanning from -3 to +3. Specifically, CPIs from *Nicotiana*, *Capsicum*, and *S. habrochaites* are predominantly anionic, while *H. niger* and *S. chacoense* CPIs are neutral. On the other hand, CPIs from *S. tuberosum* and *S. lycopersicum* exhibit a mix of neutral, positive, and negative charges. Most CPIs demonstrate toxicity, according to ToxinPred software prediction.

The program predict toxicity by aminoacids characteristics, where certain residues like C, H, N, and P are abundant as well as preferred at various positions in toxic peptides (Gupta et al., 2013). Although a small subset, comprising three from *S. lycopersicum* and one from *S. tuberosum*, are considered non-toxic.

These findings highlight the potential of these peptides as defense agents, given their physico-chemical characteristics, which resemble those of antimicrobial peptides and plant pathogenesis related proteins (García-Olmedo et al., 2001; Sels et al., 2008). Notably, the non-toxic CPIs represent interesting targets for the development of biotechnological products, as they pose no harm to humans, are natural molecules, and can be considered eco-friendly or "green" chemicals (no harmful to humans and environment) (C1 Table 1).

3.4. CPI's structural features and mechanism of action

C1 Table 2. Secondary structures patterns of *Solanaceae* CPIs.

Species	Code	PSIPRED
		secondary structure patterns*
<i>Capsicum annuum</i>	KAF36196291	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCCC
<i>Capsicum chinense</i>	A0A2G3BXM1	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCCC
<i>Hyoscyamus niger</i>	Q9SXP0	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCEE EEEECCCCCHHHH
<i>Nicotiana attenuata</i>	OIT383771	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHHCCCCCCCCCCCC CCCCC
<i>Nicotiana sylvestris</i>	A0A1U7VZY9	CCCCCCCCCCCCCCCCCEECHHHHHCCCCCCCCCCC CCCCC
<i>Nicotiana tabacum</i>	E3W9P4	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHHHHCCCCCCCCCCC CCCCC
<i>Nicotiana tabacum</i>	E3W9P5	CCCCCCCCCCCCCCCCCEECHHHHHCCCCCCCCCCC CCCCC
<i>Solanum chacoense</i>	A0A0V0GVX7	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCCC EECCC
<i>Solanum habrochaites</i>	A0A089Q749	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHHCCCCCCCCCCCC CCCC
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BWY9	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCCC EEEECCC
<i>Solanum lycopersicum</i>	FSPM	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCCC EECC
<i>Solanum lycopersicum</i>	MCPI**	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHHHCCCCCCCCCCC CCHHC
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4CBJ6	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHCCCCCCCCCCCC CCCC
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4CBJ5**	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHHHHHCCCCCCCCCCC
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC2	CCCCCCCCCCCCCCCCCEECHHCHHHCCCCCCCCC
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC1	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHHCCCCCCCCCCCC
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC0	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHHCCCCCCCCCCCC
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC4	CCCCCCCCCCCCCCCCCEECHHCCCCCCCCCCCC
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC3**	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHCHHCCCCHHHCC

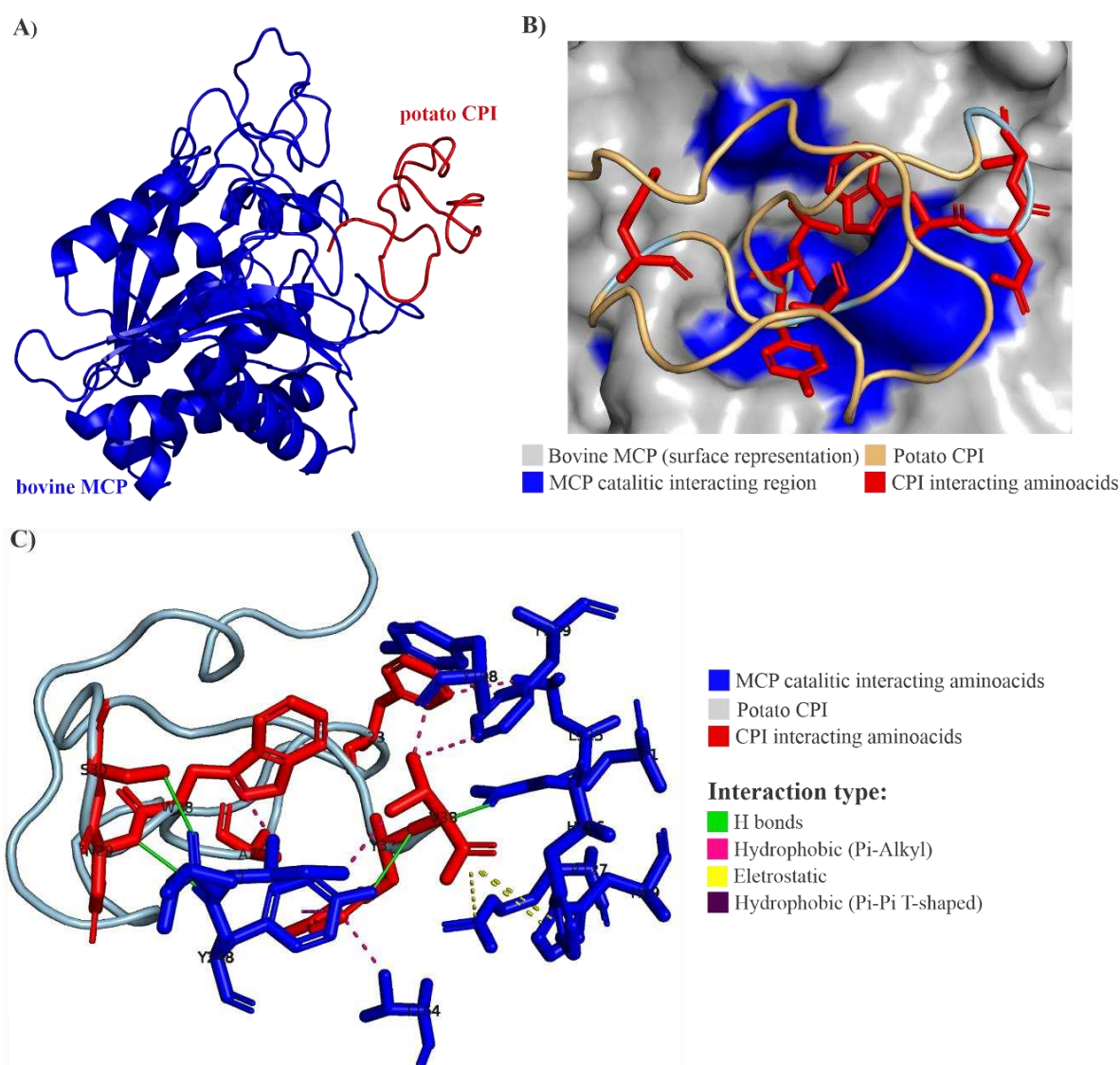
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4AW10	CCCCCECCCCCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCCEEE ECCCCEEEEEEEE
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4C6V3	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHCCCCC
<i>Solanum palustre</i>	Q949A1	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCEE EEEECC
<i>Solanum tuberosum</i>	P01075	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCCCCC CCCCCCCCC
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A6J5	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCC EEEECC
<i>Solanum tuberosum</i>	M1D117	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHHCCCCCCCCCCC CCCC
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A257**	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCC
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A255	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHHCCCHHHHHHCC
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A258	CCCCCCCCCCCCCCCCCEECHHHHHCCCCCHHCC
<i>Solanum tuberosum</i>	M1C2I1	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCEE EEEECEEEEEEECC
<i>Solanum tuberosum</i>	M1ACN3	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHCCCCC
<i>Solanum tuberosum</i>	M1ACN4	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHCCCC
<i>Solanum tuberosum</i>	O24639	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCC EEEECC
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A6J6	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCC EEEECC
<i>Solanum tuberosum</i>	M0ZJ50	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCC EEEECC
<i>Solanum tuberosum</i>	Q3S486	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCC EEEECC
<i>Solanum tuberosum</i>	O24372	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCC EEEECC
<i>Solanum tuberosum</i>	O24373	CCCCCCCCCCCCCCCCCEECHHCCCCCCCCCEE EEEECC
<i>Solanum tuberosum</i>	Q948Z8	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCC CCEEC
<i>Solanum tuberosum</i>	M1D4V9	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCC CCEEC
<i>Solanum tuberosum</i>	Q3S480	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCC CCEEC
<i>Solanum tuberosum</i>	Q41432	CCCCCCCCCCCCCCCCCEECHHCCCCCCCCCEE EEEECC
<i>Solanum tuberosum</i>	A0A097H167	CCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCC CCEEC

*H, E, and C represent respectively α -helix, β -strand and coil structure patterns.

**Nontoxic CPIs are marked in gray color.

The secondary structure patterns observed in *Solanaceae* CPIs involve the presence of β -strands located in the middle of sequences in nearly all analyzed peptides. Additionally, α -helices consistently follow β -sheets, while coil structures are present in all CPIs (**C1 Table 2**). The secondary structure characteristics and patterns are conserved within the *Nicotiana* and *Capsicum* genera but vary across different genera. Specifically, *Capsicum* CPIs typically contain a single small β -strand in the middle of sequences, while *Nicotiana* CPIs exhibit the same β -strand as *Capsicum*, followed by an α -helix. On the other hand, *Solanum* CPIs show varying secondary structure motifs within the genus and also among different species. Potato and tomato

and more recently on *Aedes aegypti* metalloprotease B (MCPB) (Gavor et al., 2021) (**C1 Figure 7**). The catalytic zinc-binding site of metalloproteases is formed through the interaction of three nitrogen atoms from histidine residues and an oxygen atom from glutamate or aspartate. Within this site, specific residues are essential for catalysis and substrate binding, and they are grouped into five subsites: S1', S1, S2, S3, and S4. The S1' subsite, composed of N144, R145, Y248, and Xaa255, is highly conserved among the M14 family of metalloproteases and plays a crucial role in fixing and neutralizing the carboxyl group of the substrate. The S1, S2, S3, and S4 subsites, involving residues such as R127, L/I 247, E270, R71, D142, S197, Y198, S199, F279, E122, R124, and L128, contribute to substrate binding and catalysis (Auld, 2013).



C1 Figure 7. Potato CPI mechanism of action. **(A)** Three-dimensional structure of potato CPI complex with bovine (*Bos taurus*) metalloprotease A (MCPA) (PDB code 4CPA). CPI is shown in red and MCPA in blue. **(B)** Interaction anchoring region of potato CPI in bovine MCPA. CPA catalytic region is destacted in blue and CPI interacting amino acids in red. **(C)** Interactions between catalytic site of

MCPA and amino acids of potato CPI generated by PLIP software. The 4CPA PDB structure was determined by X-ray crystallography technique (Rees and Lipscomb, 1982).

C1 Table 3. Mainly interactions involved in potato CPI inhibition mechanism in bovine MCP.

Interaction	Distance (Å)	Types	From	To
MCP:ARG127:NH1 - ICP:VAL38:OXT	4.27	Electrostatic - Attractive Charge	Positive	Negative
MCP:ARG127:NH2 - ICP:VAL38:O	5.42	Electrostatic - Attractive Charge	Positive	Negative
MCP:ARG145:NH1 - ICP:VAL38:OXT	4.70	Electrostatic - Attractive Charge	Positive	Negative
MCP:ARG71:NH1 - ICP:TYR37:O	2.87	Conventional Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
MCP:TYR248:OH - ICP:VAL38:OXT	2.95	Conventional Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
ICP:ASN29:N - MCP:ILE247:O	2.85	Conventional Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
ICP:VAL38:N - MCP:TYR248:OH	3.02	Conventional Hydrogen Bond	H-Donor	H-Acceptor
MCP:TYR248 - ICP:TYR37	5.09	Hydrophobic - Pi-Pi T-shaped	Pi-Orbitals	Pi-Orbitals
MCP:TYR198 - ICP:VAL38	5.39	Hydrophobic - Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl
MCP:TYR248 - ICP:ALA26	4.25	Hydrophobic - Pi-Alkyl	Pi-Orbitals	Alkyl

The interaction between PCI and bovine MCPA reveals a complex network of interactions. The C-terminal amino acids of PCI engage in multiple interactions with the catalytic site amino acids of MCPA (Marino-Buslje et al., 2000) (**C1 Figure 7A,B**). These interactions include electrostatic, hydrogen bond, hydrophobic π - π T-shaped, and T π -alkyl interactions. Notably, the C-terminal residues of PCI, such as V38, form interactions with MCPA residues in subsites S1', S1, and S2. Additionally, interactions involving PCI residues Y37, N29, and A26 with MCPA subsites S1', S1, and S2 contribute to the stability and specificity of the complex (**C1 Figure 7C, C1 Table 3**). Understanding these intrinsic interactions between PCI and metalloproteases provides valuable insights into the inhibition mechanism and the precise binding modes involved. This knowledge enhances the understanding of how plant CPIs effectively inhibit the activity of target metalloproteases and guides the design of more potent and specific inhibitors. Such insights hold promise for the development of novel therapeutic strategies targeting metalloprotease-related diseases and pathogen infections.

3.5. CPIs' potencial as antimicrobial and defense agents

C1 Table 4. *Solanaceae* CPIs antimicrobial potential.

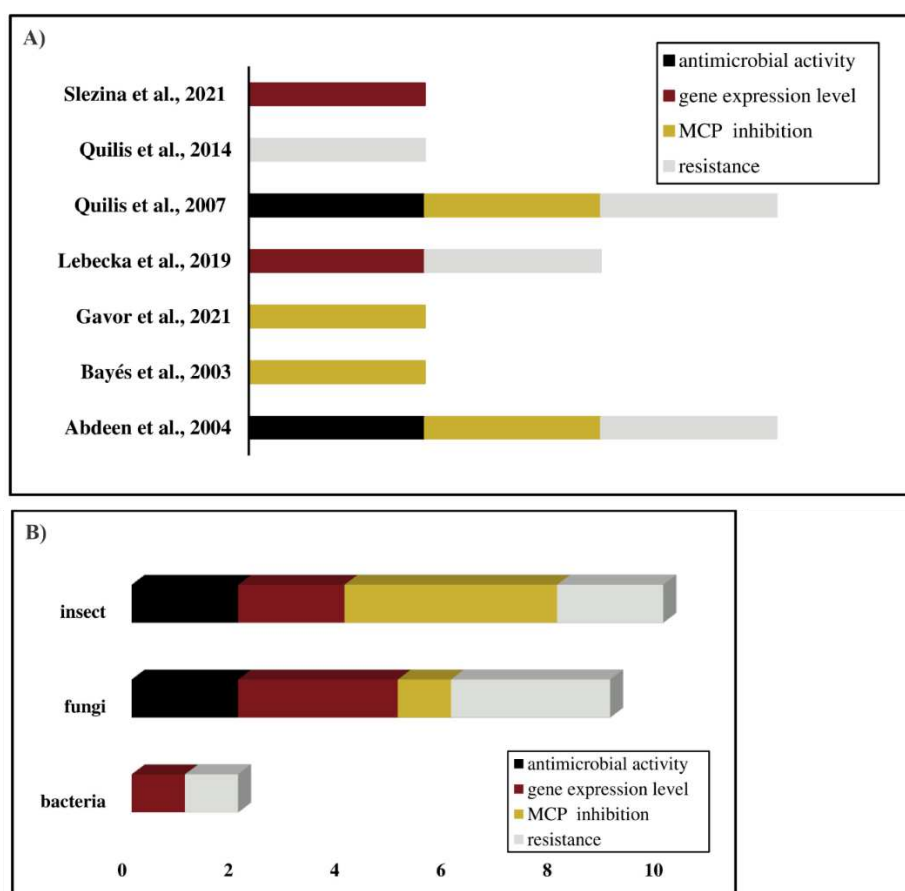
Species	Code	iAMPred - antimicrobial action*			APD3 - AMP prediction	
		ab	av	af	hidrofobicity (% / score)	binding potential

<i>Capsicum annuum</i>	KAF36196291	0.97	0.64	0.84	31% / 4.11	1.85 Kcal/mol
<i>Capsicum chinense</i>	A0A2G3BXM 1	0.97	0.64	0.84	31% / 4.11	1.85 Kcal/mol
<i>Hyoscyamus niger</i>	Q9SXP0	0.85	0.80	0.48	42% / 2.33	0.96 Kcal/mol
<i>Nicotiana attenuata</i>	OIT383771	0.87	0.69	0.67	41% / 7.34	1.21 Kcal/mol
<i>Nicotiana sylvestris</i>	A0A1U7VZY9	0.88	0.48	0.79	39% / 5.62	1.40 Kcal/mol
<i>Nicotiana tabacum</i>	E3W9P4	0.95	0.72	0.91	39% / 6.68	1.66 Kcal/mol
<i>Nicotiana tabacum</i>	E3W9P5	0.88	0.48	0.79	39% / 5.62	1.40 Kcal/mol
<i>Solanum chacoense</i>	A0A0V0GVX7	0.98	0.91	0.96	39% / 1.05	0.88 Kcal/mol
<i>Solanum habrochaites</i>	A0A089Q749	0.53	0.27	0.47	36% / 9.98	2.60 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BWY9	0.94	0.83	0.83	33% / 2.64	1.73 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	FSPM	0.89	0.76	0.86	36% / 5.71	1.58 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	MCPI**	0.81	0.38	0.79	43% / 3.58	1.04 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4CBJ6	0.71	0.28	0.86	36% / 8.48	2.41 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4CBJ5**	0.75	0.69	0.50	43% / 3.71	1.40 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC2	0.93	0.54	0.65	47% / 3.69	1.00 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC1	0.99	0.84	0.98	41% / 4.59	1.48 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC0	0.98	0.83	0.94	38% / 4.92	2.19 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC4	0.97	0.67	0.96	50% / 3.84	0.73 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4BFC3**	0.95	0.75	0.94	47% / 4.06	0.96 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4AW10	0.99	0.84	0.96	37% / 3.67	1.97 Kcal/mol
<i>Solanum lycopersicum</i>	K4C6V3	0.91	0.71	0.95	34% / 0.73	1.69 Kcal/mol
<i>Solanum palustre</i>	Q949A1	0.99	0.91	0.96	36% / 0.70	1.28 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	P01075	0.89	0.35	0.84	43% / 3.81	1.11 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A6J5	0.97	0.86	0.96	39% / 1.22	0.86 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	M1D117	0.69	0.30	0.78	38% / 9.96	2.75 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A257**	0.99	0.86	0.96	44% / 4.70	0.93 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A255	0.98	0.72	0.92	41% / 4.78	1.93 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A258	0.96	0.82	0.89	44% / 4.62	1.14 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	M1C2I1	0.91	0.65	0.81	40% / 6.81	1.87 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	M1ACN3	0.96	0.81	0.98	31% / 2.15	2.06 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	M1ACN4	0.95	0.92	0.96	35% / 1.47	1.76 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	O24639	0.99	0.94	0.98	39% / 0.77	0.75 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	M1A6J6	0.97	0.86	0.96	39% / 1.22	0.86 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	M0ZJ50	0.99	0.92	0.97	39% / 1.37	0.80 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	Q3S486	0.98	0.84	0.96	39% / 0.23	0.93 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	O24372	0.98	0.91	0.96	39% / 1.05	0.88 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	O24373	0.99	0.90	0.97	40% / 0.60	0.90 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	Q948Z8	0.99	0.90	0.98	34% / 2.10	0.96 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	M1D4V9	0.99	0.90	0.98	34% / 2.10	0.96 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	Q3S480	0.99	0.89	0.97	32% / 2.61	1.29 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	Q41432	0.99	0.91	0.97	39% / 0.48	0.93 Kcal/mol
<i>Solanum tuberosum</i>	A0A097H167	0.99	0.92	0.99	34% / 2.65	1.16 Kcal/mol

*The values of each type of antimicrobial action (ab-antibacterial, av-antiviral; af-antifungal) represents the probability between 0 and 1 of the sequences have antibacterial, antiviral, and/or antifungal action where 1 is the maxima probability.

**Nontoxic CPIs are marked in gray color.

The bioinformatics analysis of *Solanaceae* carboxypeptidase inhibitors (CPIs) has revealed their significant antimicrobial potential. Most CPIs were predicted to exhibit strong antimicrobial activity, particularly against bacteria, while the predicted values for antiviral and antifungal activity were relatively lower. The analysis of CPIs in the AMP database (APD 3) showed that a majority of the analyzed CPIs had high hydrophobicity ratios and demonstrated binding potential for antimicrobial action (**C1 Table 4**). The Boman Index, a measure of protein-binding potential, indicated positive values for CPIs, indicating a high likelihood of antimicrobial activity (Boman, 2003). These CPIs possess partial hydrophobicity and exhibit cationic or anionic properties, which further enhance their potential as defense agents and antimicrobial peptides (AMPs). Notably, the non-toxic CPIs from *S. lycopersicum* codes MCPI, K4CBJ5 and K4BFC3, and from *S. tuberosum* code M1A257 showed promising characteristics, making them attractive targets for the development of antimicrobial agents.



C1 Figure 8. CPIs activities against pathogens described in studies (n = 7). **(A)** CPIs activities identified per study. **(B)** CPIs activities frequency per type of pathogen. (A,B) Activities are shown in different colors: antimicrobial activity in black, gene expression level in wine color, MCP inhibition in dark yellow and resistance in light gray.

The systematic review search identified seven studies that described the activities of *Solanaceae* CPIs against pathogens. These activities encompassed the inhibition of pathogen MCPs, resistance mechanisms, CPI expression during pathogen infection, and antimicrobial effects. Some studies reported multiple types of CPI activities against different pathogens, indicating the versatility of CPIs in combating various pathogens. The predominant focus of CPI actions was directed towards fungi and insects, encompassing the four main CPI activities (**C1 Figure 8A,B**). However, three significant research gaps need to be addressed in the field of CPIs' actions against pathogens. Firstly, there is a limited number of studies available, indicating the need for more research in this area. Secondly, the existing studies tend to concentrate primarily on fungi and insects, leaving other types of pathogens underrepresented and third the studies concentrate the researches just in the potato and tomato CPIs. It is essential to encourage and support further research on CPI activities against a broader range of pathogens, including bacteria, viruses, and other types of microbes, and also to investigate CPIs from other *Solanaceae* species and their actions against pathogens.

C1 Table 5. PCI inhibition of pathogen MCPs evaluated in studies (n = 4).

Pathogen	PCI* (μM)	MCP inhibition (%)
<i>Aedes aegypti</i>	0.7	100
<i>Magnaporthe oryzae</i>	2.5	98
<i>Helicoverpa armigera</i>	5.0	100
<i>Liriomyza trifolii</i>	25.0	75

*PCI – potato carboxypeptidase inhibitor

The main finds of CPIs activities in studies were (**C1 Supplementary Table 2**) potato CPI antimicrobial activities were related to the inhibition growth of *Fusarium verticillioides* and *Magnaporthe oryzae* fungi (Quilis et al., 2007) and the mortality of *Heliothis obsoleta* insect larvae (Abdeen et al., 2005); 2) resistance potato CPI induction reduced symptoms of diseases caused by the fungus *Fusarium verticillioides* and *Magnaporthe oryzae* (Quilis et al., 2007, 2014), by the insects *Heliothis obsoleta*, *Liriomyza trifolii*, and *Chilo suppressalis* (Abdeen et al., 2005; Quilis et al., 2014), and by the bacteria *Dickeya solani* (Lebecka et al., 2019); 3) the expression of two tomato knottin-like peptides which shares identity with tomato CPI were regulated in response to *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sambucinum* fungal infestation (Slezina et al., 2021). The potato CPI inhibition against pathogens MCPs were one of the major finding

results, the peptide was able to inhibit A/B MCPs of the pathogens *Aedes aegypti*, *Magnaporthe oryzae*, *Helicoverpa armigera*, and *Liriomyza trifolii* in very low concentrations ranging between 0.7 and 25 μ M (Bayés et al., 2003; Abdeen et al., 2005; Quilis et al., 2007; Gavor et al., 2021) (**C1 Table 5**), which shows one more time the PCI potential to be used in development of biotechnological products for pathogen control and plant defense.

4. DISCUSSION

The characterization of CPI sequences within the *Solanaceae* plant family provided valuable insights about their distribution, sequence variability, conservation patterns, and a newly proposed consensus motif in this work. The CPIs were primarily identified in the *Solanum*, *Capsicum*, and *Nicotiana* genera, spanning across nine different species. Notably, potato and tomato CPI sequences exhibited the highest occurrence and showed significant sequence variability. *Solanum lycopersicum* and *Solanum tuberosum*, along with the *Solanum*, *Capsicum*, and *Nicotiana* genera, have been extensively studied due to their agricultural and nutritional importance, as well as their suitability as model organisms (Kimura and Sinha, 2008; Pombo et al., 2020; Bánfalvi et al., 2021). These plants are of significant interest in scientific research and breeding programs due to their economic value, widespread cultivation, and diverse applications in the food industry (Añibarro-Ortega et al., 2022). The identification of CPI sequences primarily in the *Solanum*, *Capsicum*, and *Nicotiana* genera aligns with the focus on these agriculturally important species. The extensive study of these genera and species provides a solid foundation for investigating the distribution, functional roles, and potential applications of CPIs within the *Solanaceae* family.

The consensus alignment of selected CPI sequences revealed a remarkable conservation of cysteine residues and their distances between C-C bonds. Amino acid chemical characteristics also exhibited conservation within the region between Cys I-VI, with distinct features observed in the interspace of C-C bonds. Furthermore, the presence of an aspartic acid residue (D) at a consistent position was detected. Similar conservation patterns to that observed in the CPI sequences, including cysteine distance patterns and position conservation, are found in pathogens related proteins and antimicrobial peptides such as cysteine-rich peptides and defensin peptides (Dias and Franco, 2015; Slezina et al., 2021; Ma et al., 2023). These peptides are known for their role in defense mechanisms and their contribution to the formation of highly stable

peptide structures. Based on the observed conservation patterns, a consensus motif of CXXXCXXXDCXXXXXCXXC was proposed as a global characterization of CPIs within the *Solanaceae* family for the first time. It is important to note that this motif suggests the presence of specific features for CPIs, as the presence of D residue in position 13, what shows a distinct characteristic that differentiate them from other protease inhibitors and cysteine rich peptides. This work provides a clearer and more concise presentation of the CPI sequences' characterization within the *Solanaceae* family, emphasizing their distribution, sequence variability, conservation patterns, and the proposed consensus motif.

The phylogeny shed light on the evolutionary relationships and diversification of CPIs within the *Solanaceae* family. The significant bootstrap values indicate that the clustering and grouping of CPIs in the phylogenetic tree are reliable indicators of their evolutionary relatedness. The close evolutionary proximity and sequence similarity observed within the *Capsicum*, *Nicotiana*, and *Solanum* genera support the idea of a common ancestry and recent diversification within these genera. This is further supported by the sequence similarities observed within *Capsicum* and *Nicotiana* species, reinforcing their evolutionary relationships. The presence of CPIs from the potato and tomato families in multiple clades of the tree suggests that these CPIs differentiated early in the evolutionary adaptation of carboxypeptidase inhibitor expression in plants. The higher genetic variability of potato and tomato may have contributed to their distinct evolutionary path within the *Solanaceae* family. The significance of potato and tomato CPIs is further emphasized by their presence across different clades, highlighting their evolutionary importance within the family. A previous study (Manara et al., 2020) constructed a phylogenetic tree involving *N. tabacum*, *S. lycopersicum*, and *S. tuberosum* CPIs, demonstrating that the more similar the CPIs are, the closer their evolutionary proximity. This finding further supports the evolutionary relationships described in this study, providing additional evidence for the relatedness and diversification of CPIs within the *Solanaceae* family.

The physico-chemical characteristics of *Solanaceae* CPIs shed light on their properties as defense agents. These CPIs typically have a molecular mass ranging between 3.5 and 6.5 kDa, exhibit variations in charge (ranging from cationic to anionic), and many of them show toxicity. These characteristics indicates their potential role in plant defense mechanisms. It is worth noting that these features are similar to antimicrobial peptides and plant pathogenesis related proteins, which are known to be

involved in plant defense. Interesting, the tomato CPI has already been implicated in responding to abiotic stress and shows increased expression levels after pathogen infection, suggesting its role as defense agent (Slezina et al., 2021; Guan et al., 2022). Further researches on *Solanaceae* CPIs and their involvement in plant defense mechanisms could provide valuable discovery for the development of strategies to control pathogens. In this field, the nontoxic CPIs are interesting targets for applications in biotechnology, as they can be used as natural molecules without causing harm to humans or the environment. Their eco-friendly nature makes them attractive candidates for the development of "green" chemical products for phytopathogen control.

The secondary standards of *Solanaceae* CPIs varies in the number of β -strands and/or α -helices along the sequences. CPIs structural features follow in some parts the elucidated NMR tridimensional structures of potato (1H20 – PDB code) (González et al., 2003) and tomato (2HLG – PDB code), as the presence of at least one β -strand in the sequence middle, which suggest that the deposited sequences can act the same way of them. In addition, some sequences follow secondary patterns of β -strands and/or α -helices appearance of other CPIs as the tick *Rhipicephalus bursa* TCI (Pantoja-Uceda et al., 2008) which possess two β -strands and one α -helice, and the leech *Hirudo medicinalis* LCI (Reverter et al., 2000) that possess three β -strands and one α -helice. These structural characteristics, along with the high sequence diversity, indicate the potential broad spectrum of action for CPIs. The presence of multiple gene copies and isoforms suggests that these CPIs can act more rapidly and efficiently, potentially resulting in a more potent defense response.

The mechanism of action of *S. tuberosum* PCI involves the multiple binding interactions with the S1', S1 and S2 catalytic subsites of *B. taurus* MCPA and englobes the hydrogen bond, electrostatic and hydrophobic interactions which form a highly stable and strong interaction of PCI and MCPA (Rees and Lipscomb, 1982). Recently, the PCI mechanism of inhibition in *Aedes aegypti* MCPB was elucidated and it similar to the MCPA inhibition. PCI interacts with *A. aegypti* MCPB by their C terminal (V38, Y37, S30i N29, and G25) residues anchoring in the catalytic site of CPB that comprise S1', S1, S2 and S3 subsites. The bind potency was almost the same as MCPA bind (Gavor et al., 2021). The *R. bursa* TCI and *Ascaris* ACI also have similar mechanisms of action for MCPs A and B (Arolas et al., 2005; Sanglas et al., 2009). These comparisons show the ability of PCI inhibits two types of MCPs and the conservation

of CPI mechanism of action despite the differences among kingdoms, what could be used to develop products with CPIs that target to inhibit carboxypeptidases that act as pathogenic virulence factors in host infection.

The *Solanaceae* CPIs demonstrate a significant antimicrobial potential, as evidenced by several characteristics. Firstly, they exhibit negative values for Boman Index binding potential, indicating a propensity to interact with microbial targets. Secondly, their hydrophobicity ratios fall within the range of 30%-50%, suggesting a favorable environment for antimicrobial activity. Furthermore, the majority of CPIs show high antimicrobial activity prediction scores ranging between 0.80 and 0.99, further supporting their effectiveness against microbial pathogens. Additionally, these CPIs exhibit variations in charge, displaying both anionic and cationic properties. Lastly, their toxicity levels contribute to their potential as defense agents. These combined attributes, including Boman Index binding potential, hydrophobicity ratios, antimicrobial activity prediction scores, charge variations, and toxicity, indicate the strong antimicrobial potential of *Solanaceae* CPIs. The main findings of literature systematic review about the activities of *Solanaceae* CPIs against pathogens corroborates the CPIs antimicrobial potential. The activities are discussed below.

Studies (n=7) have investigated the effectiveness of CPIs combating different types of pathogens, including insects, bacteria, and fungi. CPIs in the studies acted through four type of activities there was MCPs inhibition, inducible resistance, gene expression whin pathogen infection and antimicrobial activities. In *Solanum tuberosum*, PCI has shown significant resistance against insects such as *Heliothis obsoleta* and *Liriomyza trifolii*. Transgenic tomato lines expressing PCI exhibited high levels of resistance, resulting in larval death, reduced weight, and inhibition of larval development in *Heliothis obsoleta*. PCI also effectively inhibited the carboxypeptidase activity of *Liriomyza trifolii* (Abdeen et al., 2005). Similarly, PCI displayed inhibition against *Helicoverpa armigera* and *Aedes aegypti*, showing its potential as an effective insecticide (Bayés et al., 2003; Gavor et al., 2021). Moreover, studies have demonstrated the involvement of CPIs in plant defense against bacterial and fungal infections. The potato MCPI exhibited significant expression in response to *Dickeya solani* infection, indicating its defensive role against bacterial pathogens (Lebecka et al., 2019). Additionally, PCI demonstrated antifungal activity against *Fusarium verticillioides* and *Magnaporthe oryzae*. Transgenic rice plants expressing the PCI gene exhibited enhanced resistance, resulting in reduced fungal growth and disease

symptoms (Quilis et al., 2007, 2014). In *Solanum lycopersicum* (tomato), knottin-like peptides known as SIKnot1 and SIKnot2, which share sequence identity with metalloprotease inhibitors, were found to be involved in the plant defense against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sambucinum* fungi. The expression of these peptides was regulated in response to fungal infestation, suggesting their role in plant protection (Slezina et al., 2021).

5. CONCLUSION

In summary, the current study presented the characterization of *Solanaceae* CPI sequences and provided insights into their distribution, sequence variability, conservation standards, and the proposed consensus motif CXXXCXXXDCXXXXXCXXC. These patterns align with those found in pathogen-related proteins, underscoring their potential as defense agents. Phylogenetic analysis reveals evolutionary relationships and diversification within the *Solanaceae* family, particularly within the *Capsicum*, *Nicotiana*, and *Solanum* genera. The physico-chemical characteristics of *Solanaceae* CPIs, including molecular mass, charge variation, and toxicity, indicate their potential as defense agents, with similarities to antimicrobial peptides. Additionally, the secondary structures of those peptides show variations in the number of β -strands and α -helices, suggesting a broad spectrum of action. The CPI mechanism of inhibition involves multiple binding interactions with carboxypeptidase targets, further emphasizing their potential as antimicrobial agents. Studies have demonstrated the main activities of *Solanaceae* CPIs against various pathogens, including insects, bacteria, and fungi. These findings highlight their potential as effective defense agents and offer opportunities for their application in biotechnology and the development of environmentally friendly chemical products. Overall, the comprehensive bioinformatics analysis and systematic review confirmed the significant antimicrobial and defense agent potential of *Solanaceae* CPIs. The specific global motif characterization further supports their distinctiveness within the PR-6 pathogenesis related proteins as a new subclass of protease inhibitors. Given their unique properties and biological activities, we propose the establishment of a new subclass to encompass the carboxypeptidase inhibitors derived from *Solanaceae* plants. This classification would facilitate a more focused understanding and exploration of the functional roles and applications of these CPIs in plant defense mechanisms.

6. REFERENCES

- Abdeen, A., Virgós, A., Olivella, E., Villanueva, J., Avilés, X., Gabarra, R., et al. (2005). Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteínase inhibitors. *Plant Mol. Biol.* 57, 189–202. doi: 10.1007/s11103-004-6959-9.
- Adasme, M. F., Linnemann, K. L., Bolz, S. N., Kaiser, F., Salentin, S., Haupt, V. J., et al. (2021). PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Res.* 49, W530–W534. doi: 10.1093/nar/gkab294.
- Añibarro-Ortega, M., Pinela, J., Alexopoulos, A., Petropoulos, A. S., Ferreira, C. F. R. L., and Barros, L. (2022). The powerful *Solanaceae*: Food and nutraceutical applications in a sustainable world. *Adv. Food Nutr. Res.* 100, 131–172. doi: 10.1016/bs.afnr.2022.03.004
- Arolas, J. L., Popowicz, G. M., Lorenzo, J., Sommerhoff, C. P., Huber, R., Aviles, F. X., et al. (2005). The three-dimensional structures of tick carboxypeptidase inhibitor in complex with A/B carboxypeptidases reveal a novel double-headed binding mode. *J. Mol. Biol.* 350, 489–498. doi: 10.1016/j.jmb.2005.05.015.
- Aseel, D. G., Sobhy, S., Samy, M. A., Hamdy, E., Behiry, S. I., and Abdelkhalek, A. (2023). Comparative Analysis of the Expression Profiles of Pathogenesis-Related Genes in Tomato Systemically Infected with *Tobacco Mosaic* and *Cucumber Mosaic* Viruses. *Int. J. Plant Biol.* 14, 458–473. doi: 10.3390/ijpb14020035.
- Auld, D. S. (2013). “Catalytic Mechanisms for Metallopeptidases,” in *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Elsevier), 370–396. doi: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00078-8.
- Bánfalvi, Z., Barone, A., and Bryan, G. J. (2021). Editorial: Spotlight on *Solanaceae* Metabolism: Biotechnological Application. *Front. Plant Sci.* 12, 1–2. doi: 10.3389/fpls.2021.756948.
- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Agivetova, R., Ahmad, S., et al. (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49, D480–D489. doi: 10.1093/nar/gkaa1100.
- Bayés, A., Sonnenschein, A., Daura, X., Vendrell, J., Aviles, F. X., Bayes, A., et al. (2003). Procarboxypeptidase A from the insect pest *Helicoverpa armigera* and its derived enzyme: Two forms with new functional properties. *Eur. J. Biochem.* 270, 3026–3035. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03681.x.
- Berman, H., Henrick, K., Nakamura, H., and Markley, J. L. (2007). The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): Ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic Acids Res.* 35, 2006–2008. doi: 10.1093/nar/gkl971.
- Biovia, D. S. (2021). BIOVIA Discovery Studio, release 2021. San Diego: Dassault Systèmes.
- Boman, H. G. (2003). Antibacterial peptides: Basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* 254, 197–215. doi: 10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x.
- Buchan, D. W. A., and Jones, D. T. (2019). The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Res.* 47, W402–W407. doi: 10.1093/nar/gkz297.
- Chassot, C., Nawrath, C., and Métraux, J. P. (2007). Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant J.* 49, 972–980. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.03017.x.
- Christeller, J., and Laing, W. (2005). Plant Serine Proteínase Inhibitors. *Protein Pept. Lett.* 12, 439–447. doi: 10.2174/0929866054395329.

- Conti, G., Gardella, V., Vandecaveye, M. A., Gomez, C. A., Joris, G., Hauteville, C., et al. (2020). Transgenic Citrange troyer rootstocks overexpressing antimicrobial potato Snakin-1 show reduced citrus canker disease symptoms. *J. Biotechnol.* 324, 99–102. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.09.010.
- Cotabarren, J., Lufrano, D., Parisi, M. G., and Obregón, W. D. (2020). Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *Plant Sci.* 292. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.110398.
- Crooks, G., Hon, G., Chandonia, J., and Brenner, S. (2004). NCBI GenBank FTP Site\nWebLogo: a sequence logo generator. *Genome* 14, 1188–1190. doi: 10.1101/gr.849004.1.
- Datta, S. K., and Muthukrishnan, S. (1999). Pathogenesis Related Proteins in Plants. Florida: CRC Press.
- Dias, R. D. O., and Franco, O. L. (2015). Cysteine-stabilized $\alpha\beta$ defensins: From a common fold to antibacterial activity. *Peptides* 72, 64–72. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.017.
- Durrant, W. E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185–209. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J. M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., et al. (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. *FEBS Lett.* 498, 219–222. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02456-5.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., et al. (2005). The Proteomics Protocols Handbook. *Proteomics Protoc. Handb.*, 571–608. doi: 10.1385/1592598900.
- Gavor, E., Choong, Y. K., Jobichen, C., Mok, Y. K., Kini, R. M., and Sivaraman, J. (2021). Structure of *Aedes aegypti* carboxypeptidase B1-inhibitor complex uncover the disparity between mosquito and non-mosquito insect carboxypeptidase inhibition mechanism. *Protein Sci.* 30, 2445–2456. doi: 10.1002/pro.4212.
- Godbole, S. A., and Kharat, S. N. (2022). Review on Plant Protease Inhibitors as Therapeutic Molecules. *J. Plant Sci. Res.* 38, 277–288. doi: 10.32381/JPSR.2022.38.01.30.
- González, C., Neira, J. L., Ventura, S., Bronsoms, S., Rico, M., and Avilés, F. X. (2003). Structure and dynamics of the potato carboxypeptidase inhibitor by 1H and 15N NMR. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 50, 410–422. doi: 10.1002/prot.10291 and <https://doi.org/10.2210/pdb1H20/pdb>.
- Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., et al. (2021). Pravila PRISMA 2020. *Med. Flum.* 57, 444–465. doi: <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01626-4>.
- Guan, X. X., Sui, C. L., Luo, K. C., Chen, Z. F., Feng, C. Y., Dong, X. F., et al. (2022). Effects of α -Naphthylacetic Acid on Cadmium Stress and Related Factors of Tomato by Regulation of Gene Expression. *AGRONOMY-BASEL* 12. doi: 10.3390/agronomy12092141.
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., and Raghava, G. P. S. (2013). In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS One* 8, e73957. doi: 10.1371/journal.pone.0073957.
- Haq, S. K., Atif, S. M., and Khan, R. H. (2004). Protein proteínase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: Natural and engineered phytoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.* 431, 145–159. doi: 10.1016/j.abb.2004.07.022.

- Hass, G. M., and Ryan, C. A. (1981). "Carboxypeptidase inhibitor from potatoes," in *Methods in Enzymology*, 778–791. doi: 10.1016/S0076-6879(81)80060-2.
- Have, A. ten, Dekkers, E., Kay, J., Phylip, L. H., and van Kan, J. A. L. (2004). An aspartic proteínase gene family in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* contains members with novel features. *Microbiology* 150, 2475–2489. doi: 10.1099/mic.0.27058-0.
- Joshi, B. N., Sainani, M. N., Bastawade, K. B., Gupta, V. S., and Ranjekar, P. K. (1998). Cysteine protease inhibitor from pearl millet: A new class of antifungal protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 382–387. doi: 10.1006/bbrc.1998.8625.
- Kaur, A., Kaur, S., Kaur, A., Kaur Sarao, N., and Sharma, D. (2022). "Pathogenesis-Related Proteins and Their Transgenic Expression for Developing Disease-Resistant Crops: Strategies Progress and Challenges," in *Plant Breeding - New Perspectives [Working Title]* (IntechOpen), 13. doi: 10.5772/intechopen.106774.
- Kimura, S., and Sinha, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harb. Protoc.* 3. doi: 10.1101/pdb.emo105.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Landa, B. B., Cachinero-Díaz, J. M., Lemanceau, P., Jiménez-Díaz, R. M., and Alabouvette, C. (2002). Effect of fusaric acid and phytoanticipins on growth of rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.* 48, 971–985. doi: 10.1139/w02-094.
- Lebecka, R., Kistowski, M., Debski, J., Szajko, K., Murawska, Z., and Marczewski, W. (2019). Quantitative proteomic analysis of differentially expressed proteins in tubers of potato plants differing in resistance to *Dickeya solani*. *Plant Soil* 441, 317–329. doi: 10.1007/s11104-019-04125-7 WE - Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED).
- Letunic, I., and Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23, 127–128. doi: 10.1093/bioinformatics/btl529.
- Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., and Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Bot. Stud.* 62, 5. doi: 10.1186/s40529-021-00312-x.
- Logacheva, M. D., Valiejo-Roman, C. M., and Pimenov, M. G. (2008). Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. *Plant Syst. Evol.* 270, 783–791. doi: 10.1080/00837792.1905.10669550.
- Lufrano, D., Cotabarren, J., Garcia-Pardo, J., Fernandez-Alvarez, R., Tort, O., Tanco, S., et al. (2015). Biochemical characterization of a novel carboxypeptidase inhibitor from a variety of Andean potatoes. *Phytochemistry* 120, 36–45. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.09.010.
- Ma, H., Feng, Y., Cao, Q., Jia, J., Ali, M., Shah, D. et al. (2023). Evolution of antimicrobial cysteine-rich peptides in plants. Research Square [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2598984/v1> (Accessed July 08, 2023).
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., et al. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, W636–W641. doi: 10.1093/nar/gkz268.
- Manara, A., Fasani, E., Molesini, B., DalCorso, G., Pennisi, F., Pandolfini, T., et al. (2020). The tomato metallocarboxypeptidase inhibitor I, which interacts with a heavy metal-associated isoprenylated protein, is implicated in plant response to

- cadmium. *Molecules* 25. doi: 10.3390/molecules25030700.
- Marino-Buslje, C., Venhudová, G., Molina, M. A., Oliva, B., Jorba, X., Canals, F., et al. (2000). Contribution of C-tail residues of potato carboxypeptidase inhibitor to the binding to carboxypeptidase A: A mutagenesis analysis. *Eur. J. Biochem.* 267, 1502–1509. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01150.x.
- Mazurkiewicz-Pisarek, A., Baran, J., and Ciach, T. (2023). Antimicrobial Peptides: Challenging Journey to the Pharmaceutical, Biomedical, and Cosmeceutical Use. *Int. J. Mol. Sci.* 24. doi: 10.3390/ijms24109031.
- Meher, P. K., Sahu, T. K., Saini, V., and Rao, A. R. (2017). Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. *Sci. Rep.* 7, 1–12. doi: 10.1038/srep42362.
- Molesini, B., Treggiari, D., Dalbeni, A., Minuz, P., and Pandolfini, T. (2017). Plant cystine-knot peptides: pharmacological perspectives. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 83, 63–70. doi: 10.1111/bcp.12932.
- Pantoja-Uceda, D., Arolas, J. L., García, P., López-Hernández, E., Padró, D., Aviles, F. X., et al. (2008). The NMR structure and dynamics of the two-domain tick carboxypeptidase inhibitor reveal flexibility in its free form and stiffness upon binding to human carboxypeptidase B. *Biochemistry* 47, 7066–7078. doi: 10.1021/bi800403m and <https://doi.org/10.1021/bi800403m>.
- Pombo, M. A., Rosli, H. G., Fernandez-Pozo, N., and Bombarely, A. (2020). *Nicotiana benthamiana, A Popular Model for Genome Evolution and Plant–Pathogen Interactions*. Springer International Publishing doi: 10.1007/978-3-030-29493-9_14.
- Puthoff, D. P., Holzer, F. M., Perring, T. M., and Walling, L. L. (2010). Tomato pathogenesis-related protein genes are expressed in response to trialeurodes vaporariorum and bemisia tabaci biotype B feeding. *J. Chem. Ecol.* 36, 1271–1285. doi: 10.1007/s10886-010-9868-1.
- Quilis, J., López-García, B., Meynard, D., Guiderdoni, E., and San Segundo, B. (2014). Inducible expression of a fusion gene encoding two proteínase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnol. J.* 12, 367–377. doi: 10.1111/pbi.12143.
- Quilis, J., Meynard, D., Vila, L., Avilés, F. X., Guiderdoni, E., and San Segundo, B. (2007). A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnol. J.* 5, 537–553. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00264.x.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., and Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 46, D624–D632. doi: 10.1093/nar/gkx1134.
- Rees, D. C., and Lipscomb, W. N. (1982). Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 160, 475–498. doi: 10.1016/0022-2836(82)90309-6 and <https://doi.org/10.2210/pdb2HLG/pdb>.
- Reverter, D., Fernández-Catalán, C., Baumgartner, R., Pfänder, R., Huber, R., Bode, W., et al. (2000). Structure of a novel leech carboxypeptidase inhibitor determined free in solution and in complex with human carboxypeptidase A2. *Nat. Struct. Biol.* 7, 322–328. doi: 10.1038/74092 and <https://doi.org/10.2210/pdb1DTV/pdb>.
- Rodríguez-Sifuentes, L., Marszalek, J. E., Chuck-Hernández, C., and Serna-Saldívar, S. O. (2020). Legumes protease inhibitors as biopesticides and their defense

- mechanisms against biotic factors. *Int. J. Mol. Sci.* 21. doi: 10.3390/ijms21093322.
- Sanglas, L., Aviles, F. X., Huber, R., Gomis-Rüthe, F. X., and Arolas, J. L. (2009). Mammalian metallopeptidase inhibition at the defense barrier of *Ascaris* parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1743–1747. doi: 10.1073/pnas.0812623106.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M. A., Cammue, B. P. A., and De Bolle, M. F. C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 941–950. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011.
- Shukle, R. H., and Wu, L. (2003). The role of protease inhibitors and parasitoids on the population dynamics of *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: *Gelechiidae*). *Environ. Entomol.* 32, 488–498. doi: 10.1603/0046-225X-32.3.488.
- Sitjà-Arnau, M., Molina, M. A., Blanco-Aparicio, C., Ferrer-Soler, L., Lorenzo, J., Avilés, F. X., et al. (2005). Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) as an EGF blocker. *Cancer Lett.* 226, 169–184. doi: 10.1016/j.canlet.2005.01.025.
- Slezina, M. P., Istomina, E. A., Korostyleva, T. V., Kovtun, A. S., Kasianov, A. S., Konopkin, A. A., et al. (2021). Molecular insights into the role of cysteine-rich peptides in induced resistance to *Fusarium oxysporum* infection in tomato based on transcriptome profiling. *Int. J. Mol. Sci.* 22. doi: 10.3390/ijms22115741.
- Terras, F. R. G., Schoofs, H. M. E., Thevissen, K., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., et al. (1993). Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiol.* 103, 1311–1319. doi: 10.1104/pp.103.4.1311.
- Truman, W., Bennet, M. H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., and Grant, M. (2007). *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1075–1080. doi: 10.1073/pnas.0605423104.
- Uribe, M. I. C., Mendez, B. L., Vicinay, F. J. C., and Barbero, J. J. (2008). NMR solution structure of a new tomato peptide: Fruit-specific protein. To be published. doi: <https://doi.org/10.2210/pdb2-HLG/pdb>.
- Urwin, P. E., Lilley, C. J., McPherson, M. J., and Atkinson, H. J. (1997). Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant J.* 12, 455–461. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.12020455.x.
- Wang, G., Li, X., and Wang, Z. (2016). APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 44, D1087–D1093. doi: 10.1093/nar/gkv1278.

Capítulo 2 – ICP-SMEL: Um novo peptídeo de *Solanum melongena* 'Florida Market' caracterizado como inibidor de carboxipeptidase antimicrobiano e nematicida

Esse capítulo é um manuscrito em desenvolvimento intitulado “**ICP-SMEL: a novel antimicrobial and nematicidal peptide from *Solanum melongena* 'Florida Market' characterized as an carboxypeptidase inhibitor**”, em que Geniana da Silva Gomes, Hebréia Oliveira Almeida-Souza e Victor Dose Lage Almeida dividem a coautoria. O artigo será submetido para publicação na revista. “**Plant Physiology and Biochemistry**”. O texto do capítulo encontra-se em português. As figuras, legendas, tabelas, citações e referências estão formatadas de acordo com as exigências da revista na qual o artigo será submetido para publicação, em inglês.

O capítulo compreende a junção de resultados de três trabalhos desenvolvidos nos Laboratórios de Proteômica e Bioquímica de Proteínas, do CCBII e BIOAGRO/UFV, sob a orientação da professora Maria Cristina Baracat-Pereira. Os trabalhos envolvidos são: a Dissertação de Hebréia O. Almeida-Souza (ALMEIDA, 2007), a Monografia de Victor D. L. Almeida (ALMEIDA, 2016) e a Tese de Geniana S. Gomes (este documento).

RESUMO

As solanáceas são ricas em peptídeos antimicrobianos, sendo uma fonte promissora para a prospecção de novas moléculas com vistas a desenvolver estratégias sustentáveis no controle de fitopatógenos, como exemplo, a espécie *Solanum melongena* em que extratos peptídicos demonstraram potente ação antimicrobiana. Nesse contexto, este estudo objetivou identificar e caracterizar um novo peptídeo purificado de extratos antimicrobianos de folhas de *S. melongena* 'Florida Market'. Para o isolamento do peptídeo foi feita extração de folhas de berinjela, fracionamento do extrato por aquecimento seletivo, precipitação por sulfato de amônio e ultrafiltração, purificação por cromatografias de troca iônica ou exclusão molecular, seguindo-se fase reversa em HPLC. As frações obtidas foram avaliadas por SDS-Tricina-PAGE. A identificação do peptídeo foi realizada por espectrometria de massas LC-MS/MS e sequenciamento automático de Edman. O peptídeo foi caracterizado por análises de bioinformática de conservação, filogenia, modelagem tridimensional da estrutura e dinâmica molecular. Os extratos peptídicos purificados Pool1 e PC1 foram testados contra as bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, e contra o nematoide *Meloidogyne incognita*. O peptídeo denominado ICP-SMEL, com massa de 4.156 Da, foi caracterizado como inibidor de carboxipeptidase, apresentando alto potencial antimicrobiano e estrutura estável. Os extratos peptídicos de berinjela mostraram potente ação antimicrobiana contra os três patógenos testados. Esses resultados enfatizam a relevância da berinjela como uma fonte valiosa de novos AMPs, abrindo perspectivas promissoras para o controle de fitopatógenos. A caracterização do ICP-SMEL reforça ainda mais o potencial dos inibidores de carboxipeptidases no desenvolvimento de agroquímicos seguros e ambientalmente benignos.

Palavras-chave: Peptídeo antimicrobiano. *Solanum melongena*. ICP-SMEL. Inibidor de carboxipeptidase.

1. INTRODUÇÃO

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa dinâmicos contra patógenos, fundamentais para sua sobrevivência e saúde (Chowdhary and Tank, 2023). Dentre esses mecanismos, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm despertado interesse crescente como promissores alvos moleculares em pesquisas voltadas para alternativas sustentáveis no desenvolvimento de defensivos agrícolas (Zhang et al., 2023). Com o aumento do impacto ambiental dos agroquímicos atuais, há uma busca urgente por moléculas seguras e naturais, como os AMPs presentes nas plantas, tornando-se essas moléculas uma prioridade relevante na pesquisa de controle de fitopatógenos (Ormancey et al., 2023; Zhang et al., 2023).

As solanáceas são reconhecidas como uma rica fonte de AMPs entre as famílias de plantas, desempenhando papel importante na proteção contra patógenos. Os gêneros *Solanum*, *Capsicum* e *Nicotiana* contêm uma variedade de AMPs isolados, descritos também como proteínas relacionadas a patogênese de plantas, incluindo defensinas, inibidores de protease, lectinas, heveínas, serpentinas e peptídeos similares a tioninas e a vicilinas (Afroz et al., 2020; García-Olmedo et al., 2001; Kaur et al., 2022; Sels et al., 2008). As defensinas presentes em diferentes espécies de *Capsicum* e *Nicotiana* demonstraram atividade contra bactérias e fungos, exibindo potencial no controle de patógenos (Afroz et al., 2020; Oliveira et al., 2022). Defensinas CaDef_{2.1} e CaDef_{2.2} isoladas de *C. annum* mostraram capacidade de permeabilizar membranas fúngicas, induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e reduzir a viabilidade de células de diferentes espécies de *Candida* (Gebara et al., 2020). Em *Nicotiana*, as defensinas foram associadas à inibição da germinação e crescimento de hifas de diferentes fungos (Dracatos et al., 2016, 2014; Lay et al., 2003).

No gênero *Solanum*, os inibidores de protease (IPs) têm se destacado como moléculas relevantes com ação contra bactérias, fungos e insetos. Em *Solanum tuberosum*, um inibidor de serino protease demonstrou atividade contra diferentes fungos, um inibidor de tripsina apresentou atividade contra as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis*, e também contra o fungo *Candida albicans* (Afroz et al., 2020; Kim et al., 2005; Park et al., 2005). Além disso, um inibidor de carboxipeptidase de *S. tuberosum* também exibiu atividade antifúngica contra os fungos *Fusarium verticillioides* e *Magnaporthe oryzae* e induziu

resistência em plantas contra os insetos *Heliothis obsoleta*, *Liriomyza trifolii* e *Chilo suppressalis* (Abdeen et al., 2005; Quilis et al., 2014, 2007).

Além das solanáceas, proteases de fitopatógenos também são interessantes alvos de estudo o para o desenvolvimento de novos pesticidas, visto que desempenham um papel crucial na infecção das planta.(Chandan et al., 2022; Mosolov and Valueva, 2006). Portanto, investigar inibidores de protease, como os de *Solanum*, e as proteases como alvos de pesquisa é interessante para o desenvolvimento de estratégias mais sustentáveis e eficazes no controle de fitopatógenos.

Nesse contexto, esse trabalho objetivou identificar e caracterizar um peptídeo de um extrato antimicrobiano de folhas de *Solanum melongena* 'Florida Market', baseado em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa que demonstrou alta atividade antimicrobiana de extratos de *S. melongena* (berinjela) enriquecidos com um peptídeo de baixa massa molecular (Almeida et al., 2008, 2007).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

O cultivo experimental de plantas de berinjela (*Solanum melongena*) da variedade Florida Market foi conduzido utilizando um sistema hidropônico desenvolvido pelo Prof. Paulo Roberto Gomes Pereira, do Departamento de Fitotecnia (DFT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As plantas receberam uma solução nutritiva abrangente durante todo o período de cultivo. As sementes utilizadas neste experimento foram provenientes do Banco de Germoplasma Vegetal, também localizado na UFV, e foram doadas pelo Prof. Derly José Henriques da Silva (Departamento de Fitotecnia). As plantas foram cuidadosamente irrigadas duas vezes ao dia para garantir níveis ótimos de umidade. Após um período de crescimento aproximado de 60 dias, folhas completamente desenvolvidas de berinjela foram coletadas sistematicamente para extração subsequente de peptídeos.

2.2. Microrganismos

As bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* (gram-negativa) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (gram-positiva) foram fornecidas pelo Prof. Reginaldo da Silva Romeiro, do Departamento de Fitopatologia da UFV, responsável pelo Banco de Fitopatógenos no Laboratório de Bacteriologia e Controle

Biológico. Culturas estoque de *R. solanacearum* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* foram preparadas em meio líquido (meio LB) contendo 50% (v/v) de glicerol e armazenadas a -80 °C. Para os experimentos, as bactérias foram subcultivadas em meio líquido e cultivadas até atingirem uma densidade ótica a 560 nm (A560) de 1,0-1,2.

Meloidogyne incognita, um nematoide fitoparasita, foi fornecido pelo Prof. Leandro Grassi de Freitas, do Departamento de Fitopatologia da UFV. Os ovos de *M. incognita* foram obtidos de plantas de tomate cultivar Santa Cruz 'Kada'. Os ovos foram extraídos seguindo a metodologia proposta por Hussey e Barker (1973). Para obter juvenis de segundo estágio, os ovos foram colocados em funis de Baermann (Baermann, 1917) e incubados em uma câmara de crescimento a 28 °C.

2.3. Extração de Peptídeos

Inicialmente, o material vegetal foi pulverizado utilizando nitrogênio líquido e em seguida macerado em uma proporção de 1:4 (p/v) com Tris-HCl 0,1 M contendo 10 mM de EDTA, 1 mM de benzamidina, 1 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) e 2 mM de ureia. A mistura resultante foi homogeneizada e submetida à centrifugação a 20.300 x g e 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi fracionado pela adição de 35% de sulfato de amônio saturado, seguido de incubação a 4 °C por 2 horas. Posteriormente, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante resultante foi aquecido a 80 °C por 15 minutos. Após outra etapa de centrifugação, o sobrenadante foi dialisado em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,0, utilizando uma membrana de diálise de cutoff 1.000 Da (Sigma, St Louis, MO, EUA). A solução dialisada foi concentrada por ultrafiltração em membrana de 1.000 Da em equipamento tipo AMICON/MILLIPORE, e referida como Extrato Aquoso (AE) (adaptado de Almeida et al., 2008).

2.4. Cromatografia de troca iônica

O Extrato Aquoso (AE) obtido foi posteriormente purificado por cromatografia de troca catiônica utilizando uma coluna Q-Sepharose (36 mL) em um sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) (BioRad). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl para estabelecer linha de base. A eluição dos peptídeos alvo foi alcançada utilizando a mesma solução suplementada com 1 M de NaCl com fluxo de 1 mL/min. As frações eluídas foram nomeadas como pool catiônico (CP) e pool aniônico (AP) foram coletadas usando um coletor de frações conectado ao sistema. Durante todo o processo de cromatografia, os valores de absorbância a 210 nm e 280 nm foram

monitorados. A amostra consistiu em 7 mL de AE diálise, liofilização e reconstituição em água Milli-Q, conforme previamente informado.

2.5. Cromatografia de exclusão molecular

O Extrato Aquoso (AE) também foi paralelamente purificado utilizando cromatografia de exclusão molecular com uma coluna Sephadex-G10 com 1,6 cm de diâmetro, 26 cm de altura e 52 mL de resina. Essa etapa de purificação foi realizada em condições de baixa pressão, utilizando uma bomba peristáltica para regular a taxa de fluxo. Também serviu como etapa de dessalinização para remover impurezas. A coluna foi inicialmente equilibrada com Tris-HCl (5 mM, pH 7,0) a 0,5 mL/min. Durante a eluição, frações de 1,3 mL foram manualmente coletadas em microtubos, que analisadas em comprimentos de onda de 214 nm e 280 nm para confirmar a presença de peptídeos. As frações 51 e 53 do Pool 1, nomeadas como pool da cromatografia de exclusão molecular (PMEC), foram selecionadas para separação por cromatografia de fase reversa.

2.6. Eletroforese em gel Tricina – SDS-Tricina-PAGE

A avaliação do enriquecimento de peptídeos durante o processo de purificação foi realizada por meio da detecção das massas moleculares dentro da faixa de peptídeos de 2 a 14 kDa utilizando a eletroforese em gel de Tricina - SDS-PAGE (Judd, 1994). O sistema de eletroforese em gel consistiu em três géis diferentes: gel de separação (concentração total de monômero de 16,5%), gel intermediário (concentração total de monômero de 9,9%) e gel concentrador (concentração total de monômero de 5,1%), utilizando uma solução de acrilamida/bis (49,5% T e 3,0% C). O gel foi corado com Azul Brilhante de Coomassie para identificação das frações enriquecidas em peptídeos.

2.7. Cromatografia de fase reversa

A fração CP1 (catiônica 1) obtida da cromatografia de troca iônica e as frações 51 e 53 do Pool 1 (PMEC) coletadas da cromatografia de exclusão molecular foram liofilizadas e submetidas à cromatografia de fase reversa em um sistema HPLC utilizando uma coluna C18 (C18-RP 4,6 mm HPLC Shimadzu). A coluna foi equilibrada com 0,1% de TFA, e os peptídeos foram eluídos utilizando um gradiente de solvente B (80% de acetonitrila com 0,1% de TFA) (v/v) a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. Os peptídeos eluídos foram monitorados em A214 e A280. Após a liofilização, essas

frações foram utilizadas para análise por espectrometria de massas e sequenciamento de peptídeos.

2.8. Análise por espectrometria de massas

O pico 24 (RP-24) obtido da CP1 e os pico 14 (RP-14) obtido das frações 51 e 53 do Pool 1 resultantes da cromatografia de fase reversa foram analisados por espectrometria de massas. As análises foram realizadas na Instalação Central de Biomoléculas, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), MG/Brasil. A análise por espectrometria de massas, utilizando o modo de ionização por electrospray, foi conduzida em u22m sistema LC-MS-MS, especificamente em um equipamento Q-TOF da Micromass, após liofilização e diluição de peptídeos em ácido fórmico e acetonitrila.

2.9. Sequenciamento de aminoácidos

O peptídeo do pico 14 obtido do Pool 1 na cromatografia de exclusão molecular foi submetido ao sequenciamento utilizando o método de degradação automatizada de Edman em equipamento Shimadzu PPSQ-21A, após a determinação da massa molecular.

2.10. Teste antimicrobiano

A atividade inibitória da fração contendo peptídeos do Pool 1 (AEP1) proveniente da cromatografia de exclusão molecular foi avaliada contra as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* usando o teste de leitura em microplaca por espectrofotometria (560 nm) (Teixeira et al., 2006). O ensaio consistiu de 50 µL de meio LB líquido (2x), 10 µL da suspensão de células bacterianas ($A_{560} = 1,2$) em meio LB líquido (cultivadas a 28 °C) e 40 µL de AEP1 1 diluída, contendo volumes equivalentes a 0,75 (AEP1-1x) e 1,5 g (AEP1-2x) de peso fresco do material vegetal extraído. As placas foram incubadas a 28 °C e o crescimento foi monitorado em A_{560} . A inibição foi determinada comparando as curvas de crescimento na presença e ausência da amostra de AEP1. O controle positivo correspondeu ao cultivo bacteriano na ausência da amostra AEP1 e o controle negativo ao cultivo na ausência de bactérias e amostra AEP1. Os valores de IC₅₀ (concentração necessária para atingir 50% de inibição do crescimento bacteriano) e MIC (concentração mínima inibitória necessária para atingir 100% de inibição do crescimento bacteriano) foram estimados em peso fresco (g) do material

vegetal extraído (folhas). A análise estatística foi realizada utilizando o software Prism GraphPad versão 9.1.0.221, os dados foram submetidos ao teste T (não pareado, paramétrico e bi caudal), ao nível de 5% de probabilidade.

2.11. Teste nematicida

A atividade nematicida do extrato de peptídeo CP1 obtido após cromatografia de troca iônica foi avaliada contra o fitonematoide *Meloidogyne incognita*. No ensaio, placas de Petri (5 cm) foram preparadas com 1 mL de suspensão contendo uma média de 200 juvenis de *M. incognita* e a fração enriquecida em peptídeos CP1 correspondentes a 1,0 g, 2,0 g e 3,0 g de peso fresco de folhas de berinjela ou água (controle negativo). Cinco réplicas foram preparadas para cada tratamento. As placas foram incubadas a 28°C. A avaliação foi realizada por 24, 48 e 72 horas após a configuração do experimento, determinando a percentagem de juvenis móveis e imóveis. Após a avaliação de 48 horas, os juvenis em cada réplica foram lavados para retirar os extratos de peptídeos e uma incubação adicional de 24 horas foi realizada para outra avaliação da mobilidade dos juvenis. A percentagem de mortalidade foi calculada com base na proporção $[(\text{número de juvenis mortos})/(\text{número de juvenis mortos} + \text{juvenis vivos})] \times 100$. A porcentagem de recuperação do movimento dos juvenis foi avaliada para determinar a atividade nematicida ou nematostática dos extratos. A IC50 e a MIC foram estimadas em concentração de proteína (μg), peso fresco de folhas de berinjela (g) e massa molar, utilizando-se a massa do peptídeo de 4.200 Da para esse cálculo. A análise estatística foi realizada utilizando o software Prism GraphPad versão 9.1.0.221, os dados foram submetidos ao teste T (não pareado, paramétrico e bi caudal), ao nível de 5% de probabilidade.

2.12. Caracterização de sequência

Para caracterizar a sequência do peptídeo da berinjela, nomeado ICP-SMEL, obtida pelo do sequenciamento de Edman, foi realizada uma busca usando o tBLASTn no genoma de *Solanum melongena* (código GenBank GCA_000787875.1). Investigações adicionais também foram conduzidas para determinar suas propriedades funcionais. O programa BLASTp foi utilizado para buscar sequências similares no banco de dados do NCBI, bem como em outros bancos de dados de peptídeos, como AMPer (Fjell et al., 2007) e APD3 (Wang et al., 2016). Alinhamentos de sequência foram realizados usando o Clustal Omega (Madeira et al., 2019), e análises de similaridade e identidade foram conduzidas usando o MView (Madeira et

al., 2019). Além disso, o ProtParam (Gasteiger et al., 2005), o ToxinPred (Gupta et al., 2013) e o iAMPred (Meher et al., 2017) foram utilizados para prever as propriedades físico-químicas, toxicidade e potencial antimicrobiano do peptídeo da berinjela, respectivamente.

2.13. Filogenia

Para entender a relação do ICP-SMEL com outros peptídeos similares após sua caracterização de sequência, foi realizado um estudo filogenético utilizando o ICP-SMEL e outros peptídeos similares do banco de dados MEROPS (Rawlings et al., 2014), utilizando o software MEGA-X (Kumar et al., 2018). O alinhamento de sequência foi realizado usando o Clustal W. A filogenia por máxima verossimilhança foi realizada utilizando o modelo de substituição Jones-Taylor-Thornton (JTT) e o teste filogenético de bootstrap (Logacheva et al., 2008) com 1000 réplicas. A árvore gerada foi editada usando a ferramenta Interactive Tree of Life (iTOL) (Letunic e Bork, 2007).

2.14. Caracterização estrutural

A caracterização estrutural de ICP-SMEL foi realizada com modelagem da estrutura tridimensional da sequência pelo programa Alpha Fold (Kelley et al., 2015), utilizando o Cluster de computadores da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (**Script 1**). A validação do modelo predito para o peptídeo de interesse foi realizada pelos programas PyMOL para alinhamento estrutural com estruturas similares, ProSA (Wiederstein and Sippl, 2007) para avaliação da qualidade global e local do modelo, PROCHECK (Laskowski et al., 1993) para plotagem do gráfico de Ramachandran e para verificar a qualidade estereoquímica e geometria geral do modelo e PDBsum (Laskowski et al., 2018) para descrição dos tipos de estruturas secundárias encontradas no modelo predito. A estrutura 3D de ICP-SMEL foi comparada com estruturas depositadas no Protein Data Bank (PDB) de sequências similares a ele, que são referentes aos peptídeos inibidores de carboxipeptidase de *Solanum tuberosum* (código PDB 1H20) (Gonzalez et al., 2003) e *Solanum lycopersicum* (código PDB 2HLG) (Uribe et al., 2008). Para essa comparação as estruturas 1H20 e 2HLG foram submetidas aos mesmos programas de validação utilizados para o modelo predito.

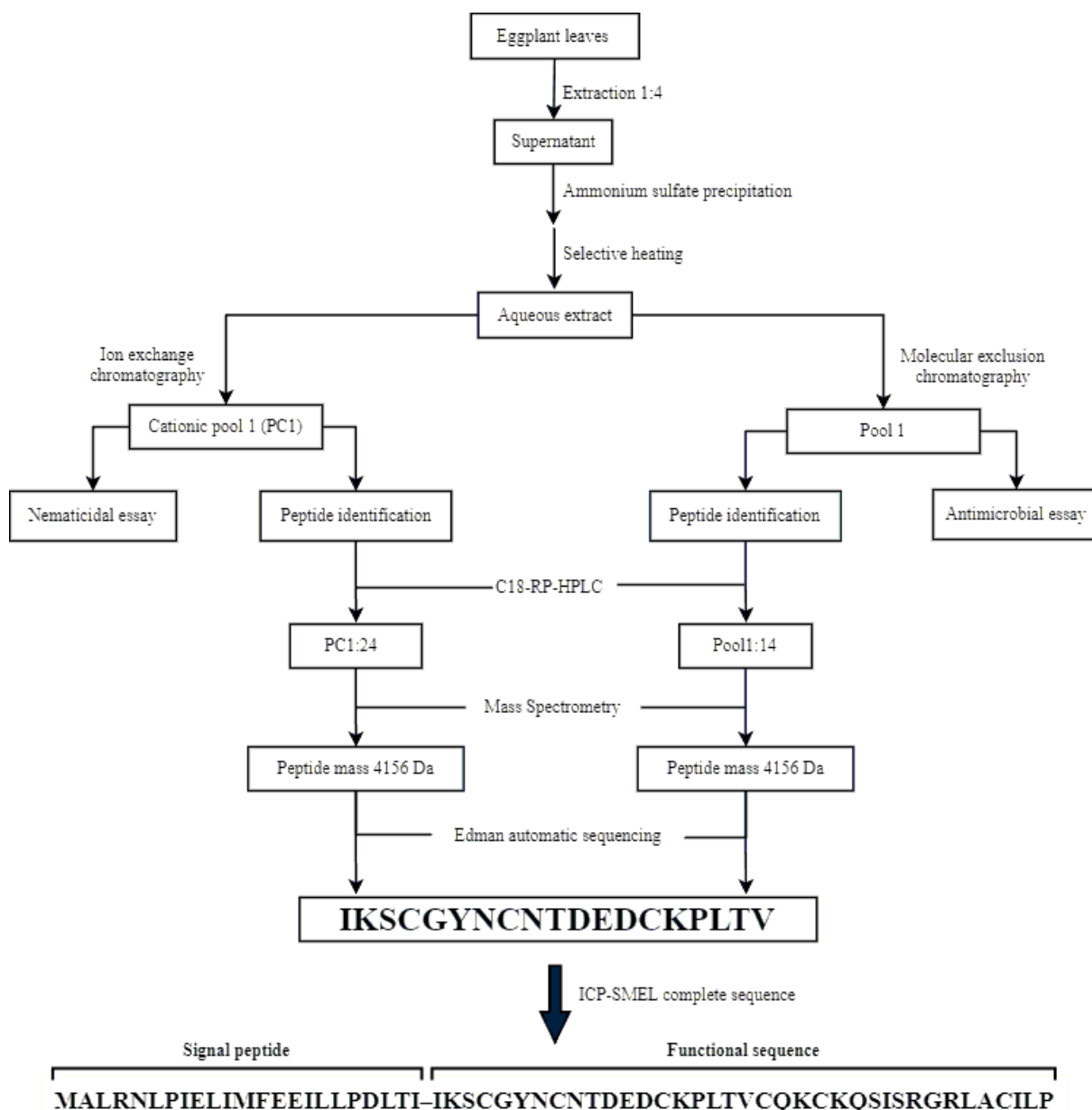
A estrutura de ICP-SMEL foi submetida a uma simulação de dinâmica molecular (MD) utilizando o GROMACS 2020.4 (Manual, 2020) com o campo de força CHARMM36 (Best et al., 2012; Huang and Mackerell, 2013). A protonação dos

resíduos foi verificada pela plataforma PDB2PQR (**Script 3**) (Jurrus et al., 2018). O modelo foi colocado no centro de uma caixa retangular equidistante 12 Å nas direções XYZ, sendo posteriormente solvatado, neutralizado e equilibrado com 0,1 M de NaCl (**Script 4**). O sistema foi submetido a três réplicas independentes de dinâmica molecular (MD) com etapas de minimização de energia, equilíbrio e produção (simulação 100ns). As simulações foram realizadas no Cluster de computadores da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) de Botucatu – especificações Cluster: Inter ® Xeon ® Gold 624R GPU @ 3.00Hz (48 processadores), 1.5 Tb de memória RAM, Placa Tesla P100 (16 Gb de memória RAM e 3584 cuda cores) – em parceria com o Professor Rafael Junqueira Borges (**Script 5 e Script 7**). Após o final de cada MD, as trajetórias foram processadas para cada réplica e, em seguida, os frames foram analisados. Cálculos de RMSD (Desvio Médio Quadrático) e RMSF (Flutuação Média Quadrática), foram realizados utilizando ferramentas incorporadas do GROMACS e os gráficos plotados utilizando o GnuPlot versão 5.4 (**Script 8 e Script 9**).

3. RESULTADOS

3.1. Extração, purificação, identificação e caracterização da sequência ICP-SMEL de folhas de berinjela

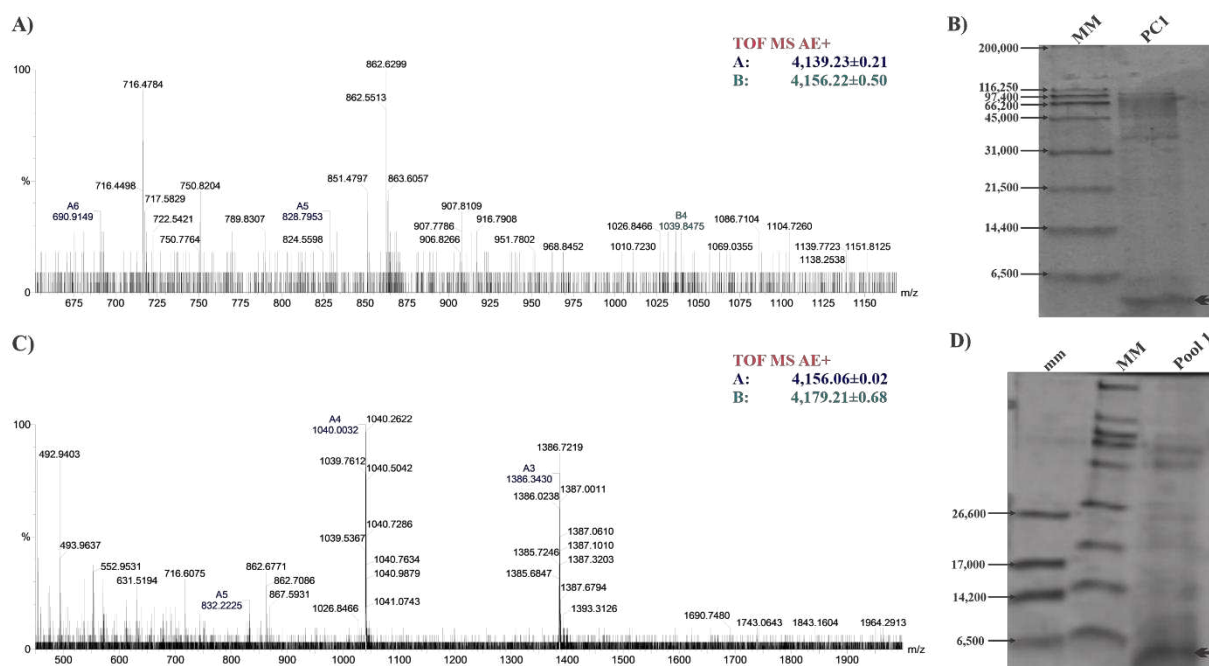
O extrato peptídico (tampão Tris-HCl 0,1 M com EDTA 10 mM, benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM e tiouréia 2 mM) de folhas totalmente expandidas de *Solanum melongena* 'Florida Market' passou por fracionamento com sulfato de amônio (35% saturação) e aquecimento seletivo (80 °C 15 min), sendo posteriormente submetido a dois processos distintos de purificação, cromatografia de exclusão molecular (CEM) ou cromatografia de troca iônica (CTI). Esses processos resultaram em frações enriquecidas de peptídeos no Pool 1 (frações 46 a 70 da CEM) e no pool catiônico 1 (PC1 – frações 51 a 53 da CTI), respectivamente. O pico 14, obtido após cromatografia de fase reversa (CFR) das frações 51 e 53 do Pool 1, e o pico 24, obtido após CFR do PC1, foram analisados por espectrometria de massas e identificaram o mesmo peptídeo, com massa de 4.156 Da, o qual foi sequenciado pelo método de sequenciamento automático de Edman. (**C2 Fig. 1**).



C2 Fig. 1. Flowchart of purification and identification of the peptide from *Solanum melongena* (eggplant). The purification by two different chromatography procedures identified the same peptide with 4,156 Da, which was sequenced by degradation method revealing a peptide with 19 amino acids residues. After confirmation by genome-search a complete sequence of 59 residues long was obtained. The first 22 residues of complete sequence belong to a signal peptide and the remaining 37 residues belong to the functional peptide, which is called ICP-SMEL.

Na análise de espectrometria de massas das frações do extrato peptídico de folhas de *S. melongena*, correspondentes aos picos 14 da CEM (**C2 Fig. 2A**) e 24 da CTI (**C2 Fig. 2C**) foram observados espectros de massa com padrões nítidos de massa/carga, revelando moléculas com massas moleculares de 4.139,23 Da e 4.156,22 Da para o pico 14, e massas moleculares de 4.156,06 Da e 4.179,21 Da para o pico 24. Esses resultados confirmam a identificação do mesmo peptídeo e ressaltam a eficácia de duas metodologias distintas de purificação para este peptídeo. SDS-

Tricina-PAGE das frações das duas purificações (C2 Fig. 2 B,D) revelaram bandas de peptídeos de massas moleculares inferiores a 6500 Da, o que está de acordo com os resultados dos espectros de massas. Essa concordância entre os resultados da espectrometria de massas e da SDS-Tricina-PAGE confirma de maneira adicional a obtenção de um peptídeo de massas similares pelos dois métodos de purificação.

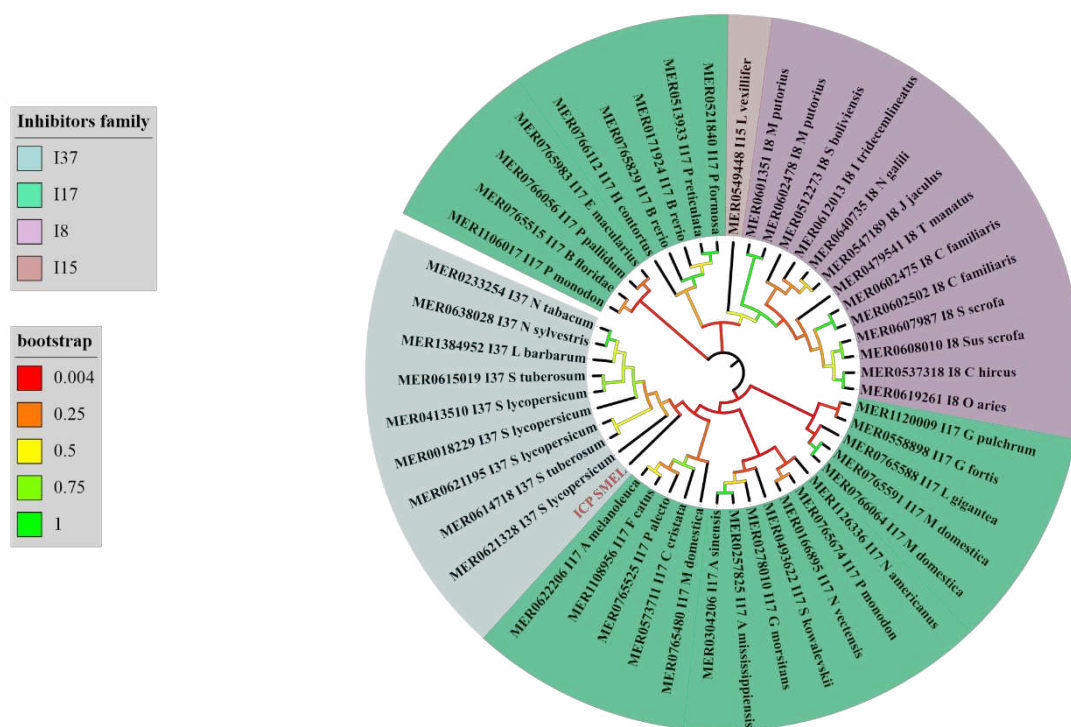


C2 Fig. 2. Mass spectrometry and electrophoresis of the peptide from *Solanum melongena* (eggplant) leaves. (A) Mass spectrum of the peak 24 obtained after reverse phase chromatography of the cationic pool 1 (PC1), which was obtained from an ion exchange chromatography from eggplant leaves aqueous extract (AE) (B) Three-phase SDS-Tricine-PAGE of PC1. (C) Mass spectrum of the peak 14 obtained after reverse phase chromatography of the fractions 51 and 53 from the pool 1, which was obtained after AE molecular exclusion chromatography. (D) Three-phase SDS-Tricine-PAGE of the pool 1 fraction 52. MM: broad range molecular weight marker; mm: low range molecular weight marker. Arrows point to the most intense bands with low mass peptides (<6,500 Da) in both gels.

O sequenciamento automático de Edman para o pico 14 do pool 1, resultou na identificação da sequência IKSCGYNCNTDEDCKPLTV com 19 resíduos de aminoácidos. A pesquisa em banco de dados de peptídeos e os alinhamentos múltiplos entre as sequências de maior similaridade encontradas, resultaram na proposta de uma sequência IKSCGYNCNTDEDCKPLTVCQKCKQSSIRG, com 30 resíduos de aminoácidos. Após busca no genoma de berinjela por uma sequência gênica correspondente, a sequência final do peptídeo foi determinada, resultando na sequência funcional IKSCGYNCNTDEDCKPLTVCQKCKQSSIRGRLACILP, com 37 resíduos de aminoácidos, que foi então denominado ICP-SMEL (C2 Fig. 1, C2 Supplementary Fig. 1).

A análise filogenética de ICP-SMEL (**C2 Fig. 3**) com peptídeos similares do banco de dados do MEROPs revelou uma proximidade evolutiva e similaridade com a família I37 de inibidores de proteases. Essa família de inibidores inclui peptídeos semelhantes ao inibidor de carboxipeptidase de batata (PCI) (*Solanum tuberosum*), e engloba sequências apenas de plantas e também só de espécies de solanáceas. Esses peptídeos têm a função de inibir carboxipeptidases da subfamília A/B pertencentes à família M14 de metaloproteases (Marino-Buslje et al., 2000; Rees and Lipscomb, 1982). Além disso, o ICP-SMEL apresenta uma relação evolutiva mais distante com as famílias de inibidores I17, I8 e I15, que englobam inibidores de serino proteases pertencentes à família S1 (Bernard and Peanasky, 1993; Rester et al., 1999; Tsunemi et al., 1993). A maior proximidade do ICP-SMEL com a família I37 sugere que esse peptídeo possa pertencer a essa família e atuar como um inibidor de carboxipeptidase (ICP), o que indica o potencial do ICP-SMEL como um importante regulador de atividades proteolíticas.

O alinhamento da sequência de ICP-SMEL com o clado filogenético das sequências de inibidores de carboxipeptidases da família I37 (**C2 Fig. 4A**) revela uma alta conservação de sequência entre o peptídeo de berinjela e os peptídeos alinhados. O consenso de 70 a 100% revela um padrão conservado de tipos de aminoácidos na região entre as cisteínas C1 e C5, onde a posição de 5 das 6 cisteínas presentes também é mantida conservada para a sequência de ICP-SMEL. Essa característica é considerada uma marca distintiva e conservada nessa classe de inibidores (Cotabarren et al., 2020). Apenas a região C-terminal apresenta alguma variação entre as sequências, mas é possível observar que sempre existe a presença de aminoácidos com características mais hidrofóbicas, o que também é compartilhado com a sequência de ICP-SMEL. O clado da família I37 é composto exclusivamente por ICPs de espécies de solanáceas. Esse fato, juntamente com a alta similaridade entre ICP-SMEL e essas sequências, fornece evidências sólidas de que o peptídeo de berinjela atua como um inibidor de carboxipeptidase.



C2 Fig. 3. Phylogeny of ICP-SMEL with others similar protease inhibitors from MEROPS database. Maximum likelihood phylogenetic tree was constructed by MEGA 11 software using the bootstrap phylogenetic test. The tree shows the phylogenetic relationships of ICP-SMEL with others similar protease inhibitors from MEROPS database. The tree clades are colored by protease inhibitor families according to MEROPS and Bootstrap variation is showed in different colors.

A sequência de ICP-SMEL apresenta várias características estruturais distintas, que incluem três ligações dissulfeto conservadas (C4-C20; C8-C23; C14-C34), uma α -hélice na região dos aminoácidos 11 a 14, duas folhas β nas posições dos resíduos de aminoácidos 22 a 25 e 32 a 35, além do padrão de volta em β entre essas folhas, conforme demonstrado nos padrões de estrutura secundária (**C2 Fig. 4B**). Em relação às características físico-químicas analisadas por ferramentas de bioinformática (**C2 Supplementary Table 1**), ICP-SMEL é classificado como um peptídeo catiônico, exibindo carga positiva 3^+ e ponto isoelétrico de 8,65. Com uma massa molecular de 4.089,81 Da, o peptídeo também é considerado tóxico e parcialmente hidrofóbico. Essas propriedades combinadas indicam alto potencial antimicrobiano, o que sugere atividade antibacteriana e antifúngica promissora, conforme predito pelo programa iAMPred.

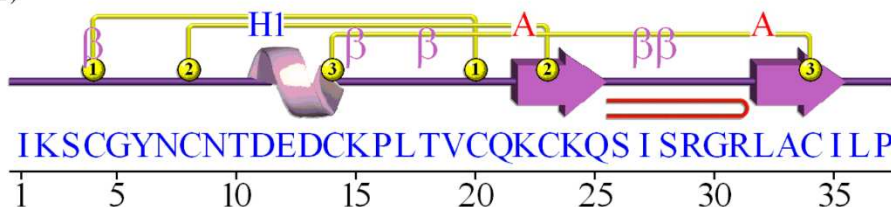
A)

Reference sequence (1): ICP_SMEL
 Identities normalised by aligned length.
 Colored by: consensus/70%

	cov	pid	1 [. . . .] 43
1 ICP_SMEL	100.0%	100.0%	----IKSCGYNCNTDEDCK-PLTVCQKCKQSI SR-GRLACILP
2 MER0018229_I37_S_lycopersicum	89.2%	25.6%	-QQYDPVCHKPCSTQDDCSGG-TFCQACWRFAGTCGPYVG---
3 MER0233254_I37_N_tabacum	89.2%	28.2%	-EQYDATCGKPCNTRDDCSKG-WLCSECYNFRKTCGPLIG---
4 MER0638028_I37_N_sylvestris	89.2%	27.5%	QEYDATCGKPCNTRDDCSSG-WLCSECYNFSKTCGPLVG---
5 MER0615019_I37_S_tuberosum	89.2%	25.0%	QEDQDPICGKPCCTHDDCSDA-SFCQACWNRQTGPFVQ---
6 MER0413510_I37_S_lycopersicum	89.2%	25.0%	QEDQDPVCGKPCCTHDDCSEA-WLCQACWNRQTGPFVQ---
7 MER1384952_I37_L_barbarum	86.5%	34.3%	----DPTCGKPCNTMDDCSNG-WFCQACWNSRKTGPFVQ---
8 MER0621328_I37_S_lycopersicum	56.8%	38.1%	-----LCNEPCSSNSDCI-GITLCQFC-----
9 MER0621195_I37_S_lycopersicum	54.1%	40.9%	-----CDDSCITNSDC-GGFTLCQWCW-----
10 MER0614718_I37_S_tuberosum	56.8%	45.5%	-----CSNSCKTSDDCSGGFTLCQWCW-----
consensus/100%		Ct.sCpo.pDC..s..hCp.C.....
consensus/90%		CspsCsTpsDC..u.hhCp.Ch.....
consensus/80%		CscsCsTpsDCptu.hhCqhCa.....
consensus/70%		hCuPCsTp-DCStG.hlCqtCap..tp.G.hh....

MView 1.63, Copyright © 1997-2018 Nigel P. Brown

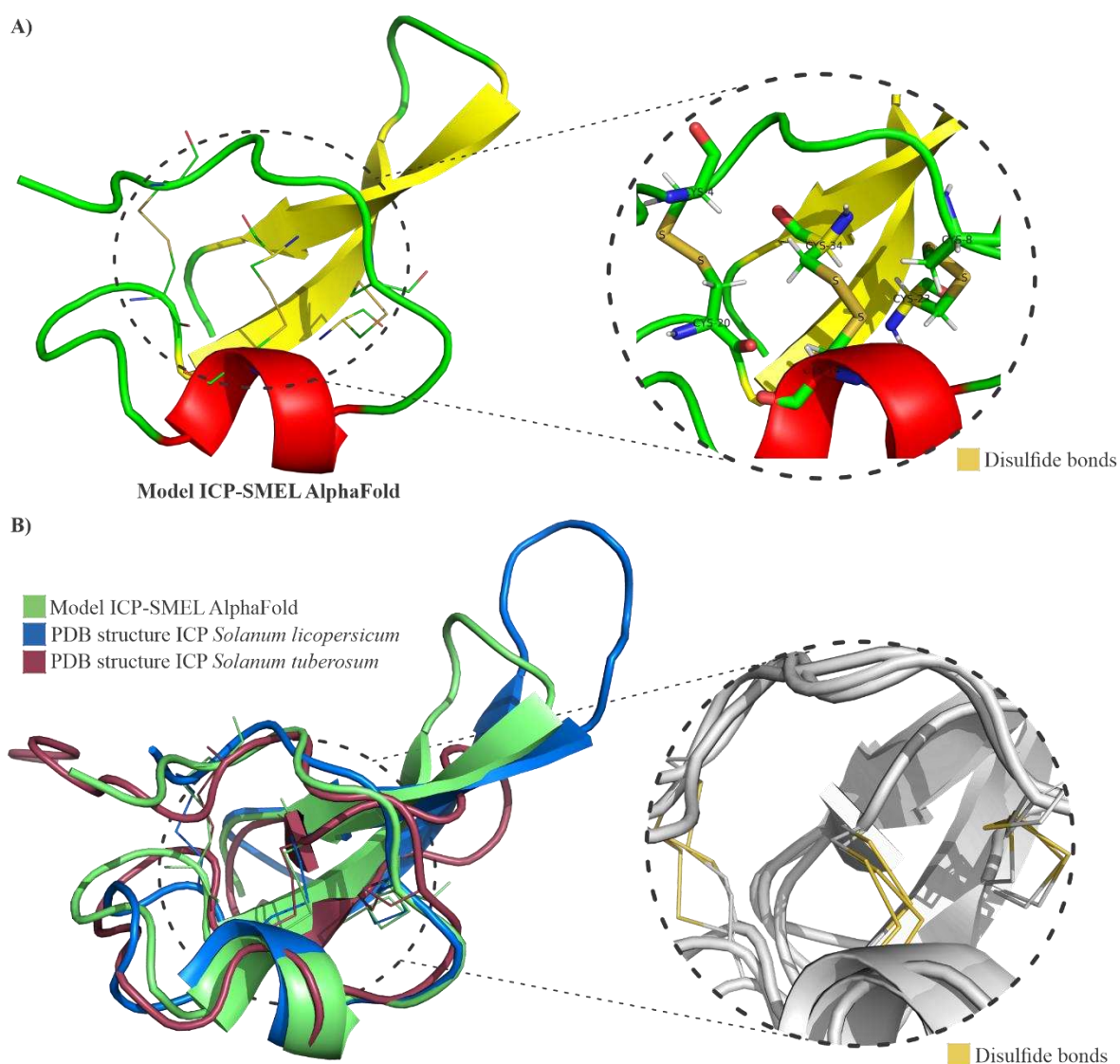
B)



C2 Fig. 4. Alignment of ICP SMEL sequence with I37 protease inhibitors family of MEROPS database and secondary structure of the peptide. (A) Alignment of ICP SMEL with I37 protease inhibitors family of MEROPS database by the software MView showing amino acids conservation, coverage and identity between aligned sequences (MView 1.63, Copyright © 1997-2018 Nigel P. Brown). cov.: percentage coverage; pid.: identity percentage; consensus 100%/90%/80%/70%: indicates consensus of amino acid there is conserved in each position; h: hydrophobic amino acid ; l: aliphatic amino acid ; o: alcoholic amino acid; p: polar amino acid; s: small amino acid; t: turnlike amino acid. (B) Secondary structure present along the functional sequence of ICP-SMEL by PDBsum software. α -helice: H1 in blue; β -sheet: A in red; disulfide bond: 1, 2 and 3 in yellow; motifs: β turn in purple.

3.2. Caracterização estrutural de ICP-SMEL

No modelo de estrutura tridimensional predito para ICP-SMEL pelo AlphaFold foi observado a conservação das 3 ligações dissulfeto encontradas nos inibidores de carboxipeptidase de *S. tuberosum* e *S. lycopersicum* já caracterizados, além de um padrão de estrutura em α -hélice e duas estruturas em β (**C2 Fig. 5**). O alinhamento estrutural entre o modelo de ICP-SMEL e as estruturas dos ICPs de *S. tuberosum* (código PDB 1H20) e *S. lycopersicum* (código PDB 2HLG) revelou alta conservação estrutural com sobreposição das três ligações dissulfeto e baixos valores de RMSD de distância entre as estruturas, 1,2 Å para o alinhamento entre ICP-SMEL e 1H20, e 1,4 Å entre ICP-SMEL e 2HLG, evidenciando a proximidade entre ICP-SMEL e os outros ICPs do gênero *Solanum*, já caracterizados (**C2 Fig. 5B**, **C2 Table 1**).



C2 Fig. 5. Three-dimensional structure of ICP-SMEL and structure alignment with similar peptides. (A) Three-dimensional structure of ICP-SMEL predicted by the AlphaFold modeling software showing three conserved disulfide bonds (in dark yellow). The structure is colored by secondary structure with α -helices in red, β -sheets in light yellow, and coil in green. The dotted circle shows in close the disulfide bonds. (B) Structural alignment of ICP-SMEL with two similar structures from carboxypeptidase inhibitors from *Solanum lycopersicum* (in blue – PDB 2HLG) and *Solanum tuberosum* (in dark red – PDB 1H20). The dotted circle evidences the overlap of the three conserved disulfide bonds (in dark yellow) in all three structures). The structures are represented in cartoon and disulfide bonds in sticks.

As métricas geradas pelo AlphaFold revelam uma avaliação altamente confiável e de qualidade para o modelo de ICP-SMEL. O *Predicted Aligned Error* (PAE) analisa a precisão da estrutura predita, estimando o erro de distância entre as estruturas preditas e verdadeiras. Valores mais baixos de PAE indicam maior precisão, variando de 0 a 35 Å (Varadi et al., 2022). O Teste de Diferença de Distância Local (pLDDT) avalia a confiança dos modelos preditos, variando de 0 a 100, onde pontuações mais altas indicam maior confiança no modelo predito, sendo calculado

para cada resíduo na sequência (Mariani et al., 2013; Varadi et al., 2022). Para o modelo de ICP-SMEL (rank 1), os valores de PAE ficaram abaixo de 10 Å para a maior parte da sequência, enquanto os valores de LDDT por posição ficaram acima de 80% para a maioria dos resíduos. Isso indica alta precisão, boa acurácia e grande confiança no modelo predito para o ICP-SMEL (**C2 Supplementary Fig. 2, C2 Supplementary Fig. 3**).

C2 Table 1. Validations of ICP-SMEL tridimensional model and comparison with similar structures.

Peptides	Disulfide bonds		Structural alignment	Ramachandran plot		Global quality
	Amount	Position (C-C)	RMSD	Favored regions	Allowed regions	Z-score ^c
ICP-SMEL	I-IV; II-V; III-VI	C3-C20; C8-C23; C14-C34		84.40%	15.60%	-7.35
ICP-St_1H20 ^a	I-IV; II-V; III-VI	C2-C19; C6-C21; C12-C35	ICP-SMEL x 1H20 1.168	53.50%	37.50%	-6.31
ICP-SI_2HLG ^b	I-IV; II-V; III-VI	C8-C24; C12-C27; C18-C34	ICP-SMEL x 2HLG 1.421	73.50%	26.40%	-4.95

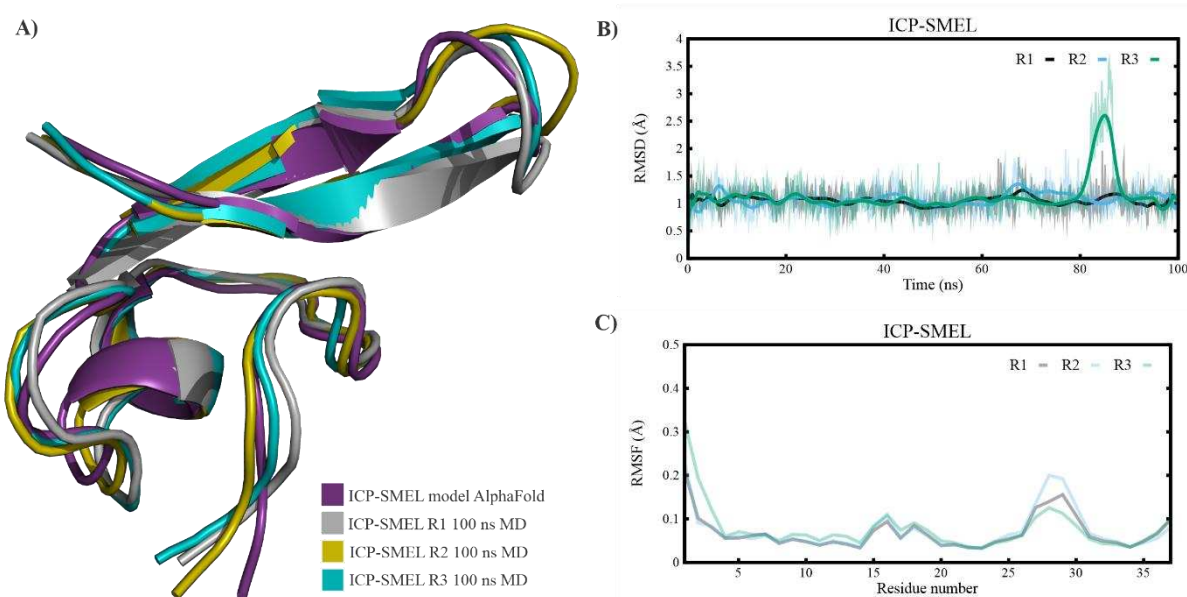
^a *Solanum tuberosum* ICP structure PDB 1H20

^b *Solanum lycopersicum* ICP structure PDB 2HLG

^c Z-score – indicates overall model quality and measures the deviation of the total energy of the structure with respect to an energy distribution derived from random conformations

Outras validações também foram realizadas para avaliar a qualidade do modelo de ICP-SMEL. O gráfico de Ramachandran revelou que 100% dos aminoácidos do modelo de ICP-SMEL estão nas regiões favorecidas (84,40%) e permitidas (15,60%) do gráfico. A percentagem de aminoácidos da estrutura de ICP-SMEL nas regiões favorecidas foi maior em comparação com as estruturas 1H20 e 2HLG dos ICPs de referência (**C2 Table 1, C2 Supplementary Fig. 4**). A avaliação global e local da qualidade do modelo também gerou resultados promissores, com um valor de Z-score de -7,35 para a qualidade global. Isso indica que o ICP-SMEL se assemelha mais às estruturas verdadeiras determinadas por ressonância magnética nuclear (RMN), o que também foi confirmado pelo ProSA para as estruturas de referência. Além disso, os gráficos de energia de qualidade local gerados para ICP-SMEL também foram semelhantes aos gerados para as estruturas 1H20 e 2HLG (**C2 Table 1, C2 Supplementary Fig. 5**). Esses resultados demonstram que o modelo predito para ICP-SMEL é de alta qualidade e se assemelha às estruturas já determinadas de outros ICPs de solanáceas.

Os resultados da dinâmica molecular (MD) revelaram uma alta estabilidade da estrutura de ICP-SMEL ao longo das simulações (**C2 Fig. 6**). O alinhamento estrutural do modelo de ICP-SMEL e suas três repetições após as três simulações independentes de MD de 100 ns demonstrou uma notável conservação nas conformações, indicando uma estabilidade consistente do peptídeo durante todo o período de simulação (**C2 Fig. 6A**). O uso da métrica RMSD permitiu avaliar a flutuação das conformações das réplicas R1, R2 e R3 ao longo da MD. Os valores de RMSD das três réplicas permaneceram próximos de um valor médio de 1 Å, sugerindo que a estrutura de ICP-SMEL se manteve altamente estável durante todas as simulações (**C2 Fig. 6B**). Além disso, o Gráfico RMSF proporcionou uma avaliação da flexibilidade de cada resíduo de aminoácido na estrutura durante as simulações de MD. Notavelmente, os valores de RMSF para todas as três réplicas estabilizaram-se em torno de 0,1 Å, indicando uma mínima flexibilidade conformacional da estrutura de ICP-SMEL ao longo do tempo de simulação (**C2 Fig. 6C**).

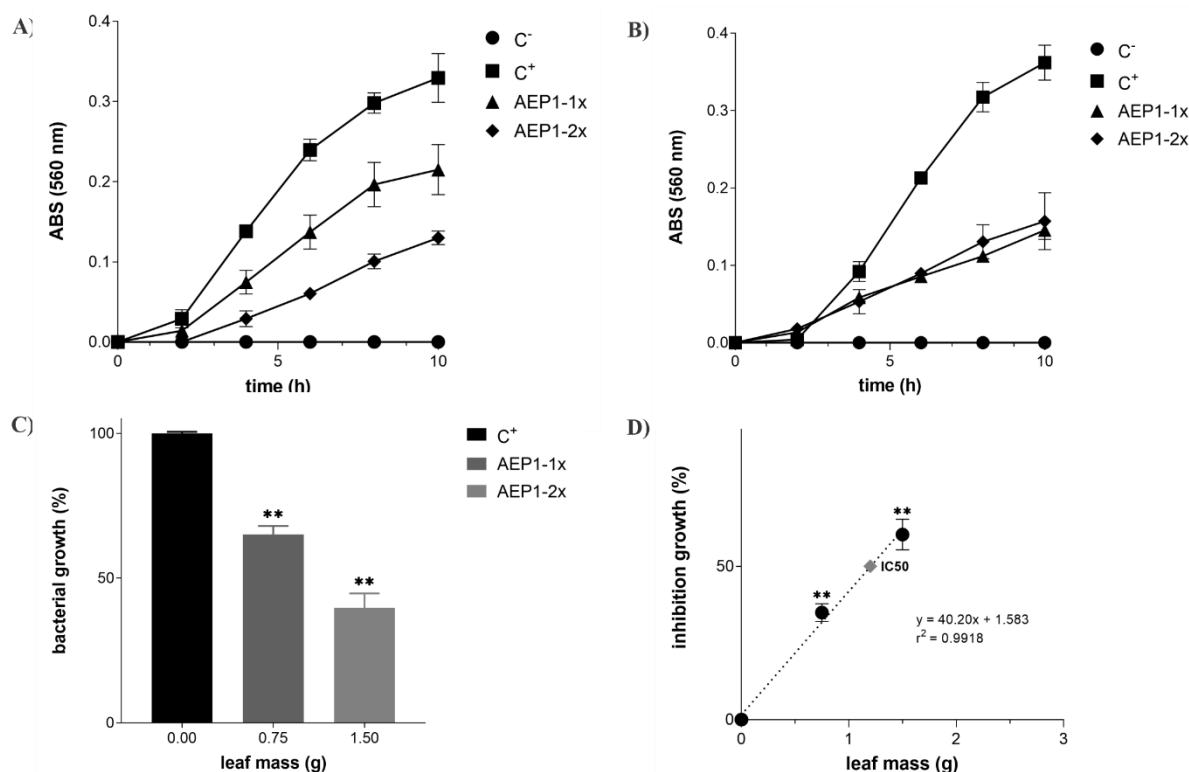


C2 Fig. 6. Molecular dynamics (MD) of ICP-SMEL structure. (A) Structural alignment of ICP-SMEL model and its three replicates after three independent MD simulations by 100 ns, showing high conservation in conformations. (B) RMSD Graph of ICP-SMEL replicates showing the fluctuation in conformations of the replicates R1 R2 and R3 along 100 ns of MD. R1, R2 and R3 stabilize RMSD around 1 Å.(C) RMSF Graphic of ICP-SMEL replicates showing the fluctuation in conformations of each amino acid along 100 ns of MD for each replicate. R1, R2 and R3 stabilize RMSF around 0.1 Å.

3.3. Testes antibacterianos

O extrato peptídico de *Solanum melongena* pool 1 (AEP1 1x e 2x), do qual ICP-SMEL foi identificado após cromatografia de exclusão molecular, inibiu o crescimento de duas bactérias fitopatogênicas, *Ralstonia solanacearum*, gram-negativa, e

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*, gram-positiva. De forma geral, *R. solanacearum* mostrou-se mais suscetível aos efeitos inibitórios quando comparado com *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (C2 Fig. 7 A,B).



C2 Fig. 7. Antimicrobial assay of extract of *Solanum melongena* 'Florida Market' leaves purified (pool 1) by molecular exclusion chromatography, enriched with peptides against the phytopathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. (A) Bacterial growth curve of *R. solanacearum* in the presence of two concentrations of the pool 1 over time. (B) Bacterial growth curve of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in the presence of two concentrations of the pool 1 over time. (C) Percentage of bacterial growth in relation to the leaf mass in 10 hours of treatment. Bacterial growth percentages were calculated relative to the control culture without peptide extracts (C⁺). (D) Percentage of bacterial growth inhibition in relation to the leaf mass in 10 hours of treatment. Inhibition percentages were calculated relative to the control culture without peptide extracts and bacteria (C⁻). Linear regression was performed to estimate IC50 (concentration required to achieve 50% inhibition of bacterial growth) and MIC (minimum inhibitory concentration required to achieve 100% inhibition of bacterial growth). AEP1-1x: pool 1 extract with mass equivalent to 0.75 g of eggplant leaves; AEP1-2x: pool 1 extract with equivalent to 1.50 g of eggplant leaves. The bars in the graphs indicate the standard deviation. * in B and C indicate significant differences between control and treatments.

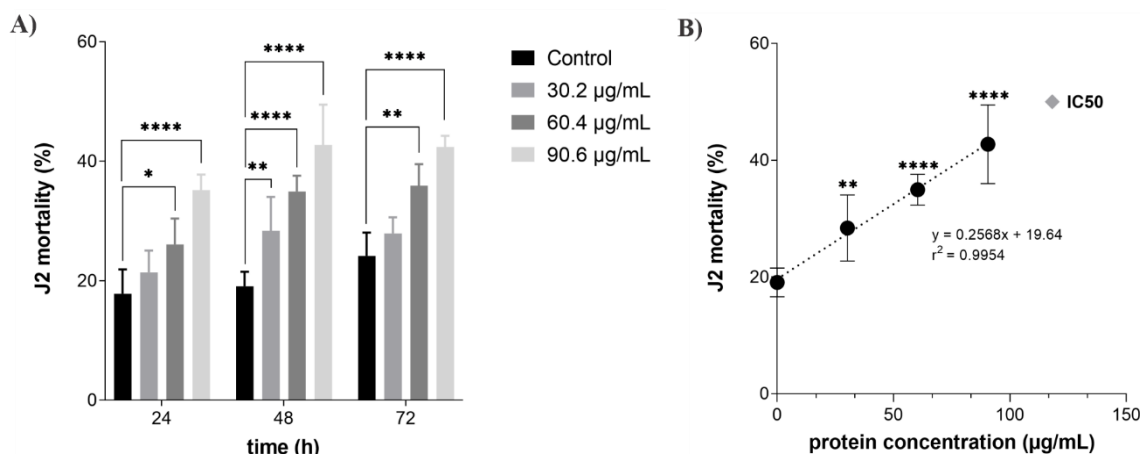
Para *R. solanacearum* à medida que a concentração do extrato aumentou, a inibição do crescimento bacteriano também aumentou significativamente. Esse efeito foi evidenciado pelo tratamento com EAP1-2x, que atingiu 60,5% de inibição em 10 horas, enquanto EAP1-1x alcançou 34,57% de inibição no mesmo tempo (C2 Fig. 7 C). Além disso, os resultados permitiram estimar o IC50 e o MIC da ação antimicrobiana do extrato peptídico de berinjela em *R. solanacearum*, correspondendo a 1,22 g e 2,44 g de peso fresco do material vegetal extraído, respectivamente (C2 Fig. 7 D). De forma diferente, para *C. michiganensis*, a percentagem de inibição foi

similar para as diferentes massas de folhas nos tratamentos. Tanto AEP1-1x quanto AEP1-2x alcançaram aproximadamente 60% de inibição em 10 horas (**C2 Fig. 7 B**, **C2 Supplementary File 1**). Esses resultados ressaltam o potencial da berinjela como fonte de agentes de defesa, bem como de ICP-SMEL como um AMP.

3.4. Teste contra nematoides

Os resultados obtidos a partir do extrato peptídico de *S. melongena* PC1, no qual ICP-SMEL também foi identificado após cromatografia de troca catiônica, demonstrou uma ação nematicida eficaz contra *Meloidogyne incognita*, causando morte significativa de juvenis de segundo estágio de desenvolvimento (J2) do nematoide das galhas, indicando o potencial de ação contra fitonematoides (**C2 Fig. 8**). Os resultados obtidos em 24 e 48 horas de tratamento revelaram um aumento linear significativo na mortalidade de J2 em relação ao aumento da concentração de proteína nos diferentes tratamentos. As concentrações de 30, 60 e 90 µg/mL de peptídeos corresponderam a 1, 2 e 3 gramas de folhas de material vegetal extraído, respectivamente. Além disso, foi observada pouca diferença no aumento de mortalidade entre os tempos de 24h e 48h, indicando que o efeito da concentração foi mais relevante do que o efeito do tempo. Em 72 horas, a percentagem de mortalidade permaneceu semelhante à observada em 48 horas, confirmando a ação nematicida e não nematostática do extrato, o que demonstra que o efeito de morte persiste mesmo após a retirada dos tratamentos e a reavaliação da mortalidade dos J2 no tempo de 72h (**C2 Fig. 8A**).

A correlação linear significativa entre a concentração de proteína e o aumento de mortalidade de J2 permitiu estimar o IC50 e o MIC da ação nematicida do extrato peptídico de berinjela em *M. incognita*, após purificação por cromatografia de troca catiônica, correspondendo a 118,2 e 312,8 µg de peptídeo, respectivamente, ou seja, equivalente a 5,9 e 14,7 g de folhas da planta empregadas para preparar o extrato, e às concentrações de 28 e 76 µM considerando um peptídeo de 4.200 Da (**C2 Fig. 8B**, **C2 Table 2**). Esses resultados revelam o potencial biotecnológico da fração enriquecida com o peptídeo de berinjela, ICP-SMEL, para pesquisas que visam novas alternativas de moléculas naturais e não tóxicas, para uso no manejo de fitonematoides.



C2 Fig. 8. Nematicidal assay of extracts of *Solanum melongena* 'Florida Market' leaves purified (PC1) by cationic exchange chromatography, enriched with peptides against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. (A) Nematode mortality percentage in relation to treatments in 24, 48, and 72 hours. The treatments are different protein concentrations (μg) of PC1, corresponding to 1, 2 and 3 grams of leaf mass. (B) Percentage of nematode mortality in relation to protein concentration (μg) of PC1 treatments in 48 h. Linear regression was performed to estimate IC50 (concentration required to achieve 50% of nematode mortality). The bars indicate the standard deviation. * Indicates significant differences between control and treatments, each * corresponds to one decimal ratio of significance. Graphs display the percentages of nematode mortality relative to the C- treatment (0.0 μg of protein), which corresponds to the treatment in the absence of the peptide extract.

C2 Table 2. Estimated MIC and IC50 of peptide-enriched extract of *Solanum melongena* leaves (PC1) for the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.

	MIC	IC-50
Protein concentration (μg)	312.8	118.2
Leaf mass (g)	14.7	5.9
Molar mass (μM) ^a	76.0	28.0

^a For the calculation of the MIC in μM , a peptide mass of 4200 Da was used, considering the molecular weight of the molecules as indicated in the mass spectras and the height of the band corresponding to the enriched peptide extract observed in the tricine-page gel.

4. DISCUSSÃO

O peptídeo ICP-SMEL foi identificado de forma significativa em frações peptídicas obtidas de folhas de *Solanum melongena*. Os processos de purificação empregados foram eficazes, resultando em frações enriquecidas de peptídeos. Essa abordagem de purificação também foi aplicada com sucesso para isolar peptídeos antimicrobianos de outras plantas, como *Achillea millefolium*, *Calêndula officinalis* e *Capsicum annuum* (Carrijo et al., 2015; Games et al., 2013; Tessarollo et al., 2013). Dessa forma, a combinação de técnicas de fracionamento e purificação, baseadas nas características bioquímicas das moléculas, corresponde a uma metodologia promissora para a prospecção de novos peptídeos de plantas, considerando sua alta eficiência no isolamento de proteínas e peptídeos, conforme descrito na literatura (Martínez-Maqueda et al., 2013; Stasyk and Huber, 2004).

A análise filogenética revelou a proximidade evolutiva do ICP-SMEL com a família de inibidores I37 e a sua função como um inibidor de carboxipeptidase (ICP). As características de sequência desse peptídeo o enquadram em outras duas classificações que evidenciam também sua função como ICP e como peptídeo antimicrobiano. O padrão de conservação de cisteínas inclui ICP-SMEL entre os peptídeos ricos em cisteínas pertencentes à classe de AMPs *cystine-knot* lineares, caracterizados por um padrão de três ligações dissulfeto conservadas entre as cisteínas C1-C4, C2-C5 e C3-C6 (Molesini et al., 2017; Tam et al., 2015). Uma outra classificação mais recente seria a apresentada no capítulo 1 deste documento, que classifica os ICPs de solanáceas como uma nova subclasse de inibidores de protease pertencentes à família PR6 de proteínas (ou peptídeos) relacionada a patogênese de plantas, à qual foi caracterizada pelo motivo global CXXXCXXXDCXXX-XXCXXC, que também caracteriza ICP-SMEL (SELS et al., 2008; GOMES et al., 2023 – Capítulo 1). Nesta sequência, X representa qualquer resíduo de aminoácido. Essas discussões, destacam a importância dos ICPs na família das solanáceas, e especificamente, o ICP-SMEL para berinjela, como parte de mecanismos de defesa dessas plantas contra patógenos.

O ICP-SMEL é o primeiro inibidor dessa natureza a ser identificado na berinjela, enquanto outras espécies de solanáceas, como *Capsicum annum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* e *Solanum lycopersicum*, ICPs já foram caracterizados (Cotabarren et al., 2018; Molesini et al., 2017; Sitjà-Arnau et al., 2005). A sequência do peptídeo ICP-SMEL exibiu características estruturais distintas e propriedades bioquímicas *in vitro* e *in silico*, que sugerem alto potencial antimicrobiano contra bactérias e fungos. Essa descoberta coloca o ICP-SMEL ao lado de outros ICPs já caracterizados na literatura com propriedades antimicrobianas, como o ICP de batata, que demonstrou ação antifúngica contra o fitopatógeno *Magnaporthe oryzae* e induziu resistência na infecção da bactéria fitopatogênica *Dickeya solani* (Lebecka et al., 2019; Quilis et al., 2007). A singularidade do ICP-SMEL no contexto das solanáceas, como peptídeo com amplo espectro de ação, abre novas possibilidades para o estudo de suas propriedades e potencial aplicação no controle de patógenos

As análises estruturais do modelo de ICP-SMEL destacam a sua alta conservação estrutural em relação aos ICPs já caracterizados de *S. tuberosum* e *S. lycopersicum* (Gonzalez et al., 2003; Uribe et al., 2008). O modelo de ICP-SMEL também é semelhante a ICPs de outros organismos, como o TCI de *Rhipicephalus*

bursa (Arolas et al., 2005) e ACI de *Ascaris suum* (Homandberg et al., 1989; Sanglas et al., 2009), em relação aos padrões de estrutura secundária e à conservação das ligações dissulfeto entre os pares de cisteína (C1-C4; C2-C5; C3-C6), evidenciando sua função como inibidor de carboxipeptidase. A alta estabilidade e qualidade da estrutura tridimensional do peptídeo confirmada pelas abordagens de validação e sua consistência estrutural confirmada pela alta estabilidade na simulação de MD, aproximam o modelo predito das estruturas verdadeiras determinadas por ressonância magnética nuclear (RMN), como é o caso dos ICPs de batata e tomate (Gonzalez et al., 2003; Uribe et al., 2008). Esses resultados sugerem que o modelo de ICP-SMEL é uma ferramenta valiosa para estudos do mecanismo de ação do peptídeo. A compreensão de como o ICP-SMEL interage com a carboxipeptidase e de quais regiões da proteína são importantes para a ligação e inibição enzimática é essencial para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas desse peptídeo. Além disso, o conhecimento do mecanismo de ação pode servir como base para o desenvolvimento de novos inibidores ou para a otimização do peptídeo, buscando melhorar sua eficácia e seletividade.

Os ensaios antimicrobianos realizados no extrato de *S. melongena* reforçam seu potencial como uma fonte promissora de novos peptídeos antimicrobianos, com destaque para o ICP-SMEL isolado do extrato. As solanáceas, incluindo a berinjela, são conhecidas por apresentarem ação antimicrobiana potente entre as espécies da família, enfatizando ainda mais a relevância da berinjela como fonte de peptídeos antimicrobianos (Almeida et al., 2008, 2007; Tessarollo et al., 2013). A marcante atividade antimicrobiana do extrato peptídico contra as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, bem como contra o fitonematoide *Meloidogyne incognita*, é consistente com a presença de uma alta variedade de genes de resistência encontrados na berinjela e em outras solanáceas, bem como com a resistência natural de algumas espécies de *Solanum* a fitonematoides do gênero *Meloidogyne* (Boiteux and Charchar, 1996; Caliskan et al., 2023; Yang et al., 2014). A variedade Florida Market de *S. melongena*, exibindo significativa ação antimicrobiana, reforça sua relevância para aplicações agrícolas. O ICP-SMEL, como isolado do extrato de suas folhas, também possui um forte potencial como peptídeo antimicrobiano, tornando-o um alvo viável para estudos, como por exemplo de manipulação genética para indução de resistência no controle de doenças

causadas por bactérias fitopatogênicas e por fitonematoides (Aravindh et al., 2023; Caliskan et al., 2023).

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a identificação do ICP-SMEL como o primeiro inibidor de carboxipeptidase de *Solanum melongena* 'Florida Market' relatado e as análises estruturais confirmando sua estabilidade e semelhança com outros ICPs conhecidos, destacam-no como uma ferramenta valiosa para estudos moleculares de defesa de plantas pelos ICPs. No entanto, para aproveitar plenamente o potencial do ICP-SMEL como uma alternativa promissora para o controle de patógenos agrícolas, é necessário aprofundar o conhecimento sobre seu mecanismo de ação e seu potencial aplicativo. Investigações futuras podem incluir estudos de atividade antimicrobiana em diferentes concentrações, investigação dos efeitos em organismos não alvo, estudos de estabilidade e formulação do peptídeo para aplicações práticas. A ação antimicrobiana e nematicida das frações peptídicas contendo ICP-SMEL, obtido das folhas de berinjela, aponta essa solanácea como uma fonte promissora de novos peptídeos e uma importante ferramenta biotecnológica, incluindo o ICP-SMEL, no manejo de fitopatógenos, oferecendo soluções mais seguras e eficazes para o controle das pragas vegetais. Portanto, destaca-se que a descoberta e caracterização de ICP-SMEL reforça a importância de investigar compostos naturais como fontes promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas e a utilização de recursos naturais, como os peptídeos da berinjela e de outras solanáceas.

6. REFERÊNCIAS

- Abdeen, A., Virgós, A., Olivella, E., Villanueva, J., Avilés, X., Gabarra, R., Prat, S., 2005. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteínase inhibitors. *Plant Mol. Biol.* 57, 189–202. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-6959-9>
- Afroz, M., Akter, S., Ahmed, A., Rouf, R., Shilpi, J.A., Tiralongo, E., Sarker, S.D., Göransson, U., Uddin, S.J., 2020. Ethnobotany and Antimicrobial Peptides From Plants of the *Solanaceae* Family: An Update and Future Prospects. *Front. Pharmacol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00565>
- Almeida, H.O., 2007. Identificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela para o controle de patógenos de plantas. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa.
- Almeida, H.O., Mattos, E.C., Barbosa, M.O., Teixeira, F.R., Magalhães, R.D.M., Romeiro, R.S., Fontes, E.P.B., Baracat-Pereira, M.C., 2007. Peptide fraction inhibiting plant pathogen growth predominated in cell wall extracts from young

- plants or in soluble cell fraction from expanded leaves from eggplants. *J. Phytopathol.* 155, 735–737. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01308.x>
- Almeida, H.O., Teixeira, F.R., Romeiro, R.D.S., Da Silva, D.J.H., Pereira, P.R.G., Fontes, E.P.B., Baracat-Pereira, M.C., 2008. Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Summa Phytopathol.* 34, 62–64. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000100012>
- Almeida, V.D.L., 2016. Estudos in silico do mecanismo de ação de um peptídeo antimicrobiano de berinjela (*Solanum melongena* L.) com atividade de inibidor de carboxipeptidases. Monografia. Universidade Federal de Viçosa.
- Aravindh, C., Bhavana, P., Singh, A.K., Jha, A.K., Anjum, N., 2023. Genetic variability and association studies for yield traits and bacterial wilt resistance in brinjal (*Solanum melongena* L.) 12, 3244–3248.
- Arolas, J.L., Lorenzo, J., Rovira, A., Castellà, J., Aviles, F.X., Sommerhoff, C.P., 2005. A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: Isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* 280, 3441–3448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411086200>
- Baermann, G., 1917. A simple method for detecting *Ankylostomum* (nematode) larvae in soil samples. *Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indië.* 57, 131–137.
- Bernard, V.D., Peanasky, R.J., 1993. The Serine Protease Inhibitor Family from *Ascaris suum*: Chemical Determination of the Five Disulfide Bridges. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 367–376. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1297>
- Best, R.B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P.E.M., Mittal, J., Feig, M., MacKerell, A.D., 2012. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. *J. Chem. Theory Comput.* 8, 3257–3273. <https://doi.org/10.1021/ct300400x>
- Boiteux, L.S., Charchar, J.M., 1996. Genetic resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in eggplant (*Solanum melongena*). *Plant Breed.* 115, 198–200. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1996.tb00902.x>
- Caliskan, S., Toppino, L., Boyaci, H.F., Rotino, G.L., Cebeci, E., 2023. Assessment of new genetic resources to uncover potential nematode resistance traits for eggplant (*Solanum melongena*) improvement. *Phytoparasitica.* <https://doi.org/10.1007/s12600-023-01081-y>
- Carrijo, L.C., Marques, A.E., Fontes, P.P., Games, P.D., Magalhães, M.J., Baracat-Pereira, M.C., 2015. Aqueous extracts from calendula as natural potential sources to develop phyto-medicines and natural defense agents. *Acta Hort.* 1098, 117–124. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1098.12>
- Chandan, C., Pardhe, H.A., Gowthamarajan, K., ..., 2022. Systematic approach & Application in relevance to Economic & Therapeutic actions of Proteolytic Enzyme: A Review. *J. Posit. ...* 6, 10476–10486.
- Chowdhary, V.A., Tank, J.G., 2023. Biomolecules Regulating Defense Mechanism in Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.* 93, 17–25. <https://doi.org/10.1007/s40011-022-01387-7>
- Cotabarren, J., Lufrano, D., Parisi, M.G., Obregon, W.D., 2020. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *PLANT Sci.* 292. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110398> WE - Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED)
- Cotabarren, J., Tellechea, M.E., Avilés, F.X., Lorenzo Rivera, J., Obregón, W.D., 2018.

- Biochemical characterization of the YBPCI miniprotein, the first carboxypeptidase inhibitor isolated from Yellow Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.). A novel contribution to the knowledge of miniproteins stability. *Protein Expr. Purif.* 144, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.12.003>
- Dracatos, P.M., Payne, J., Di Pietro, A., Anderson, M.A., Plummer, K.M., 2016. Plant defensins NaD1 and NaD2 induce different stress response pathways in fungi. *Int. J. Mol. Sci.* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17091473>
- Dracatos, P.M., Van Der Weerden, N.L., Carroll, K.T., Johnson, E.D., Plummer, K.M., Anderson, M.A., 2014. Inhibition of cereal rust fungi by both class I and II defensins derived from the flowers of *Nicotiana glauca*. *Mol. Plant Pathol.* 15, 67–79. <https://doi.org/10.1111/mpp.12066>
- Fjell, C.D., Hancock, R.E.W., Cherkasov, A., 2007. AMPper: A database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides. *Bioinformatics* 23, 1148–1155. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm068>
- Games, P.D., Koscky-Paier, C.R., Almeida-Souza, H.O., Barbosa, M.O., Antunes, P.W.P., Carrijo, L.C., Pereira, P.R.G., Baracat-Pereira, M.C., 2013. In vitro antibacterial and anti-fungal activities of hydrophilic plant defence compounds obtained from the leaves of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 88, 551–558. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11513005>
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J.M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., Poza-Carrión, C., 2001. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxy-nitrite in plant defence. *FEBS Lett.* 498, 219–222. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02456-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02456-5)
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. The Proteomics Protocols Handbook. *Proteomics Protoc. Handb.* 571–608. <https://doi.org/10.1385/1592598900>
- Gebara, R. da S., Taveira, G.B., de Azevedo dos Santos, L., Calixto, S.D., Simão, T.L.B.V., Lassounskaia, E., Muzitano, M.F., Teixeira-Ferreira, A., Perales, J., Rodrigues, R., de Oliveira Carvalho, A., Gomes, V.M., 2020. Identification and Characterization of Two Defensins from *Capsicum annuum* Fruits that Exhibit Antimicrobial Activity. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 12, 1253–1265. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09647-6>
- Gonzalez, C., Neira, J.L., Ventura, S., Bronsoms, S., Rico, M., Aviles, F.X., 2003. Structure and dynamics of the potato carboxypeptidase inhibitor by H-1 and N-15 NMR. *PROTEINS-STRUCTURE Funct. Genet.* 50, 410–422. <https://doi.org/10.1002/prot.10291> WE - Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED)
- GROMACS 2020.4 Manual, 2020. <https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.4054996>.
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Raghava, G.P.S., 2013. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS One* 8, e73957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>
- Homandberg, G.A., Litwiler, R.D., Peanasky, R.J., 1989. Carboxypeptidase inhibitors from *Ascaris suum*: The primary structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 270, 153–161. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90017-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90017-9)
- Huang, J., Mackerell, A.D., 2013. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* 34, 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- Hussey, R.S., Barker K.R., 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter.* 57, 1025–

- 1028.
- Judd, R.C., 1994. Electrophoresis of peptides, in: Walker, J.M. (Eds.), *Methods in molecular biology: basic protein and peptide protocols*. Humana Press, Totowa, pp. 49–57.
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L.E., Brookes, D.H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D.W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D.R., Nielsen, J.E., Head-Gordon, T., Geng, W., Krasny, R., Wei, G.W., Holst, M.J., McCammon, J.A., Baker, N.A., 2018. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci.* 27, 112–128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>
- Kaur, Anroop, Kaur, S., Kaur, Ajinder, Kaur Sarao, N., Sharma, D., 2022. Pathogenesis-Related Proteins and Their Transgenic Expression for Developing Disease-Resistant Crops: Strategies Progress and Challenges, in: *Plant Breeding - New Perspectives [Working Title]*. IntechOpen, p. 13. <https://doi.org/10.5772/intechopen.106774>
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 10, 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kim, J.Y., Park, S.C., Kim, M.H., Lim, H.T., Park, Y., Hahm, K.S., 2005. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 921–927. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.057>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Laskowski, R.A., Jabłońska, J., Pravda, L., Vařeková, R.S., Thornton, J.M., 2018. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci.* 27, 129–134. <https://doi.org/10.1002/pro.3289>
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291. <https://doi.org/10.1107/s0021889892009944>
- Lay, F.T., Brugliera, F., Anderson, M.A., 2003. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiol.* 131, 1283–1293. <https://doi.org/10.1104/pp.102.016626>
- Lebecka, R., Kistowski, M., Debski, J., Szajko, K., Murawska, Z., Marczewski, W., 2019. Quantitative proteomic analysis of differentially expressed proteins in tubers of potato plants differing in resistance to *Dickeya solani*. *Plant Soil* 441, 317–329. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04125-7> WE - Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED)
- Letunic, I., Bork, P., 2007. Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23, 127–128. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529>
- Logacheva, M.D., Valiejo-Roman, C.M., Pimenov, M.G., 2008. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. *Plant Syst. Evol.* 270, 783–791. <https://doi.org/10.1080/00837792.1905.10669550>
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D., Lopez, R., 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Mariani, V., Biasini, M., Barbato, A., Schwede, T., 2013. IDDT: A local superposition-

- free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics* 29, 2722–2728. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt473>
- Marino-Buslje, C., Venhudová, G., Molina, M.A., Oliva, B., Jorba, X., Canals, F., Avilés, F.X., Querol, E., 2000. Contribution of C-tail residues of potato carboxypeptidase inhibitor to the binding to carboxypeptidase A: A mutagenesis analysis. *Eur. J. Biochem.* 267, 1502–1509. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01150.x>
- Martínez-Maqueda, D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B., Gómez-Ruiz, J.Á., 2013. Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion, in: *Proteomics in Foods*. Springer US, Boston, MA, pp. 21–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5626-1_2
- Meher, P.K., Sahu, T.K., Saini, V., Rao, A.R., 2017. Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. *Sci. Rep.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep42362>
- Molesini, B., Treggiari, D., Dalbeni, A., Minuz, P., Pandolfini, T., 2017. Plant cystine-knot peptides: pharmacological perspectives. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 83, 63–70. <https://doi.org/10.1111/bcp.12932>
- Mosolov, V. V., Valueva, T.A., 2006. Participation of proteolytic enzymes in the interaction of plants with phytopathogenic microorganisms. *BIOCHEMISTRY-MOSCOW* 71, 838–845. <https://doi.org/10.1134/S0006297906080037>
- Oliveira, A.P.B.F., Resende, L.M., Rodrigues, R., de Oliveira Mello, É., Taveira, G.B., de Oliveira Carvalho, A., Gomes, V.M., 2022. Antimicrobial peptides of the genus *Capsicum*: a mini review. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 63, 453–466. <https://doi.org/10.1007/s13580-022-00421-x>
- Ormancey, M., Guillotin, B., Merret, R., Camborde, L., Duboé, C., Fabre, B., Pouzet, C., Impens, F., Van Haver, D., Carpentier, M.C., Clemente, H.S., Aguilar, M., Laressergues, D., Scharff, L.B., Pichereaux, C., Burlet-Schiltz, O., Bousquet-Antonelli, C., Gevaert, K., Thuleau, P., Plaza, S., Combiér, J.P., 2023. Complementary peptides represent a credible alternative to agrochemicals by activating translation of targeted proteins. *Nat. Commun.* 14, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35951-0>
- Park, Y., Bo, H.C., Kwak, J.S., Kang, C.W., Lim, H.T., Cheong, H.S., Hahm, K.S., 2005. Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). *J. Agric. Food Chem.* 53, 6491–6496. <https://doi.org/10.1021/jf0505123>
- Quilis, J., López-García, B., Meynard, D., Guiderdoni, E., San Segundo, B., 2014. Inducible expression of a fusion gene encoding two proteínase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnol. J.* 12, 367–377. <https://doi.org/10.1111/pbi.12143>
- Quilis, J., Meynard, D., Vila, L., Avilés, F.X., Guiderdoni, E., San Segundo, B., 2007. A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnol. J.* 5, 537–553. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00264.x>
- Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A. 2014. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 42, D503-D509.
- Rees, D.C., Lipscomb, W.N., 1982. Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 160, 475–498. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90309-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90309-6)
- Rester, U., Bode, W., Moser, M., Parry, M.A.A., Huber, R., Auerswald, E., 1999. Structure of the complex of the antistatin-type inhibitor bdellastatin with trypsin

- and modelling of the bdellastasin-microplasmin system. *J. Mol. Biol.* 293, 93–106. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3162>
- Sanglas, L., Aviles, F.X., Huber, R., Gomis-Rüthe, F.X., Arolas, J.L., 2009. Mammalian metallopeptidase inhibition at the defense barrier of *Ascaris* parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1743–1747. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812623106>
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 941–950. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.06.011>
- Sitjà-Arnau, M., Molina, M.A., Blanco-Aparicio, C., Ferrer-Soler, L., Lorenzo, J., Avilés, F.X., Querol, E., de Llorens, R., Sitjà-Arnau, M., Molina, M.A., Blanco-Aparicio, C., Ferrer-Soler, L., Lorenzo, J., Aviles, F.X., Querol, E., de Llorens, R., 2005. Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) as an EGF blocker. *CANCER Lett.* 226, 169–184.
- Stasyk, T., Huber, L.A., 2004. Zooming in: Fractionation strategies in proteomics. *Proteomics* 4, 3704–3716. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401048>
- Tan, J.P., Wang, S., Wong, K.H., Tan, W. L., 2015. Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals* 8, 711–757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>.
- Teixeira, F.R., Lima, M.C.O.P., Almeida, H.O., Romeiro, R.S., Silva, D.J.H.; Pereira, P.R.G., Fontes, E.P.B., Baracat-Pereira, M.C., 2006. Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. *Journal of Phytopathology. Göttingen.* 54, 418–421
- Tessarollo, N.G., Carrijo, L.C., Barbosa, M.O., Almeida, H.O., Pereira, T.H.A., Magalhães, M.J., Leite, J.P.V., Pereira, P.R.G., Baracat-Pereira, M.C., 2013. Fitodefensivos em plantas medicinais: Macromoléculas hidrofílicas de folhas de mil folhas (*Achillea millefolium* L.) inibem o crescimento in vitro de bactérias fitopatogênicas. *Rev. Bras. Plantas Med.* 15, 180–187.
- Tsunemi, M., Matsuura, Y., Sakakibara, S., Katsube, Y., 1993. Crystallization of a Complex between an Elastase-specific Inhibitor Elafin and Porcine Pancreatic Elastase. *J. Mol. Biol.* 232, 310–311. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1387>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Zidek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D., Velankar, S., 2022. AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 50, D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Wang, G., Li, X., Wang, Z., 2016. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 44, D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Wiederstein, M., Sippl, M.J., 2007. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 35, 407–410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>
- Yang, X., Cheng, Y.F., Deng, C., Ma, Y., Wang, Z.W., Chen, X.H., Xue, L.B., 2014. Comparative transcriptome analysis of eggplant (*Solanum melongena* L.) and turkey berry (*Solanum torvum* Sw.): Phylogenomics and disease resistance analysis. *BMC Genomics* 15, 0–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-412>
- Zhang, Y.M., Ye, D.X., Liu, Y., Zhang, X.Y., Zhou, Y.L., Zhang, L., Yang, X.L., 2023. Peptides, new tools for plant protection in eco-agriculture. *Adv. Agrochem* 2, 58–78. <https://doi.org/10.1016/j.aac.2023.01.003>

Capítulo 3 – Mecanismo de ação de ICP-SMEL de *Solanum melongena* embasado na expansão gênero-específica de novos inibidores de carboxipeptidases das solanáceas

Esse capítulo é um manuscrito em desenvolvimento intitulado “**ICP-SMEL mechanism of action from *Solanum melongena* based on the genus-specific expansion of new *Solanaceae* carboxypeptidase inhibitors**”. O artigo será submetido para publicação na revista. “**Biochimie**”. O capítulo encontra-se em português, de acordo com as normas da ABNT.

O capítulo compreende a junção de resultados de três trabalhos desenvolvidos nos Laboratórios de Proteômica e Bioquímica de Proteínas, do CCBII e BIOAGRO/UFV, sob a orientação da professora Maria Cristina Baracat-Pereira. Os trabalhos envolvidos são: Monografia de Danilo M. dos Santos (SANTOS, 2018), Trabalho desenvolvido durante Intercâmbio da aluna Elizabeth R. Alfaro-Espinoza (2019/2020) e a Tese de Geniana S. Gomes (este documento).

RESUMO

Os inibidores de carboxipeptidase (ICPs) presentes nas solanáceas são peptídeos de defesa que se destacam pela conservação de cistinas e capacidade de inibir metalocarboxipeptidases. No entanto, seu potencial ainda é pouco explorado, sendo alvos interessantes para pesquisas no controle de fitopatógenos. Neste estudo, objetivou-se estudar a distribuição de novos ICPs nos genomas das solanáceas e caracterizar o mecanismo de inibição do ICP-SMEL de *Solanum melongena* frente à conservação desses peptídeos. Foram empregadas diversas metodologias, incluindo busca por novos ICPs nos genomas das solanáceas, estudos de conservação e filogenia dos ICPs identificados, simulações de docking e dinâmica molecular entre o ICP-SMEL e a metalocarboxipeptidase bovina (MCPA), mapeamento de interações e proposta do perfil de interação físico-química dos novos ICPs com as MCPs. Na prospecção de ICPs foram identificadas 62 sequências inéditas altamente conservadas nos genomas das solanáceas. A filogenia revelou uma expansão gênero-específica desses inibidores na família e maior proliferação em *S. melongena*, sugerindo a aquisição recente na evolução das plantas. As simulações de docking e dinâmica molecular caracterizaram o mecanismo de ação do ICP-SMEL, demonstrando alta estabilidade dos complexos SMEL-MCPA A e B, e interações frequentes entre o ICP-SMEL e os resíduos dos subsítios catalíticos S1, S1' e S2 da MCPA. A proposta do perfil de interação físico-química dos novos ICPs com as MCPs revelou a preservação das características físico-químicas dos aminoácidos envolvidos na ancoragem e inibição. Esses resultados reforçam a importância dos ICPs como peptídeos de defesa nas solanáceas, e a compreensão aprofundada do mecanismo de inibição de ICP-SMEL abre novas oportunidades para explorá-los como defensivos agrícolas.

Palavras chave: Expansão gênero-específica. Solanáceas. Inibidores de carboxipeptidases. ICP-SMEL. Mecanismo de ação.

1. INTRODUÇÃO

As plantas produzem compostos bioativos que atuam em uma ampla gama de alvos biológicos, tornando-as fontes atrativas para a descoberta de novos agentes terapêuticos (COTABARREN et al., 2020). Entre os compostos naturais encontrados nas plantas estão os peptídeos antimicrobianos (AMPs), que são alvos de pesquisas para aplicações biotecnológicas, biomédicas e agronômicas, devido ao seu amplo espectro de ação, inibindo diversos fitopatógenos, como bactérias, fungos e parasitas, além de estarem amplamente distribuídos entre diferentes gêneros e espécies de plantas (COTABARREN et al., 2020; DATTA; ROY, 2020).

Membros da família *Solanaceae* destacam-se pelo seu uso na medicina tradicional e na alimentação humana, além de algumas espécies serem conhecidas por sua resistência natural a patógenos, sendo fontes de diversos peptídeos antimicrobianos (YANG et al, 2014; AFROZ et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2022). Os AMPs encontrados nessas plantas demonstram atividades inibitórias significativas contra bactérias e fungos fitopatogênicos. Esses peptídeos estão amplamente distribuídos em diferentes gêneros dentro da família e são classificados em diversas categorias, incluindo a classe de inibidores de protease, como a tripsina, e também os inibidores de carboxipeptidases (SARNTHIMA; KHAMMUANG, 2012; MOULIN et al., 2014; MUHAMMAD et al., 2019.).

Inibidores de carboxipeptidases (ICPs), encontrados em abundância nas solanáceas são peptídeos de defesa pertencentes à classe de AMPs cystine-knot lineares, caracterizados por ligações dissulfeto conservadas e baixa massa molecular (TAM et al., 2015; MOLESINI et al., 2017). Em trabalho recente de nosso grupo, foi proposta a inclusão dos ICPs das solanáceas como uma nova subclasse da família de proteínas relacionadas à patogênese 6 (PR-6), classificando-os como peptídeos de defesa de plantas, juntamente com os inibidores de proteases (SELS et al., 2008; GOMES et al., 2023 – Capítulo 1 desde documento). Os ICPs têm como principal função inibir metalocarboxipeptidases (MCPs) da subfamília A/B, com os quatro últimos resíduos na região C-terminal sendo considerados determinantes para o mecanismo de inibição (REES; LIPSCOMB, 1982; MARINO-BUSLJE et al., 2000; GAVOR et al., 2021). As MCPs são moléculas efetoras descritas na infecção de fitopatógenos em plantas (FIGAJ et al., 2019; CHANDAN et al., 2022), o que torna os ICPs alvos interessantes para aplicações biotecnológicas, como defensivos agrícolas.

Espécies de solanáceas que possuem ICPs caracterizados incluem *Capsicum annuum* (pimentão), *Hyoscyamus niger* (meimendro), *Nicotiana tabacum* (fumo), *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Solanum tuberosum* (batata). Dentre eles, o ICP de *S. tuberosum* é o mais estudado e apresenta diversas funções atribuídas, como atuar como antagonista do fator de crescimento epidérmico (EGF) com propriedades antitumorais, agir como agente antimalárico e antitrombótico, além de exibir atividade antifúngica contra *Magnaporthe oryzae* (SITJÀ-ARNAU et al., 2005; WANG et al., 2006; QUILIS et al., 2007; QUILIS et al., 2014; LUFRANO et al., 2015). Estudos conduzidos por Molesini et al. (2017) demonstraram a atividade inibitória do ICP de *S. lycopersicum* em exopeptidases, a atividade inibitória do crescimento de células cancerígenas pelo ICP de *N. tabacum*, e a atividade antiangiogênica do ICP de *H. niger*. Recentemente, um novo inibidor de carboxipeptidase das solanáceas, chamado ICP-SMEL, foi identificado a partir de um extrato antimicrobiano das folhas de *Solanum melongena* 'Florida Market' (berinjela), o qual apresentou 100% de atividade inibitória contra as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (ALMEIDA et al., 2008, Gomes et al., 2023 – Capítulo 2 desde documento)

O potencial dessa classe de inibidores ainda é pouco explorado nas plantas, tornando os ICPs alvos de grande interesse para estudos que visam descobrir novas moléculas para o controle de fitopatógenos. Além disso, há interesse em identificar novos ICPs em membros da família *Solanaceae* e compreender suas interações moleculares com as carboxipeptidases, apresentando assim relevância científica significativa. Nesse contexto, o presente estudo objetivou investigar a distribuição de novos ICPs na família *Solanaceae* e caracterizar o mecanismo de inibição do ICP-SMEL encontrado em *Solanum melongena*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, as análises foram conduzidas utilizando ferramentas de bioinformática gratuitamente disponíveis. As sequências do peptídeo ICP-SMEL de *Solanum melongena*, tanto a completa (MALRNLPIELIMFEEILLPDLTIKSCGYNCN-TDEDCKPLTVCQKCKQSISRGRILACILP) como a funcional (IKSCGYNCNTDEDCKPLTVCQKCKQSISRGRILACILP), foram adotadas como modelos para os estudos realizados. Além disso, as sequências precursoras dos ICPs de *Solanum tuberosum* (HASS; RYAN, 1981a) (código NCBI NP0012750481) e *Solanum lycopersicum*

(HASS; HERMODSON, 1981b) (código UniProt P01076), cujas estruturas tridimensionais estão definidas e identificadas pelos códigos de depósito PDB 1H20 e 2HLG, respectivamente, foram incluídas nas análises como controles de comparação o estudo das novas sequências ICP encontradas.

2.1. Prospecção de sequências ICPs em genomas das solanáceas

Para a busca das sequências ICPs nos genomas das solanáceas foi utilizada a sequência completa do peptídeo ICP-SMEL de *Solanum melongena*, previamente identificado por Almeida et al (2008) e caracterizada conforme Gomes et al. (2023 – Capítulo 2 deste documento) em estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa nos Laboratórios de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (LPBP) do Edifício CCBII e do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os genomas referenciais das espécies de solanáceas foram obtidos no banco de dados NCBI (National Center for Integrative Biomedical Informatics) e sua qualidade foi avaliada utilizando o programa Busco (SEPPEY; MANNI; ZDOBNOV, 2019) pelo Cluster de computadores da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (**Script 2**), além de análises do tamanho e %GC dos genomas (**C3 Tabela Suplementar 1**).

Posteriormente, análises de similaridade local entre sequências foram desenvolvidas usando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do tBLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) contra cada genoma disponível identificado, utilizando a sequência completa de ICP-SMEL como referência. As sequências de interesse foram selecionadas com base em critérios específicos, como E-value menor que 10^{-03} , cobertura acima de 70% e identidade maior que 30% em relação à sequência modelo. Todas as sequências selecionadas foram analisadas com a ferramenta Translate (<https://web.expasy.org/translate/>) para confirmar a codificação dos peptídeos de interesse e verificar a presença de stop códons internos (pseudogenes). Além disso, utilizamos o DeepLoc (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2017) para predição de sublocalização celular, excluindo as sequências com stop códon interno e aquelas sem predição de sublocalização celular para peptídeo secretado.

2.2. Análises de conservação e filogenia

As sequências ICPs identificadas foram alinhadas usando o Clustal Omega (parâmetros default) (MADEIRA et al., 2019). Em seguida, foram analisadas quanto à

conservação de aminoácidos, cobertura e identidade usando os softwares MView (MADEIRA et al., 2019) e WebLogo (CROOKS et al., 2004). Sequências que não possuíam as seis cisteínas conservadas foram excluídas após uma curadoria manual.

O estudo de filogenia foi conduzido usando o software MEGA-X (KUMAR et al., 2018). O alinhamento das sequências de aminoácidos dos ICPs foi realizado pelo Clustal W e das sequências de nucleotídeos pelo Muscle, utilizando o método que leva em consideração os códons. A filogenia de máxima verossimilhança foi executada pelo método estatístico Maximum Likelihood Estimation (MLE), com o teste filogenético de Bootstrap (LOGACHEVA; VALIEJO-ROMAN; PIMENOV, 2008) realizado com 1000 replicatas. Para a árvore de aminoácidos, aplicou-se o modelo de substituição de Jones-Taylor-Thornton (JTT), enquanto para a árvore de nucleotídeos, utilizou-se o modelo de Tamura-Nei. As árvores resultantes foram editadas pela ferramenta Interactive Tree of Life (iTOL) (LETUNIC; BORK, 2007), permitindo a visualização dos clados em diferentes cores

2.3. Docking molecular e mapeamento de interações

Para o docking molecular, a estrutura da sequência funcional de ICP-SMEL foi obtida a partir das previsões do AlphaFold (Gomes et al., 2023 – Capítulo 2 deste documento). A estrutura da metalocarboxipeptidase A (MCPA) bovina (*Bos taurus*), cadeia A, foi utilizada, correspondendo aos códigos PDB 1M4L (KILSHAIN-VARDI et al., 2003) e 4CPA (REES; LIPSCOMB, 1982). As simulações de docking foram realizadas usando os programas ClusPro 2.0 (KOZAKOV et al., 2017) e Haddock 2.2 (VAN ZUNDERT et al., 2016) com 4 metodologias diferentes, descritas na **C3 Tabela Suplementar 2**. Os parâmetros padrão dos programas foram utilizados, ou o docking foi direcionado com base em aminoácidos importantes para o mecanismo de inibição, tanto do sítio catalítico da MCPA bovina (ver **C3 Arquivo Suplementar 1**) quanto de regiões específicas de ICP-SMEL (ver **C3 Arquivo Suplementar 2**). Os arquivos em formato PDB, referentes às estruturas de ICP-SMEL e da MCPA, foram submetidos aos programas de acordo com cada direcionamento, e os complexos foram ranqueados com base no tamanho do cluster gerado para cada modelo. Os complexos resultantes foram visualizados e tiveram suas interações mapeadas.

A visualização e o mapeamento das interações moleculares dos complexos obtidos foram realizados no Discovery Studio 2021 (BIOVIA, 2021). Os complexos que apresentaram interações significativas entre ICP-SMEL e os aminoácidos do sítio

catalítico da MCPA, bem como aqueles em que ICP-SMEL se sobrepôs à região de ancoramento do ICP de batata na MCPA por alinhamento estrutural, foram selecionados para a simulação de dinâmica molecular (complexos apresentados na **C3 Tabela Suplementar 2**).

2.4. Dinâmica molecular (MD)

Os 14 complexos SMEL-MCPA selecionados por docking passaram por simulações de dinâmica molecular utilizando GROMACS 2020.4 (MANUAL, 2020) com o campo de força CHARMM36 (BEST et al., 2012; HUANG; MACKERELL, 2013). A protonação dos resíduos foi verificada com a plataforma PDB2PQR (JURRUS et al., 2018) (**Script 3**). Os sistemas foram preparados com os complexos centralizados em uma caixa retangular equidistante de 14 Å nas direções XYZ, solvatados, neutralizados e equilibrados com 0,1 M de NaCl (**Script 4**). Cada sistema foi submetido a uma réplica independente de dinâmica molecular de 100 ns com etapas de minimização de energia, equilíbrio e produção. Seis complexos com flutuações médias menores que 10 Å foram selecionados a partir do cálculo de RMSD (Desvio Médio Quadrático) e, desses, três foram escolhidos para simulações de MD em três réplicas de 500 ns, dos quais apenas dois (A e B) foram escolhidos para o estudo final do mecanismo de ação de ICP-SMEL.

As simulações foram realizadas no Cluster de computadores UNESP de Botucatu – especificações Cluster: Inter ® Xeon ® Gold 624R GPU @ 3.00Hz (48 processadores), 1.5 Tb de memória RAM, Placa Tesla P100 (16 Gb de memória RAM e 3584 cuda cores) – em parceria com o Professor Rafael Junqueira Borges (**Script 5, Script 6 e Script 7**). O processo de screening é apresentado na **C3 Tabela Suplementar 2**. Em todas as MDs, as trajetórias foram processadas, os frames foram analisados e as métricas de RMSD e RMSF (Flutuação Média Quadrática) foram calculadas usando ferramentas incorporadas do GROMACS e plotadas pelo programa GnuPlot versão 5.4 (**Script 8 e Script 9**). Para cada réplica (R1, R2 e R3) dos complexos finais (A e B), foram calculados os parâmetros de RMSD do complexo, da proteína e do peptídeo separadamente, bem como o RMSF da proteína e do peptídeo. A clusterização das estruturas foi realizada para obter um complexo representativo de todas as variações conformacionais adquiridas durante a simulação (**Script 7, Script 10 e Script 11**). Além disso, o mapeamento das interações foi realizado para os complexos finais e ao longo de cada MD, utilizando o Discovery Studio 2021 (BIOVIA,

2021) e o PLIP (**Script 12** e **Script 13**) (ADASME et al., 2021). Essas análises permitiram a caracterização do mecanismo molecular de interação entre ICP-SMEL e a MCPA.

2.5. Caracterização do perfil de interação físico-químico dos ICPs em MCPs

A árvore filogenética das sequências de aminoácidos dos novos ICPs das solanáceas foi dividida em subgrupos com base na proximidade filogenética. Um representante foi escolhido para cada subgrupo. A partir dessas sequências representativas e do mapeamento das interações dos complexos SMEL-MCPA resultantes do docking molecular e MD, foi proposto um perfil de interação. Nesse perfil, foram avaliadas as características físico-químicas dos aminoácidos dos novos ICPs das solanáceas que podem estar envolvidos na ancoragem desses peptídeos no sítio catalítico de metalocarboxipeptidases.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação de ICPs nos genomas das solanáceas

A busca de inibidores de carboxipeptidase nos genomas das solanáceas resultou na identificação 62 sequências inéditas distribuídas em 29 espécies dentro da família *Solanaceae*, abrangendo um total de 39 genomas analisados (**C3 Tabela 1**). Essa busca revelou uma maior abundância de ICPs na família *Solanaceae*, uma vez que poucas sequências de ICPs semelhantes são encontrados em outras famílias pertencentes ao reino *Viridiplantae*, ressaltando a especificidade desses peptídeos nas solanáceas. Contudo, vale mencionar que os ICPs também são encontrados em outras formas de vida, incluindo o reino *Animalia*.

C3 Tabela 1. Total de sequências de ICPs encontrados nos genomas das solanáceas.

Resultado geral prospecção dos ICPs	Total
Genomas das solanáceas com ICPs encontrados	29
Genomas das solanáceas sem ICPs encontrados	10
Genomas analisados	39
Sequências ICPs encontradas	62

Entre os animais, existem ICPs identificados em diversas espécies, como no parasita intestinal *Ascaris suum* (ACI) (SANGLAS et al., 2009), no sanguessuga *Hirudo medicinalis* (LCI) (REVERTER et al., 1998), nos carrapatos *Rhipicephalus bursa* (TCI) (AROLAS et al., 2005) e *Hemaphysalis longicornis* (H1TCI) (GONG et al.,

2007), bem como em espécies marinhas como *Nerita versicolor* (NvCI) (COVALEDA et al., 2012) e *Sabellastarte magnifica* (SmCI) (ALONSO-DEL-RIVERO et al., 2009). Além disso, os ICPs também foram encontrados em tecidos de mamíferos, como *Mus musculus* (ratos) e *Homo sapiens* (humanos) (ECI - inibidor endógeno da carboxipeptidase) (LIU et al., 2000).

A presença desses inibidores tanto em organismos vegetais quanto em animais pode indicar uma possível função conservada e importante ao longo da evolução para os ICPs, uma vez que eles inibem metaloproteases que são encontradas na maioria dos organismos e que exercem funções conservadas no metabolismo de eucariotos e procariotos (AULD, 2013; CHANDAN et al., 2022). Essa ampla distribuição dos ICPs em diferentes reinos, abrem novas perspectivas para explorar suas funções, em processos biológicos e aplicações biotecnológicas, principalmente como agentes de defesa.

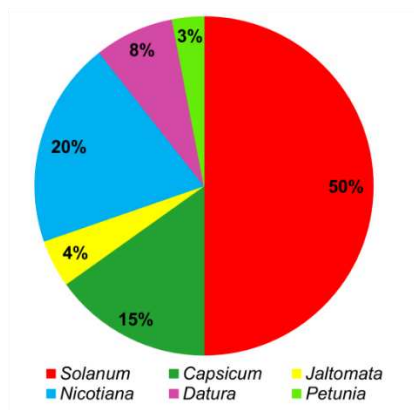
No genoma de 10 solanáceas (**C3 Tabela 1**) não foram encontradas sequências que se enquadrassem nos critérios de seleção, sendo elas *Solanum stenotomum subsp. goniocalyx*, *Solanum sitiens*, *Solanum pinnatisectum*, *Solanum phureja*, *Solanum pennellii*, *Solanum habrochaites*, *Solanum bukasovii*, *Solanum americanum*, *Nicotiana paniculata* e *Nicotiana knightiana*. A ausência de detecção pode ser atribuída principalmente à baixa qualidade de alguns genomas depositados (**C3 Tabela Suplementar 1**), os quais podem apresentar montagens fragmentadas, dificultando a identificação de sequências específicas.

Por outro lado, é importante ressaltar que outras sequências de ICPs podem ser identificadas na família *Solanaceae*, através de outras abordagens, como o depósito direto de sequências em bancos de dados de proteínas. Um exemplo disso são as sequências abordadas no capítulo 1, que abrangem ICPs principalmente de *Solanum tuberosum* e *Solanum lycopersicum* provenientes de diferentes bancos de dados, como o Uniprot (BATEMAN et al., 2021) e o KNOTTIN (POSTIC et al., 2018). A concentração de pesquisas dos ICPs em poucas espécies de solanáceas, destacam a importância da prospecção dessas novas sequências para se aprofundar o conhecimento sobre os ICPs na família *Solanaceae*. O estudo com novos ICPs, como os aqui identificados podem fornecer perspectivas valiosas sobre a diversidade funcional desses inibidores e suas potenciais aplicações biotecnológicas.

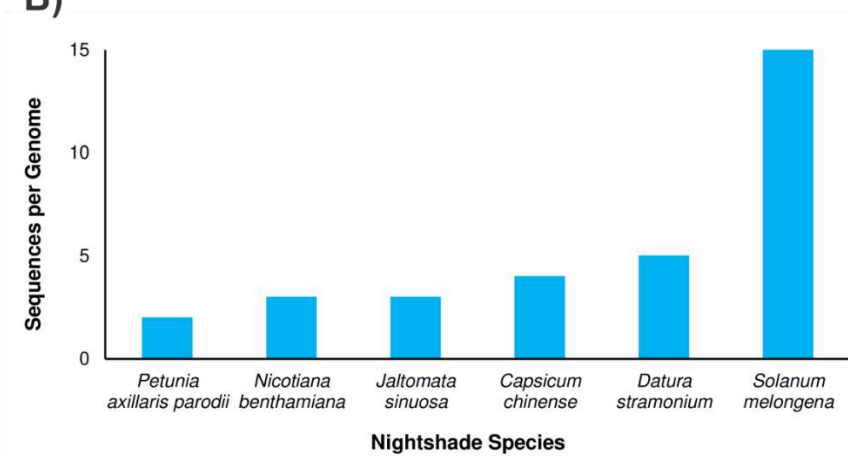
As sequências de ICPs encontradas abrangem seis gêneros da família *Solanaceae* (**C3 Figura 1A**). Dentre esses gêneros, *Solanum*, *Nicotiana* e *Capsicum*

se destacaram com as maiores porcentagens de ICPs, com 29 encontradas em treze espécies para o gênero *Solanum*, 13 sequências em dez espécies para o gênero *Nicotiana* e 10 ICPs em três espécies para o gênero *Capsicum* (**C3 Figura Suplementar 1**). As espécies que apresentaram a maior quantidade de ICPs nesses três gêneros foram *Solanum melongena*, *Capsicum chinense* e *Nicotiana benthamiana*. Em contraste, os outros três gêneros representados por apenas uma espécie cada, foram encontrados com cinco sequências em *Datura stramonium*, três sequências em *Jaltomata sinuosa* e duas sequências em *Petunia axillaris parodii* (**C3 Figura 1B**).

A)



B)



C3 Figura 1. Distribuição de Sequências de ICPs em solanáceas. **A)** Gráfico do percentual de sequências de ICPs por gênero, com a proporção de sequências de ICPs encontradas em seis diferentes gêneros de solanáceas. **B)** Sequências de ICPs por genoma de espécies representativas. Apresenta a contagem de sequências de ICPs identificadas em cada genoma de espécies representativas dos gêneros mencionados.

Dentre as solanáceas, na espécie de *S. melongena* (berinjela) foi encontrado um alto número de isoformas de ICPs, sendo identificadas 14 sequências inéditas do inibidor (**C3 Figura 1B**, **C3 Figura Suplementar 1**). Esse achado reforça a

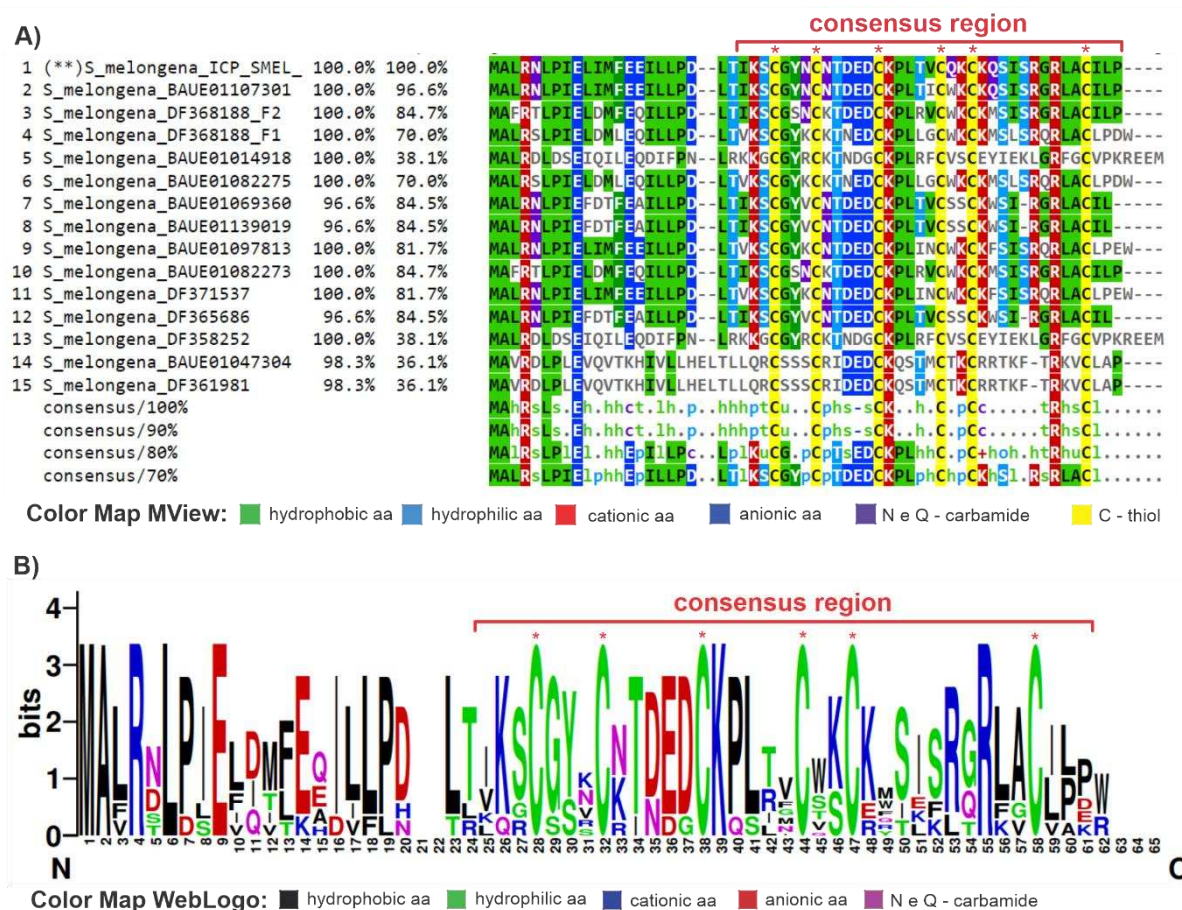
importância desses peptídeos para a defesa da planta, uma vez que estudos anteriores apontam uma grande variedade de genes de resistência expressos pela berinjela (Yang et al., 2014). O alto número de cópias de ICPs encontrados nessa solanácea sugere um potencial de indução de resistência o que já foi relatado para ICPs em batata contra fungos e insetos, bem como alto potencial de ação como antimicrobianos, o que já foi demonstrado para o extrato peptídico, a partir do qual ICP-SMEL foi identificado (ABDEEN et al., 2005; ALMEIDA et al., 2008; QUILIS et al., 2014).

Outras espécies analisadas na busca também possuem ICPs previamente caracterizados com atividade inibitória em carboxipeptidase A. Por exemplo, foram encontradas novas sequências de ICPs em *C. annum*, enquanto *S. lycopersicum* e *S. tuberosum* não apresentaram outras sequências de ICPs além das já conhecidas (COTABARREN et al., 2018; HASS; RYAN, 1981a,b). *Datura stramonium* e *Solanum clarkiae* também se destacaram, cada uma com cinco novos ICPs identificados. Além disso, o banco de dados do KNOTTIN (POSTIC et al., 2018), que é um repositório específico de sequências de AMPs pertencentes à classe cystine-knot, contém várias sequências de ICPs de solanáceas depositadas. Isso ressalta a abundância e variedade desses peptídeos nas solanáceas, além de indicar a possível atuação dos ICPs como importantes moléculas antimicrobianas, incluindo espécies não abordadas neste estudo, como *Solanum brevidens* e *Solanum chacoense*.

Nesse sentido, as moléculas de ICPs encontradas nas solanáceas podem desempenhar um papel na resistência dessas plantas contra patógenos, bem como agirem como AMPs. Estudos anteriores relataram que extratos ricos em peptídeos das espécies dos gêneros *Solanum*, *Capsicum* e *Nicotiana*, bem como alguns ICPs caracterizados, apresentam atividade inibitória contra bactérias e fungos fitopatogênicos (ALMEIDA et al., 2008; AFROZ et al., 2020, QUILIS et al., 2007). Além disso, a presença comum de genes de resistência na família *Solanaceae* sugere uma relação potencial entre os ICPs e a resistência das plantas a infecções (GRUBE; RADWANSKI; JAHN, 2000; KIM et al., 2009). Vários estudos discutem o potencial uso dos inibidores de protease vegetais como moduladores da fisiologia vegetal, indutores de resistência em plantas e como agentes antimicrobianos (DUNAEVSKY et al., 2005; COTABARREN et al., 2020; TURRÀ; LORITO). Como exemplo, a indução de resistência em tomateiro (*S. lycopersicum*) e arroz (*Oryza sativa*) pela expressão do ICP de *S. tuberosum*, bem como a respectiva ação antifúngica desse ICP (ABDEEN

et al., 2005; QUILIS et al., 20014). Nesse contexto, esses peptídeos mostram-se moléculas promissoras para estudos de diferentes estratégias de controle de fitopatógenos.

3.2. Características de conservação dos novos ICPs das solanáceas



C3 Figura 2. Conservação das sequências ICPs identificadas em *Solanum melongena*. **A)** Alinhamento da região de maior similaridade dos ICPs identificados em *S. melongena* a partir das buscas nos genomas. O alinhamento global foi gerado no Clustal Omega e visualizado no software MView (MView 1.63, Copyright © 1997-2018 Nigel P. Brown). Os consensos 100%, 90%, 80% e 70% evidenciam a conservação entre sequências alinhadas. **Mapa de cores MView** mostra os padrões de semelhança de aminoácidos (aa) por suas características químicas: **h** (aa hidrofóbico); **o** (aa função orgânica álcool); **p** (aa polar); **s** (aa pequeno); **t** (aa região de volta); **c** (aa carregados); **l** (aa alifáticos); **u** (aa região de ponta). **cov.:** porcentagem de cobertura; **pid.:** porcentagem de identidade.. (**) indica a sequência de ICP-SMEL utilizada como modelo para a busca de outras sequências ICPs nos genomas de espécies da família *Solanaceae*. **B)** Logotipo gerado pelo software WebLogo do alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos dos ICPs de *S. melongena*, evidenciando a maior conservação dos ICPs encontrados no genoma dessa planta. O gráfico gerado indica a frequência relativa dos aminoácidos mais comuns em cada posição do alinhamento múltiplo das sequências dos ICPs (<https://weblogo.berkeley.edu/>); no eixo horizontal é apresentado a numeração de cada posição dos aminoácidos no alinhamento, em que **N** indica o N-terminal correspondente ao início do alinhamento e **C** o C-terminal correspondente ao fim do alinhamento; no eixo vertical é indicado os **bits** variando de 0 a 4 que corresponde a frequência dos aminoácidos em cada posição. **Mapa de cores WebLogo** evidencia os aminoácidos (aa) conservados coloridos em diferentes cores de acordo com a classificação dos aminoácidos pelas características físico-químicas. Em **A** e **B** região consenso entre as sequências é marcada pela barra vermelha e evidencia a parte da sequência de ICP-SMEL que

corresponde a sua sequência funcional e a conservação de posição das cisteínas é indicada por * em vermelho.

Os ICPs identificados em *S. melongena* apresentam alta variabilidade entre as sequências, com identidade variando entre 28,6% e 96,6% (**C3 Figura 2A**). No entanto, esses ICPs também são altamente conservados em relação aos padrões de características físico-químicas dos aminoácidos, especialmente na região consenso que destaca a sequência bioativa de ICP-SMEL, onde há uma maior frequência de um mesmo aminoácido em cada posição (**C3 Figura 2B**). Os consensos gerados para esses ICPs, com limiares de 100% a 70% de alinhamento, também apontam para a conservação de cargas positivas e negativas, além de características mais hidrofóbicas dos aminoácidos na região C-terminal. Outra característica comum a todas as cópias de ICP dessa espécie é a conservação da posição das seis cisteínas presentes em todas as sequências.

A análise de alinhamento múltiplo global com todas as novas sequências encontradas na família *Solanaceae* também revelou uma alta variabilidade entre os ICPs, com identidade variando entre 11,7% e 96,6% (**C3 Figura Suplementar 2**). Neste caso, os principais padrões de conservação são a posição de cinco das seis cisteínas na maioria das sequências e o aminoácido glutâmico na posição 13 da região consenso destacada, bem como alguns padrões de características físico-químicas de aminoácidos observados nos consensos de 100% a 70% na região entre as cisteínas I e V.

Os dados obtidos sobre a alta variabilidade nas sequências de CPIs indicam uma resposta adaptativa dessas plantas em relação a diferentes patógenos e ou herbívoros. A conservação de resíduos de cisteína e padrões de aminoácidos nas sequências de CPIs destaca regiões importantes para a atividade dessas moléculas, o que pode ser essencial para sua eficácia como inibidores de protease. Além disso, a presença de um resíduo de ácido aspártico em uma posição específica é um traço distintivo dos CPIs das solanáceas, reforçando sua relevância na defesa das plantas.

Os padrões de conservação sugerem duas classificações distintas para essas novas sequências. A primeira delas considera a conservação da posição das seis cisteínas na maioria dos novos ICPs encontrados, o que sugere que essas moléculas podem pertencer à família de peptídeos cisteíno-knot lineares. (**C3 Figura Suplementar 2**). Essa classe é caracterizada pela conservação de três pontes dissulfetos que conectam os resíduos de cisteína I-IV, II-V e III-VI. Os peptídeos

cisteíno-knot lineares de plantas têm sido descritos por apresentarem atividade inibitória contra exo e endopeptidases, incluindo metalo carboxipeptidases e serino proteases (MOLESINI et al., 2017). O ICP da batata (controle apresentando **C3 Figura Suplementar 2**) foi o primeiro inibidor apontado como pertencente à classe cisteíno-knot em plantas (REES; LIPSCOMB, 1980). Outros ICPs da família *Solanaceae*, também são incluídos nessa classe e são caracterizados principalmente para *S. tuberosum* e *S. lycopersicum* (PEAR et al., 1989; MOLNÁR et al., 2001), os quais podem ser encontrados no banco de dados KNOTTIN (<http://knottin.cbs.cnrs.fr>).

A segunda classificação é a discutida no Capítulo 1 (GOMES; ESPÓSITO; BARACAT-PEREIRA, 2023) e considera o motivo global de sequência CXXXCXXXXDCXXXXXCXXC, que descreve a conservação dos padrões de aminoácidos na região entre cisteínas I-V, onde "X" representa qualquer aminoácido. Essa classificação sugere a inserção dos novos ICPs em uma nova subclasse de inibidores de protease da família PR-6 de proteínas relacionadas a patogênese de plantas (SELS et al., 2008), na qual os inibidores de carboxipeptidase de solanáceas são descritos em uma subclasse específica devido às suas características particulares. Essa classificação é de alta importância, pois enfatiza a relevância dos ICPs como moléculas de defesa específicas em plantas, com maior predominância na família das solanáceas.

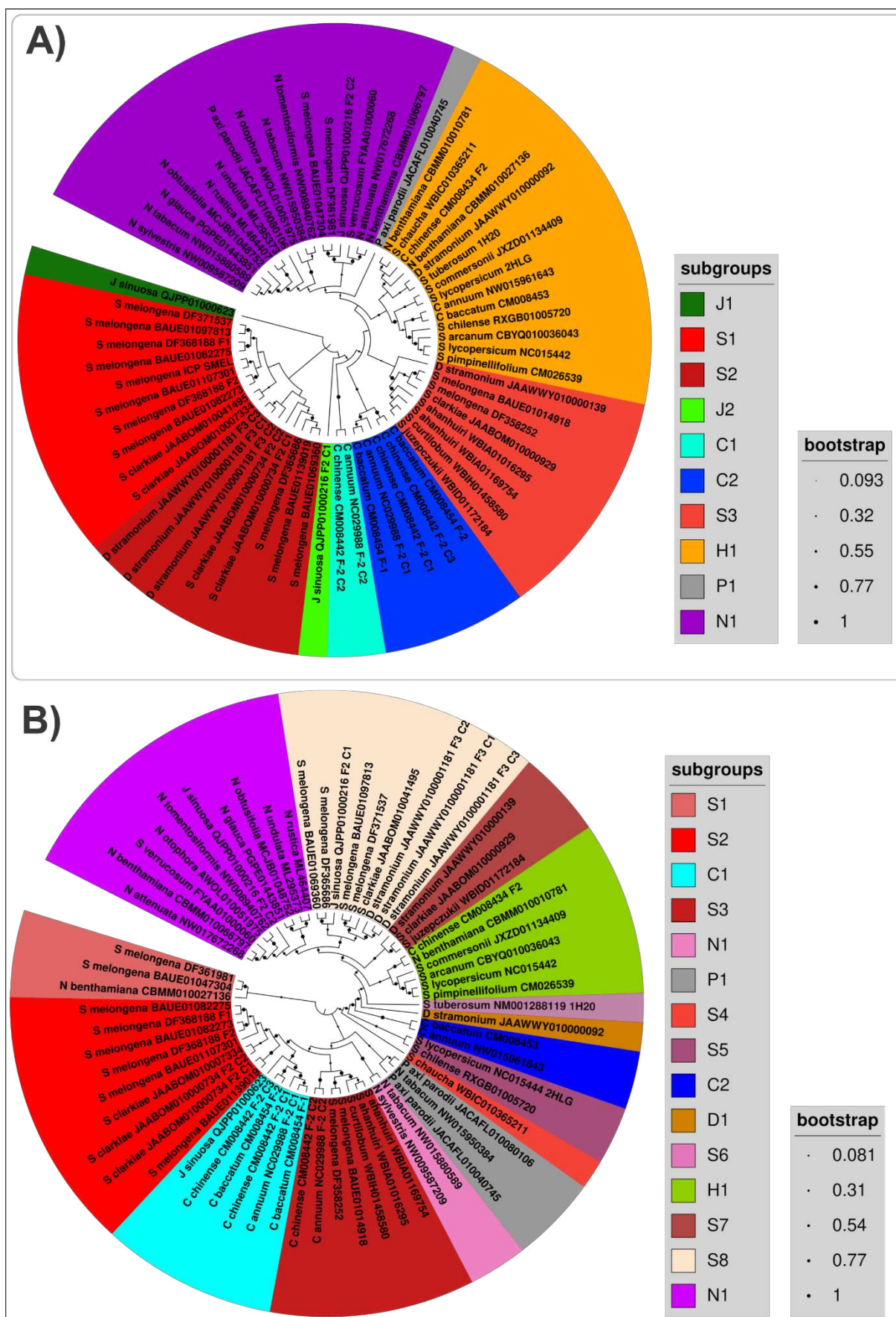
A classificação dos ICPs por dois padrões distintos de sequência, uma pertencente à classe de peptídeos cisteíno-knot lineares e outra caracterizada pela nova subclasse de inibidores de protease da família PR6, ressalta a diversidade funcional dessas moléculas e reafirma o potencial de ação dos ICPs como peptídeos antimicrobianos. Isso pode ser relevante para o desenvolvimento de estratégias de manejo integrado de pragas, onde a combinação de diferentes ICPs pode aumentar a eficiência do controle de patógenos e evitar o desenvolvimento de resistência.

3.3. Relações filogenéticas dos novos ICPs das solanáceas

A árvore filogenética das sequências de aminoácidos dos ICPs das solanáceas (**C3 Figura 3A**) fornece informações sobre a relação evolutiva entre esses inibidores nas diferentes espécies da família *Solanaceae*, em que os ICPs estão distribuídos de forma específica por gênero de plantas, mostrando maior proximidade evolutiva e similaridade entre as sequências do mesmo gênero e maior divergência e distanciamento evolutivo para gêneros diferentes. Essa distribuição é claramente

evidenciada em clados específicos, como S1, S2 e S3 para o gênero *Solanum*, C1 e C2 para o gênero *Capsicum* e N1 para o gênero *Nicotiana*. Os padrões de relação evolutiva também são corroborados pela árvore filogenética das sequências de nucleotídeos (**C3 Figura 3B**). Embora haja redistribuição dos ICPs em mais de um subgrupo gênico na árvore de nucleotídeos, o padrão de separação dos clados por grupos para cada gênero é mantido. Por exemplo, as sequências de ICPs pertencentes aos clados S1, S2 e S3 do gênero *Solanum* na árvore de aminoácidos são redistribuídas entre os clados de S1 a S8 na árvore de nucleotídeos, mas mantêm a proximidade evolutiva com as sequências dos gêneros *Capsicum* (C1 e C2) e mais distante com as de *Nicotiana* (N1) (**C3 Tabela Suplementar 3**).

Os valores de bootstrap elevados nos ramos das árvores reforçam a confiabilidade dos resultados das análises de relação evolutiva dos diferentes clados. Isso significa que os agrupamentos e a proximidade entre as sequências de ICPs em cada clado são suportados estatisticamente, aumentando a validade dos resultados obtidos. Além disso, a relação evolutiva dos ICPs reflete a relação de proximidade e distanciamento evolutivo das espécies de diferentes gêneros nas solanáceas. Os ICPs dos clados *Solanum*, *Jaltomata* e *Capsicum* são mais próximos evolutivamente, enquanto os do clado *Nicotiana* são mais distantes. Essa observação é reforçada pela maior identidade média de sequências entre espécies de *Solanum melongena* e *Capsicum annum* em comparação com a menor identidade média entre *Solanum melongena* e *Nicotiana tabacum* (**C3 Figura 3A**, **C3 Figura Suplementar 2**).

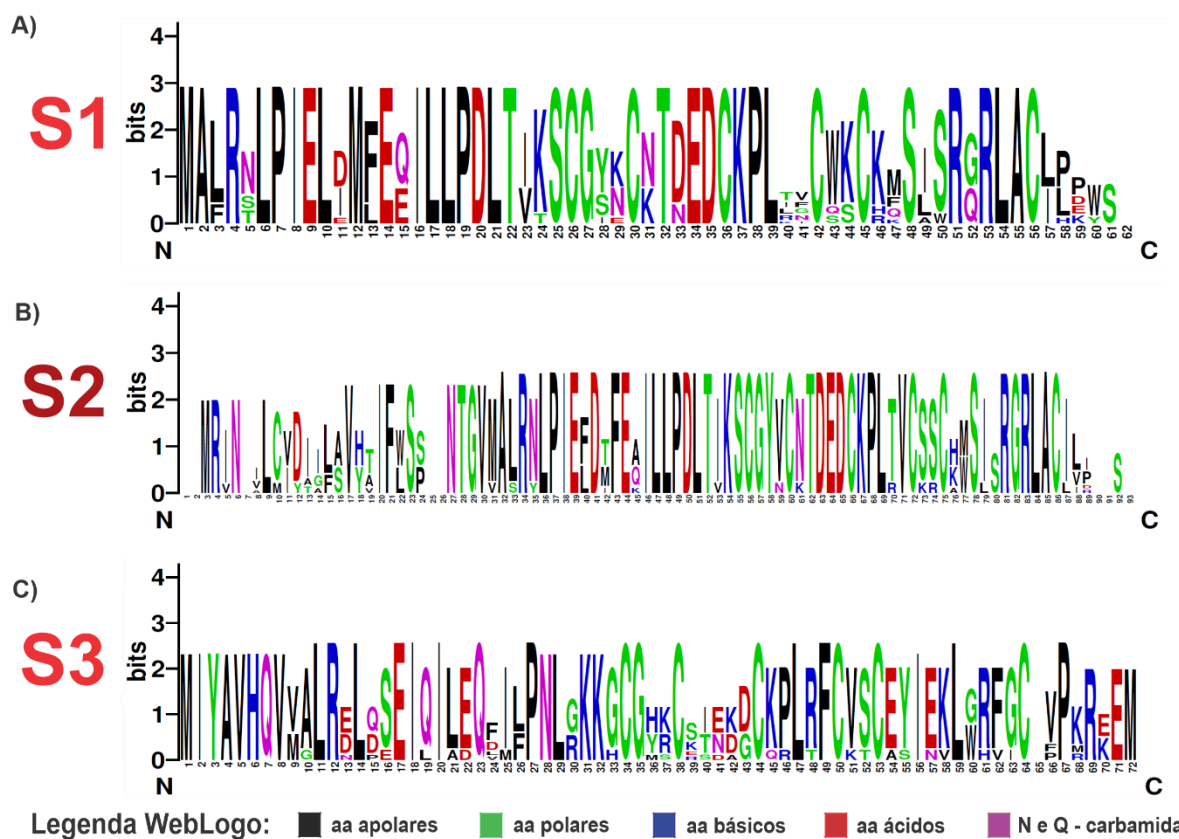


C3 Figura 3. Árvores filogenéticas ICPs das solanáceas. **A)** Árvore filogenética das seqüências de aminoácidos dos ICPs das solanáceas. **B)** Árvore filogenética das seqüências de nucleotídeos dos ICPs das solanáceas. Cada cor representa um subgrupo de seqüências separados de acordo com os

clados gerados. Os valores de Bootstrap nos ramos variam na escala de 0 a 1 e são representados pelo símbolo circular em preto. As letras representantes para cada subgrupo são referentes ao gênero de solanácea com maior número de sequências em cada subgrupo, em que S refere-se a *Solanum*, C a *Capsicum*, N a *Nicotiana*, J a *Jaltomata*, P a *Petunia* e H refere-se a heterogêneo uma vez que nesse subgrupo são apresentadas sequências de diferentes gêneros.

O trabalho de Olmstead et al. (2008) fornece evidências consistentes que corroboram as relações evolutivas observadas nas árvores de aminoácidos e nucleotídeos dos ICPs em solanáceas. As descobertas desse estudo demonstraram que as espécies de solanáceas pertencentes aos gêneros *Solanum* e *Capsicum* possuem relações evolutivas mais próximas, agrupando-se em clados e ramos mais próximos, enquanto o gênero *Nicotiana* apresenta maior distanciamento evolutivo. Além disso, a distribuição dos ICPs nos subgrupos C1 e C2 segue a mesma relação filogenética observada entre as espécies dentro do gênero *Capsicum* (WALSH; HOOT, 2001), e o subgrupo N1 segue a mesma relação no gênero *Nicotiana* (CLARKSON et al., 2004). A heterogeneidade do subgrupo H1, representado por diferentes gêneros de solanáceas, também é relevante para entender a diversidade dos ICPs entre as espécies. A consistência das relações filogenéticas, respaldada por outros trabalhos, fortalece a confiabilidade dos resultados das análises filogenéticas dos ICPs neste estudo. Nesse contexto, o entendimento dessas relações evolutivas é fundamental para compreender a diversidade desses inibidores entre as solanáceas.

As análises filogenéticas dos ICPs em solanáceas revelam padrões distintos de relacionamento evolutivo entre as diferentes espécies. Os ICPs de *S. melongena* são predominantemente encontrados nos clados S1 e S2, e são muito próximos evolutivamente aos ICPs de *S. clarkiae* e de *D. stramonium*, pertencentes aos mesmos clados filogenéticos e apresentando alta similaridade entre suas sequências. Cada subgrupo filogenético caracterizado possui padrões de conservação, com alta identidade entre as sequências e alta frequência de aminoácidos específicos em cada posição ao longo das sequências. Essa característica é apresentada na **C3 Figura 4** para os subgrupos S1, S2 e S3, específicos para o gênero *Solanum*. Esse mesmo padrão é característico para os subgrupos, C1, C2 e N1 gerados pela árvore. Os subgrupos de *J. sinuosa* (J1 e J2) e de *P. axillaris parodii* (P1) são representados apenas por uma sequência, sendo J1 e J2 mais próximos do gênero *Solanum* e P1 do gênero *Nicotiana*. As solanáceas *Jaltomata* são consideradas irmãs das solanáceas *Solanum* e a espécie *P. axillaris* é próxima evolutivamente das espécies de *Nicotiana* (OLMSTEAD et al., 2008).



C3 Figura 4. Subgrupos filogenéticos da árvore de aminoácidos do gênero *Solanum*. **A)** Subgrupo S1 específico do gênero *Solanum*. **B)** Subgrupo S2 representado por dois gêneros *Solanum* e *Datura*. **C)** Subgrupo S3 representado predominantemente pelo gênero *Solanum* e um representante do gênero *Datura*. Em **A**, **B** e **C**, observa-se o logotipo gerado pelo software WebLogo do alinhamento múltiplo das sequências de ICPs de cada subgrupo filogenético específico S1, S2 e S3. O gráfico gerado indica a frequência relativa dos aminoácidos mais comuns em cada posição do alinhamento das sequências (<https://weblogo.berkeley.edu/>). No eixo horizontal é apresentado a numeração de cada posição dos aminoácidos no alinhamento, em que N indica o N-terminal correspondente ao início do alinhamento e C o C-terminal correspondente ao fim do alinhamento. No eixo vertical é indicado os bits variando de 0 a 4 que corresponde a frequência dos aminoácidos em cada posição. **Mapa de cores WebLogo:** evidencia os aminoácidos (aa) conservados coloridos em diferentes cores de acordo com a classificação dos aminoácidos pelas características físico-químicas.

O subgrupo S3, representado por diferentes espécies do gênero *Solanum*, incluindo duas sequências de ICPs de *S. melongena* (BAUE01014918 e DF358252), pode ser considerado como o grupo basal que relaciona os ICPs de *S. melongena* com as outras espécies de *Solanum*, os subgrupos H1 e N1, bem como com os peptídeos controle 1H20 e 2HLG. Esses ICPs basais podem ter dado origem a sequências menores e mais adaptadas para a função de inibição por meio de processos de divergência evolutiva ainda desconhecidos.

A relação evolutiva dos ICPs nas solanáceas ainda é pouco estudada, mas estudos anteriores, como o de Manara et al. (2020), demonstram que quanto maior a similaridade entre os inibidores, maior é a proximidade evolutiva entre eles. Os resultados filogenéticos para os novos ICPs das solanáceas descritos neste estudo

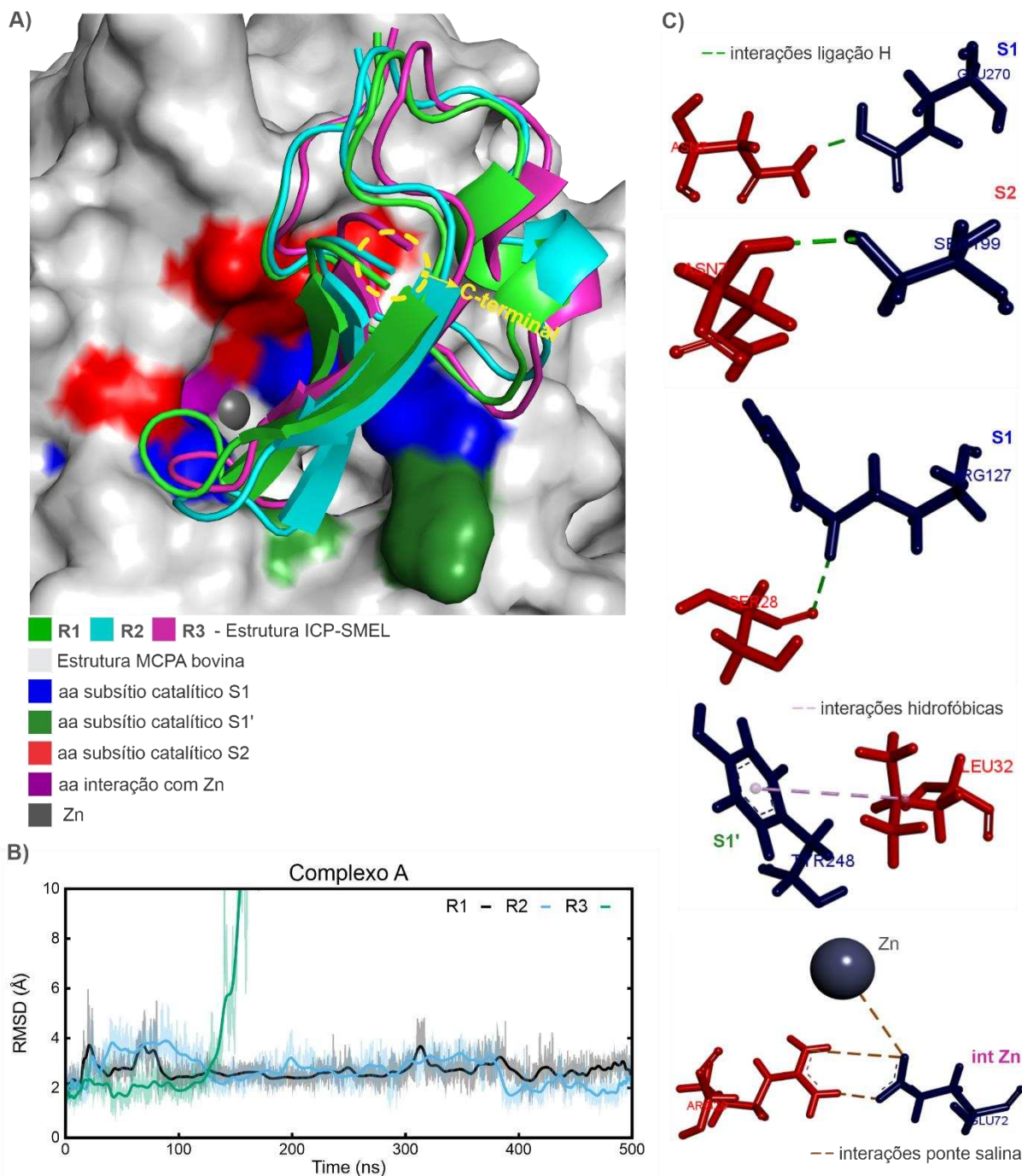
corroboram essa ideia, apontando para uma expansão gênero-específica desses ICPs, sendo mais abundantes na família *Solanaceae* em *Viridiplantae* e conservados de forma específica para cada gênero. Essa expansão e a menor frequência desses peptídeos em outras plantas sugerem que essa família de peptídeos bioativos foi adquirida mais recentemente na evolução dessas plantas.

Notavelmente, a espécie *S. melongena* apresenta uma maior expansão desses inibidores, com um alto número de cópias de ICPs encontrados apenas nessa espécie. Comparando com outros ICPs das solanáceas estudados, *somente S. tuberosum* e *S. lycopersicum* também demonstram um alto número de cópias desses peptídeos (GOMES; ESPÓSITO; BARACAT-PEREIRA, 2023), caracterizando essa maior expansão exclusivamente para o gênero *Solanum*. Isso sugere uma aquisição e adaptação de expressão desses peptídeos primeiramente para as solanáceas desse gênero na família.

Essas descobertas filogenéticas proporcionam perspectivas valiosas sobre a evolução e a diversificação dos ICPs em solanáceas. A compreensão dessas relações evolutivas é essencial para desvendar a complexidade desses peptídeos e como eles desempenham seu papel na defesa das plantas contra patógenos. Além disso, essas informações podem ser úteis para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas voltadas para o manejo sustentável de fitopatógenos.

3.4. Mecanismo de inibição ICP-SMEL

A caracterização do inibidor de carboxipeptidase de *Solanum melongena*, denominado ICP-SMEL, a partir de um extrato antimicrobiano das folhas da variedade Florida Market de berinjela, revelou um grande potencial para sua utilização como agente antimicrobiano, conforme documentado no Capítulo 2 (ALMEIDA et al., 2023). Com o intuito de obter uma compreensão mais aprofundada do mecanismo de ação do ICP-SMEL e direcionar aplicações mais refinadas, seu mecanismo molecular de inibição foi minuciosamente caracterizado por meio de técnicas de docking e dinâmica molecular, tendo como alvo a metalocarboxipeptidase de *Bos taurus* (ou bovina), uma proteína já reconhecida como alvo de inibição do ICP de batata (REES; LIPSCOMB, 1982).



C3 Figura 5. Complexo A: Interação entre ICP-SMEL de *Solanum melongena* e a metalocarboxipeptidase de *Bos taurus* (MCPA). **A)** Visualização da estrutura do complexo A SMEL-MCPA, composta pelas réplicas R1, R2 e R3 derivadas da simulação de dinâmica molecular (MD). A sobreposição das três réplicas destaca a ligação das moléculas de ICP-SMEL no sítio catalítico da MCPA, representado em superfície tridimensional. Os subsítios catalíticos da MCPA, S1, S1', S2 e Int Zn (local de interação com o cofator Zn), são apresentados em cores distintas. As estruturas de ICP-SMEL são apresentadas em formato cartoon, enquanto o cofator Zn é exibido como uma esfera. **B)** Gráfico de RMSD (Desvio Quadrático Médio) ao longo da simulação de dinâmica de MD do complexo A SMEL-MCPA. O RMSD revela a flutuação conformacional das réplicas R1 e R2, que estabilizam em torno de 4 Å durante os 500 ns de simulação. Por outro lado, a réplica R3 exibe desassociação de ICP-SMEL da MCPA, indicada pelo aumento súbito do RMSD após 100 ns.. **C)** Interações identificadas nas três réplicas do complexo A ao longo da simulação de MD. As interações específicas entre os aminoácidos de ICP-SMEL e os aminoácidos dos subsítios S1, S1', S2 e Int Zn da MCPA são destacadas. Essas interações abrangem ligações de hidrogênio, pontes salinas e interações hidrofóbicas. Os aminoácidos de ICP-SMEL são destacados em vermelho, enquanto os aminoácidos

da MCPA são mostrados em azul escuro. Para cada interação, são indicados o subsítio dos aminoácidos da MCPA envolvidos e o tipo de interação correspondente.

Os resultados das análises de docking e dinâmica molecular revelaram duas possíveis formas, nomeadas nesta tese como A e B, de interação do ICP-SMEL com a carboxipeptidase A bovina, com o inibidor se ancorando na região do sítio ativo da MCPA por meio de múltiplas interações. Os complexos A e B detalham a interação do ICP-SMEL no sítio catalítico da MCPA através de diferentes tipos de interações intermoleculares, incluindo ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas do tipo ponte salina e interações hidrofóbicas nos subsítios S1, S1' e S2, bem como com os resíduos de aminoácidos do subsítio responsável por coordenar o átomo de zinco, o cofator da enzima (**C3 Figura 5** e **C3 Figura 6**). Esses achados sugerem uma inibição competitiva da carboxipeptidase A bovina pelo ICP-SMEL da berinjela, com duas possíveis formas de ancoragem na MCPA, ambas envolvendo os mesmos aminoácidos dos subsítios catalíticos da peptidase, mas interagindo em regiões distintas da estrutura peptídica.

O sítio catalítico de zinco das metaloproteases é formado pela interação de três átomos de nitrogênio de resíduos de histidina e um átomo de oxigênio do resíduo de glutamato (motivo HxxE), uma característica comum das carboxipeptidases A pertencentes à família M14 de metaloproteases. Os resíduos essenciais para a catálise e ligação do substrato são agrupados em cinco subsítios: S1' (N144, R145, Y248 e Xaa255), que é comum a todas as MCPs da família M14 e é responsável por fixar e neutralizar o grupo carboxila do substrato; S1 (R127, L1247 e E270); S2 (R71, D142, S197, Y198 e S199); S3 (F279); e S4 (E122, R124 e K128), sendo esses últimos importantes para a ligação e catálise (AULD, 2013). As interações do ICP-SMEL na MCPA nos três dos cinco subsítios mencionados, cruciais para a função catalítica, reforçam o mecanismo de inibição pelo ICP-SMEL, uma vez que envolvem aminoácidos determinantes no mecanismo de ação dessa metalocarboxipeptidase.

O complexo de interação A SMEL-MCPA exibe uma notável estabilidade no encaixe do inibidor à peptidase, evidenciado pela sobreposição na mesma posição das três réplicas de cluster do peptídeo resultantes da simulação de dinâmica molecular (**C3 Figura 5A**). O plot de RMSD reforça a alta estabilidade de duas das três simulações independentes de dinâmica molecular para o complexo. As flutuações conformacionais do complexo se estabilizam em torno de 4 Å, destacando uma associação sólida entre a enzima e o inibidor, indicando uma interação substancial.

Contudo, a avaliação do RMSD para a réplica R3 revela uma dissociação do complexo, indicando uma conformação energeticamente menos estável e com interações mínimas entre a enzima e o inibidor, evidenciada pelo abrupto aumento nos valores de RMSD (**C3 Figura 5B**). Essa desassociação pode estar relacionada a uma situação energética da interação que marca o momento de desassociação da enzima, com a saída do ICP-SMEL. Nesse momento, tanto o inibidor quanto a enzima adquirem uma gama de conformações estruturais desfavoráveis durante um breve período, necessário para que o complexo se desfça. Para melhor compreender esse processo, seria interessante desenvolver estudos físico-químicos que investigassem a energia livre de associação e dissociação do complexo.

Em relação às interações, o ICP-SMEL se ancora na MCPA por meio de duas regiões distintas de sua estrutura, denominadas R1-(A) (composta pelos resíduos Y6, N7 e N9) e R2-(B) (envolvendo os resíduos S28, R29, G30, R31 e L32). As interações intermoleculares entre esses resíduos do inibidor e a MCPA incluem múltiplas ligações de hidrogênio com os resíduos R127, I247 e E270 do subsítio S1, bem como N144, R145 e Y248 do subsítio S1', R71, Y198 e S199 do subsítio S2. Além disso, algumas interações hidrofóbicas são formadas com os resíduos I247 e Y248 dos subsítios S1 e S1', e uma interação do tipo pi-cátion ocorre com o F279 do subsítio S3. As interações eletrostáticas mais fortes, do tipo ponte salina, são observadas entre os grupos positivos das argininas 29 e 31 do ICP-SMEL e os grupos negativos dos glutamatos 72 e 270 da MCPA. Essas interações foram mantidas em relativa abundância nas réplicas R1 e R2 ao longo de toda a dinâmica molecular, persistindo até a dissociação do complexo na réplica R3 (**C3 Figura 5C, C3 Tabela 2**). A excepcional estabilidade do complexo evidencia um forte ancoramento do ICP-SMEL no sítio ativo da enzima, com as interações peptídeo-substrato se mantendo consistentes através de uma alternância de interações entre os aminoácidos de cada subsítio. Essas interações sustentaram níveis elevados de estabilidade, considerando o total de 500 ns de simulação de dinâmica molecular.

C3 Tabela 2. Abundância de interações encontradas ao longo da MD de 500ns presentes nas 3 réplicas do complexo A SMEL-MCPA.

Complexo A			
Interações ^a (SMEL-MCPA)	Porcentagem (%)	Categoria	SC ^b MCPA
ASN7:CB-ILE247:CG2	17.4	Hidrofóbica	S1
ASN7:CB-ILE247:CD	15.1	Hidrofóbica	S1

LEU32:CD1-TYR248:CD1	22.3	Hidrofóbica	S1'
LEU32:CG-TYR248:CB	11.1	Hidrofóbica	S1'
CYS4:O-TYR198:OH	10.0	Ligação de Hidrogênio	S2
GLY5:O-TYR198:OH	25.1	Ligação de Hidrogênio	S2
ASN7:N-SER199:OG	70.8	Ligação de Hidrogênio	S2
CYS8:O-TYR248:N	19.3	Ligação de Hidrogênio	S1'
ASN9:ND2-ILE247:O	16.7	Ligação de Hidrogênio	S1
GLN25:NE2-TYR248:OH	15.6	Ligação de Hidrogênio	S1
SER28:O-ARG127:NH1	28.4	Ligação de Hidrogênio	S1
SER28:OG-ARG71:NH1/A	23.2	Ligação de Hidrogênio	S2
SER28:O-ARG71:NH1	14.0	Ligação de Hidrogênio	S2
SER28:O-ARG71:NH2	11.3	Ligação de Hidrogênio	S2
ARG29:O-ARG145:NH1	29.4	Ligação de Hidrogênio	S1'
ARG29:O-ARG145:NH2	28.7	Ligação de Hidrogênio	S1'
ARG29:NH2-SER197:O	27.9	Ligação de Hidrogênio	S2
ARG29:NH2-TYR198:N	18.9	Ligação de Hidrogênio	S2
ARG29:NH2-TYR198:OH	12.8	Ligação de Hidrogênio	S2
ARG31:NH2-ASN144:OD1	15.3	Ligação de Hidrogênio	S1'
ARG31:NH1-ASN144:OD1	12.8	Ligação de Hidrogênio	S1'
LEU32:N-ILE247:O	10.9	Ligação de Hidrogênio	S1
ARG29-GLU72	36.2	Ponte Salina/Eletrostática	Int Zn ^b
ARG29-PHE279	16.8	Pi-Cátion	S3
ARG31-GLU270	12.5	Ponte Salina/Eletrostática	S1

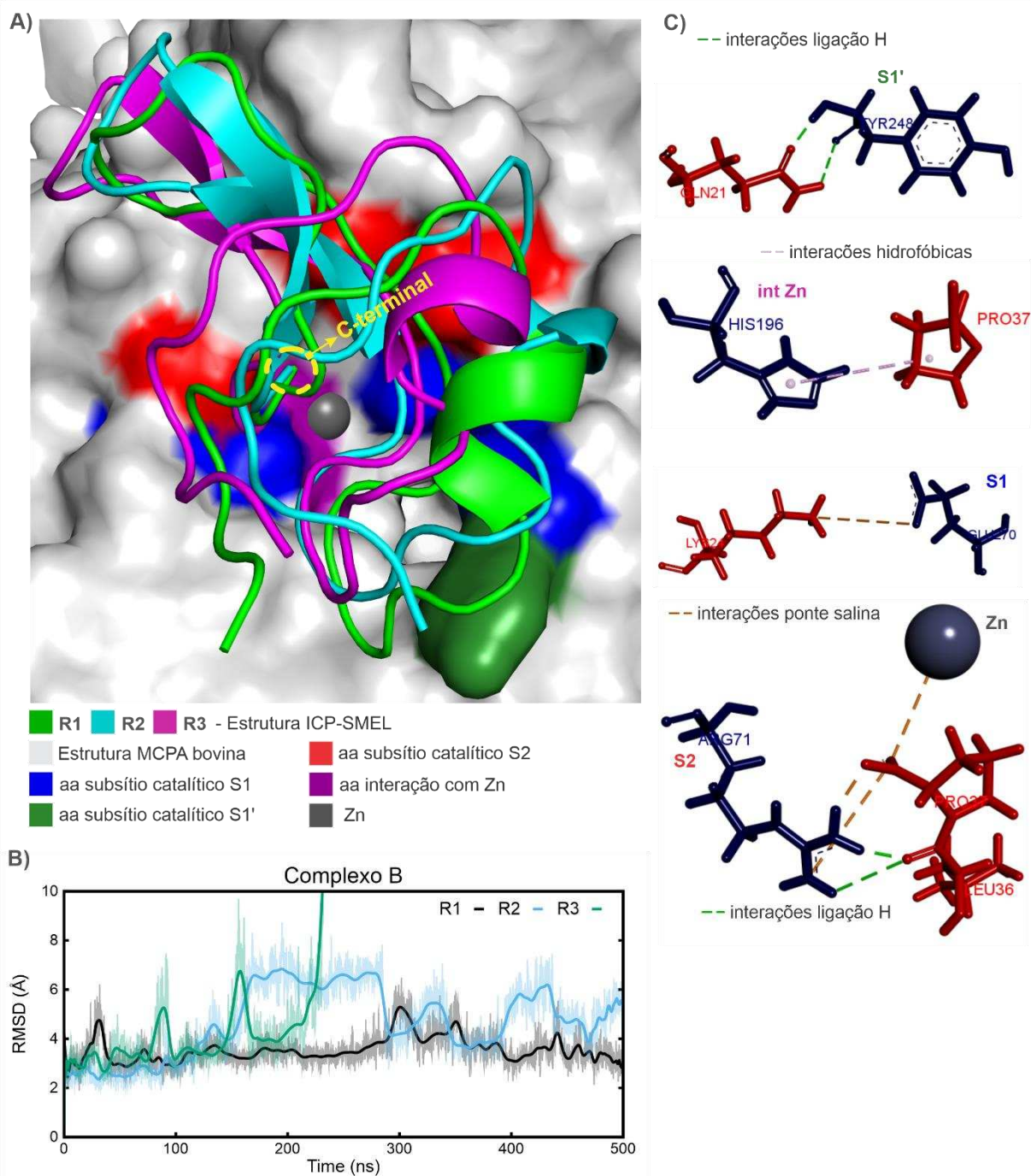
^a Interações estão coloridas de acordo com os subsítios catalíticos da metalocarboxipeptidase bovina.

^b SC – subsítio catalítico MCPA bovina; Int Zn – aminoácidos da MCPA que interagem e coordenam com o cofator Zn²⁺.

No complexo de interação B SMEL-CPA, foram identificadas características similares ao complexo A em relação à estabilidade e ancoragem do peptídeo no sítio catalítico da carboxipeptidase. Isso é evidenciado pelo encaixe dos três clusters estruturais nos resultados finais da dinâmica molecular (MD) na mesma região do sítio ativo da enzima, bem como pela estabilização da flutuação de conformações pelo RMSD em duas das três réplicas, mantendo-o abaixo de 6 Å. Um ponto notável é a terceira réplica, que destaca o momento de dissociação do complexo, indicando a importância de uma análise mais aprofundada por meio de abordagens físico-químicas refinadas **C3 Figura 6A, B**). Além disso, as interações entre ICP-SMEL e MCPA nesse complexo envolvem os mesmos resíduos da MCPA, relacionados aos subsítios S1, S1' e S2. Essas interações abrangem uma variedade de ligações, incluindo hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e pontes salinas, conforme representado na **C3 Figura 6C**. A riqueza de interações mantidas ao longo da MD é

indicativa da alta estabilidade e consistência da ligação entre ICP-SMEL e MCPA, demonstrando a manutenção dessas interações em relação aos subsítios catalíticos da enzima durante a simulação de dinâmica molecular (**C3 Tabela 3**). Vale ressaltar que algumas interações se repetem nos dois complexos A e B. Por exemplo, ligações de hidrogênio fortes, com distâncias inferiores a 2 Å entre doador e receptor, contribuem significativamente para a estabilização dos complexos. Outras interações cruciais incluem as pontes salinas com os resíduos que coordenam o cofator Zn, as quais são reconhecidas como algumas das mais fortes interações intermoleculares (**C3 Figura 5C** e **C3 Figura 6C**) (NITTINGER et al., 2017; SHEINERMAN, 2000).

Nas interações específicas dos resíduos de ICP-SMEL, R31 (complexo A) e N7 (complexo B) desempenham papéis fundamentais na inibição enzimática através de ligações de ponte salina e de hidrogênio, respectivamente, com o resíduo E270 da MCPA. Além disso, as interações entre R29-E72 no complexo A, assim como entre P37-H69 e P37-H196 no complexo B, também são essenciais, formando pontes salinas. Essas interações são críticas para a catálise da CPA bovina, que ocorre por meio de um mecanismo ácido-base geral. Nesse processo, a água que ataca a carbonila peptídica é ativada por E270, o qual interage com Zn. Outros resíduos, como E72, H69 e H196, coordenando o cofator Zn, auxiliam na estabilização dessa ação. Essencialmente, E270 desempenha o papel de iniciar o mecanismo de ação catalítica das carboxipeptidases, em que primeira etapa, ele remove um próton da água ligada ao Zn^{2+} , permitindo que o íon hidroxila, coordenado com o Zn^{2+} , ataque o grupo carbonila do peptídeo. Na segunda etapa, E270 assume o papel de um catalisador de ácido geral, doando um próton ao grupo amina liberado à medida que o intermediário tetraédrico, ligado ao Zn^{2+} , se dissocia para formar os produtos, coordenados por E270 ou pelo grupo carboxílico C-terminal do substrato (AULD, 2013; XU; GUO, 2009).



C3 Figura 6. Complexo B: Interação entre ICP-SMEL de *Solanum melongena* e a metalocarboxipeptidase de *Bos taurus* (MCPA). **A)** Visualização da estrutura do complexo B SMEL-MCPA, composta pelas réplicas R1, R2 e R3 derivadas da simulação de dinâmica molecular (MD). A sobreposição das três réplicas destaca a ligação das moléculas de ICP-SMEL no sítio catalítico da MCPA, representado em superfície tridimensional. Os subsítios catalíticos da MCPA, S1, S1', S2 e Int Zn (local de interação com o cofator Zn), são apresentados em cores distintas. As estruturas de ICP-SMEL são apresentadas em formato cartoon, enquanto o cofator Zn é exibido como uma esfera. **B)** Gráfico de RMSD (Desvio Quadrático Médio) ao longo da simulação de dinâmica de MD do complexo B SMEL-MCPA. O RMSD revela a flutuação conformacional das réplicas R1 e R2, que estabilizam em torno de 6Å durante os 500 ns de simulação. Por outro lado, a réplica R3 exibe desassociação de ICP-SMEL da MCPA, indicada pelo aumento súbito do RMSD após 200 ns. **C)** Interações identificadas nas três réplicas do complexo B ao longo da simulação de MD. As interações específicas entre os aminoácidos de ICP-SMEL e os aminoácidos dos subsítios S1, S1', S2 e Int Zn da MCPA são destacadas. Essas interações abrangem ligações de hidrogênio, pontes salinas e interações hidrofóbicas. Os aminoácidos de ICP-SMEL são destacados em vermelho, enquanto os aminoácidos

da MCPA são mostrados em azul escuro. Para cada interação, são indicados o subsítio dos aminoácidos da MCPA envolvidos e o tipo de interação correspondente.

Por outro lado, no complexo B, ICP-SMEL estabelece interações com a MCPA por meio de outras duas regiões estruturais: R1-(B), englobando os resíduos Q21, K22 e K24, e R2-(B), envolvendo os resíduos L36 e P37 do C-terminal. Notavelmente, a interação entre o C-terminal hidrofóbico do ICP-SMEL e a MCPA oferece uma evidência biológica mais substancial do mecanismo de inibição do peptídeo. Este é um aspecto significativo, uma vez que outros inibidores de carboxipeptidase, cujos mecanismos de inibição já foram caracterizados, atuam pela região C-terminal, que também possuem características hidrofóbicas de sequência, por meio de inibição competitiva, imitando a interação com o substrato. Um exemplo notável desse mecanismo é o inibidor de carboxipeptidase ICP de *Solanum tuberosum* (batata), conhecido como PCI e também pertencente à família das solanáceas. Nesse caso, a interação ocorre por meio de múltiplas interações com os subsítios catalíticos S1', S1 e S2 da MCPA bovina, estabelecendo uma ligação robusta e estável através de interações de hidrogênio, eletrostáticas e hidrofóbicas (REES; LIPSCOMB, 1982).

C3 Tabela 3. Abundância de interações encontradas ao longo da MD de 500ns presentes nas 3 réplicas do complexo B SMEL-MCPA.

Complexo B			
Interações ^a (SMEL-MCPA)	Porcentagem (%)	Categoria	SC ^b MCPA
GLN21:CG-ILE247:CG2	10.8	Hidrofóbica	S1
LYS24:CD-TYR198:CE1	10.1	Hidrofóbica	S2
GLN21:NE2-TYR248:O	18.3	Ligação de Hidrogênio	S1'
GLN21:OE1-TYR248:N	14.2	Ligação de Hidrogênio	S1'
LYS22:NZ-SER199:OG	38.4	Ligação de Hidrogênio	S2
LYS22:NZ-GLU270:OE2	16.3	Ligação de Hidrogênio	S1
LYS22:NZ-GLU270:OE1	10.5	Ligação de Hidrogênio	S1
LYS24:NZ-TYR198:O	22.6	Ligação de Hidrogênio	S2
LYS24:NZ-SER199:OG	13.1	Ligação de Hidrogênio	S2
LYS24:NZ-TYR198:N	10.5	Ligação de Hidrogênio	S2
GLN25:N-TYR198:OH	32.9	Ligação de Hidrogênio	S2
LEU36:O-ARG71:NH2	48.0	Ligação de Hidrogênio	S2
LEU36:O-ARG71:NH1	21.3	Ligação de Hidrogênio	S2
PRO37-ARG71	81.0	Ponte Salina/Eletrostática	S2
PRO37-ARG71	67.4	Ponte Salina/Eletrostática	S2
PRO37-HIS69	23.8	Ponte Salina/Eletrostática	Int Zn ^b
PRO37-HIS196	17.8	Ponte Salina/Eletrostática	Int Zn

^a Interações estão coloridas de acordo com os subsítios catalíticos da catalítico metalocarboxipeptidase bovina.

^b SC – subsítio catalítico MCPA bovina; Int Zn – aminoácidos da MCPA que interagem e coordenam com o cofator Zn²⁺.

Os resultados dessas análises robustecem a importância essencial das interações específicas entre ICP-SMEL e MCPA nos complexos A e B. A consistente estabilidade e ancoragem do peptídeo no sítio catalítico, em conjunto com a persistência das interações ao longo das simulações de dinâmica molecular, ressaltam a validade inequívoca da proposta de inibição. Adicionalmente, as interações por meio de pontes salinas e ligações de hidrogênio, aliadas à influência exercida nos resíduos cruciais para o mecanismo de ação da MCPA, consolidam de maneira contundente o papel inibitório desempenhado pelo ICP-SMEL. Destaca-se, ainda, a contribuição inestimável da interação específica entre o C-terminal do ICP-SMEL e a MCPA no complexo B, fornecendo uma compreensão esclarecedora do mecanismo de inibição, comparável a outros inibidores previamente caracterizados. Nesse contexto, tais descobertas coletivas não apenas avançam o discernimento sobre a ação inibitória do ICP-SMEL, mas também realçam seu potencial notável como um agente terapêutico promissor no cenário da inibição enzimática.

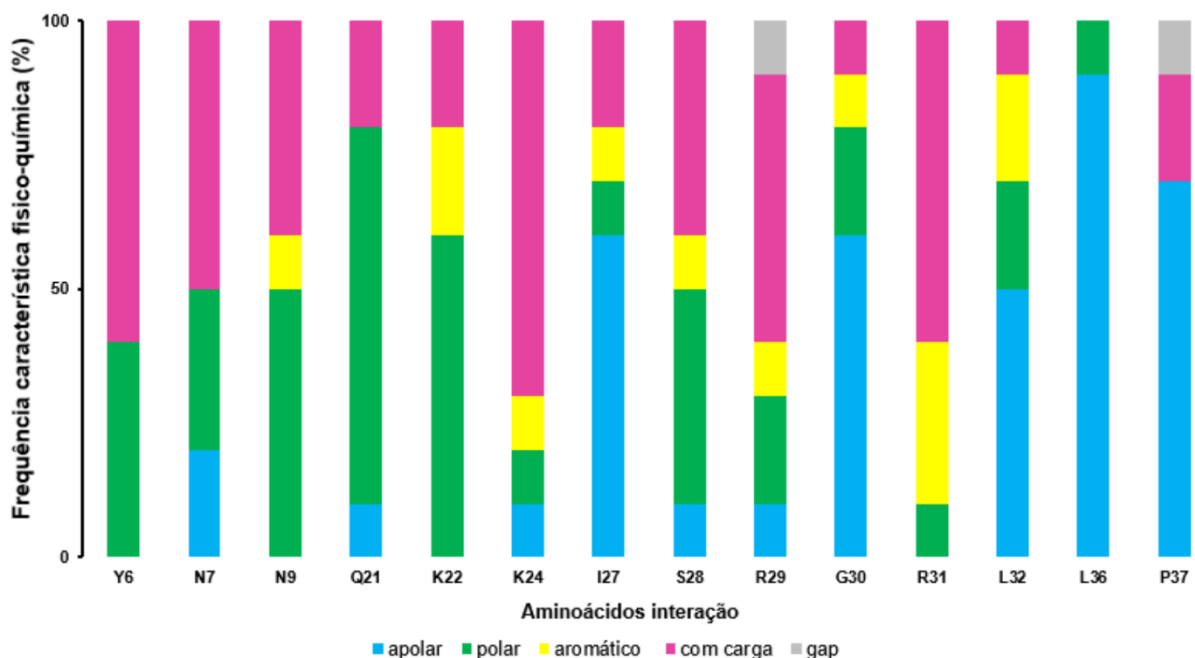
3.5. Perfil geral da interação de ICPs com MCPs baseado nas características físico-químicas dos aminoácidos

A

C3 Figura 8, ilustra o perfil de interação das novas sequências de inibidores de carboxipeptidase provenientes das solanáceas. Esse perfil foi desenvolvido com base nas características físico-químicas dos aminoácidos e na interação observada entre o ICP-SMEL e a MCPA bovina. O ICP-SMEL foi usado como modelo para identificar potenciais sequências inibidoras. Ao mapear as interações-chave nos complexos SMEL-MCPA A e B, foram identificados os aminoácidos principais das sequências peptídicas que podem interagir com as MCPs e, possivelmente, inibi-las (quadro –

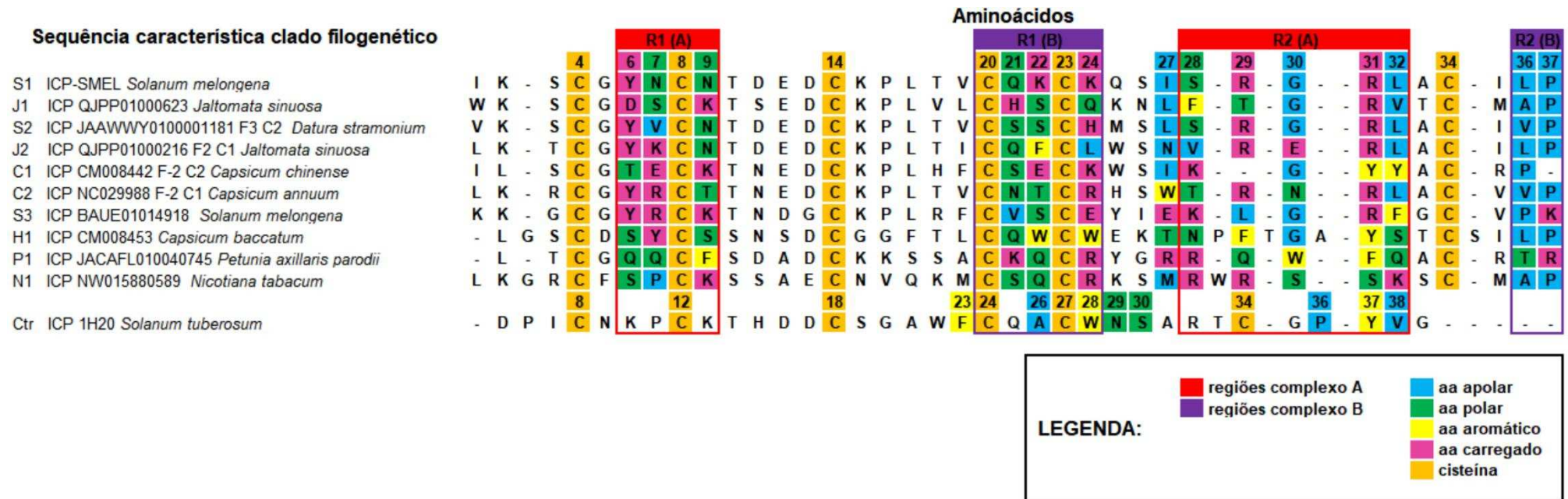
C3 Figura 8). cada clado filogenético é representado por um membro, evidenciando alta variabilidade entre essas sequências, mas mantendo as

características físico-químicas dos aminoácidos que interagem com a carboxipeptidase A. Esses padrões específicos de frequência por posição de aminoácidos foram observados nas sequências (**C3 Figura 7**).



C3 Figura 7. Gráfico da frequência das características físico-química para cada aminoácido significativo na interação entre MCPs e ICPs de solanáceas. O gráfico é construído com base na análise da frequência das características físico-químicas dos aminoácidos importantes na interação, por posição, entre as dez sequências representativas dos subgrupos filogenéticos.

Os aminoácidos da região R1 dos complexos A e B desempenham papéis cruciais nas interações em torno das cisteínas C8, C20 e C23 que são conservadas entre as sequências. Essa característica é compartilhada com o ICP 1H20 (controle) de *S. tuberosum*, que também interage com a CPA bovina através dos resíduos próximos às cisteínas C24, C27 e C34, como previamente discutido (REES; LIPSCOMB, 1982), Isso ressalta a importância das cisteínas na estabilização e ancoramento dos ICPs na carboxipeptidase, considerando que os aminoácidos da região R1 Y6, N7 e N9 do complexo A e Q21, K22 e K24 do complexo B são identificados por interagirem com aminoácidos importantes na ligação e catálise da carboxipeptidase pertencentes aos subsítios S1 e S2 da carboxipeptidase (**C3 Tabela 2C3 Tabela 3**). Os aminoácidos das regiões R1 possuem características mais polares nos ICPs representativos, refletindo a característica físico-química das regiões R1 A e B na sequência de ICP-SMEL (**C3 Figura 7**)



C3 Figura 8. Perfil de interação entre metalocarboxipeptidases e ICPs de solanáceas com base nas propriedades físico-químicas dos aminoácidos. O painel ilustra a classificação dos principais aminoácidos envolvidos na interação entre MCPs e ICPs, levando em conta suas características físico-químicas. Os aminoácidos essenciais para essa interação são destacados para o ICP representante de cada subgrupo filogenético. Esse painel foi montado a partir do alinhamento da região consenso entre as sequências de ICPs representantes dos subgrupos filogenéticos, em que a posição dos aminoácidos cruciais para a interação entre ICP-SMEL e a carboxipeptidase A bovina foram marcados e classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas em cada sequência representante. As regiões marcadas por **R1** e **R2** representam regiões específicas da sequência de ICP-SMEL que interagem com a MCPA nos complexos A e B, respectivamente. Para efeito de comparação de interações, o ICP de *Solanum tuberosum* foi usado como controle (**Ctrl**), seus aminoácidos interativos com a carboxipeptidase A bovina também foram destacados e classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas.

A interação de 1H20 com a CPA bovina já foi investigada, destacando o envolvimento da região C-terminal (P36, Y37, V38) na inibição da carboxipeptidase (MARINO-BUSLJE et al., 2000). Os aminoácidos das regiões R2 do complexo A (S28 a L32) e do complexo B (L36 e P37) são vitais para a inibição da metaloprotease. Esses resíduos compartilham características físico-químicas semelhantes com a região C-terminal de 1H20, apresentando maior hidrofobicidade. Em particular, R31 do complexo A e P37 do complexo B interagem fortemente com E270 da carboxipeptidase por pontes salinas, bloqueando a coordenação do átomo de Zn e iniciando a inibição enzimática. Essa característica físico-química é mantida em quase todas as sequências representativas dos diferentes clados filogenéticos (**C3 Figura 7**), sugerindo o potencial dos peptídeos identificados nas solanáceas de inibirem metalocarboxipeptidases.

Outros estudos apoiam essa discussão. Por exemplo, a estrutura do ICP de *Ascaris* (ACI) em complexo com CPA1 revelou mecanismo de inibição similar ao ICP de *S. tuberosum* (PCI), enfatizando a importância da região C-terminal na inibição da CPA (SANGLAS et al., 2009). Trabalhos como o de Reverter et al. (1998) caracterizaram o leech carboxypeptidase inhibitor (LCI), que possui mecanismo de inibição semelhante ao PCI e similaridade de sequência na porção C-terminal. O tick carboxypeptidase inhibitor (TCI) de *R. bursa* também demonstrou inibição eficaz das carboxipeptidases bovina (CPA) e humana (TAF1a) pela interação com os três resíduos C-terminais, afetando essencialmente a ligação do substrato e a catálise (AROLAS et al., 2005). Consequentemente, o mecanismo de ação do ICP-SMEL segue uma abordagem semelhante aos outros ICPs já descritos, inibindo carboxipeptidases por meio da interação da região C-terminal. A conservação das características de sequência dos aminoácidos envolvidos na inibição ressalta o potencial dos novos ICPs identificados nas solanáceas para também atuarem como inibidores de carboxipeptidases. Esses resultados enriquecem nossa compreensão dos mecanismos de inibição das metalocarboxipeptidases e possuem implicações promissoras tanto no avanço de estratégias terapêuticas voltadas para doenças e infecções associadas a essas enzimas, quanto no desenvolvimento de agentes de proteção agrícola contra patógenos que exploram essas vias durante suas invasões nas plantas.

4. CONCLUSÃO

Em conclusão, a exploração dos genomas das solanáceas em busca de inibidores de carboxipeptidase (ICPs) revela uma diversidade marcante na família *Solanaceae*, com a análise minuciosa de múltiplos genomas resultando na identificação de 62 novas sequências de ICPs em 29 espécies distintas. Essas descobertas ressaltam a ampla distribuição evolutiva e possível papel conservado ao longo da evolução das solanáceas. As análises de docking e dinâmica molecular revelaram duas formas distintas de interação do ICP-SMEL com a carboxipeptidase A bovina, ambas ancoradas na região do sítio ativo da MCPA por meio de múltiplas interações, incluindo ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Esses resultados indicam uma potencial inibição competitiva da carboxipeptidase A bovina pelo ICP-SMEL, esclarecendo aspectos cruciais do seu mecanismo de ação, com destaque para a importância dos aminoácidos R31 e N7 do ICP-SMEL nas interações, além da conservação de resíduos de cisteína e leucina. A estabilidade e ancoragem do ICP-SMEL no sítio catalítico da MCPA, como demonstrado por simulações de dinâmica molecular, reforçam a compreensão do seu papel inibitório, abrindo potenciais aplicações terapêuticas. Além disso, a análise adicional das sequências de inibidores de carboxipeptidase de solanáceas enriquece o conhecimento, identificando características físico-químicas e interações-chave, destacando o potencial de outros peptídeos como inibidores de metalocarboxipeptidases, com implicações em estratégias terapêuticas e proteção agrícola. Em resumo, este trabalho contribuiu de maneira significativa para o entendimento dos mecanismos de inibição dos ICPs, desvendando novas possibilidades terapêuticas e estratégias agrícolas, e delineando o papel multifacetado dessas moléculas na interação planta-microrganismo, abrindo horizontes promissores para futuras pesquisas e aplicações biotecnológicas com potencial impacto na saúde humana e na segurança alimentar.

5. REFERÊNCIAS

ABDEEN, Ashraf; VIRGÓS, Ariadna; OLIVELLA, Elisenda; VILLANUEVA, Josep; AVILÉS, Xavier; GABARRA, Rosa; PRAT, Salomé. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteínase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 189–202, 2005. DOI: 10.1007/s11103-004-6959-9.

ADASME, Melissa F.; LINNEMANN, Katja L.; BOLZ, Sarah Naomi; KAISER, Florian; SALENTIN, Sebastian; HAUPT, V. Joachim; SCHROEDER, Michael. PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 49, n. W1, p. W530–W534, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkab294.

AFROZ, Mohasana; AKTER, Sanzida; AHMED, Asif; ROUF, Razina; SHILPI, Jamil A.; TIRALONGO, Evelin; SARKER, Satyajit D.; GÖRANSSON, Ulf; UDDIN, Shaikh Jamal. Ethnobotany and Antimicrobial Peptides From Plants of the *Solanaceae* Family: An Update and Future Prospects. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 11, n. May, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.00565.

ALMAGRO ARMENTEROS, José Juan; SONDERBY, Casper Kaae; SONDERBY, Søren Kaae; NIELSEN, Henrik; WINTHER, Ole. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics (Oxford, England)**, [S. l.], v. 33, n. 21, p. 3387–3395, 2017. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx431.

ALMEIDA, H.O. Identificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela para o controle de patógenos de plantas. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007. 110 p.

ALMEIDA, Hebréia Oliveira; TEIXEIRA, Felipe Roberti; ROMEIRO, Reginaldo Da Silva; DA SILVA, Derly José Henriques; PEREIRA, Paulo Roberto Gomes; FONTES, Elizabeth Pacheco Batista; BARACAT-PEREIRA, Maria Cristina. Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Summa Phytopathologica**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 62–64, 2008. DOI: 10.1590/S0100-54052008000100012.

ALONSO-DEL-RIVERO, Maday et al. A novel metallo-carboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*—a step into the invertebrate world of proteases. **FEBS Journal**, 2009. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07187.

ALTSCHUL, Stephen F.; GISH, Warren; MILLER, Webb; MYERS, Eugene W.; LIPMAN, David J. Basic Local Alignment Search Tool 2 Department of Computer Science. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 215, p. 403–410, 1990. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

AROLAS, Joan L.; LORENZO, Julia; ROVIRA, Ana; CASTELLÀ, Joaquim; AVILES, Francesc X.; SOMMERHOFF, Christian P. A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: Isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 280, n. 5, p. 3441–3448, 2005. a. DOI: 10.1074/jbc.M411086200.

AROLAS, Joan L.; POPOWICZ, Grzegorz M.; LORENZO, Julia; SOMMERHOFF, Christian P.; HUBER, Robert; AVILES, Francesc X.; HOLAK, Tad A. The three-dimensional structures of tick carboxypeptidase inhibitor in complex with A/B carboxypeptidases reveal a novel double-headed binding mode. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 350, n. 3, p. 489–498, 2005. b. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.05.015.

AULD, David S. Catalytic Mechanisms for Metallopeptidases. *In: Handbook of Proteolytic Enzymes*. [s.l.]: Elsevier, 2013. v. 1p. 370–396. DOI: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00078-8.

BATEMAN, Alex et al. UniProt: The universal protein knowledge base in 2021. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 49, n. D1, p. D480–D489, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkaa1100.

BEST, Robert B.; ZHU, Xiao; SHIM, Jihyun; LOPES, Pedro E. M.; MITTAL, Jeetain; FEIG, Michael; MACKERELL, Alexander D. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 3257–3273, 2012. DOI: 10.1021/ct300400x.

BIOVIA, D. S. (2021). BIOVIA Discovery Studio. San Diego: Dassault Systèmes, release 2021.

CHANDAN, C.; PARDHE, H. A.; GOWTHAMARAJAN, K.; .Systematic approach & Application in relevance to Economic & Therapeutic actions of Proteolytic Enzyme: A Review. **Journal of Positive ...**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 10476–10486, 2022. Disponível em: <https://www.journalppw.com/index.php/jpsp/article/download/9675/6311>.

CLARKSON, James J.; KNAPP, Sandra; GARCIA, Vicente F.; OLMSTEAD, Richard G.; LEITCH, Andrew R.; CHASE, Mark W. Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (*Solanaceae*) inferred from multiple plastid DNA regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 75–90, 2004. DOI: 10.1016/j.ympev.2004.05.002.

COTABARREN, Juliana; LUFRANO, Daniela; PARISI, Mónica Graciela; OBREGÓN, Walter David. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *Plant Science*, [S. l.], v. 292, n. January, 2020. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110398.

COTABARREN, Juliana; TELLECHEA, Mariana Edith; AVILÉS, Francesc Xavier; LORENZO RIVERA, Julia; OBREGÓN, Walter David. Biochemical characterization of the YBPCI miniprotein, the first carboxypeptidase inhibitor isolated from Yellow Bell Pepper (*Capsicum annuum* L). A novel contribution to the knowledge of miniproteins stability. **Protein Expression and Purification**, [S. l.], v. 144, n. December 2017, p. 55–61, 2018. DOI: 10.1016/j.pep.2017.12.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.12.003>.

COVALEDA, Giovanni; DEL RIVERO, Maday Alonso; CHÁVEZ, María A.; AVILÉS, Francesc X.; REVERTER, David. Crystal structure of novel metallocarboxypeptidase inhibitor from marine mollusk *Nerita versicolor* in complex with human carboxypeptidase A4. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 12, p. 9250–9258, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M111.330100.

CROOKS, G.; HON, G.; CHANDONIA, J.; BRENNER, S. NCBI GenBank FTP Site\nWebLogo: a sequence logo generator. **Genome Res**, [S. l.], v. 14, p. 1188–1190, 2004. DOI: 10.1101/gr.849004.1.

DATTA, Shreeja; ROY, Arpita. Antimicrobial Peptides as Potential Therapeutic Agents: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, [S. l.], n. August, 2020. DOI: 10.1007/s10989-020-10110-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10989-020-10110>.

DUNAEVSKY, YA. E. ELPIDINA, E. N., VINOKUROV, K. S. BELOZERSKY, M. A. Protease Inhibitors in Improvement of Plant Resistance. *Molecular Biology*, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 608– 613., 2005.

FIGAJ, D.; AMBROZIAK, P.; PRZEPIORA, T.; SKORKO-GLONEK, J. The role of proteases in the virulence of plant pathogenic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, J. Skorko-Glonek, Department of General and Medical Biochemistry, Faculty of Biology, University of Gdansk, Wita Stwosza 59, Gdansk, Poland, v. 20, n. 3, 2019. DOI: 10.3390/ijms20030672. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L2001558568&from=export>.

GAVOR, Edem; CHOONG, Yeu Khai; JOBICHEN, Chacko; MOK, Yu Keung; KINI, R. Manjunatha; SIVARAMAN, J. Structure of Aedes aegypti carboxypeptidase B1-inhibitor complex uncover the disparity between mosquito and non-mosquito insect carboxypeptidase inhibition mechanism. *Protein science*, United States, v. 30, n. 12, p. 2445–2456, 2021. DOI: 10.1002/pro.4212.

GONG, Haiyan; ZHOU, Jinlin; LIAO, Min; HATTA, Takeshi; HARNNOI, Thasaneeya; UMEMIYA, Rika; INOUE, Noboru; XUAN, Xuenan; FUJISAKI, Kozo. Characterization of a carboxypeptidase inhibitor from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Insect Physiology*, [S. l.], v. 53, n. 10, p. 1079–1087, 2007. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2007.06.008.

GROMACS 2020.4 Manual. [S. l.] 2020. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4054996>.

GRUBE, Rebecca C.; RADWANSKI, Elaine R.; JAHN, Molly. Comparative genetics of disease resistance within the solanaceae. *Genetics*, [S. l.], v. 155, n. 2, p. 873–887, 2000. DOI: 10.1093/genetics/155.2.873.

HASS, G. Michael; RYAN, C. A. Carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *In: Methods in Enzymology*. [s.l.: s.n.]. v. 80p. 778–791, 1981 a. DOI: 10.1016/S0076-6879(81)80060-2.

HASS, G. Michael; HERMODSON, Mark A. Amino Acid Sequence of a Carboxypeptidase Inhibitor from Tomato Fruit. *Biochemistry*, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 2256–2260, 1981 b. DOI: 10.1021/bi00511a029.

HUANG, Jing; MACKERELL, Alexander D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*, [S. l.], v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 2013. DOI: 10.1002/jcc.23354.

JURRUS, Elizabeth et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 112–128, 2018. DOI: 10.1002/pro.3280.

KILSHAIN-VARDI, Alexandra; GLICK, Meir; GREENBLATT, Harry M.; GOLDBLUM, Amiram; SHOHAM, Gil. Refined structure of bovine carboxypeptidase A at 1.25 Å, resolution. **Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 323–333, 2003. DOI: 10.1107/S0907444902015706.

KIM, Jin Young; PARK, Seong Cheol; HWANG, Indeok; CHEONG, Hyeonsook; NAH, Jae Woon; HAHM, Kyung Soo; PARK, Yoonkyung. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 2860–2872, 2009. DOI: 10.3390/ijms10062860.

KOZAKOV, Dima et al. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature protocols**, v. 12, n. 2, p. 255, 2017.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; LI, Michael; KNYAZ, Christina; TAMURA, Koichiro. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

LEBECKA, R.; KISTOWSKI, M.; DEBSKI, J.; SZAJKO, K.; MURAWSKA, Z.; MARCZEWSKI, W. Quantitative proteomic analysis of differentially expressed proteins in tubers of potato plants differing in resistance to *Dickeya solani*. **PLANT AND SOIL**, Mlochow Res Ctr, Natl Res Inst, Plant Breeding & Acclimatizat Inst, Platanowa 19, PL-05831 Mlochow, Poland, v. 441, n. 1–2, p. 317–329, 2019. DOI: 10.1007/s11104-019-04125-7 WE - Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED).

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 127–128, 2007. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl529.

LIU, Q.; YU, L.; GAO, J.; FU, Q.; ZHANG, J.; ZHANG, P.; CHEN, J.; ZHAO, S. Cloning, tissue expression pattern and genomic organization of latexin, a human homologue of rat carboxypeptidase A inhibitor. **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 241–246, 2000. DOI: 10.1023/A:1010971219806.

LOGACHEVA, M. D.; VALIEJO-ROMAN, C. M.; PIMENOV, M. G. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. **Plant systematics and evolution = Entwicklungsgeschichte und Systematik der Pflanzen**, [S. l.], v. 270, n. 3–4, p. 783–791, 2008. DOI: 10.1080/00837792.1905.10669550.

LUFRANO, Daniela; COTABARREN, Juliana; GARCIA-PARDO, Javier; FERNANDEZ-ALVAREZ, Roberto; TORT, Olivia; TANCO, Sebastián; AVILÉS, Francesc Xavier; LORENZO, Julia; OBREGÓN, Walter D. Biochemical characterization of a novel carboxypeptidase inhibitor from a variety of Andean potatoes. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 120, p. 36–45, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.09.010>.

MADEIRA, Fábio et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 47, n. W1, p. W636–W641, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz268.

MANARA, Anna; FASANI, Elisa; MOLESINI, Barbara; DALCORSO, Giovanni; PENNISI, Federica; PANDOLFINI, Tiziana; FURINI, Antonella. The tomato metallopeptidase inhibitor I, which interacts with a heavy metal-associated isoprenylated protein, is implicated in plant response to cadmium. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 3, 2020. DOI: 10.3390/molecules25030700.

MARINO-BUSLJE, Cristina; VENHUDOVÁ, Gabriela; MOLINA, Miguel A.; OLIVA, Baldomero; JORBA, Xavier; CANALS, Francesc; AVILÉS, Francesc X.; QUEROL, Enrique. Contribution of C-tail residues of potato carboxypeptidase inhibitor to the binding to carboxypeptidase A: A mutagenesis analysis. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 267, n. 5, p. 1502–1509, 2000. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01150.

MOLESINI, Barbara; TREGGIARI, Davide; DALBENI, Andrea; MINUZ, Pietro; PANDOLFINI, Tiziana. Plant cystine-knot peptides: pharmacological perspectives. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 63–70, 2017. DOI: 10.1111/bcp.12932.

MOLNÁR, Attila; LOVAS, Ágnes; BÁNFALVI, Zsófia; LAKATOS, Lóránt; POLGÁR, Zsolt; HORVÁTH, Sándor. Tissue-specific signal(s) activate the promoter of a metallopeptidase inhibitor gene family in potato tuber and berry. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 301–311, 2001. DOI: 10.1023/A:1010649503229.

MOULIN, M. M.; RODRIGUES, R.; RIBEIRO, S.; GONÇALVES, L.; BENTO, C. S.; SUDRÉ, C. P.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M. Trypsin inhibitors from *Capsicum baccatum* var. *Pendulum* leaves involved in pepper yellow mosaic virus resistance. **Genetics and Molecular Research**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 9229–9243, 2014. DOI: 10.4238/2014.November.7.10.

MUHAMMAD, Surayya Mustapha; SABO, Ibrahim A.; GUMEL, Ahmed Mohammed; ALKALI, Fatima I, Extraction and Purification of Antimicrobial Proteins from *Datura Stramonium* Seed. **Journal of Advances in Biotechnology**, [S. l.], v. 8, p. 1073–1077, 2019. DOI: 10.24297/jbt.v8i0.8221.

NITTINGER, Eva; INHESTER, Therese; BIETZ, Stefan; MEYDER, Agnes; SCHOMBURG, Karen T.; LANGE, Gudrun; KLEIN, Robert; RAREY, Matthias. Large-Scale Analysis of Hydrogen Bond Interaction Patterns in Protein – Ligand Interfaces. [S. l.], 2017. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00101.

OLIVEIRA, Arielle Pinheiro Bessiatti Fava; RESENDE, Larissa Maximiano; RODRIGUES, Rosana; DE OLIVEIRA MELLO, Érica; TAVEIRA, Gabriel Bonan; DE OLIVEIRA CARVALHO, André; GOMES, Valdirene Moreira. Antimicrobial peptides of the genus *Capsicum*: a mini review. **Horticulture Environment and Biotechnology**, [S. l.], v. 63, n. 4, p. 453–466, 2022. DOI: 10.1007/s13580-022-00421-x.

OLMSTEAD, Richard G.; BOHS, Lynn. A summary of molecular systematic research in solanaceae: 1982-2006. **Acta Horticulturae**, [S. l.], v. 745, n. June 2007, p. 255–268, 2007. DOI: 10.17660/ActaHortic.2007.745.11.

OLMSTEAD, Richard G.; BOHS, Lynn; MIGID, Hala Abdel; SANTIAGO-VALENTIN, Eugenio; GARCIA, Vicente F.; COLLIER, Sarah M. A molecular phylogeny of the *Solanaceae*. **Taxon**, [S. l.], v. 57, n. 4, p. 1159–1181, 2008. DOI: 10.1002/tax.574010.

PEAR, Julie R.; RIDGE, Neal; RASMUSGEN, Rik; ROSE, Ronald E.; HOUCK, Catherine M. Isolation and characterization of a fruit-specific cDNA and the corresponding genomic clone from tomato. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 639–651, 1989. DOI: 10.1007/BF00016019.

POSTIC, Guillaume; GRACY, Jérôme; PÉRIN, Charlotte; CHICHE, Laurent; GELLY, Jean Christophe. KNOTTIN: The database of inhibitor cystine knot scaffold after 10 years, toward a systematic structure modeling. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 46, n. D1, p. D454–D458, 2018. DOI: 10.1093/nar/gkx1084.

QUILIS, Jordi; LÓPEZ-GARCÍA, Belén; MEYNARD, Donaldo; GUIDERDONI, Emmanuel; SAN SEGUNDO, Blanca. Inducible expression of a fusion gene encoding two proteinase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 367–377, 2014. DOI: 10.1111/pbi.12143.

QUILIS, Jordi; MEYNARD, Donaldo; VILA, Laura; AVILÉS, Francesc X.; GUIDERDONI, Emmanuel; SAN SEGUNDO, Blanca. A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 537–553, 2007. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2007.00264.

REES, Douglas C.; LIPSCOMB, William N. Structure of potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 5.5-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 77, n. 1, p. 277–280, 1980. DOI: 10.1073/pnas.77.1.277. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.77.1.277>.

REES, D. C.; LIPSCOMB, W. N. Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, Gibbs Chemical Laboratory, Harvard University, Cambridge, MA 02138, 12 Oxford St, United States, v. 160, n. 3, p. 475–498, 1982. DOI: 10.1016/0022-2836(82)90309-6. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.00020491126&doi=10.1016%2F00222836%2882%29903096&partnerID=40&md5=f0e062c190f4f645d626fd10d5673432>.

REVERTER, David; VENDRELL, Josep; CANALS, Francesc; HORSTMANN, Jeanny; AVILÉS, Francesc X.; FRITZ, Hans; SOMMERHOFF, Christian P. A carboxypeptidase inhibitor from the medical leech *Hirudo medicinalis*: Isolation, sequence analysis, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 49, p. 32927–32933, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.49.32927.

SANGLAS, Laura; AVILES, Francesc X.; HUBER, Robert; GOMIS-RÜTHE, F. Xavier; AROLAS, Joan L. Mammalian metallopeptidase inhibition at the defense barrier of *Ascaris* parasite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 106, n. 6, p. 1743–1747, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0812623106.

SANTOS, D. M. Estudos *in silico* do mecanismo de ação de um peptídeo antimicrobiano de berinjela (*Solanum melongena* L.) com atividade de inibidor de carboxipeptidases, 2018. Monografia (Bioquímica) –Universidade Federal de Viçosa.

SARNTHIMA, Rakrudee; KHAMMUANG, Saranyu. Antibacterial Activities of *Solanum stramonifolium* Seed Extract. **J. Agric. Biol.**, [S. l.], n. March, 2014.

SELS, Jan; MATHYS, Janick; DE CONINCK, Barbara M. A.; CAMMUE, Bruno P. A.; DE BOLLE, Miguel F. C. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 46, n. 11, p. 941–950, 2008. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011.

SEPPEY, Mathieu; MANNI, Mosè; ZDOBNOV, Evgeny M. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. *In: Notes on the Greek Text of Genesis*. [s.l.]: SBL Press, 2019. v. 1962p. 227–245. DOI: 10.1007/978-1-4939-9173-0_14. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/j.ctvfxvc64.18>.

SHEINERMAN, F. Electrostatic aspects of protein–protein interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 153–159, 2000. DOI: 10.1016/S0959-440X(00)00065-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X00000658>.

SITJÀ-ARNAU, Marta; MOLINA, Miguel A.; BLANCO-APARICIO, Carmen; FERRER-SOLER, Laura; LORENZO, Julia; AVILÉS, Francesc X.; QUEROL, Enrique; DE LLORENS, Rafael. Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) as an EGF blocker. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 226, n. 2, p. 169–184, 2005. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.01.025.

SLEZINA, Marina P.; ISTOMINA, Ekaterina A.; KOROSTYLEVA, Tatyana V.; KOVTUN, Alexey S.; KASIANOV, Artem S.; KONOPKIN, Alexey A.; SHCHERBAKOVA, Larisa A.; ODINTSOVA, Tatyana I. Molecular insights into the role of cysteine-rich peptides in induced resistance to *Fusarium oxysporum* infection in tomato based on transcriptome profiling. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 11, 2021. DOI: 10.3390/ijms22115741.

TAM, James P.; WANG, Shujing; WONG, Ka H.; TAN, Wei Liang. Antimicrobial peptides from plants. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 711–757, 2015. DOI: 10.3390/ph8040711.

TURRA, David; LORITO, Matteo. Potato Type I and II Proteinase Inhibitors: Modulating Plant Physiology and Host Resistance. **Current Protein & Peptide Science**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 374–385, 2011. DOI: 10.2174/138920311796391151.

VAN ZUNDERT, G. C. P. et al. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 428, n. 4, p. 720–725, 2016. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.09.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014>.

WALSH, Brian M.; HOOT, Sara B. Phylogenetic Relationships of *Capsicum* (*Solanaceae*) Using DNA Sequences from Two Noncoding Regions: The Chloroplast atpB - rbcL Spacer Region and Nuclear Waxy Introns. **International Journal of Plant Sciences**, [S. l.], v. 162, n. 6, p. 1409–1418, 2001. DOI: 10.1086/323273. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/323273>.

WANG, Xinkang; SMITH, P. L.; HSU, M. Y.; OGLETREE, M. L.; SCHUMACHER, W. A. Murine model of ferric chloride-induced vena cava thrombosis: Evidence for effect of potato carboxypeptidase inhibitor. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 403–410, 2006. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01703.

XU, Dingguo; GUO, Hua. Quantum mechanical/molecular mechanical and density functional theory studies of a prototypical zinc peptidase (carboxypeptidase A) suggest a general acid-general base mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 131, n. 28, p. 9780–9788, 2009. DOI: 10.1021/ja9027988.

YANG, Xu; CHENG, Yu Fu; DENG, Cao; MA, Yan; WANG, Zhi Wen; CHEN, Xue Hao; XUE, Lin Bao. Comparative transcriptome analysis of eggplant (*Solanum melongena* L.) and turkey berry (*Solanum torvum* Sw.): Phylogenomics and disease resistance analysis. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 0–12, 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-412.

CAPÍTULO 4 – Explorando o potencial dos inibidores de carboxipeptidase (ICPs) das solanáceas como alvos para o controle de fitopatógenos: foco na interação ICPs-fitonematoide com ênfase em ICP-SMEL de *Solanum melongena* e PCI de *Solanum tuberosum*

Esse capítulo engloba os outros experimentos do Doutorado de Geniana S. Gomes desenvolvidos nos Laboratórios de Proteômica e Bioquímica de Proteínas, do CCBII e BIOAGRO/UFV, sob a orientação da professora Maria Cristina Baracat-Pereira.

RESUMO

A preocupação global com a segurança de produtos agrícolas impulsiona abordagens sustentáveis no controle de pragas vegetais. Os capítulos 1, 2 e 3 enfatizaram os inibidores de carboxipeptidases (ICPs) como cruciais na proteção de solanáceas, com potencial para atuação como antimicrobianos, sendo assim alvos estratégicos para desenvolvimento de táticas de controle de patógenos, incluindo suas proteases alvo que atuam na interação patógeno-planta. Nesse sentido, esse trabalho concentrou-se no estudo da interação ICPs-fitonematoide, com ênfase em ICP-SMEL de *Solanum melongena* e PCI de *Solanum tuberosum*. As metaloproteases (MPs) foram examinadas como fatores de virulência vegetal através de revisão sistemática. Além disso, novos ICPs prospectados dos genomas das solanáceas foram identificados com potencial antimicrobiano por ferramentas de bioinformática. A expressão heteróloga dos ICPs foi investigada via clonagem e expressão em *Leishmania tarentolae*, seguida por testes de atividade antimicrobiana contra bactérias, leveduras e o fitonematoide *Meloidogyne incognita*. A interação ICP-SMEL e metalocarboxipeptidases de *Meloidogyne* foi explorada por docking e dinâmica molecular. Resultados significativos mostraram que os ICPs de *S. tuberosum* e *S. melongena* têm potencial nematicida, inibindo eclosão de ovos e juvenis de *M. incognita*, além de atividade antimicrobiana. A expressão heteróloga validou sua eficácia como agentes antimicrobianos, confirmando o correto enovelamento dos ICPs e sua atividade biológica. O papel central das MPs na virulência vegetal também foi revelado. A busca por soluções inovadoras no controle de fitonematoides enfatizou os ICPs como alvos promissores, sustentada pela análise das metalocarboxipeptidases em várias espécies de nematoides, apontando o amplo potencial dos ICPs como inibidores. Validação dos modelos estruturais de MCPs auxiliou na identificação de alvos potenciais dos ICPs, enquanto as interações por docking e dinâmica molecular corroboraram a hipótese de inibição competitiva. Esses achados ressaltaram a relevância da pesquisa das interações ICP-MCP, apontando para estratégias promissoras de controle de fitonematoides e destacando a importância dos estudos de interação patógeno-planta em pesquisas para combater ameaças agrícolas.

Palavras-chave: Interação ICPs-fitonematoide. Ação antimicrobiana ICP-SMEL e PCI. Metaloproteases como fatores de virulência. Expressão heteróloga em *Leishmania tarentolae*.

1. INTRODUÇÃO

As plantas, como um vasto grupo de organismos, frequentemente enfrentam ataques de diversos patógenos. Essas doenças representam um risco considerável, impactando significativamente na qualidade e na produção das colheitas agrícolas (TAHERI; SOWEYZI; TARIGHI, 2023). Atualmente, a segurança dos produtos agrícolas é uma preocupação global proeminente, relacionadas especialmente aos microrganismos patogênicos (HOU et al., 2022; PASCALE et al., 2020). Além disso, os elevados custos e a toxicidade dos pesticidas sintéticos para o meio ambiente e organismos vivos impulsionam a busca por novos métodos de controle de fitopatógenos. Embora a tecnologia transgênica e controle biológico abra potenciais caminhos para programas de aprimoramento de culturas, outras abordagens continuam sendo imperativas para se alcançar estratégias eficazes no manejo integrado das patogêneses vegetais. Nesse contexto, a realização de estudos voltados para o desenvolvimento de práticas de manejo não-químicas e ambientalmente sustentáveis assume uma importância crucial (ORMANCEY et al., 2023; ZHANG et al., 2023).

O interesse pela busca de compostos naturais com aplicações medicinais, industriais e agronômicas tem crescido significativamente. Os AMPs (peptídeos antimicrobianos) têm sido extensivamente estudados devido ao seu papel na defesa natural da maioria dos organismos vivos. Sua ampla distribuição entre animais, plantas, fungos e bactérias, além da capacidade de inibir o crescimento de diversos fitopatógenos de relevância agroeconômica, tornou-os alvos de investigação (COTABARREN et al., 2020; ZHANG et al., 2023). Especificamente no contexto das plantas, as solanáceas mostram-se potenciais alvos em pesquisas nesse campo. Espécies pertencentes a essa família apresentam alta resistência e são ricas em AMPs, que muitos já caracterizados demonstraram atividade inibitória contra uma variedade de bactérias e fungos (AFROZ et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2022; YANG et al., 2014).

Dentre os peptídeos de defesa encontrados nas solanáceas, destacam-se os inibidores, que se revelam promissores para investigações futuras. Esses peptídeos atuam inibindo proteases que desempenham funções fisiológicas cruciais em todos os seres vivos (CHANDAN et al., 2022). Especificamente, a classe de inibidores de carboxipeptidase (ICPs) ainda é pouco explorada e, notavelmente, a literatura atual

carece de estudos aprofundados sobre o potencial de ação desses peptídeos. As pesquisas discutidas ao longo dos capítulos 1, 2 e 3 destacaram a importância dos ICPs na defesa das solanáceas, seu potencial antimicrobiano, bem como suas características estruturais e mecanismos de ação, evidenciando que os ICPs são alvos interessantes para serem aplicados em diferentes estratégias que visem controlar patógenos. Em uma outra perspectiva, as proteases que são alvos dos ICPs atuam como moléculas efetoras na interação entre patógenos e plantas, sendo alvos promissores para a exploração no desenvolvimento de novas estratégias para o controle de fitopatógenos (CHANDRASEKARAN et al., 2016; FIGAJ et al., 2019). Portanto, o estudo dessa interação entre ICPs e suas enzimas-alvo em patógenos assume uma relevância significativa, fornecendo *insights* valiosos.

Neste contexto, a expressão dos ICPs em um sistema biológico é essencial para investigar a função biológica desses peptídeos em fitopatógenos. Dada a importância das modificações pós-traducionais e das ligações dissulfeto no mecanismo de ação dos ICPs (abordado no Capítulo 3 dessa tese) , a utilização de um sistema de expressão eucariótico que garanta essas modificações é crucial para a produção eficaz dessas moléculas. Nesse cenário, *Leishmania tarentolae* se destaca como uma promissora opção para a expressão heteróloga de ICPs, devido à sua maquinaria de modificações pós-traducionais mais semelhante a mamíferos e sua capacidade de produzir proteínas corretamente dobradas e com modificações complexas, como glicosilação e pontes dissulfeto. Além disso, a rápida taxa de multiplicação celular em cultura torna seu cultivo e escalonamento mais eficientes em comparação com outros sistemas de células de mamífero. Assim, o sistema LEXSY se apresenta como uma plataforma promissora e escalável para a expressão de proteínas e peptídeos com modificações pós-traducionais complexas, oferecendo uma alternativa viável para a produção de ICPs de interesse (BASILE; PETICCA, 2009; DE OLIVEIRA et al., 2019; LAI; KLATT; LIM, 2019).

Sendo assim, os ICPs das solanáceas, como moléculas que atuam sobre carboxipeptidases, representam alvos interessantes para estudos, uma vez que inibem proteases que são consideradas proteínas efetoras na interação de fitopatógenos com as plantas, participando da evasão de respostas imunológicas, penetração e digestão de tecidos no hospedeiro (CASTAGNONE-SERENO et al., 2011; FIGAJ et al., 2019). Nesse sentido, este estudo, objetivou explorar o potencial dos inibidores de carboxipeptidase (ICPs) presentes nas solanáceas como alvos no

controle de fitopatógenos com foco na interação ICPs-fitonematoide e ênfase em ICP-SMEL de *Solanum melongena* e PCI de *Solanum tuberosum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Revisão sistemática

Uma busca sistemática na literatura foi realizada para identificar estudos relevantes relativos às metaloproteases como alvos para o controle de fitopatógenos, essa pesquisa foi focada na ação das metaloproteases como fatores de virulência na infecção de patógenos em plantas. Os bancos de dados Web of Science, Scopus, PubMed e Embase foram extensivamente pesquisados usando os principais termos de pesquisa termos “metalloprot*”, “metalloprotein*”, “metallopeptid*”, “metallocarboxypeptidase”, “zinc peptidase”, “phytopathogen” e “plant pathogen”. Subdescritores de cada termo principal foram empregados para ampliar o escopo da busca. Os estudos resultantes das quatro buscas foram compilados e as listas de referências dos estudos identificados foram revisadas para identificar documentos adicionais relevantes. Na seleção, foram excluídos artigos duplicados e pelos critérios de não se referirem a metaloproteases, fitopatógenos, de abordarem sobre metaloproteases de plantas, sobre outras funções de metaloproteases de fitopatógenos, de serem estudos secundários e de apresentarem apenas ensaios de identificação, detecção e caracterização de metaloproteases. Apenas os estudos que abordaram as metaloproteases como fatores de virulência na ação de fitopatógenos em plantas, foram incluídos no estudo. Os resultados de cada estudo incluído foram cuidadosamente tabulados para análise posterior. As **C4 Figura Suplementar 1** e **C4 Tabela Suplementar 1**. Estratégia de busca detalhada com filtros de busca e número de estudos recuperados em bases de dados eletrônicas. fornecem informações detalhadas sobre a estratégia de busca. A metodologia empregada para a busca da literatura aderiu a uma forma adaptada das diretrizes do PRISMA statement (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis) (GRIMSHAW et al., 2021). Essa abordagem sistemática garantiu uma seleção abrangente e transparente de estudos relevantes para abordar os objetivos da pesquisa de maneira eficaz.

2.2. Avaliação das propriedades físico-químicas e potencial antimicrobiano

novos ICPs das solanáceas

As propriedades físico-químicas das sequências de ICPs prospectados dos genomas das solanáceas foram preditas pelo software ProtParam (GASTEIGER et al., 2005) para avaliação de ponto isoelétrico (pI), peso molecular e carga e ToxinPred (GUPTA et al., 2013) para toxicidade. A avaliação do potencial antimicrobiano pelos softwares iAMPred (MEHER et al., 2017) para predição de atividade antimicrobiana (antiviral, antifúngica e antibacteriana) e APD3 (WANG; LI; WANG, 2016) para avaliação de hidrofobicidade e potencial de ligação. As análises foram realizadas com sequências de ICPs cortadas três aminoácidos antes da primeira cisteína, esse padrão foi determinado por comparação com a sequência funcional do ICP-SMEL de *Solanum melongena* que foi utilizada como modelo para a busca dos novos ICPs nos genomas da família *Solanaceae* (**C4 Arquivo Suplementar 1**).

2.3. Expressão heteróloga de ICP-SMEL de *S. melongena* e PCI de *S. tuberosum* em sistema eucarioto de *Leishmania tarentolae*

A clonagem e expressão dos ICPs de *S. melongena* e de *S. tuberosum* foram realizadas em parceria com o Professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes, no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) localizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) na Universidade Federal de Viçosa(UFV).

2.3.1. Teste de toxicidade em *Leishmania tarentolae*

O teste de toxicidade em *Leishmania tarentolae* foi realizado com o objetivo de avaliar se existia a possibilidade de algum ICP, encontrado nas solanáceas, inibir esse protozoário, e assim ter mais segurança na proposta de clonagem do ICP de *S. melongena* e também do ICP de *S. tuberosum* em *L. tarentolae*. Para esse teste foi utilizado o ICP de *S. tuberosum* comercial (PCI isoformas I, II e III) (Sigma West Sussex, U.K.).

As promastigotas da cepa P10 fluorescente (EGF) de *L. tarentolae* cultivadas em meio BHI (infusão de cérebro/coração –Sigma West Sussex, U.K.) suplementado com 15 µg/ml hemina (Sigma, West Sussex, U.K.), 10% de soro bovino fetal, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e incubadas a 26 °C no escuro. Para o teste, 100 µL do meio de cultura com 1×10^6 promastigotas foram aplicados em microplacas de 96 poços e as concentrações em diluição seriada de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µM do inibidor de *S. tuberosum* foram testadas. A cada 24 h

de incubação no escuro por cinco dias, leituras de absorvância de crescimento do cultivo de *L. tarentolae* foram realizadas em leito de microplaca (equipamento SpectraMax M5 microplate/cuvette reader.) nos comprimentos de onda 488 nm de emissão e 510 nm de excitação específicos para fluorescência à GFP. O ensaio foi realizado em triplicata utilizando neomicina como controle positivo para inibição e como controle negativo cultivo de *L. tarentolae* sem tratamento. Gráfico de absorvância em relação aos dias de experimento foi plotado no programa Prism GraphPad versão 9.1.0.221, para analisar a inibição por PCI de *S. tuberosum*. Esse protocolo foi adaptado de Graziose et al. (2012).

2.3.2. Desenho de oligo primers

As sequências dos genes de interesse (CPI de batata e ICP-SMEL de berinjela) foram projetadas com os códons otimizados para serem expressos em *L. tarentolae* utilizando a ferramenta Codon Optimization Tool da Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) e utilizando como espécie de referência *Leishmania donovani*. Os oligo primers específicos para cada gene foram desenhados manualmente adicionando os sítios de restrição das enzimas *XbaI* e *NotI* nos genes otimizados, de maneira que a ligação dos genes no plasmídeo de expressão ocorresse de forma que adquirisse o peptídeo sinal presente no vetor (que proporciona que a molécula proteica clonada seja secretada) e de que não adquirisse a cauda de histidina. O software NEBcutter (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/>) foi utilizado para checar se as sequências dos genes de ICPs não seriam cortadas pelas enzimas de restrição escolhidas e o software DNA complement reverse (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) para gerar as sequências de DNA complementares e reversas dos ICPs que originaram os primers direto e reverso, específicos para cada peptídeo. As sequências resultantes dos primers (**C4 Tabela 1**), em que já estavam inseridas às sequências dos genes de ICPs, foram encaminhadas à Sigma (West Sussex, U.K) para síntese química.

C4 Tabela 1. Oligo primers sintetizados.

Nome	Sequência
ICP_SMEL_plesxy_f	CTAGACATCAAAGCTGTGGGTACAACGTGAACACAGATGAGGATT GCAAGCCACTGACAGTGTGCCAAAAATGTAAGCAGAGCATTAGCCG GGGGCGGCTTGCGTGTATCCTTCCATGAGC
ICP_SMEL_plesxy_r	

```

GCGGCCGCTCATGGAAGGATACACGCAAGCCGCCCGGCTAATG
CTCTGCTTACATTTTTGGCACACTGTGAGTGGCTTGCAATCCTCATC
TGTGTTACAGTTGTACCCACAGCTTTTGATGT
ICP_tub_plesxy_f  CTAGACGAACAACACGCCGACCCCATCTGCAATAAGCCATGCAAGA
CGCACGATGATTGTTCCGGGGCATGGTTCTGTCAGGCCTGCTGGAA
CTCGGCTCGGACCTGCGGGCCTTACGTCGGTTGAGC
ICP_tub_plesxy_r  GCGGCCGCTCAACCGACGTAAGGCCCGCAGGTCCGAGCCGAGTTC
CAGCAGGCCTGACAGAACCATGCCCGGAACAATCATCGTGCGTCT
TGCATGGCTTATTGCAGATGGGGTTCGGCGTGTGTTTCGT

```

2.3.3. Organismos

Os organismos utilizados nessa parte do trabalho foram a estirpe de *E. coli* da linhagem DH5 α para as técnicas de multiplicação de plasmídeos (antes ou após as clonagens) e a linhagem de *L. tarentolae* cepa P10 (Código: LT-101, Jena Bioscience) utilizada para expressão constitutiva integrativa.

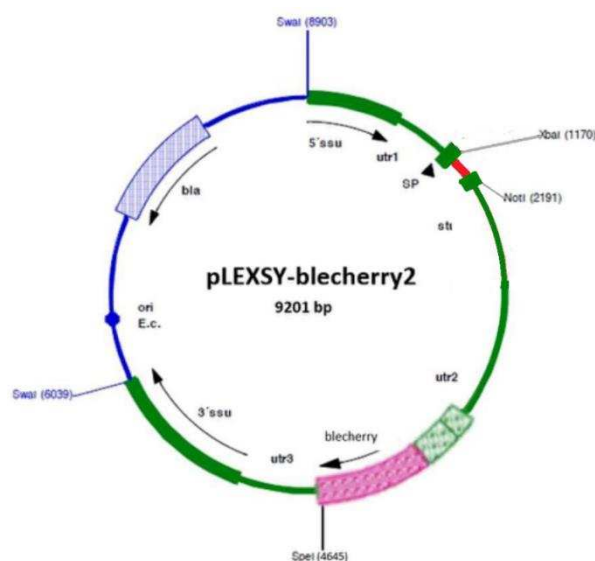
2.3.4. Técnicas de biologia molecular

As técnicas de biologia molecular, que não foram escritas nesta seção, como a elaboração de géis de agarose, a eletroforese de DNA, a extração de DNA plasmidial (Miniprep) e a preparação de tampões, seguiram as diretrizes estabelecidas por Sambrook e seus colegas (SAMBROOK et al., 1989). Além disso, todas as avaliações e mensurações dos componentes genéticos (DNA plasmidial) e das substâncias proteicas empregadas neste trabalho foram efetuadas mediante a utilização do equipamento Qubit 3.0 Fluorometer, desenvolvido pela Thermo Fisher Scientific.

2.3.5. Clonagem

O planejamento da clonagem no vetor de expressão pLEXSY-NEO2 do Sistema de expressão proteica eucariótica em *Leishmania tarentolae* (LEXSY, Jena Bioscience, Jena, Alemanha) foi cuidadosamente concebido. Isso envolveu a inserção dos genes dos ICPs de interesse entre os sítios de restrição das enzimas *Xba*I e *Not*I, de modo a direcionar os peptídeos para a secreção extracelular. Essa secreção é regulada pela presença da sequência da fosfatase ácida secretada de *L. mexicana* (LMSAP), utilizada como peptídeo sinal, e que está disponível no plasmídeo. No processo de clonagem, utilizou-se o vetor específico pLEXSY-blecherry-2 (resistência a bleomicina e proteína repórter cherry) (**C4 Figura 1**). Essa construção incorporou uma modificação que substituiu a marca de seleção original (neomicina) do vetor pLEXSY-neo-2 pela marca de seleção blecherry, desenvolvida no LBM pelo Dr. Renato Lima Senra. Além de conferir resistência ao antibiótico bleomicina, essa marca

também expressa uma proteína fluorescente denominada Cherry, que emite fluorescência na faixa do espectro vermelho.



C4 Figura 1. Vetor pLEXSY-blecherry-2 de expressão em *Leishmania tarentolae*. Construção modificada do Vetor pLEXSY-NEO2 desenvolvida pelo Dr. Renato Lima Senra.

O procedimento de clonagem envolveu a digestão do vetor pLEXSY-blecherry-2 pelas enzimas de restrição *XbaI* e *NotI*, resultando na linearização do plasmídeo e na liberação dos sítios de clonagem desejados. Os primers oligonucleotídeos direto e reverso correspondentes a cada gene de interesse foram submetidos a um processo de anelamento gradual de temperatura. Para cada par de primers, uma reação foi preparada em uma proporção equimolar de 1:1, com uma concentração de 10 μ M. Essas reações foram termocicladas, passando por uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por um processo de anelamento gradual da temperatura até atingir a temperatura ambiente.

A inserção das sequências de interesse no vetor foi realizada pela incubação do plasmídeo linearizado juntamente com os produtos de anelamento correspondentes, utilizando a enzima T4 DNA ligase. Após a circularização com a inserção dos genes, os plasmídeos recombinantes foram introduzidos em células *E. coli* DH5 α por meio de choque térmico e selecionados com base na resistência à ampicilina. Os clones potenciais foram posteriormente isolados por miniprep, submetidos a validação por PCR utilizando primers específicos do vetor P1442_f (5'-CCGACTGCAACAAGGTGTAG-3' – Código PM110) e A264_r (5'-CATCTATAGAGAAGTACACGTAAAAG-3' – Código PM101). Além de serem

submetidos a análises de digestão com as enzimas *XbaI* e *NotI*, e posteriormente enviados para confirmação por sequenciamento gênico.

2.3.6. Transfecção e seleção clonal em *L. tarentolae*

Para a transfecção em *L. tarentolae*, os vetores dos clones positivos pLEXY-smel e pLEXY-tub foram linearizados com a enzima de restrição *SwaI* e utilizados para transfecção. As promastigotas de *L. tarentolae* foram cultivadas em meio BHI suplementado com 15 µg/ml de hemina (Sigma, West Sussex, Reino Unido), 10% de soro bovino fetal, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e posteriormente foram incubadas a 26 °C no escuro. A transfecção foi conduzida de acordo com o método descrito por Basile e Peticca (2009). Aproximadamente 4×10^7 células promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram empregadas em cada sistema de transfecção. As células foram adicionadas às cuvetas de 0,2 cm (Gene Pulser Bio-Rad), contendo 5-10 µg do DNA de interesse em um volume final de 50 µL. Uma exceção foi feita para as culturas controle (mock), nas quais 50 µL de água foram adicionados. As cuvetas foram mantidas em gelo por um período de 10 minutos. Em seguida, cada cuveta foi individualmente inserida no eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad), e as amostras foram submetidas a 2 pulsos de 0,3 kV a 500 µF, com intervalos de 10 segundos entre eles.

Após a eletroporação, as células foram transferidas para garrafas de 25 cm² esterilizadas, contendo 5 mL de meio BHI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, e foram incubadas a 26 °C. Vinte e quatro horas após a transfecção, o antibiótico bleomicina na concentração de 100 µg/mL foi adicionado às culturas. Após cerca de 7 dias a partir da transfecção, foi obtida a população selecionada. A seleção da população resistente também foi acompanhada por microscopia confocal, na qual a presença da proteína cherry era detectada através da fluorescência no espectro de luz vermelha nas células onde o cassete de expressão integrou no genoma.

2.3.7. Preparo amostras para eletroforese de proteínas.

Após a seleção das populações de *L. tarentolae* resistentes expressando os ICPs de interesse, 10mL do sobrenadante da cultura de cada seleção e também da cultura selvagem (controle negativo), nomeados respectivamente SME, TUB e P10 foram separados para análise das proteínas expressas. As células coletadas foram centrifugadas a 5000g por 5 minutos e o sobrenadante recuperado. O preparo das amostras de proteínas/peptídeos total foi realizado por metodologias distintas.

Para proteína total, o preparo de amostras seguiu o manual LEXSY. Para precipitação das proteínas secretadas, ao sobrenadante foi adicionado uma solução de TCA 50% (concentração final de 10%). O volume final foi encubado em geladeira a 4 °C *overnight*, posteriormente centrifugado a 15000 x g, por 15 minutos e 4°C. Cinco lavagens com acetona gelada a 80% foram realizadas e o pellet resultante foi ressuspensionado em tampão de solubilização (Ureia 8 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2% [m/v]) para análise por eletroforese de proteínas.

O protocolo de aquecimento seletivo também foi realizado para fracionar sobrenadantes das culturas de P10, SMEL e TUB, visto o interesse em visualizar peptídeos de baixa massa, para tal as amostras foram aquecidas a 80 °C por 15 minutos em banho seco e encubadas posteriormente a 4 °C por 2h, após foram centrifugadas a 15000 x g, por 15 minutos e 4°C. O sobrenadantes dessas amostras foram submetidos a precipitação de proteínas total segundo o manual LEXSY e o precipitado ressuspensionado direto em tampão de solubilização. Todas as amostras preparadas foram submetidas a eletroforese monodimensional de proteínas do tipo tricina-page.

2.3.8. Eletroforese em gel Tricina - SDS-PAGE

A avaliação da expressão dos peptídeos em *L. tarentolae* também foi acessada utilizando a eletroforese em gel de Tricina - SDS-PAGE (JUDD, 1994). O sistema de eletroforese em gel consistiu em três géis diferentes: gel de separação (concentração total de monômero de 16,5%), gel intermediário (concentração total de monômero de 9,9%) e gel concentrador (concentração total de monômero de 5,1%), utilizando uma solução de acrilamida/bis (49,5% T e 3,0% C). O gel foi corado com Azul Brilhante de Coomassie para análise das frações obtidas da expressão dos ICPs no preparo de amostra de proteína total e aquecimento seletivo.

2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana de PCI comercial e clones ICP-SMEL e PCI expressos em *L. tarentolae*

2.4.1. Microrganismos

As bactérias *Staphylococcus aureus* (gram positiva) (cepa ATC 29213) e *Escherichia coli* (gram negativa) (cepa ATC 35218) do banco da Fiocruz, foram doadas pelo Professor Ciro Rossi do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. A bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* (gram-negativa) cepa

LPF 0710 foi doada pelo Laboratório de Patologia Florestal Molecular, DFP, sob coordenação do Prof. Rafael Ferreira Alfenas. Culturas estoque das bactérias foram preparadas em meio líquido (meio LB) contendo 60% (v/v) de glicerol e armazenadas a -80 °C.

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (cepa 40157) Fiocruz foi doada pelo Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (LabFis), DMB, sob coordenação do Prof. Wendel Batista da Silveira e a levedura *Saccharomyces pastorianus* (cepa 40090 Fiocruz) doada pelo Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (LabFis), DMB, sob coordenação do Prof. Wendel Batista da Silveira. Culturas estoque das leveduras foram preparadas em meio líquido (meio YPD) contendo 60% (v/v) de glicerol e armazenadas a -80 °C.

O fitonematoide *Meloidogyne incognita*, foi fornecido pelo Prof. Leandro Grassi de Freitas, do Departamento de Fitopatologia da UFV, coordenador do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides (Bionema), onde os experimentos com o ICP comercial de batata envolvendo o nematoide das galhas foram conduzidos. Outra remessa de J2 de *M. incognita* foi doada pelo Laboratório de Nematologia, DFP, sob coordenação Prof.^a Dalila Seni Buonicontro, doação para os experimentos envolvendo os ICPs expressos em *L. tarentolae*.

2.4.2. Cultivo ICP-SMEL e PCI em *L. tarentolae* e purificação parcial ICPs

Para realizar os ensaios antimicrobianos e testes contra o nematoide das galhas, envolvendo os ICPs de batata e berinjela expressos em *L. tarentolae*, foram preparados cultivos de 300 mL para cada população poli clonal de *Leishmania*: P10 (selvagem) e as variantes resistentes SMEL e TUB.

A etapa inicial da purificação parcial dos ICPs SMEL e PCI envolveu o cultivo das promastigotas de *L. tarentolae*. Nesse processo, 10 mL de pré-inóculo das promastigotas foram cultivados em meio BHI suplementado com 15 µg/ml de hemina (Sigma, West Sussex, Reino Unido), 10% de soro bovino fetal, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Esse cultivo foi então incubado no escuro a 26 °C por 48 horas, período necessário para alcançar a fase logarítmica de crescimento. Após esse período, os 10 mL de cultivo foram transferidos para um volume de 300 mL de meio BHI previamente suplementado, como mencionado anteriormente. Essas culturas foram mantidas em agitação a 100 rpm e a 26 °C, em condições de ausência de luz, por um período de 4 dias. Após o período de cultivo, os

300 mL de cada expressão foram submetidas a centrifugação para separação das células. Os sobrenadantes resultantes foram coletados, filtrados através de membranas de 0.22 µm da marca Millipore e, em seguida, armazenados para uso posterior em etapas de purificação.

Visando a obtenção de uma fração mais concentrada e direcionada aos peptídeos de interesse, além de remoção de proteínas de elevado peso molecular, os extratos obtidos dos cultivos de P10, SMEL e TUB passaram por um processo de ultrafiltração positiva do tipo AMICON/MILLIPORE. Esse procedimento foi realizado empregando membranas de 10 kDa e 1 kDa da marca Millipore. Durante essa etapa, os extratos foram fracionados, adquirindo uma purificação parcial e concentrados até atingir um volume de 5 mL (60 vezes a concentração inicial). Como resultado, as frações de interesse foram recuperadas para os subsequentes ensaios antimicrobianos. As frações relevantes, denotadas como F1-10 kDa e F<1 kDa, correspondentes aos cultivos de P10, SMEL e TUB, foram segregadas e direcionadas para análise. É importante ressaltar que na fração F1-10 kDa, encontra-se a concentração dos ICPs de batata e berinjela, o foco central de estudo. Essa abordagem permitiu uma maior concentração e isolamento das espécies de interesse, otimizando a preparação para os ensaios antimicrobianos subsequentes. Uma alíquota dessas amostras também foi submetida a precipitação de proteínas, como descrito previamente, para análise por eletroforese monodimensional tricina-page.

2.4.3. Avaliação da inibição em *Meloidogyne incognita* utilizando PCI comercial e clones de ICP-SMEL e PCI expressos em *L. tarentolae*

Na avaliação da inibição da eclosão de ovos de *Meloidogyne incognita* pela ação do PCI de *S. tuberosum*, a metodologia utilizada foi adaptada do trabalho de Neves et al. (2010). Os ovos de *M. incognita* foram obtidos da cultivar de tomate Santa Cruz 'Kada', que foi mantida em estufa. Os ovos foram extraídos seguindo a metodologia proposta por (Hussey e Barker, 1973). A fim de avaliar a eclosão dos juvenis, foram preparadas suspensões aquosas contendo 200 ovos de *M. incognita* em tubos de rosca. Estas suspensões foram então submetidas aos tratamentos com as concentrações de 100 µg, 200 µg, 300 µg e 400 µg do PCI de batata comercial. Os tubos contendo os diferentes tratamentos foram incubados a uma temperatura de 26°C ao longo de um período de 10 dias em incubadora BOD. A água destilada foi usada como grupo de controle, enquanto cada tratamento foi conduzido com cinco

repetições independentes. A contagem de juvenis que eclodiram, de ovos não eclodidos e J2 eclodidos mortos foi realizada em 48h e 96h após a montagem do experimento, com o auxílio da câmara de Peters em microscópio ótico.

Após a avaliação de 96 horas, os ovos / juvenis eclodidos de cada réplica foram lavados para retirar os tratamentos e uma incubação adicional de mais seis dias foi realizada, para outra avaliação de eclosão ou não eclosão dos ovos. A porcentagem de eclosão e / ou morte dos juvenis eclodidos foi calculada com base na proporção $[(\text{número de ovos não eclodidos})/(\text{número de ovos eclodidos} + \text{ovos não eclodidos})] \times 100$ e $[(\text{número de juvenis mortos})/(\text{número de juvenis mortos} + \text{juvenis vivos})] \times 100$. Em dez dias de incubação, em que seis foram sem tratamentos, a porcentagem de eclosão e juvenis mortos eclodidos foi avaliada para determinar se a inibição de eclosão foi permanente ou temporária, e se os tratamentos de alguma forma foram tóxicos ou não para os juvenis eclodidos.

A avaliação da inativação ou morte dos juvenis de *M. incognita* pela ação do PCI comercial de batata também foi realizada. Para se obter juvenis de segundo estágio, ovos de *M. incognita*, obtidos da cultivar de tomate Santa Cruz 'Kada' mantida em estufa, foram colocados em funis de Baermann (Baermann, 1917) e incubados em uma câmara de crescimento a 28 °C. por 48h. Para o ensaio, suspensões contendo 200 ovos de *M. incognita* foram preparadas em tubos de rosca. As suspensões foram tratadas com diferentes concentrações (100 µg, 200 µg, 300 µg e 400 µg) do PCI de batata comercial ou água (controle negativo). Os tubos foram incubados a 26°C por 10 dias em incubadora BOD. O grupo controle foi tratado com água destilada. Cada tratamento foi repetido cinco vezes. A porcentagem de juvenis móveis e imóveis foi avaliada em 48h, 72h e 12 dias após o início do experimento e calculada com base na proporção $[(\text{número de juvenis mortos})/(\text{número de juvenis mortos} + \text{juvenis vivos})] \times 100$. O IC50, que é a concentração para atingir 50% de mortalidade dos fitopatógenos, foi estimado após 12 dias de tratamento.

No estudo da inativação ou mortalidade dos juvenis de *M. incognita* através da ação dos clones de PCI e ICP-SMEL expressos em *L. tarentolae*, empregou-se a fração F1-10 kDa de P10, SMEL e TUB, parcialmente purificada. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, cada poço contendo uma suspensão de 70 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* em 100 µL, tratados com mais 100 µL de cada extrato nas concentrações correspondentes a 393 µg/mL para P10, 179 µg/mL para SMEL e 382 µg/mL para TUB. Cada tratamento foi replicado cinco vezes, e o grupo controle foi

exposto a água destilada. A placa foi incubada a 26°C por 4 dias em uma incubadora BOD. A avaliação da atividade nematocida ou nematostática dos extratos ocorreu 96 horas após o início do experimento. A porcentagem de juvenis móveis e imóveis foi calculada com base na proporção [(número de juvenis mortos)/(número de juvenis mortos + juvenis vivos)] x 100. Para avaliar a resposta nematocida ou nematostática dos extratos, NaOH a 2 M foi adicionado aos poços de cada replicata no momento da contagem, observando se os J2 recuperariam ou não o movimento.

2.4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos clones de ICP-SMEL e PCI expressos em *L. tarentolae* contra bactérias e leveduras por difusão em ágar

Esta metodologia foi desenvolvida com base no trabalho de Balouiri, Sadiki e Ibensouda (2016) como referência. Para conduzir este experimento, 200 µL das bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *R. solanacearum* foram ativadas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37 °C sob agitação a 180 rpm durante a noite. Posteriormente, uma placa de Petri foi preparada para cada tipo de bactéria, contendo meio sólido (LB-ágar), no qual 1 mL do cultivo ativado de cada bactéria foi diluído para solidificação. Após a solidificação do meio, sete pequenas cavidades foram criadas em cada placa para a aplicação dos tratamentos. Os tratamentos consistiram na aplicação de 50 µL de frações F1-10 kDa e F<1 kDa correspondentes aos extratos parcialmente purificados de P10, TUB e SMEL. Além disso, um controle de inibição com o antibiótico cloranfenicol (2 mg/mL) foi utilizado. As concentrações das frações F1-10 kDa de P10, TUB e SMEL foram de 39,3 µg, 38,2 µg e 17,9 µg de proteína total, respectivamente. As placas foram então incubadas por 24 horas a 37 °C em uma câmara BOD. No dia seguinte, os halos de inibição foram analisados. Para as leveduras *R. mucilaginosa* e *S. pastorianus*, o procedimento foi similar ao das bactérias. As leveduras foram ativadas em meio YPD a 30 °C e, da mesma forma, placas de Petri contendo meio YPD-ágar foram preparadas e incubadas a 30 °C durante a noite. O restante do processo seguiu o mesmo padrão utilizado para as bactérias.

2.4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana dos clones de ICP-SMEL e PCI expressos em *L. tarentolae* contra bactérias e leveduras por curva de crescimento

A atividade inibitória das frações F1-10 kDa e F<1 kDa, derivadas da purificação parcial dos extratos de P10, SMEL e TUB, foi avaliada contra as bactérias *S. aureus*,

E. coli e *R. solanacearum*, além das leveduras *R. mucilaginosa* e *S. pastorianus*. Para conduzir os experimentos, as bactérias foram cultivadas a 37 °C durante a noite em meio LB, com um subsequente processo de repicagem em diluição 1:2 até alcançar uma densidade ótica aproximada de 0,500, o que foi essencial para preparar a montagem do ensaio. No caso das leveduras, o cultivo ocorreu a 30 °C em meio YPD, com uma etapa semelhante de repicagem em diluição 1:2 até atingir uma densidade ótica de cerca de 0,100. A configuração do ensaio consistiu na adição de 90 µL de meio LB líquido (2x) em uma microplaca, seguido de 10 µL da suspensão de células bacterianas ($A_{560} = 0,5$), previamente cultivadas a 37 °C, e 100 µL de cada uma das frações F1-10 kDa e F<1 kDa correspondentes aos extratos de P10, SMEL e TUB. Essas frações foram utilizadas nas concentrações específicas de 393 µg/mL, 179 µg/mL e 382 µg/mL de proteína total para as frações F1-10 kDa. A microplaca para bactéria foi então incubada a 37 °C, com o crescimento sendo monitorado em intervalos de 2 horas ao longo de um período de 24 horas, através da medição da absorbância em A_{600} . A avaliação da inibição foi realizada comparando as curvas de crescimento na presença e ausência das amostras. Para fins de referência, três tipos de controles foram empregados: o controle positivo correspondendo ao cultivo bacteriano sem a presença das frações, o controle negativo representando o cultivo sem bactérias ou amostras, e o controle de inibição utilizando o antibiótico cloranfenicol em uma concentração de 250 µg/mL. Para as leveduras *R. mucilaginosa* e *S. pastorianus*, a montagem experimental foi semelhante à das bactérias, com a única alteração sendo a temperatura de cultivo (30 °C) e o uso do meio YPD (2x). O restante do procedimento seguiu o mesmo padrão estabelecido para as bactérias (Metodologia adaptada de ALMEIDA et al., 2007)

2.4.6. Análise estatística

Os dados de todos os ensaios antimicrobianos foram analisados usando o software Prism GraphPad versão 9.1.0.221 com plotagem de gráficos e avaliação estatística por teste T (não pareado, paramétrico e bicaudal) ao nível de 5% de probabilidade (**C4 Arquivo Suplementar 2** e **C4 Arquivo Suplementar 3**).

2.5. Caracterização MCPs do gênero *Meloidogyne* de interesse para estudo

Os estudo envolvendo as metalocarboxipeptidases foram focados em fitonematoides, visto os resultados dos testes realizados com extrato de *S. melongena* (berinjela) em que ICP-SMEL foi caracterizado (Capítulo 2), duas espécies foram

focadas *Meloidogyne incognita*, alvo de inibição positiva da ação do extrato de berinjela e também *Meloidogyne hapla*, outra espécie muito problemática do gênero com problemas na agricultura, além das duas espécies serem abundantes em metaloproteases (47% do total de proteases em cada espécie) (CASTAGNONE-SERENO et al., 2010).

2.5.1. Busca de sequências e Filogenia

A busca por sequências de metalocarboxipeptidases (MCPs) de *M. incognita* foi conduzida a partir das proteínas anotadas no genoma sequenciado desse fitonematoide. O respectivo material está disponível no suplemento do artigo de Szipenberg et al., 2017, acessível em <https://github.com/HullUni-bioinformatics/MIG-Phylogenomics#mig-phylogenomics>. Inicialmente, a qualidade desse conjunto de proteínas foi avaliada pelo programa Busco (SEPPEY; MANNI; ZDOBNOV, 2019) (**Script 14**). Em seguida, foi realizado um rps-BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) no banco de dados Pfam (MISTRY et al., 2021) utilizando o conjunto de proteínas anotadas de *M. incognita*, a fim de caracterizar cada proteína. Um BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990) foi executado com esse conjunto de proteínas em um banco de dados específico para metalocarboxipeptidases, criado a partir do Uniprot (BATEMAN et al., 2021), visando a identificação de possíveis MCPs. A elaboração dessas metodologias foi realizada com o auxílio do sistema Cluster da UFV (**Script 15, Script 16 e Script 17**). Após a caracterização do conjunto de proteínas de *M. incognita*, as proteínas classificadas como CPs da família M14 pelo Pfam e confirmadas como MCPs pelo Uniprot foram selecionadas. Estas proteínas foram posteriormente analisadas pelos programas SMART (LETUNIC; KHEDKAR; BORK, 2021) e ScanProsite (DE CASTRO et al., 2006) (**C4 Arquivo Suplementar 4**).

As sequências de metalocarboxipeptidases de *M. hapla* foram recuperadas no banco de dados no Uniprot, uma vez que seu proteoma já se encontra caracterizado, com as metaloproteases encontradas nesse banco de dados. As análises de caracterização de sequência, com busca de família da MCPs, presença de domínios e sítios de ligação pelos programas do Pfam, SMART e ScanProsite foi realizada também para as sequências de MCPs de *M. hapla* recuperadas do Uniprot. Com base nessas análises, algumas proteínas de cada espécie de *Meloidogyne* analisadas, foram escolhidas para modelagem de proteínas e assim caracterização estrutural.

Uma estudo de filogenia também foi realizado para entender como as MCPs encontradas no gênero se relacionam evolutivamente e como são distribuídas. Para a filogenia, foi utilizada apenas a sequência referente ao domínio da família M14 de metalocarboxipeptidase de cada MCP selecionada, e para comparação foi utilizada a sequência da MCPA de *Bos tauros* (bovina), da estrutura depositada no PDB (código 4CPA), que já é altamente caracterizada, inclusive com mecanismo de ação e inibição (para o ICP de batata) definidos. Para a construção da árvore filogenética com base nas sequências de aminoácidos, o alinhamento foi conduzido no software MEGA-X (KUMAR et al., 2018) por meio do método Clustal W. A filogenia foi estabelecida utilizando o método estatístico de *Maximum Likelihood Estimation* (MLE), juntamente com o teste filogenético de Bootstrap (LOGACHEVA; VALIEJO-ROMAN; PIMENOV, 2008), o qual foi executado com 1000 replicatas. O modelo de substituição de Jones-Taylor-Thornton (JTT) foi aplicado para orientar a análise. Posteriormente, a árvore filogenética obtida foi analisada com a ferramenta Interactive Tree of Life (iTOL) (LETUNIC; BORK, 2007). O que possibilitou a representação dos diferentes clados gerados por meio de cores distintas, fornecendo uma visualização mais clara e elucidativa das relações filogenéticas.

2.5.2. Modelagem MCPs

Para a modelagem das MCPs selecionadas, foram empregados dois programas distintos: o Phyre2 (KELLEY et al., 2015) e o AlphaFold (VARADI et al., 2022). Estas ferramentas buscam, retrospectivamente, as sequências mais adequadas a partir das estruturas depositadas no Protein Data Bank (PDB), as quais são então utilizadas como referência para a construção dos modelos estruturais. Os modelos obtidos pelo Phyre2 foram submetidos a um processo a mais de minimização de energia mediante o uso do programa YASARA (KRIEGER et al., 2009). Subsequentemente, a validação dos modelos gerados foi efetuada através de uma série de programas específicos. Primeiramente, o PyMOL foi empregado para realizar o alinhamento estrutural com uma proteína de referência. O ProSA (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) foi utilizado para avaliar tanto a qualidade global quanto local dos modelos construídos. A análise da qualidade estereoquímica e geometria geral dos modelos foi executada através do uso do PROCHECK pelo plot do gráfico de Ramachandran (LASKOWSKI et al., 1993). Ademais, para a avaliação da

classificação estrutural dos modelos a partir de um nível atômico, foi empregado o Verify3D (LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992).

2.6. Docking e dinâmica molecular interação ICP-SMEL e MCPs de *M. hapla* e *M. incognita*

2.6.1. Docking molecular

No contexto do docking molecular, a estrutura da sequência funcional de ICP-SMEL foi derivada das previsões geradas pelo AlphaFold (ALMEIDA et al., 2023 – Capítulo 2). As metalocarboxipeptidases utilizadas foram as estruturas modeladas de g6640 da *M. incognita* e A0A1I8BSY8 da *M. hapla*, obtidas por meio das ferramentas AlphaFold e Phyre2, respectivamente. A execução das simulações de docking foi conduzida utilizando o programa ClusPro 2.0 (KOZAKOV et al., 2017), com os parâmetros padrão do software. Os arquivos em formato PDB correspondentes às estruturas de ICP-SMEL e suas respectivas MCPs foram submetidos ao programa, resultando em complexos que foram classificados com base no tamanho do cluster formado por cada modelo. Os complexos que melhor representaram a interação entre ICP-SMEL e a MCP das espécies de *Meloidogyne* foram selecionados com base no alinhamento estrutural com os complexos A e B obtidos a partir da dinâmica molecular de ICP-SMEL com a MCPA bovina. O complexo de docking mais similar em termos de alinhamento estrutural à região de encaixe de ICP-SMEL na MCPA bovina foi escolhido como representante da interação, e suas interações foram posteriormente mapeadas e analisadas. A análise e visualização das interações moleculares nos complexos resultantes foram realizadas utilizando o Discovery Studio 2021 (BIOVIA, 2021).

Para identificar os resíduos de aminoácidos relacionados à região catalítica das MCPs de *M. hapla* e *M. incognita*, que foram modeladas e utilizadas no processo de docking, foi realizado um alinhamento estrutural dessas proteínas com a MCPA bovina (código PDB 4CPA). Os subsítios catalíticos presentes na MCPA bovina foram marcados e em seguida remapeados nas estruturas das respectivas MCPs de *Meloidogyne*. Dessa forma, as interações cruciais para uma possível inibição de ICP-SMEL nessas proteínas foram identificadas e computadas. Adicionalmente, a fim de entender a conservação desses resíduos em relação à MCPA de *Bos taurus*, foi realizado um alinhamento de sequência para o domínio M14 de cada metalocarboxipeptidase específica, usando o Clustal Omega (MADEIRA et al., 2019) e

visualizado por meio do MView (MADEIRA et al., 2019). Nesse alinhamento, as regiões dos subsítios catalíticos e sua conservação foram minuciosamente analisadas.

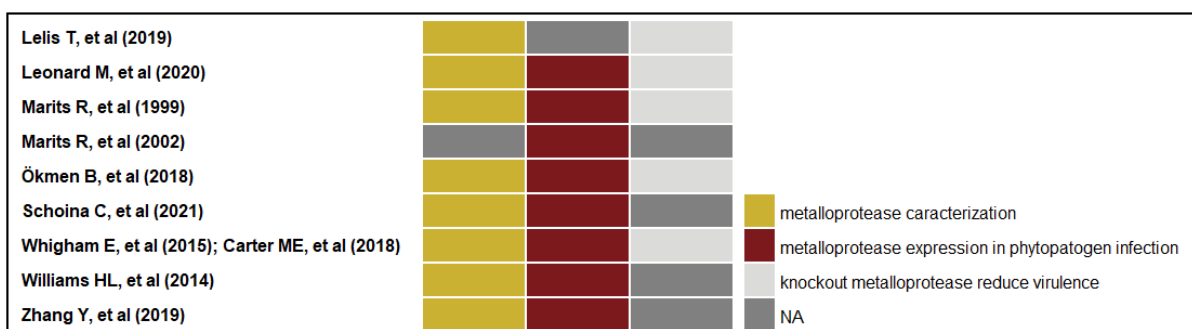
2.6.2. Dinâmica molecular complexo SMEL-MCP g6640 *M. incognita*

O complexo representativo da interação de ICP-SMEL com a MCP g6640 de *M. incognita* foi submetido a uma simulação de dinâmica molecular de 100 ns utilizando o GROMACS 2020.4 (MANUAL, 2020) com o campo de força CHARMM36 (BEST et al., 2012; HUANG; MACKERELL, 2013). A protonação dos resíduos do complexo foi verificada com a plataforma PDB2PQR (JURRUS et al., 2018) (**Script 3**). O sistema foi preparado com o complexo centralizado em uma caixa retangular equidistante de 14 Å nas direções XYZ, solvatado, neutralizado e equilibrado com 0,1 M de NaCl (**Script 4**). O sistema foi submetido a apenas uma réplica independente de dinâmica molecular de 100 ns com etapas de minimização de energia, equilíbrio e produção. A simulação foi realizada no Cluster de computadores UNESP de Botucatu – especificações Cluster: Inter ® Xeon ® Gold 624R GPU @ 3.00Hz (48 processadores), 1.5 Tb de memória RAM, Placa Tesla P100 (16 Gb de memória RAM e 3584 cuda cores) – em parceria com o Professor Rafael Junqueira Borges (**Script 5 e Script 7**).

As trajetórias do resultado da MD foram processadas, os frames foram analisados e as métricas de RMSD (Desvio Médio Quadrático) foram calculadas usando ferramentas incorporadas do GROMACS e plotadas pelo programa GnuPlot versão 5.4 (**Script 8**), sendo calculados os parâmetros de RMSD do complexo, da proteína e do peptídeo separadamente. A clusterização das estruturas foi realizada para obter um complexo representativo de todas as variações conformacionais adquiridas durante a simulação (**Script 7, Script 10 e Script 11**). Além disso, o mapeamento das interações foi realizado para o complexo final utilizando o Discovery Studio 2021 (BIOVIA, 2021) Essas análises permitiram uma compreensão melhor da interação entre ICP-SMEL e a MCP g6640 de *M. incognita*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Metaloproteases como alvos para o controle de fitopatógenos



C4 Figura 2. Heatmap das principais atividades descritas em estudos ($n = 10$) relacionadas à ação das metaloproteases como fatores de virulência na infecção das plantas por patógenos. Cada coluna avalia uma atividade diferente relacionada a essa ação das MPs, caracterizando os principais achados em cada artigo analisado.

A busca de revisão sistemática resultou em 282 artigos, sendo 49 do PubMed, 70 do Web of Science, 72 do Embase e 91 do Scopus, dos quais 163 foram excluídos por duplicação, e outros 90 de acordo com os critérios de exclusão. Dos 35 artigos incluídos, 29 foram selecionados pelos critérios de inclusão e 6 das listas de referências consultadas (**C4 Figura Suplementar 1**). No total foram identificados 10 estudos em que as metaloproteases (MPs) atuaram como moléculas efetoras em processos de invasão das plantas por patógeno, em que os principais achados foram as metaloproteases atuarem como fatores de virulência na infecção de fungos e bactérias em plantas, de serem altamente expressas quando o patógeno entra em contato com a planta hospedeira e de o silenciamento dessas peptidases afetarem a virulência do fitopatógeno diminuindo os sintomas de infecção do hospedeiro (**C4 Figura 2**).

Nos estudos encontrados, as metaloproteases são descritas como fatores cruciais na virulência durante infecções por patógenos, sendo descrita por diferentes resultados mais de uma atividade por estudo que se relacionam à ação das MPs como fator de virulência (**C4 Tabela Suplementar 2**). O estudo de Lelis et al (2019) com *Burkholderia glumae* evidenciou a ação da metaloprotease codificada pelo gene *ptrA*, em que a ausência de atividade proteolítica em mutantes *ptrA*⁻ e sua restauração por um clone *ptrA* demonstraram que essa protease extracelular é essencial para a plena virulência da bactéria. Além disso, a redução significativa na gravidade da doença em plantas infectadas por mutantes *ptrA*⁻ reforça a importância das metaloproteases na patogenicidade.

Em fungos do gênero *Verticillium*, metaloproteases das famílias M36 e M43 foram identificadas como contribuintes chave para a virulência. A secreção dessas metaloproteases em *V. longisporum* em meio enriquecido com xilema sap. de *Brassica napus* ressaltou sua atividade durante a infecção. A ausência de severos sintomas de doença em mutantes Δ MEP1 de *V. dahliae*, comparados aos do tipo selvagem, indicou o papel crítico de MEP1 na patogenicidade. Por outro lado, mutantes Δ MEP2 não mostraram perda significativa de sintomas, evidenciando diferentes funções das enzimas na virulência desses fungos (LEONARD et al., 2020).

Em *Erwinia carotovora*, a metaloprotease codificada pelo gene ptrW foi associada à virulência. A indução do gene ptrW na presença de extratos de plantas, bem como a redução na maceração de tecidos vegetais em mutantes prtW, realça seu papel na patogenicidade. Além disso, os mecanismos de regulação complexos envolvendo ptrW demonstram sua importância durante diferentes estágios de infecção (MARITS et al., 1999; MARITS et al., 2002). No caso do fungo *Ustilago maydis*, a metaloprotease UmFly1 mostrou ser crucial para a clivagem de quitinases durante a infecção. A falta de clivagem em mutantes Δ umfly1 e a restauração do fenótipo pelo gene umfly1 reintroduzido confirmaram o papel essencial de UmFly1 na virulência. Além disso, a regulação da expressão de umfly1 durante a infecção e a redução na formação de tumores em plântulas de milho indicaram sua contribuição para a patogenicidade (ÖKMEN et al., 2018).

Outros estudos também destacaram a importância das metaloproteases na virulência de patógenos. A análise de *Oomicetos*, como *Phytophthora infestans*, revelou uma diversidade significativa de metaloproteases, algumas das quais foram associadas ao aumento da virulência, como as carboxipeptidases pertencentes à família das M14 metaloproteases (SCHOINA et al., 2021). Em fungos como *Blumeria graminis* e *Phellinus sulphurascens*, genes que codificam metaloproteases foram relacionados à capacidade de colonização e crescimento no hospedeiro. A regulação complexa dessas enzimas e sua influência nas interações patógeno-hospedeiro fornecem insights cruciais para o entendimento da virulência (CARTER et al., 2018; WHIGHAM et al., 2015; WILLIAMS et al., 2014; ZHANG et al., 2019).

Os resultados destacam a promissora utilidade das metaloproteases como alvos potenciais em estratégias de controle de fungos e bactérias fitopatogênicos. Ao silenciar a expressão dessas peptidases, foi observado um impacto significativo na virulência desses microrganismos. No entanto, a pesquisa nessa área ainda é

limitada, havendo uma necessidade de estudos mais abrangentes sobre como o silenciamento dessas proteínas afeta a virulência de diferentes fitopatógenos, incluindo insetos e nematoides que também infectam plantas. A expansão desses estudos é crucial para uma compreensão completa do papel das metaloproteases nas interações patógeno-hospedeiro.

Especificamente, a inibição de carboxipeptidases da família M14 expressas por insetos por meio da superexpressão do inibidor de batata em folhas de plantas hospedeiras demonstrou indução de resistência e efeitos prejudiciais no desenvolvimento dos insetos (ABDEEN et al., 2005). Estudos de knockout da carboxipeptidase em nematoides, como o *Radopholus similis*, evidenciaram uma redução na patogenicidade, ressaltando a importância dessas enzimas no ciclo de vida desses parasitas e em suas interações com as plantas hospedeiras (HUANG et al., 2017). Além disso, a expressão abundante de metaloproteases em fitonematoides, como *Meloidogyne incognita*, destaca o papel crucial dessas enzimas em fitoparasitas (CASTAGNONE-SERENO et al., 2010). Esses achados complementam a compreensão da ação das metaloproteases na infecção de fitopatógenos, enfatizando seu papel como fatores de virulência.

Essa compreensão aprofundada das metaloproteases como fatores de virulência oferece oportunidades para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes. A identificação dessas enzimas como alvos potenciais permite intervenções direcionadas, como a inibição seletiva das metaloproteases. A utilização de inibidores de carboxipeptidase, como os encontrados em solanáceas, pode ser uma abordagem promissora para diminuir a atividade virulenta dos fitopatógenos. Essas estratégias, que podem envolver a modificação genética ou intervenções bioquímicas, têm o potencial de reduzir os sintomas da doença nas plantas hospedeiras. No contexto do manejo integrado de patógenos, a busca por compostos inibidores das metaloproteases destaca-se como uma alternativa mais sustentável em comparação com produtos químicos sintéticos. A integração dessas abordagens inovadoras em programas de controle de doenças de plantas pode contribuir para uma maior segurança alimentar e para a redução do impacto ambiental. Portanto, a pesquisa contínua nessa área é fundamental para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes e sustentáveis no combate aos fitopatógenos.

3.2. Potencial antimicrobiano de novos ICPs prospectados a partir dos

genomas das solanáceas

As características físico-químicas dos ICPs das solanáceas identificados a partir do genoma englobam pontos isoelétricos predominantemente básicos ou ácidos, além de cargas predominantemente positivas. Quanto à toxicidade, embora sejam identificadas várias sequências não tóxicas em diversos gêneros, a maior parte das sequências é prevista como tóxica. O programa ToxinPred avalia a toxicidade baseado nas características dos amino ácidos de cada sequência, e o algoritmo do programa foi treinado com peptídeos já caracterizados empiricamente como tóxicos. Os resíduos C, H, N e P são abundantes em peptídeos considerados tóxicos e também preferidos em algumas posições específicas (GUPTA et al., 2013). Essas propriedades físico-químicas também conferem a essas sequências um potencial como agentes microbianos, destacando-se especialmente devido aos pontos isoelétricos básicos e cargas positivas (**C4 Tabela 2**).

C4 Tabela 2. Avaliação das propriedades físico-químicas de ICPs prospectados a partir de genomas das solanáceas.

Solanácea	Código sequências	ProtParam ^a			ToxinPred ^b
		pl	mm	carga	toxicidade
<i>C. annuum</i>	NW015961643	4.0	4547,07 Da	-2	tóxico
<i>C. annuum</i>	NC029988_2	7.8	4014,65 Da	+1	tóxico
<i>C. annuum</i>	NC029988_1	9.2	4556,31 Da	+5	não tóxico
<i>C. baccatum</i>	CM008453	4.0	4547,07 Da	-2	tóxico
<i>C. baccatum</i>	CM008454_1	9.2	4556,31 Da	+5	não tóxico
<i>C. baccatum</i>	CM008454_2	9.8	4750,62 Da	+8	não tóxico
<i>C. chinense</i>	CM008434_2	8.3	4621,26 Da	+2	tóxico
<i>C. chinense</i>	CM008442_1	9.2	4570,34 Da	+5	tóxico
<i>C. chinense</i>	CM008442_2	7.8	4014,65 Da	+1	tóxico
<i>C. chinense</i>	CM008442_3	9.8	4750,62 Da	+8	não tóxico
<i>D. stramonium</i>	JAAWWY010000139	7.8	4002,72 Da	+3	tóxico
<i>D. stramonium</i>	JAAWWY010000092	5.4	4558,14 Da	-1	não tóxico
<i>D. stramonium</i>	JAAWWY0100001181_1	7.8	4375,17 Da	+1	não tóxico
<i>D. stramonium</i>	JAAWWY0100001181_2	8.7	4449,21 Da	+3	não tóxico
<i>D. stramonium</i>	JAAWWY0100001181_3	8.9	4503,39 Da	+4	não tóxico
<i>J. sinuosa</i>	QJPP01000216_1	7.8	4279,06 Da	+1	tóxico
<i>J. sinuosa</i>	QJPP01000216_2	9.4	4284,99 Da	+6	tóxico
<i>J. sinuosa</i>	QJPP01000623	8.3	4263,98 Da	+2	não tóxico
<i>N. attenuata</i>	NW017672268	9.6	4696,46 Da	+7	não tóxico
<i>N. benthamiana</i>	CBMM010010781	6.7	6278,10 Da	0	tóxico

<i>N. benthamiana</i>	CBMM010027136	7.8	3867,30 Da	+1	tóxico
<i>N. benthamiana</i>	CBMM010066797	9.4	4735,54 Da	+6	não tóxico
<i>N. glauca</i>	PGPE01443851	9.8	4432,22 Da	+8	tóxico
<i>N. obtusifolia</i>	MCJB01048752	9.8	4432,22 Da	+8	tóxico
<i>N. otophora</i>	AWOL010051975	9.5	4273,11 Da	+7	tóxico
<i>N. rustica</i>	ML464407	9.8	4464,27 Da	+8	tóxico
<i>N. sylvestris</i>	NW009587209	9.8	4432,22 Da	+8	tóxico
<i>N. tabacum</i>	NW015950384	9.5	4273,11 Da	+7	tóxico
<i>N. tabacum</i>	NW015880589	9.8	4432,22 Da	+8	tóxico
<i>N. tomentosiformis</i>	NW008940762	9.5	4273,11 Da	+7	tóxico
<i>N. undulata</i>	ML295373	9.8	4464,27 Da	+8	tóxico
<i>P. axillaris</i> Parodii	JACAFL010040745	9.2	4349,94 Da	+5	tóxico
<i>P. axillaris</i> Parodii	JACAFL010080106	9.1	4172,82 Da	+5	tóxico
<i>S. ahanhouri</i>	WBIA01016295	8.9	4092,90 Da	+4	tóxico
<i>S. ahanhouri</i>	WBIA01169754	9.2	4864,88 Da	+6	tóxico
<i>S. arcanum</i>	CBYQ010036043	4.0	4600,05 Da	-3	tóxico
<i>S. chaucha</i>	WBIC010365211	7.8	3748,39 Da	+1	tóxico
<i>S. chilense</i>	RXGB01005720	4.4	4653,16 Da	-2	tóxico
<i>S. clarkiae</i>	JAABOM010000734_2	8.3	3864,56 Da	+2	tóxico
<i>S. clarkiae</i>	JAABOM010000929	8.6	4762,57 Da	+3	tóxico
<i>S. clarkiae</i>	JAABOM010007334	7.8	4555,29 Da	+1	tóxico
<i>S. clarkiae</i>	JAABOM010041495	9.1	4076,77 Da	+5	tóxico
<i>S. clarkiae</i>	JAABOM010000734_1	8.9	4533,33 Da	+4	não-tóxico
<i>S. commersonii</i>	JXZD01134409	6.1	4392,99 Da	0	tóxico
<i>S. curtilobum</i>	WBIH01458580	9.2	4864,88 Da	+6	tóxico
<i>S. juzepczukii</i>	WBID01172184	9.2	4864,88 Da	+6	tóxico
<i>S. lycopersicum</i> ^c	P14903	4.8	4376,00 Da	-1	tóxico
<i>S. lycopersicum</i> ^d	NC015442	4.0	4600,05 Da	-3	tóxico
<i>S. melongena</i> ^e	ICP-SMEL	8.7	4089,81 Da	+3	tóxico
<i>S. melongena</i>	BAUE01014918	9.1	4733,61 Da	+5	tóxico
<i>S. melongena</i>	BAUE01047304	9.4	4183,94 Da	+6	tóxico
<i>S. melongena</i>	BAUE01082275	9.1	4393,28 Da	+5	tóxico
<i>S. melongena</i>	BAUE01097813	8.6	4467,25 Da	+3	tóxico
<i>S. melongena</i>	BAUE01107301	8.7	4161,92 Da	+3	tóxico
<i>S. melongena</i>	DF358252	9.1	4733,61 Da	+5	tóxico
<i>S. melongena</i>	DF361981	9.4	4183,94 Da	+6	tóxico
<i>S. melongena</i>	DF368188_1	9.1	4393,28 Da	+5	tóxico
<i>S. melongena</i>	DF371537	8.6	4467,25 Da	+3	tóxico
<i>S. melongena</i>	BAUE01069360	8.3	3866,57 Da	+2	não tóxico
<i>S. melongena</i>	BAUE01082273	9.1	4144,01 Da	+5	não tóxico

<i>S. melongena</i>	BAUE01139019	8.3	3866-57 Da	+2	não tóxico
<i>S. melongena</i>	DF365686	8.3	3866-57 Da	+2	não tóxico
<i>S. melongena</i>	DF368188_2	9.1	4144,01 Da	+5	não tóxico
<i>S. pimpinellifolium</i>	CM026539	4.0	4600,05 Da	-3	tóxico
<i>S. tuberosum</i> ^f	NP0012750481	6.9	4913,56 Da	0	tóxico
<i>S. verrucosum</i>	FYAA01000060	9.6	4619,46 Da	+8	não tóxico

^a pI - ponto isoelétrico; mm - massa molecular.

^b ICPs não tóxicos são marcados na cor cinza.

^c P14903 - controle 1 peptídeo já caracterizado com dados na literatura e estrutura 3D já determinada.

^d NC015442 - sequência de ICP encontrada em outros banco de dados além do genoma.

^e ICP-SMEL- controle 2 peptídeo empírico utilizado como modelo para prospecção novos ICPs.

^f NP0012750481 - controle 3 peptídeo já caracterizado com dados na literatura, estrutura 3D e mecanismo de ação já determinados.

Esse potencial é corroborado pelas predições de atividade antimicrobiana feitas pelo iAMPred, que indicam uma alta probabilidade de ação, principalmente contra bactérias e fungos. Adicionalmente, o APD3 prevê a presença de peptídeos antimicrobianos, evidenciando potenciais de ligação mais positivos e índices de hidrofobicidade mais elevados. Seguindo a abordagem do Índice Boman, valores de potencial de ligação acima de 2 são considerados indicativos de atividade antimicrobiana expressiva, uma característica diretamente relacionada às maiores hidrofobicidades e cargas positivas observadas nos ICPs (BOMAN, 2003). Vale ressaltar o fato intrigante de que os ICPs não tóxicos demonstram um considerável potencial antimicrobiano (C4 Tabela 3). Esses inibidores, portanto, emergem como alvos promissores para aplicações biotecnológicas, abrindo possibilidades para futuras caracterizações aprofundadas.

Nos gêneros *Capsicum* e *Solanum*, os ICPs identificados por meio da abordagem de busca com ICP-SMEL exibem características antimicrobianas notavelmente proeminentes. Essa observação está em consonância com a literatura existente, a qual já documentou a notável atividade antimicrobiana das pimentas, bem como a resistência intrínseca das espécies do gênero *Solanum* contra a invasão de diversos patógenos (CHERENE et al., 2023; IMANDI; BAHADUR, 2023; LI et al., 2023). Em espécies como *Solanum melongena*, *Solanum tuberosum* e *Solanum lycopersicum*, mais de 500 genes foram identificados como marcadores de resistência (YANG et al., 2014). Ao compararmos os ICPs provenientes dessas espécies com aqueles previamente caracterizados no Capítulo 1, torna-se evidente que os ICPs encontrados em *S. melongena* exibem propriedades antimicrobianas mais proeminentes em comparação com os de *S. tuberosum* e *S. lycopersicum*. Esse

achado ressalta, mais uma vez, a importância de *S. melongena* como uma rica fonte de compostos naturais, particularmente os ICPs presentes em alta abundância na berinjela, os quais podem ser explorados para a extração de moléculas visando o controle de patógenos. Essa promissora característica oferece perspectivas para a aplicação biotecnológica visando o desenvolvimento de agentes de controle microbiano derivados desses ICPs.

C4 Tabela 3. Avaliação do potencial antimicrobiano de ICPs prospectados a partir de genomas das solanáceas.

Solanácea	Código ^a	iAMPred ^b (ação antimicrobiana)			APD3 – Predição para AMP	
		ab	av	af	hidrofobicidade (%/score)	potencial de ligação
<i>C. annuum</i>	NW015961643	0.92	0.74	0.62	38% / -2,11	0,82 Kcal/mol
<i>C. annuum</i>	NC029988_2	0.99	0.88	0.97	37% / 6,37	1,62 Kcal/mol
<i>C. annuum</i>	NC029988_1	0.96	0.77	0.94	36% / 9,93	2,94 Kcal/mol
<i>C. baccatum</i>	CM008453	0.92	0.74	0.62	38% / -2,11	0,82 Kcal/mol
<i>C. baccatum</i>	CM008454_1	0.96	0.77	0.94	36% / 9,93	2,94 Kcal/mol
<i>C. baccatum</i>	CM008454_2	0.99	0.82	0.97	31% / 11,35	3,81 Kcal/mol
<i>C. chinense</i>	CM008434_2	0.97	0.62	0.95	36% / 5,34	1,98 Kcal/mol
<i>C. chinense</i>	CM008442_1	0.97	0.81	0.96	36% / 9,55	2,92 Kcal/mol
<i>C. chinense</i>	CM008442_2	0.99	0.88	0.97	37% / 6,37	1,62 Kcal/mol
<i>C. chinense</i>	CM008442_3	0.99	0.82	0.97	31% / 11,35	3,81 Kcal/mol
<i>D. stramonium</i>	JAAWWY010000139	0.97	0.75	0.95	49% / 2,34	1,00 Kcal/mol
<i>D. stramonium</i>	JAAWWY010000092	0.95	0.85	0.83	41% / 0,92	1,43 Kcal/mol
<i>D. stramonium</i>	JAAWWY0100001181_1	0.95	0.72	0.82	44% / 5,13	0,97 Kcal/mol
<i>D. stramonium</i>	JAAWWY0100001181_2	0.95	0.70	0.90	39% / 8,44	1,84 Kcal/mol
<i>D. stramonium</i>	JAAWWY0100001181_3	0.94	0.79	0.95	44% / 6,48	1,61 Kcal/mol
<i>J. sinuosa</i>	QJPP01000216_1	0.91	0.84	0.93	46% / 5,43	1,44 Kcal/mol
<i>J. sinuosa</i>	QJPP01000216_2	0.97	0.80	0.98	32% / 10,65	3,27 Kcal/mol
<i>J. sinuosa</i>	QJPP01000623	0.98	0.76	0.95	42% / 4,41	1,45 Kcal/mol
<i>N. attenuata</i>	NW017672268	0.99	0.88	0.99	31% / 8,82	3,74 Kcal/mol
<i>N. benthamiana</i>	CBMM010010781	0.70	0.62	0.30	42% / 2,03	0,94 Kcal/mol
<i>N. benthamiana</i>	CBMM010027136	0.98	0.77	0.92	35% / 6,68	2,92 Kcal/mol
<i>N. benthamiana</i>	CBMM010066797	0.97	0.83	0.96	33% / 9,46	3,65 Kcal/mol
<i>N. glauca</i>	PGPE01443851	0.86	0.60	0.88	36% / 9,46	3,00 Kcal/mol
<i>N. obtusifolia</i>	MCJB01048752	0.86	0.60	0.88	36% / 9,46	3,00 Kcal/mol
<i>N. otophora</i>	AWOL010051975	1.00	0.91	0.99	43% / 7,26	2,01 Kcal/mol
<i>N. rustica</i>	ML464407	0.84	0.48	0.94	28% / 16,29	3,95 Kcal/mol
<i>N. sylvestris</i>	NW009587209	0.86	0.60	0.88	36% / 9,46	3,00 Kcal/mol

<i>N. tabacum</i>	NW015950384	1.00	0.91	0.99	43% / 7,26	2,01 Kcal/mol
<i>N. tabacum</i>	NW015880589	0.86	0.60	0.88	36% / 9,46	3,00 Kcal/mol
<i>N. tomentosifor- mis</i>	NW008940762	1.00	0.91	0.99	43% / 7,26	2,01 Kcal/mol
<i>N. undulata</i>	ML295373	0.84	0.48	0.94	28% / 16,29	3,95 Kcal/mol
<i>P. axillaris</i> Parodii	JACAFL010040745	0.97	0.69	0.98	35% / 8,55	3,52 Kcal/mol
<i>P. axillaris</i> Parodii	JACAFL010080106	1.00	0.95	0.99	31% / 10,38	3,59 Kcal/mol
<i>S. ahanhouri</i>	WBIA01016295	0.99	0.94	0.98	40% / 8,05	1,75 Kcal/mol
<i>S. ahanhouri</i>	WBIA01169754	0.99	0.91	0.98	39% / 12,7	2,14 Kcal/mol
<i>S. arcanum</i>	CBYQ010036043	0.94	0.83	0.83	33% / 2,64	1,73 Kcal/mol
<i>S. chaucha</i>	WBIC010365211	0.99	0.85	0.97	47% / 5,46	1,66 Kcal/mol
<i>S. chilense</i>	RXGB01005720	0.91	0.86	0.88	36% / 3,36	1,88 Kcal/mol
<i>S. clarkiae</i>	JAABOM010000734_2	0.96	0.89	0.93	49% / 4,72	1,42 Kcal/mol
<i>S. clarkiae</i>	JAABOM010000929	0.95	0.77	0.90	34% / 13,88	2,65 Kcal/mol
<i>S. clarkiae</i>	JAABOM010007334	0.98	0.81	0.95	43% / 4,14	1,56 Kcal/mol
<i>S. clarkiae</i>	JAABOM010041495	0.99	0.83	0.99	35% / 9,03	2,55 Kcal/mol
<i>S. clarkiae</i>	JAABOM010000734_1	0.99	0.82	0.97	37% / 9,14	2,11 Kcal/mol
<i>S. commersonii</i>	JXZD01134409	0.99	0.93	0.98	34% / 2,26	0,96 Kcal/mol
<i>S. curtibolum</i>	WBIH01458580	0.99	0.91	0.98	39% / 12,7	2,14 Kcal/mol
<i>S. juzepczukii</i>	WBID01172184	0.99	0.91	0.98	39% / 12,7	2,14 Kcal/mol
<i>S. lycopersicum</i> ^c	P14903	0.89	0.76	0.86	36% / 5,71	1,58 Kcal/mol
<i>S. lycopersicum</i> ^d	NC015442	0.94	0.83	0.83	33% / 2,64	1,73 Kcal/mol
<i>S. melongena</i> ^e	ICP-SMEL	0.99	0.93	0.99	38% / 8,90	1,92 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	BAUE01014918	0.99	0.90	0.98	34% / 13,03	2,39 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	BAUE01047304	0.98	0.81	0.99	36% / 11,19	3,39 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	BAUE01082275	0.98	0.86	0.98	42% / 5,62	1,72 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	BAUE01097813	0.98	0.94	0.95	42% / 6,66	1,93 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	BAUE01107301	0.99	0.94	0.98	41% / 6,09	1,68 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	DF358252	0.99	0.90	0.98	34% / 13,03	2,39 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	DF361981	0.98	0.81	0.99	36% / 11,19	3,39 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	DF368188_1	0.98	0.86	0.98	42% / 5,62	1,72 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	DF371537	0.98	0.94	0.95	42% / 6,66	1,93 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	BAUE01069360	0.98	0.93	0.95	46% / 4,23	1,28 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	BAUE01082273	0.99	0.93	0.99	43% / 7,97	1,89 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	BAUE01139019	0.98	0.93	0.95	46% / 4,23	1,28 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	DF365686	0.98	0.93	0.95	46% / 4,23	1,28 Kcal/mol
<i>S. melongena</i>	DF368188_2	0.99	0.93	0.99	43% / 7,97	1,89 Kcal/mol
<i>S. pimpinellifolium</i>	CM026539	0.94	0.83	0.83	33% / 2,64	1,73 Kcal/mol
<i>S. tuberosum</i> ^f	NP0012750481	0.89	0.35	0.84	43% / 3,81	1,11 Kcal/mol
<i>S. verrucosum</i>	FYAA01000060	1.00	0.94	1.00	36% / 6,49	2,73 Kcal/mol

^a ICPs não tóxicos são marcados na cor cinza.

^b Os valores de cada tipo de ação antimicrobiana (ab-antibacteriana, av-antiviral; af-antifúngica) representam a probabilidade entre 0 e 1 das sequências terem ação antibacteriana, antiviral e/ou antifúngica onde 1 é a probabilidade máxima.

^c P14903 - controle 1 peptídeo já caracterizado com dados na literatura e estrutura 3D já determinada.

^d NC015442 - sequência de ICP encontrada em outro banco de dados além do genoma.

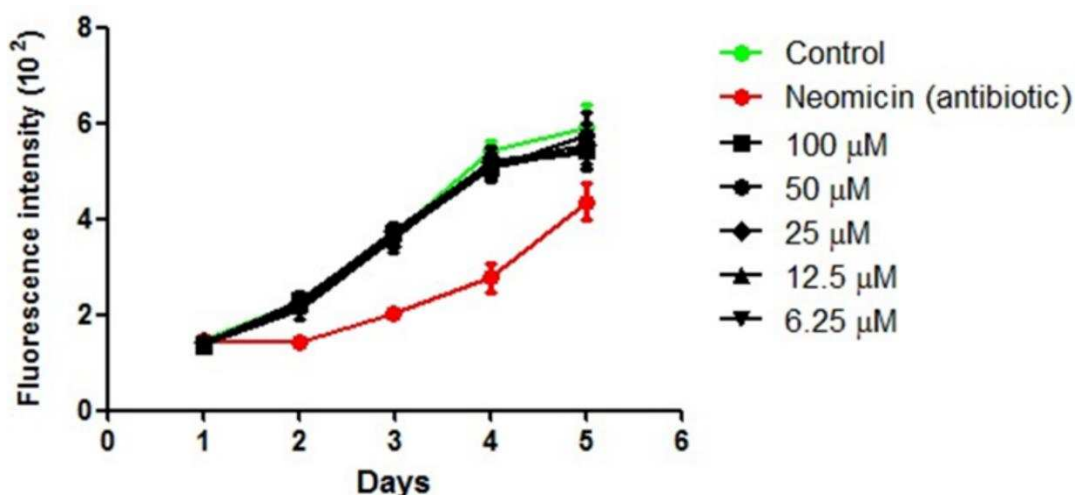
^e ICP-SMEL- controle 2 peptídeo empírico utilizado como modelo para prospecção novos ICPs.

^f NP0012750481 - controle 3 peptídeo já caracterizado com dados na literatura, estrutura 3D e mecanismo de ação já determinados.

3.3. Expressão de ICP-SMEL de *Solanum melongena* e PCI de *Solanum tuberosum* no sistema eucarioto de *Leishmania tarentolae*

A avaliação de toxicidade do ICP proveniente de *Solanum tuberosum* em relação ao cultivo de *L. tarentolae* resultou na constatação de que o PCI não exerce inibição sobre o protozoário (**C4 Figura 3**). Esse resultado confere uma base sólida e tranquilizadora para a progressão da proposta de clonagem de ICPs utilizando esse sistema. É importante notar que a escolha desse sistema de clonagem é respaldada pelo fato de que *L. tarentolae* é um organismo eucariótico, o que proporciona um ambiente propício para o correto enovelamento dos peptídeos, juntamente com as modificações pós-traducionais (3 ligações dissulfeto) necessárias para o pleno desempenho das funções biológicas dos ICPs.

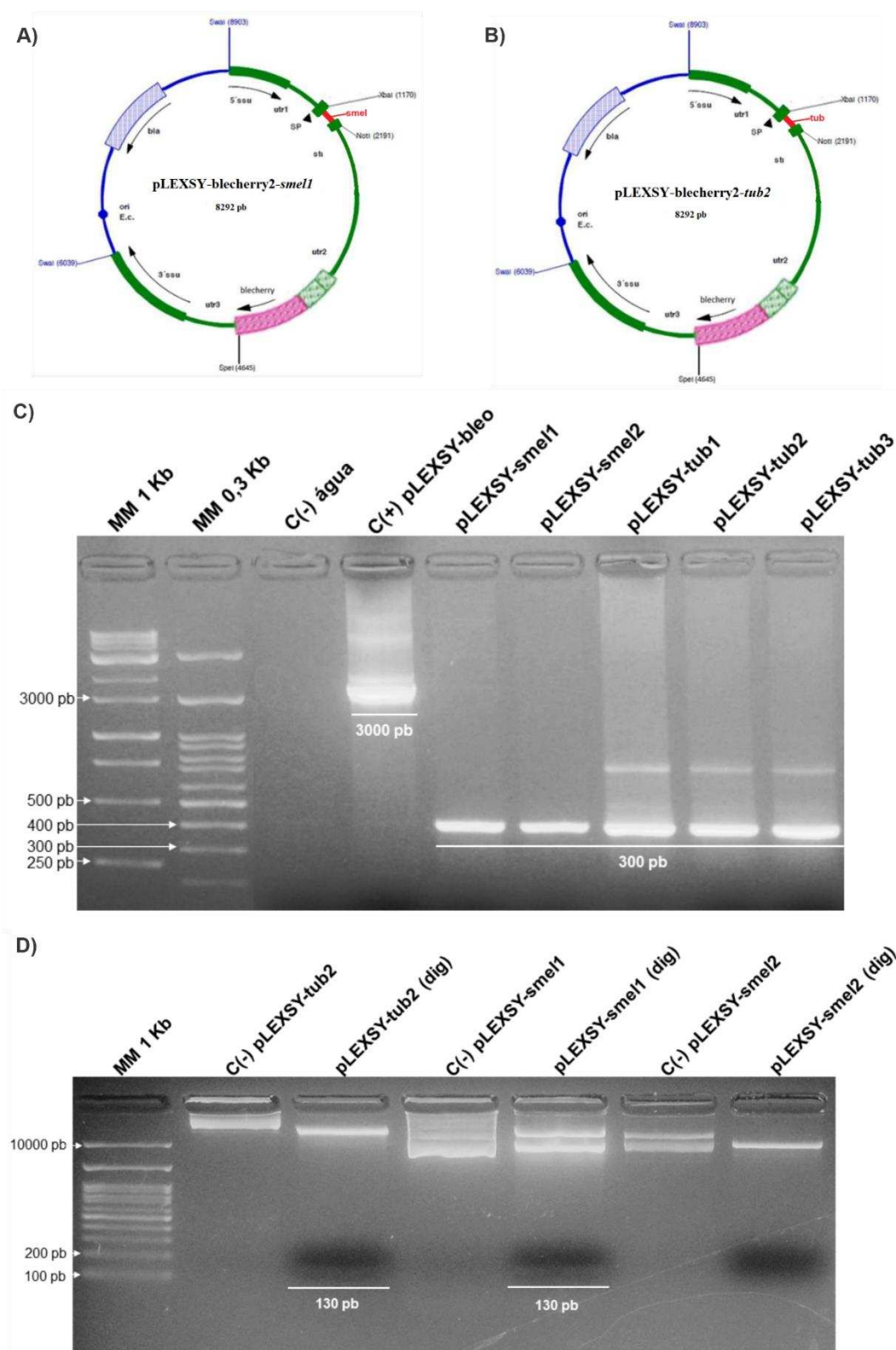
Ao confirmar a ausência de inibição do protozoário pelo ICP de *Solanum tuberosum*, a viabilidade dessa abordagem é reforçada para a produção de ICPs funcionais. O sistema de clonagem adotado, com sua capacidade de assegurar o enovelamento adequado e as modificações pós-traducionais essenciais, pode ser considerado uma ferramenta promissora para a engenharia de ICPs com potencial aplicação biotecnológica (DE OLIVEIRA et al., 2019) ausência de toxicidade nesse contexto específico também sugere que a expressão e a produção de ICPs podem ser realizadas sem comprometer a viabilidade e o crescimento do organismo hospedeiro, ampliando ainda mais as perspectivas para futuras aplicações na área da biologia molecular e na pesquisa de agentes bioativos.



C4 Figura 3. Teste de toxicidade do PCI comercial de *Solanum tuberosum* sobre cultura de *Leishmania tarentolae*. Diluição seriada das concentrações variando de 6,25 a 100 µM do PCI de batata que foram testadas para ver se o ICP inibia de alguma forma o protozoário. Foram utilizados como controle positivo cultivo de *L. tarentolae* sem tratamentos e como controle de inibição o antibiótico neomicina. Crescimento foi acompanhado por leitura em A488 e A510 específicos para fluorescência a EGF.

A validação da clonagem dos genes ICP-SMEL e PCI no vetor de expressão pLEXY-blecherry-2 foi criteriosamente comprovada por meio de análises de PCR e de digestão (conforme ilustrado na **C4 Figura 4**). As construções finais dos clones de SMEL e TUB pLEXY-blecherry-2-*smel1* (**C4 Figura 4A**) e pLEXY-blecherry-2-*tub2* (**C4 Figura 4B**) reduziu em aproximadamente 902 pb o tamanho do vetor original. Essa diminuição foi obtida através da exclusão da região de stuffer do vetor, bem como da região responsável pela adição de cauda de histidina à sequência a ser clonada. Na **C4 Figura 4C** foi possível visualizar os produtos de PCR relativos aos cinco clones positivos: *smel1*, *smel2*, *tub1*, *tub2* e *tub3*. Cada um desses clones exibe bandas de aproximadamente 300 pb. A amplificação foi realizada utilizando os primers P1442_f e A264_r, especificamente concebidos para o vetor pLEXY, conforme as orientações do manual da Jena. Esta região de amplificação compreende 80 pb antes do códon de iniciação e 80 pb após o códon de terminação. Considerando que cada gene correspondente aos ICPs possui 130 pb, a amplificação final geraria um fragmento de aproximadamente 290 pb. Esta correspondência se alinha com a altura das bandas evidenciadas, corroborando de maneira inequívoca a clonagem por PCR para os cinco clones. Por sua vez, a confirmação da clonagem foi também confirmada por meio da digestão das construções utilizando as enzimas de restrição *XbaI* e *NotI*. A análise dessas digestões confirma de forma conclusiva a clonagem dos clones *smel1* e *tub2*, uma vez que os fragmentos liberados, correspondentes às sequências

synthesized from the genes, present the expected size of 130 pb, as illustrated in **C4 Figura 4D**.



C4 Figura 4. Clonagem de ICP-SMEL de *S. melongena* e PCI de *S. tuberosum* no vetor de expressão pLEXSY-blecherry-2. **A)** Representação da construção final do vetor com ICP-SMEL clonado chamada pLEXSY-blecherry-2-smel1 com 8292 pb. **B)** Representação da construção final do vetor com PCI clonado chamada pLEXSY-blecherry-2-tub2 com 8292 pb. **C)** Eletroforese em gel de agarose 2 % contendo os produtos de PCR dos genes de ICPs inseridos no vetor, sendo 2 clones de ICP-SMEL e 3 clones de PCI. **D)** Eletroforese em gel de agarose 2 % contendo os produtos de PCR dos genes de ICPs inseridos no vetor, sendo 2 clones de ICP-SMEL e 3 clones de PCI.

clones de PCI, em que são evidenciadas pela barra branca bandas de 300 pb para os produtos de PCR . **D)** Eletroforese em gel de agarose 2% contendo os produtos de digestão do vetor pLEXY-blecherry-2 liberando os fragmentos de baixo tamanho (130 pb) dos genes de ICPs, que estão evidenciados pela barra branca. Em **A** e **B** é evidenciado em vermelho qual região os ICPs foram inseridos no vetor entre os sítios de restrição das enzimas XbaI e NotI. **MM**: Padrão de bandeamento de DNA 1 Kb

A observação das bandas correspondentes aos fragmentos dos genes *smel1* e *tub2* apresenta desafios de visualização, devido ao tamanho extremamente reduzido dessas bandas. Como resultado, a migração das bandas no gel de eletroforese frequentemente se detém quando o gel se encontra saturado com excesso de corante na região de parada da corrida. Isso, por sua vez, dificulta a clara visualização dessas bandas e pode comprometer a precisão da análise. Outra indicação relevante da ocorrência da digestão é a observação de padrões de bandas distintos entre os controles negativos de cada digestão, quando comparados com os genes submetidos à digestão. Esse fenômeno é evidente tanto no caso do clone *smel1* quanto no *tub2*, solidificando ainda mais a confirmação da clonagem por meio da análise de digestão.

A desafiante visualização das bandas devido ao tamanho reduzido e a possível sobreposição com o excesso de corante ressalta a necessidade de cautela e de múltiplas abordagens para a confirmação das etapas de clonagem. Nesse sentido, a observação de padrões diferenciados de bandas entre os controles negativos e os genes digeridos fornece um suporte adicional à integridade e precisão das construções genéticas obtidas.

A análise de sequenciamento permitiu confirmar a clonagem apenas no caso do clone *tub2*, enquanto para o clone *smel1* o resultado do sequenciamento foi inconclusivo. No alinhamento do resultado do sequenciamento com o primer de síntese do gene *p_SMEL_plexsy_R*, foram observados diversos gaps, em contraste com o padrão observado para o clone *tub2* (**C4 Figura 5A**). No caso do clone *tub2*, o alinhamento entre o resultado do sequenciamento e o primer *p_TUB_plexsy_R* exibiu apenas 2 gaps ao longo da região alinhada, o que confirma de forma definitiva a clonagem desse gene (**C4 Figura 5B**). Além disso, um indicativo adicional da efetiva clonagem é a presença em fase dos dois sítios de restrição das enzimas *NotI* e *XbaI* no alinhamento referente ao clone *tub2*. No entanto, para o clone *smel1*, o alinhamento mostra somente a presença do sítio da enzima *NotI*.

A) Sequenciamento clone pLEXSY-bleocherry-smel1

SMEI_sequenc_R	AACGCGCGCGCTGACGCGGCGTAGTGCTCAGTGTCCGGCATCACCGAGATTGCCGAGCGAC	60
p_SMEI_plexsy_R	--GCGGCCG-----CTCATGGAAGGATACACGCAAGCCGCC-----	35
	*** ** * * * * * * * * *	
	sítio NotI	
SMEI_sequenc_R	TTGGCCTTGCTGTCTTGATCAGGCAGCCACCAAAAGCGATGTCGGTGCCGTCGATCCCA	120
p_SMEI_plexsy_R	-----CCGGCTAATGCT	47
	*** * * *	
SMEI_sequenc_R	ACGGTGATATTGCTACTGGTGTGGCCGGGGCCGGGGTAAAATACCTTGAGCGGGCCAAAG	180
p_SMEI_plexsy_R	CTGCTTACATT-----	59
	* * * * *	
SMEI_sequenc_R	TTGGGCGCGGTTGCTGGTTCGACCCAGCCATTGGCGGCRAAAGTCAGGCTGTGTTGCGCC	240
p_SMEI_plexsy_R	-----TTGGCACACTGTCAAGTGGCTTGCAATCCTCATCTGTGTTACAGT	103
	* * * * * * * * * * * * * * *	
SMEI_sequenc_R	GCAACCATCCCCTCTTGCGGGGAAGCTGGTTCGACAACGCATTGGCATAAGTCGCAATC	300
p_SMEI_plexsy_R	TGTACCCACAGCTTTTGTATG-----	124
	*** * * * * *	

B) Sequenciamento clone pLEXSY-bleocherry-tub2

TUB_sequenc_R	AGGGCGGCCGCTCAACCGACGTAAGGCCCGCAGGTCCGAGCCGAGTTCAGCASGCCTGA	120
P_TUB_plexsy_R	--GCGGCCGCTCAACCGACGTAAGGCCCGCAGGTCCGAGCCGAGTTCAGCAGGCCCTGA	57

	sítio NotI	
TUB_sequenc_R	CAGAACCATGCCCGGAACACTCATCGTGCCTTGCATGGCTTATTGCAGATGGGGTCG	180
P_TUB_plexsy_R	CAGAACCATGCCCGGAACAATCATCGTGCCTTGCATGGCTTATTGCAGATGGGGTCG	117

TUB_sequenc_R	GCGTGTGTTGCTCTAGAGAGGGCGCCAGCGTCGACCGACACGGCCGCTGCAACCAAGCATG	240
P_TUB_plexsy_R	GCGTGTGTTGCT-----	130

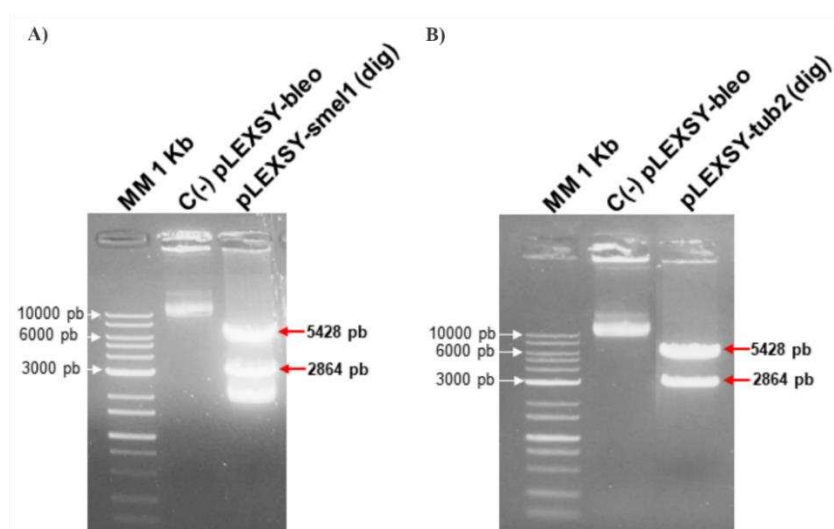
	sítio XbaI	

C4 Figura 5. Sequenciamento dos clones de ICP-SMEL e PCI no vetor pLEXSY-blecherry-2. **A)** Alinhamento gerado pelo Clustal Omega entre resultado do sequenciamento para ICP-SMEL no sentido reverso (SMEI_sequenc_R) e primer reverso do gene de ICP-SMEL sintetizado (p_SMEI_plexsy_R). **B)** Alinhamento gerado pelo Clustal Omega entre resultado do sequenciamento para PCI no sentido reverso (TUBL_sequenc_R) e primer reverso do gene de PCI sintetizado (p_TUB_plexsy_R). **Quaro vermelho** evidencia sítios referentes às enzimas de restrição NotI e XbaI. * representam bases nitrogenadas iguais ao longo do alinhamento.

A disparidade entre os resultados de sequenciamento para os clones smel1 e tub2 destaca a importância de considerar múltiplas abordagens de confirmação da clonagem, uma vez que variações nos padrões de sequenciamento podem ocorrer. A falta de alinhamento preciso com o primer de síntese p_SMEI_plexsy_R para o clone smel1 indica a necessidade de uma análise mais aprofundada para elucidar os eventuais problemas. Enquanto isso, a concordância entre o sequenciamento e os sítios de restrição para o clone tub2 fortalece a validação da clonagem bem-sucedida nesse caso específico. Esses resultados ressaltam a complexidade associada à caracterização precisa de clones, reforçando a importância da utilização de abordagens complementares para confirmar a integridade das construções genéticas.

Embora o sequenciamento do clone smel1 não tenha fornecido conclusões definitivas, outros indicativos apontam para a sua integração bem-sucedida e a

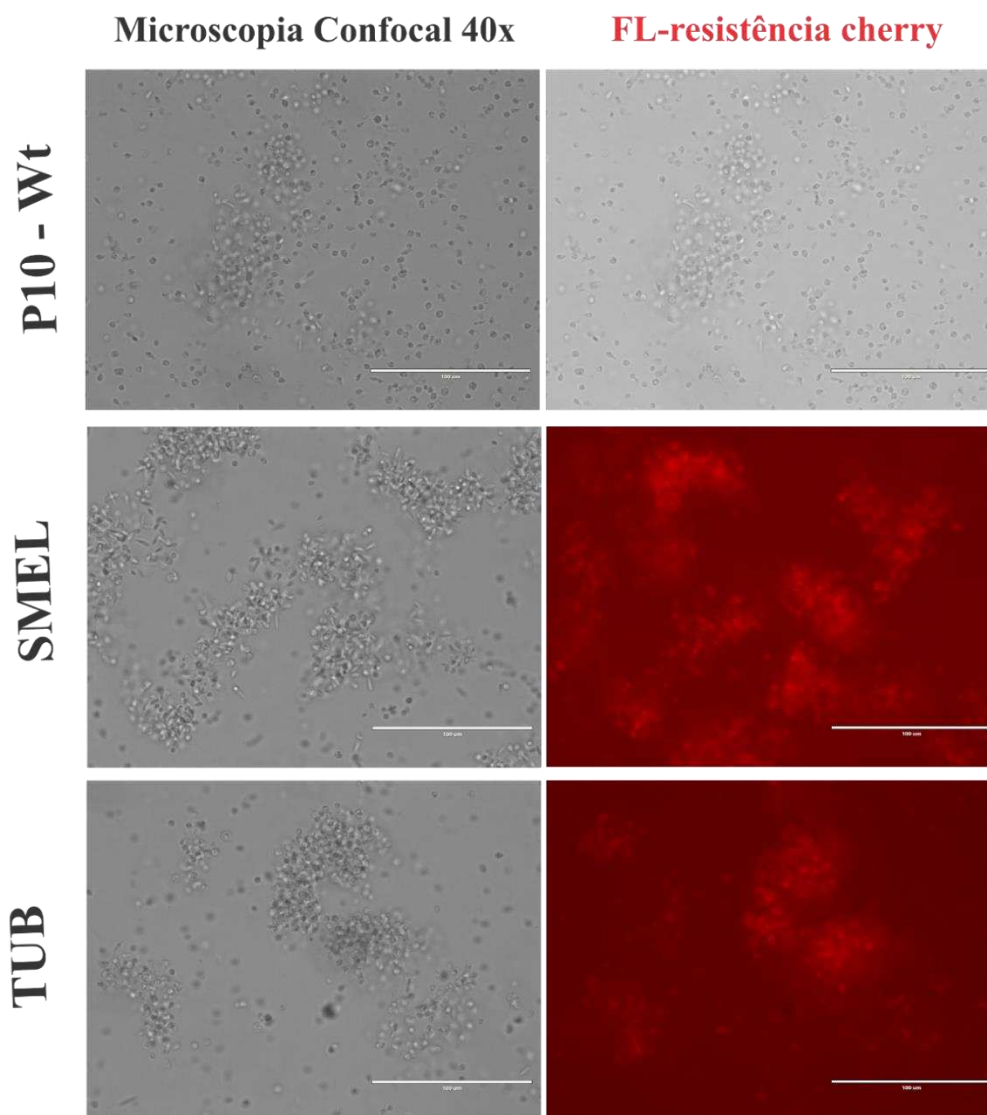
clonagem correta no vetor pLEXSY-blecherry-2. Um desses indícios é apresentado na **C4 Figura 6** que demonstra a validação da digestão utilizando a enzima *SwaI* nas construções dos clones pLEXSY-blecherry-2-*smel1* (**C4 Figura 6A**) e pLEXSY-blecherry-2-*tub2* (**C4 Figura 6B**). Nesta figura, é possível observar a presença de bandas posicionadas nas alturas apropriadas para essa digestão. A sequência total de 5428 pb corresponde à sequência gênica de interesse, contendo os respectivos peptídeos inseridos, a qual é posteriormente transfectada em *Leishmania tarentolae*. A sequência de 2864 pb, por sua vez, representa a porção do vetor de expressão em *E. coli*, de acordo com as diretrizes do manual da Jena, que é eliminada no processo.



C4 Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% demonstrando a digestão por *SwaI* das construções recombinantes dos clones pLEXSY-blecherry-2-*smel1* e pLEXSY-blecherry-2-*tub2*. **A)** Fragmentos resultantes da digestão da construção pLEXSY-blecherry-2-*smel1*, liberando uma sequência de 5428 pb que inclui o peptídeo inserido, destinada à transfecção em *L. tarentolae*. **B)** Fragmentos provenientes da digestão da construção pLEXSY-blecherry-2-*tub2*, resultando em uma sequência de 5428 pb que abriga o peptídeo inserido, destinada à transfecção em *L. tarentolae*. Em **A** e **B**, a sequência de 2864 pb representa a porção do vetor de expressão em *E. coli*. **MM:** Padrão de bandeamento de DNA 1 Kb

A construção específica para o clone *smel1* foi concebida com um tamanho total de 8292 pb, correspondente à sua inserção adequada no vetor. A digestão com a enzima *SwaI* libera um fragmento menor de 2864 pb, resultando em uma sequência apropriada para a transfecção de 5428 pb. Esse fragmento corresponde a cassete de expressão em *L. tarentolae*, caracterizado por duas regiões denominadas 5ssu e 3ssu que integra no genoma de *L. tarentolae* por recombinação homologa no locus do 18S do ribossomo. Na **C4 Figura 6A**, as bandas evidenciam uma correspondência precisa com esses tamanhos, conforme atestado pelo marcador molecular utilizado. Esse padrão de bandas sugere fortemente a correta inserção de *smel1* no vetor, corroborando a eficácia do processo de clonagem. Similarmente, a **C4 Figura 6B**

demonstra resultados análogos para o clone tub2, reforçando ainda mais a confirmação da sua inserção precisa e clonagem correta no vetor de expressão de *L. tarentolae*. Dessa maneira, embora o sequenciamento possa ocasionalmente apresentar limitações em termos de resolução, a combinação de múltiplos métodos de confirmação, incluindo análises de digestão, oferece um suporte substancial à integridade e à autenticidade dos clones.



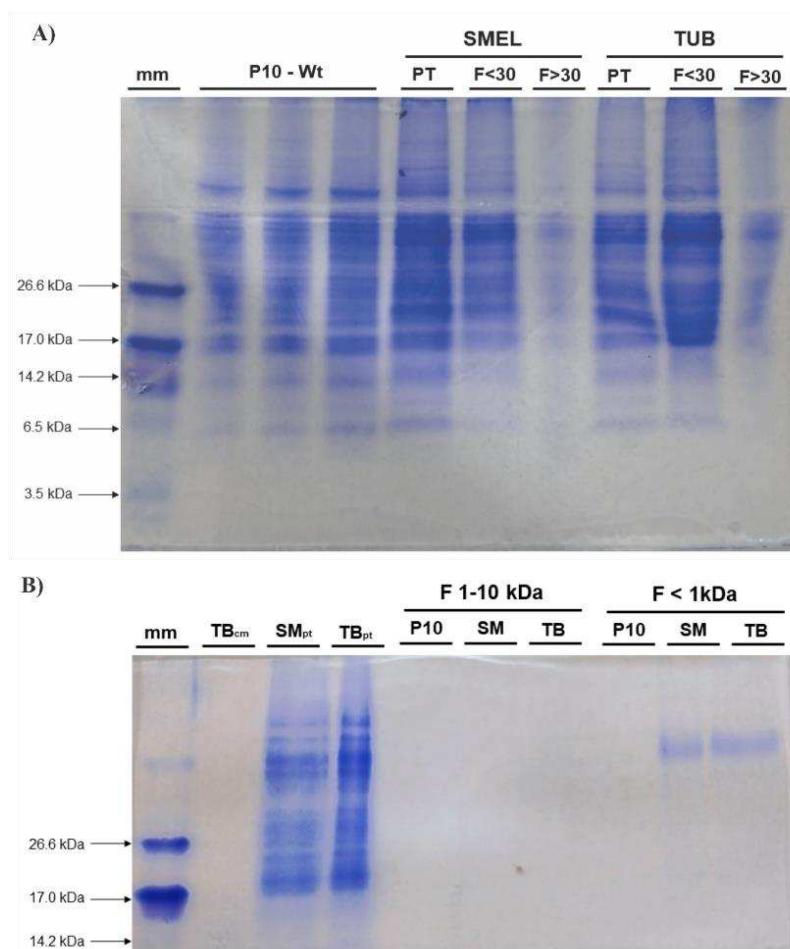
C4 Figura 7. Seleção poli clonal de populações de *Leishmania tarentolae* transfectada e resistentes expressando os clones smel1 e tub2. A microscopia confocal das culturas de *L. tarentolae* inclui linhagem selvagem P10 e populações resistentes para os clones smel1 e tub2, revelando emissão de fluorescência na faixa do espectro vermelho devido à expressão da proteína cherry +(marcador de resistência). Cada amostra é representada por dois painéis: um que ilustra a microscopia em luz branca e outro que apresenta a sobreposição com a fluorescência no espectro vermelho, indicando a resistência nas populações de smel1 e tub2. **FL** fluorescência.

A seleção poli clonal das culturas de *L. tarentolae* transfectadas com os genes smel1 ou tub2 evidencia a expressão bem-sucedida dos peptídeos, conforme

demonstrado pela marca de resistência fluorescente no espectro do vermelho nas construções que expressam constitutivamente a proteína cherry. Na **C4 Figura 7**, os painéis ilustram claramente a resistência manifestada nas populações de *L. tarentolae* transfectadas com *smel1* e *tub2*, fornecendo assim uma confirmação adicional da clonagem bem-sucedida e da correta inserção dos ICPs no vetor de expressão.

Destaca-se que a cepa P10, que atua como controle negativo, não apresenta fluorescência visível. Isso ocorre porque a cepa P10 representa a linhagem selvagem e não transfectada, servindo como ponto de referência para distinguir a fluorescência resultante da expressão dos ICPs nas culturas transfectadas. Essa abordagem estratégica de controle contribui para a validação da expressão específica dos peptídeos, garantindo que a fluorescência observada seja atribuída de maneira precisa às construções transfectadas. O uso da proteína cherry como gene repórter e expressão oferece uma maneira eficaz de visualizar e monitorar a expressão dos peptídeos de interesse nas culturas de *L. tarentolae*. Ao observarmos a fluorescência no espectro do vermelho nas populações transfectadas, podemos concluir de forma confiável que os genes *smel1* e *tub2* foram incorporados de maneira correta nas células e que sua expressão ocorre de maneira efetiva.

A análise por gel Tricina-PAGE revelou a presença de uma banda de proteína abaixo de 6 kDa em todas as canaletas da **C4 Figura 8A**. Essa banda sugere a possível presença dos peptídeos de interesse. No entanto, não foram observadas diferenças significativas nas frações proteicas entre a cepa P10 e os ICPs clonados. A ausência de diferenças indica que a *Leishmania* selvagem também pode expressar peptídeos como metabólitos. Na **C4 Figura 8B**, o gel avalia amostras provenientes da ultrafiltração, que foram utilizadas nos testes antimicrobianos. No entanto, os resultados do gel foram inconclusivos, pois apenas as bandas de 26,6 e 17,0 kDa do marcador molecular de baixa massa foram visíveis. Isso sugere que o gel pode ter corrido por tempo excessivo, resultando na perda das bandas de baixo peso molecular. Nas canaletas 9 e 10 referentes às frações $F < 1$ kDa de SMEL e TUB respectivamente é possível ver bandas na região mais alta do gel, que podem corresponder a perdas dos peptídeos de interesse que passaram a membrana de 1000 Da na ultrafiltração e se aglutinaram formando essas bandas que não se separam no gel.



C4 Figura 8. Eletroforese em tricina-page para análise de proteína total das frações enriquecidas e extratos de expressão dos peptídeos *smel1* e *tub2* em *L. tarentolae*. **A)** Gel de análise de proteína total e aquecimento seletivo dos extratos do cultivo (sobrenadante) de P10, SMEL e TUB. As canaletas da esquerda para direita correspondem – **1) mm**: marcador molecular de baixa massa intervalo de 3,5 a 26,6 kDa; **2-4)** proteína total cepa P10 selvagem aplicadas em 3 quantidades diferentes (6; 9 e 18 μ L); **5-7)** amostras transfecção SMEL – PT: proteína total, F<30: aquecimento seletivo fração menor que 30 kDa e F>30: aquecimento seletivo fração maior que 30 kDa; **8-10)** amostras transfecção TUB – PT: proteína total, F<30: aquecimento seletivo fração menor que 30 kDa e F>30: aquecimento seletivo fração maior que 30 kDa. **B)** Gel de análise da ultrafiltração dos extratos do cultivo (sobrenadante) de P10, SMEL e TUB. As canaletas da esquerda para direita correspondem – **1) mm**: marcador molecular de baixa massa intervalo de 3,5 a 26,6 kDa; **2) TB_{cm}**: ICP batata comercial; **3) SM_{pt}**: proteína total transfecção SMEL; **4) TB_{pt}**: proteína total transfecção TUB; **5-7) Ultrafiltração F1-10 kDa**: P10; SMEL; TUB; **8-10) Ultrafiltração F<1 kDa**: P10; SMEL; TUB.

Como sugestão para próximos experimentos, seria benéfico concentrar uma maior quantidade de extrato para a realização do gel Tricina-PAGE dessas amostras. Paralelamente, a preparação de material para a espectrometria de massas por MALDI da banda abaixo de 6 kDa poderia ser considerada. Isso permitiria uma tentativa de identificação dos peptídeos clonados, fornecendo uma confirmação adicional por meio de identificação de peptídeos trípticos, além do sequenciamento de DNA já realizado. A combinação de técnicas, como espectrometria de massas e sequenciamento de DNA, pode fornecer uma validação robusta da identificação dos peptídeos clonados.

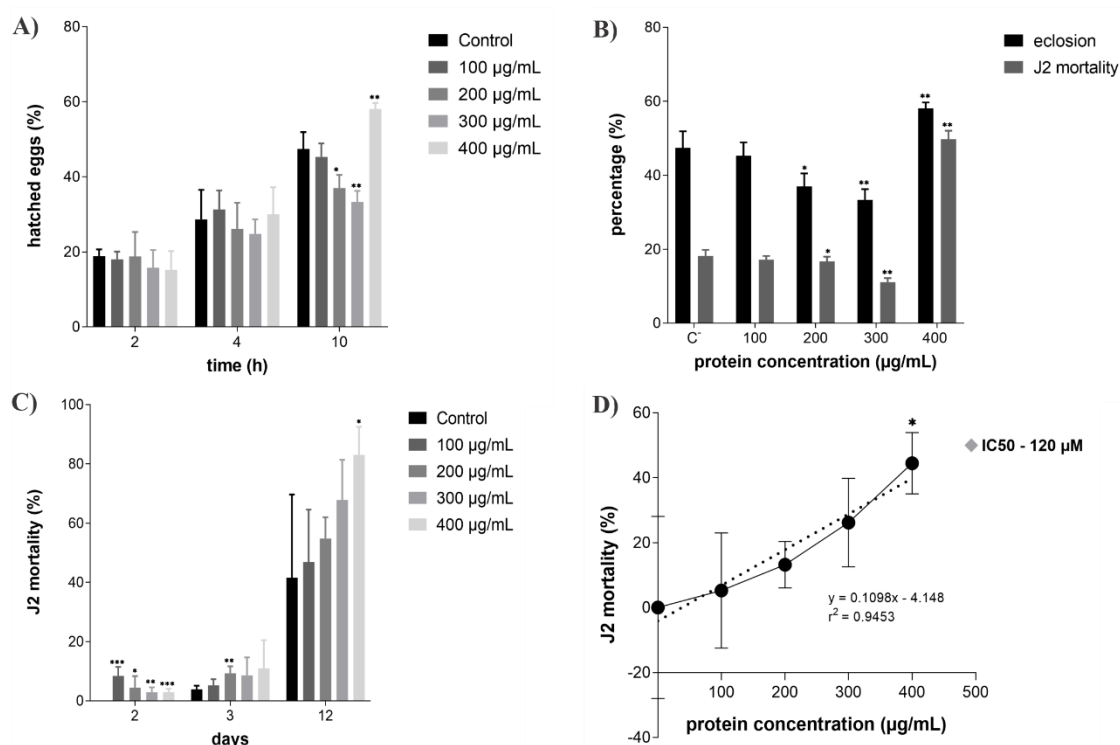
Além disso, otimizar os procedimentos experimentais, como a concentração de amostras e o tempo de corrida do gel, pode melhorar a resolução e a interpretação dos resultados, contribuindo para uma compreensão mais completa dos peptídeos expressos e suas características.

A escolha do sistema de expressão para proteínas recombinantes deve considerar suas características, vantagens e limitações (GERNGROSS, 2004). Enquanto sistemas bacterianos e de levedura são amplamente usados devido à sua facilidade de manipulação e expressão rápida, eles frequentemente carecem de modificações pós-traducionais necessárias para algumas proteínas. Nesse contexto, *Leishmania tarentolae* emerge como uma alternativa promissora para expressão heteróloga de peptídeos, como os ICPs, que possuem modificações pós tradicionais como as pontes dissulfeto (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; GERNGROSS, 2004). *L. tarentolae* sendo um protozoário parasita não patogênico, com maquinaria de modificações pós-traducionais mais similares a mamíferos do que leveduras e por sua capacidade de produzir proteínas com dobramento correto e modificações complexas, como glicosilação e pontes de dissulfeto, torna-o um candidato valioso para a expressão de proteínas e também peptídeos com atividade biológica. Diferentemente de outros sistemas de células de mamífero, *L. tarentolae* oferece rápida multiplicação em cultura, escalabilidade e cultivo menos complexo. Sendo assim, o sistema LEXSY oferece uma plataforma promissora para expressão de proteínas recombinantes e também de peptídeos com modificações pós-traducionais complexas, apresentando uma alternativa viável e escalável para a produção de peptídeos mais complexos de interesse, como é o caso dos ICPs (BASILE; PETICCA, 2009; DE OLIVEIRA et al., 2019; LAI; KLATT; LIM, 2019)

3.4. Atividade antimicrobiana de ICP-SMEL de *Solanum melongena* e PCI de *Solanum tuberosum*

A avaliação da inibição da eclosão de ovos e a mortalidade de J2 de *M. incognita* revelaram uma ação tardia e notável do PCI comercial de *Solanum tuberosum*. Entre os diferentes tratamentos, a concentração mais alta do inibidor puro (400 µg) exibiu uma atividade nematicida marcante, resultando em 40% de mortalidade dos juvenis em 10 e 12 dias de tratamento (**C4 Figura 9**). No teste de eclosão, observou-se que o PCI não conseguiu inibir eficazmente a eclosão, mas demonstrou ação nematicida nos J2 eclodidos. A maioria dos J2 eclodidos estava

morta até o décimo dia de contagem, destacando-se que o efeito do tratamento com PCI de batata persistiu mesmo após sua remoção do meio (**C4 Figura 9A,B**).



C4 Figura 9. Testes de atividade inibitória do PCI de *Solanum tuberosum* comercial contra o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita*. **A)** Porcentagem de ovos eclodidos por tratamento com PCI) avaliado em 2, 4 e 10 de dias do experimento. **B)** Porcentagem de ovos eclodidos e J2 eclodidos mortos avaliados em 10 dias de experimento. **C)** Porcentagem de mortalidade de J2 ao longo de 2, 3 e 12 dias por tratamento com PCI de batata. **D)** Estimativa do IC50 para mortalidade de J2 com o PCI de batata para 12 dias de experimento. Em todos os experimentos foram testadas quatro concentrações de 100 a 400 µg /mL do peptídeo puro e água foi utilizada como controle negativo.

Quanto à avaliação específica da mortalidade dos J2 de *M. incognita*, observou-se uma relação linear crescente a partir do terceiro dia do experimento, com um aumento na mortalidade dos J2 à medida que a concentração do tratamento de PCI aumentava (**C4 Figura 9C**). Diferenças estatisticamente significativas foram observadas de forma não linear apenas para alguns tratamentos em comparação com o controle negativo. É importante ressaltar a notável diferença significativa obtida com a maior concentração do tratamento com PCI (400 µg) em 10 e 12 dias, onde a diferença em relação ao controle foi estatisticamente significativa em ambos os testes (**C4 Figura 9B,C**). O IC50 da mortalidade dos J2 para o PCI foi estimado em 12 dias de tratamento e correspondeu a 120 µM, equivalente a 515 µg/mL do PCI puro. Este cálculo levou em consideração a massa molecular do ICP previamente caracterizado, que é de 4,9 kDa (**C4 Figura 9D**). Esses resultados sugerem PCI comercial de

Solanum tuberosum como um agente nematicida, especialmente em concentrações mais elevadas, sugerindo seu potencial uso no controle de *M. incognita*.

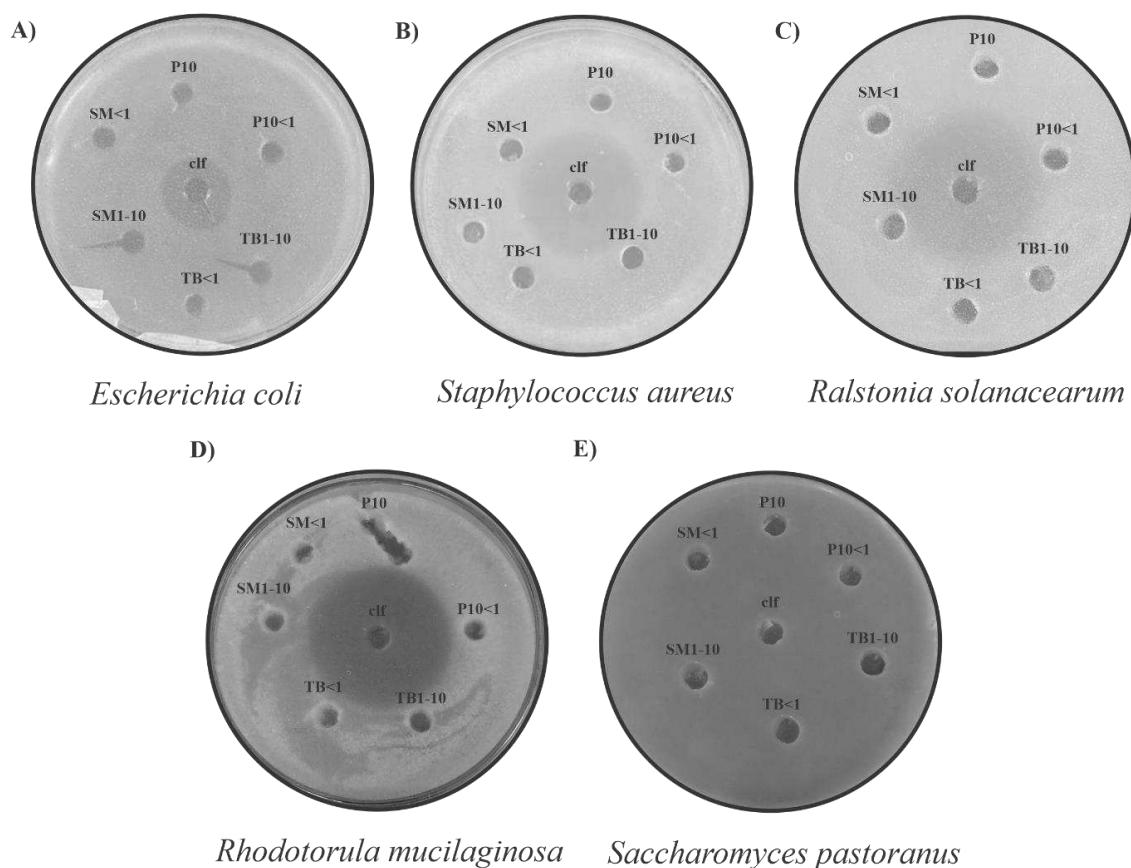
Seria altamente benéfico conduzir experimentos *in vivo* utilizando os ICPs testados em conjunto com o nematoide das galhas, a fim de investigar possíveis efeitos desses tratamentos. Essa abordagem permitiria explorar se os ICPs têm a capacidade de interferir na penetração do fitonematoide na planta hospedeira. Além disso, seria interessante investigar se a aplicação desses peptídeos como tratamento de proteção nas raízes das plantas poderia desencadear mecanismos de resistência nas plantas, resultando na redução da taxa de penetração dos nematoides.

Ao realizar experimentos *in vivo*, seria possível observar de forma mais completa e realista como os ICPs interagem com o nematoide e as plantas hospedeiras. Seria possível avaliar se os ICPs afetam a habilidade do nematoide em penetrar nas raízes das plantas, potencialmente criando uma barreira protetora que dificultaria sua entrada. Além disso, a investigação das respostas das plantas às aplicações de ICPs poderia revelar insights sobre a ativação de vias de resistência ou outros mecanismos de defesa. Compreender como os ICPs afetam as interações entre nematoides e plantas permitiria uma avaliação mais precisa de suas possíveis aplicações agrícolas em estratégias de manejo para o controle de *M. incognita*, em que esses peptídeos poderiam ser utilizados em aplicações no solo, para criação de cultivares resistentes, bem como em manipulação genética visando controle biológico, por exemplo. (ALI et al., 2021).

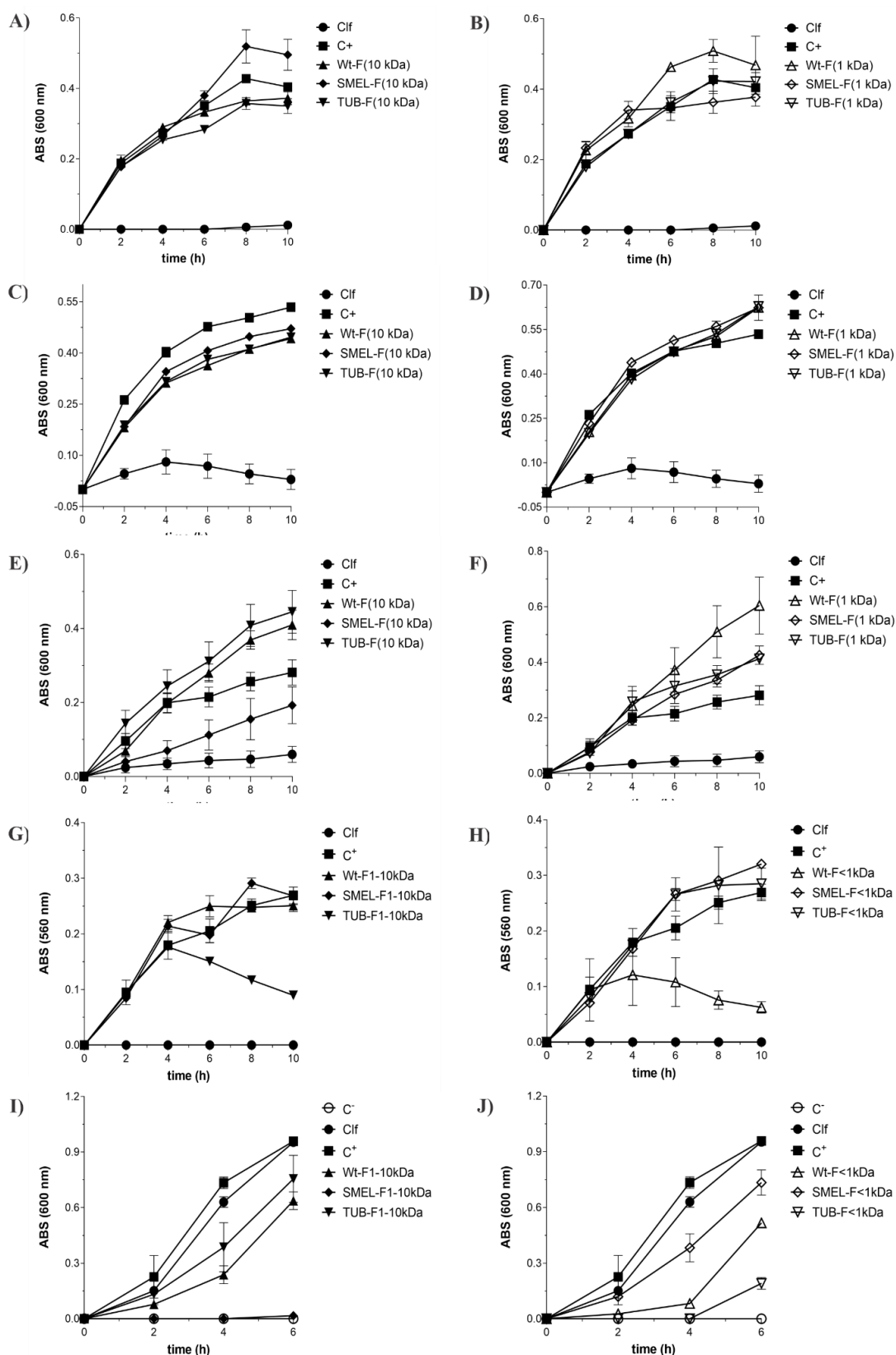
O ensaio de difusão em ágar realizado para avaliar os efeitos sobre as leveduras e bactérias testadas não revelou sinais de inibição quando expostas às frações F1-10 kDa e F<1 kDa derivadas dos extratos de P10, SMEL e TUB. Curiosamente, observou-se uma notável inibição em relação ao controle do antibiótico, evidenciado por uma zona de inibição proeminente, exceto no caso da levedura *Saccharomyces pastorianus*, que apresentou resistência ao cloranfenicol (**C4 Figura 10**). Esses resultados sugerem que os peptídeos testados podem estar presentes em concentrações relativamente baixas nas frações F1-10 kDa, que representam um foco de interesse particular nos extratos de P10, SMEL e TUB. As concentrações fixas testadas para essas frações foram de 39,3 µg, 38,2 µg e 17,9 µg de proteína total, respectivamente.

Adicionalmente, é possível que algum obstáculo à difusão dos peptídeos no meio de ágar tenha ocorrido, talvez devido a interações intermoleculares complexas

ou incompatibilidades estruturais, considerando a natureza intrínseca desses peptídeos. A complexidade estrutural dos peptídeos poderia estar contribuindo para essas observações, destacando a importância de explorar mais a fundo suas propriedades intermoleculares e possíveis modos de interação.



C4 Figura 10. Teste de atividade antimicrobiana de frações parcialmente purificadas relativas aos extratos de P10, SMEL e TUB expressos em *L. tarentolae* contra bactérias e leveduras por difusão em ágar. **A)** Teste contra a bactéria *Escherichia coli* (gram -). **B)** Teste contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (gram +). **C)** Teste contra a bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* (gram -). **D)** Teste contra a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. **E)** Teste contra a levedura *Saccharomyces pastorianus*. Em todas as placas foram aplicados 50 uL dos extratos referentes as frações peptídicas F1-10 kDa e F<1 kDa de P10, SMEL e TUB. Cloranfenicol a 2 mg/mL foi utilizado como controle de inibição.



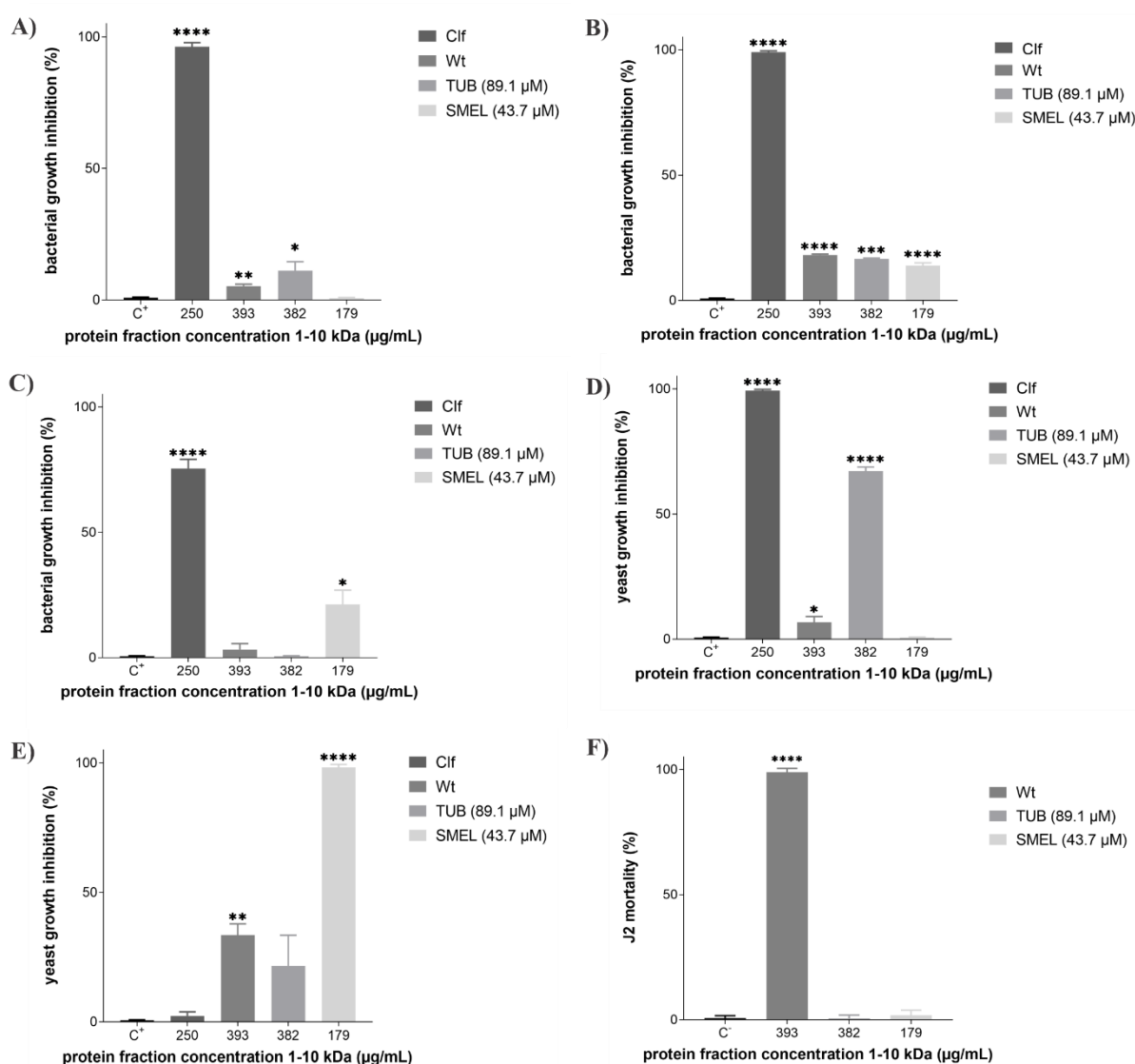
C4 Figura 11. Teste de atividade antimicrobiana de frações parcialmente purificadas relativas aos extratos de P10, SMEL e TUB expressos em *L. tarentolae* contra bactérias e leveduras por inibição de curva de crescimento. **A)** Teste contra a bactéria *Escherichia coli* (gram -) F1-10 kDa. **B)** Teste contra a bactéria *Escherichia coli* (gram -) F<1 kDa. **C)** Teste contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (gram +) F1-10 kDa. **D)** Teste contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (gram +) F<1 kDa. **E)** Teste contra a bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* (gram -) F1-10 kDa. **F)** Teste contra a bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* (gram -) F<1 kDa. **G)** Teste contra a levedura *Rhodotorula*

mucilaginosa F1-10 kDa. **H)** Teste contra a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* F<1 kDa. **I)** Teste contra a levedura *Saccharomyces pastorianus* F1-10 kDa. **J)** Teste contra a levedura *Saccharomyces pastorianus* F<1 kDa. Os gráficos apresentados são referentes as frações peptidômicas de P10 (Wt), SMEL e TUB. Cloranfenicol (Clf) a 2 mg/mL foi utilizado como controle de inibição e cada bactéria e levedura como controle positivo de crescimento.

Os resultados derivados dos testes piloto de inibição de crescimento por meio das curvas de crescimento ofereceram insights intrigantes em relação ao potencial antimicrobiano das frações F1-10 kDa derivadas dos extratos de P10, SMEL e TUB. Notavelmente, os extratos provenientes de SMEL e TUB apresentaram habilidades distintas de inibição de crescimento tanto em bactérias quanto em leveduras, evidenciando padrões divergentes em comparação com o efeito de inibição observado em P10. Essas discrepâncias sugerem a presença de moléculas únicas nos diferentes extratos, fornecendo assim implicações biológicas intrigantes que respaldam a existência e expressão dos ICPs de berinjela e batata (**C4 Figura 11** e **C4 Figura 12**). Vale ressaltar que as concentrações fixas selecionadas para os extratos de interesse (F1-10 kDa) de P10, SMEL e TUB foram, respectivamente, 393 µg/mL, 179 µg/mL e 382 µg/mL de proteína total. Importante observar que a padronização das concentrações dos extratos não se baseou na quantificação das proteínas, mas sim na relação entre a quantidade de vezes que os extratos foram concentrados em relação ao volume inicial de cultivo da expressão dos ICPs. Isso resultou em concentrações cerca de 60 vezes mais elevadas do que as originais.

No que se refere às bactérias, observou-se que o extrato SMEL exibiu uma inibição parcial, porém significativa, no crescimento das bactérias *S. aureus* e *R. solanacearum*, resultando em uma redução de até 14% e 20%, respectivamente, após 10 horas de crescimento (**C4 Figura 11C,E** e **C4 Figura 12B,C**). Por sua vez, o extrato TUB demonstrou atividade contra *E. coli* e *S. aureus*, com inibições de até 11% e 16% em 10 horas de crescimento, respectivamente (**C4 Figura 11A,C** e **C4 Figura 12A,B**). Embora as taxas de inibição tenham sido modestas, são suficientes para evidenciar a presença da atividade biológica de cada peptídeo, especialmente considerando as diferenças de inibição entre eles e em relação ao extrato de P10. Notavelmente, o extrato de P10 demonstrou uma inibição de até 5% contra *E. coli* e 18% contra *S. aureus* em 10 horas de crescimento (**C4 Figura 11A,C** e **C4 Figura 12A,B**). Ambos os peptídeos expressos revelaram atividade, embora modesta, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, evidenciando um amplo espectro de ação. Vale ressaltar que, devido à concentração mais baixa de proteína total no ICP-SMEL (179 µg/mL)

em comparação com o ICP-TUB (382 µg/mL), o ICP-SMEL exibiu um maior potencial de inibição, refletindo a influência da diferença de concentrações. No contexto das frações F<1 kDa, nenhuma atividade de inibição do crescimento bacteriano foi observada em nenhum dos extratos, enfatizando ainda mais a presença dos ICPs nas frações F1-10 kDa correspondentes.



C4 Figura 12. Porcentagem de inibição antimicrobiana das frações de interesse F1-10 kDa de P10 (Wt), SMEL e TUB parcialmente purificadas. **A)** Teste contra a bactéria *Escherichia coli* (gram -). **B)** Teste contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (gram +). **C)** Teste contra a bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* (gram -). **D)** Teste contra a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. **E)** Teste contra a levedura *Saccharomyces pastorianus*. **F)** Teste contra o fitonematoide *Meloidogyne incognita*. Cada bactéria e levedura foram utilizadas como controle positivo de crescimento. Para *M. incognita* água foi utilizada como controle. Cloranfenicol (Clif) a 2 mg/mL foi utilizado como controle de inibição (A-E).

Em relação às leveduras, o extrato SMEL apresentou uma notável inibição, atingindo 98% de inibição em 6 horas de cultivo apenas contra *S. pastorianus* (C4 Figura 11I e C4 Figura 12E). Enquanto isso, o extrato TUB exibiu atividade contra

ambas as leveduras, com uma inibição de até 20% em 10 horas para *R. mucilaginosa* e 67% em 6 horas para *S. pastorianus* (**C4 Figura 11G,I** e **C4 Figura 12D,E**). Esses resultados corroboram com os testes antimicrobianos apresentados no Capítulo 2 para *Solanum melongena*, em que o extrato do qual o ICP-SMEL foi identificado demonstrou uma forte inibição contra as bactérias fitopatogênicas *R. solanacearum* e *C. michiganensis*, alinhando-se também com os trabalhos de Quilis et al. (2007; 2014) que reportaram atividade antifúngica do ICP da batata.

O teste de inativação/mortalidade de J2 realizado com as frações F1-10 kDa de P10, SMEL e TUB contra *M. incognita* não exibiu ação de SMEL e TUB nos fitonematoides, apenas a P10 (selvagem) apresentou mortalidade próximo a 100% dos nematoides, o que foi incoerente com todas as atividades já testadas (**C4 Figura 12F**). Também foi verificada forte contaminação por protozoário desconhecido na amostra do tratamento com P10, em que essa alta porcentagem de morte pode ser atribuída à essa contaminação, sendo necessário repetir os experimentos.

Os resultados obtidos através das análises abrangentes destacam o potencial promissor do ICP de *Solanum tuberosum* (TUB) como agente nematicida, com uma ação marcante e diferenciada em relação ao fitonematoide *M. incognita*, bem como ICP-SMEL cuja ação foi caracterizada no Capítulo 2. Enquanto o peptídeo de TUB demonstrou um impacto notável na inibição de eclosão de ovos e mortalidade de juvenis de *M. incognita* em concentrações mais elevadas, o estudo também revelou sutilezas na atividade antimicrobiana desse composto. As análises de inibição de crescimento de bactérias e leveduras revelaram padrões distintos entre os extratos de P10, SMEL e TUB, sugerindo uma complexidade na composição e interações desses peptídeos com diferentes microrganismos. A investigação das interações entre os ICPs e os nematoides, tanto em termos de inibição de eclosão quanto de mortalidade dos juvenis, aponta para uma possível aplicação desses compostos como alternativas viáveis para o controle de *M. incognita*, um fitonematoide de significativa relevância agrícola. Além disso, a sugestão de atividade antimicrobiana dos ICPs, ainda que modesta, ressalta a natureza multifuncional desses peptídeos, com potencialidades que vão além da ação nematicida. É crucial ressaltar que, apesar de encontrar um desafio na contaminação observada nos experimentos com a fração P10, esses resultados reforçam a importância de rigorosas abordagens experimentais e validações em pesquisas científicas. A busca por soluções inovadoras no manejo de fitonematoides, que frequentemente representam uma ameaça significativa às

culturas agrícolas, destaca a relevância dos ICPs de *Solanum tuberosum* e *Solanum melongena* como alvos de estudo promissores para futuras estratégias de controle. Nesse sentido buscou-se também estudar mais a fundo a interação de ICP-SMEL com metalocarboxipeptidases do gênero *Meloidogyne*, assunto do próximo tópico.

3.5. Caracterização MCPs de *Meloidogyne hapla* e *Meloidogyne incognita*

A busca por MCPs de *M. hapla* e *M. incognita* resultou na recuperação de 5 sequências de MCPs de *M. hapla* do banco de dados do Uniprot e 11 sequências de *M. incognita* caracterizadas a partir do proteoma traduzido do seu genoma (SZITENBERG et al., 2017) (**C4 Tabela 4**). A caracterização de 11 MCPs para *M. incognita* vai de acordo com o total de proteínas pertencente à família M14 das metalocarboxipeptidases apresentadas para esse fitonematoide no trabalho de Castagnone-Sereno et al. (2011).

Para o gênero *Meloidogyne* foram caracterizadas a presença de três tipos principais de MCPs, àquelas proteínas somente caracterizadas como da família M14 que são caracterizadas por serem carboxipeptidases da subfamília A e B (AULD, 2013) com 3 em *M. hapla* e 4 em *M. incognita*. Outras foram caracterizadas como MCPs com um domínio de carboxypeptidase D, com 1 membro em *M. hapla* e 3 em *M. incognita*. Segundo ScanProsite a carboxipeptidase D é uma enzima que faz parte da família M14B e tem múltiplos domínios semelhantes à CP. Ela desempenha um papel fundamental no processamento de proteínas na via secretora e está envolvida em processos regulatórios e de sinalização em diferentes contextos celulares e biológicos, incluindo a patogênese do lúpus eritematoso e a modulação do TGF-beta (DE CASTRO et al., 2006)). O último tipo de MCP além do domínio da família M14, possui um domínio ShKT pequeno caracterizado como uma toxina, para essa MCP tem também 1 membro para *M. hapla* e 3 membros para *M. incognita*. O ScanProsite caracteriza o domínio ShKT como uma toxina bloqueadora de canais de potássio que é encontrada em várias proteínas, incluindo metalopeptidases, ele é caracterizado por sua estrutura compacta, composta por hélices e ligações dissulfetos que contribuem para sua estabilidade (DE CASTRO et al., 2006)

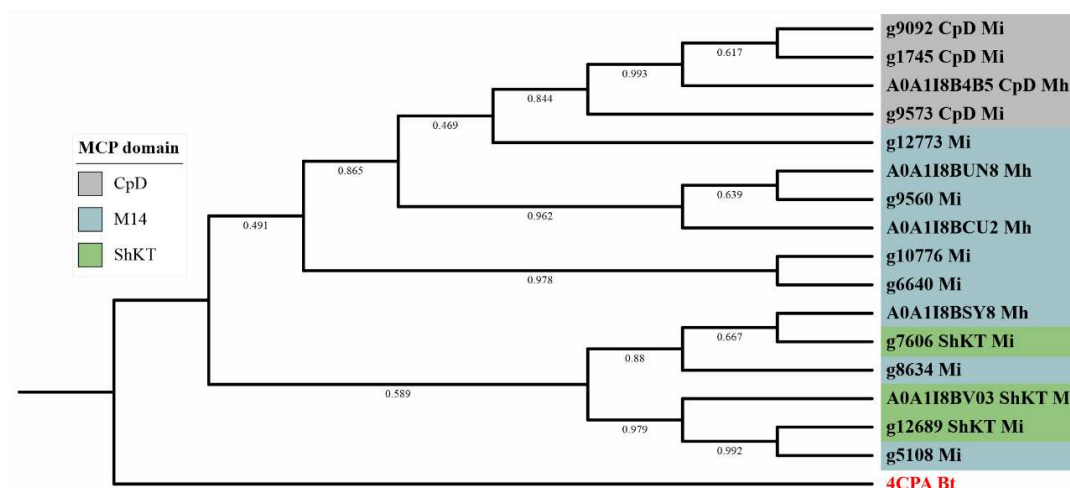
C4 Tabela 4. Caracterização sequências MCPs *Meloidogyne hapla* e *Meloidogyne incognita*

Espécie	Código	Família MCP	Pfam	Smart	Prosite
---------	--------	-------------	------	-------	---------

<i>Meloidogyne hapla</i>	A0A1I8B4B5 – Carboxypeptidase D	M14	PF00246	Zn_pept domain (29-460)	zinc-binding region – PEVKYVGNMHGNEAIGRE-LLIRL
<i>Meloidogyne hapla</i>	A0A1I8BSY8	M14	PF00246	Zn_pept domain (185-486)	
<i>Meloidogyne hapla</i>	A0A1I8BUN8	M14	PF00246	Zn_pept domain (169-302)	zinc-binding region – PAIWIDGGIHAREWVSPA-VVLFM
<i>Meloidogyne hapla</i>	A0A1I8BCU2	M14	PF00246	Zn_pept domain (200-339)	zinc-binding region – PAIWIDAGVHAREWIAPA-TAMIL
<i>Meloidogyne hapla</i>	A0A1I8BV03 – ShKT	M14	PF00246	Zn_pept domain (124-335)	—
<i>Meloidogyne incognita</i>	g1745 – Carboxypeptidase D	M14	PF00246	Zn_pept domain (1-418)	zinc-binding region – PEVKYVGNMHGNEAIGRE-LLIRL
<i>Meloidogyne incognita</i>	g5108 – ShKT	M14	PF00246	Zn_pept domain (164-388)	zinc-binding region – HAYSQWIIYPY
<i>Meloidogyne incognita</i>	g6640	M14	PF00246	Zn_pept domain (141-403)	zinc-binding region – PIFLLDGGIHAREWIAPA-VALNV
<i>Meloidogyne incognita</i>	g7606 – ShKT	M14	PF00246	Zn_pept domain (20-321)	ShKT domain – CADRTKW-CSGWIRVSPNVCKRS-SIYMRRDCALSCGFC
<i>Meloidogyne incognita</i>	g8634	M14	PF00246	Zn_pept domain (20-249)	
<i>Meloidogyne incognita</i>	g9092 – Carboxypeptidase D	M14	PF00246	Zn_pept domain (1-366)	zinc-binding region – PEVKYVGNMHGNEAIGRE-LLIRL
<i>Meloidogyne incognita</i>	g9560	M14	PF00246	Zn_pept domain (90-293)	
<i>Meloidogyne incognita</i>	g9573 – Carboxypeptidase D	M14	PF00246	Zn_pept domain (82-340)	zinc-binding region – HGGSLVANYPY
<i>Meloidogyne incognita</i>	g10776	M14	PF00246	Zn_pept domain (32-294)	zinc-binding region – PAIWIDAGVHAREWIAPA-TAMIL
<i>Meloidogyne incognita</i>	g12689 – ShKT	M14	PF00246	Zn_pept domain (163-387)	ShKT domain – CFDA-VEHCPIWIKANPQICS-DSKTSMMRECRKSKFC
<i>Meloidogyne incognita</i>	g12773	M14	PF00246	Zn_pept domain (662-807)	

A análise filogenética das sequências de MCPs caracterizadas revela a conservação dos três tipos CpD, M14 e ShKT em diferentes espécies do gênero *Meloidogyne*. Notavelmente, os agrupamentos na árvore filogenética não são definidos por espécies individuais, mas sim pela divisão dos tipos de MCPs. Essa particularidade oferece uma perspectiva interessante para o estudo dos ICPs, uma vez que a alta conservação das carboxipeptidases entre várias espécies sugere que

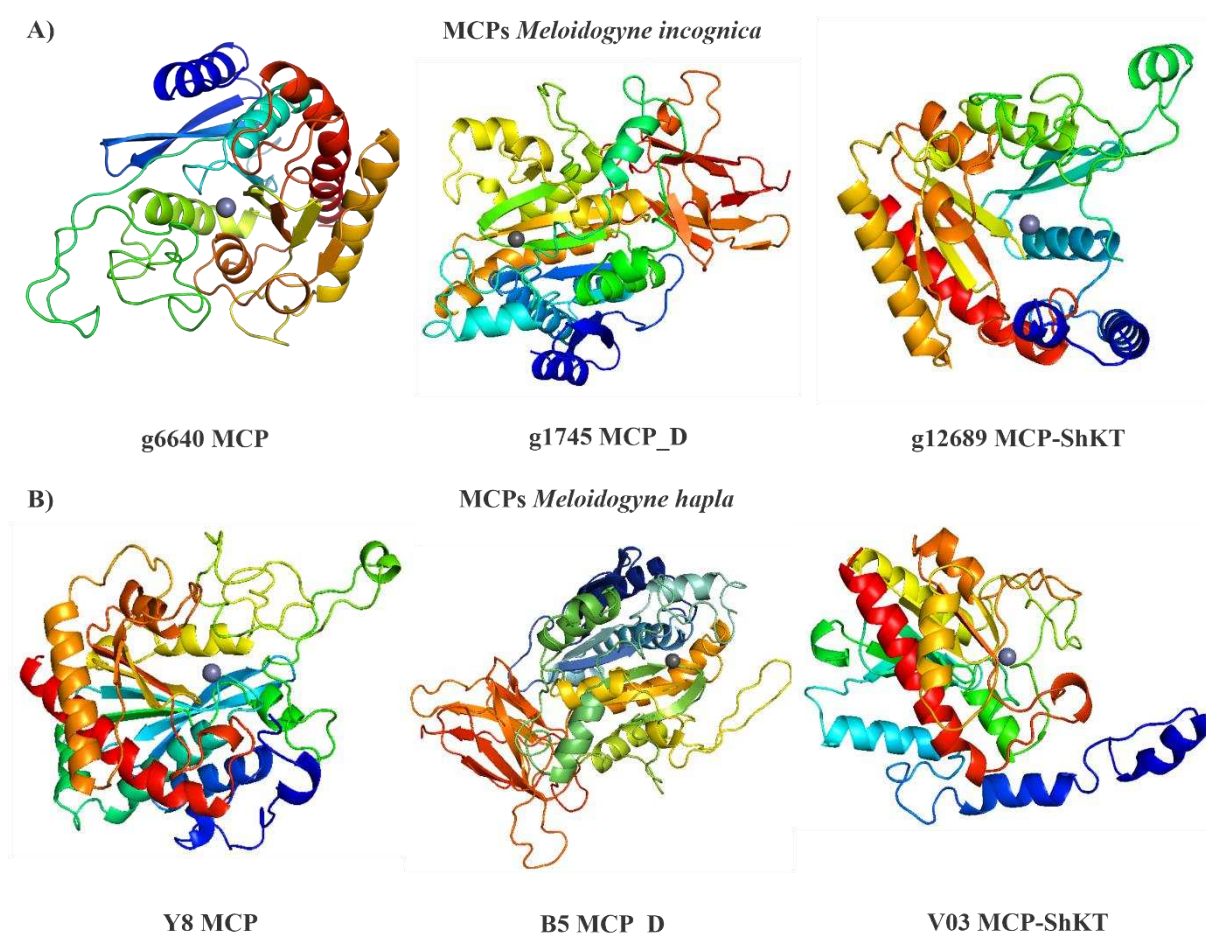
os ICPs têm maior probabilidade de inibir alvos em diversas espécies. Esse padrão ampliado de ação pode direcionar um uso mais abrangente e eficaz dos ICPs como agentes terapêuticos ou ferramentas de manejo (**C4 Figura 13**).



C4 Figura 13. Filogenia das sequências MCPs caracterizadas para o gênero *Meloidogyne* a partir das espécies de *M. hapla* e *M. incognita*. A árvore filogenética de máxima verossimilhança foi construída pelo software MEGA X usando o teste filogenético bootstrap. A árvore mostra as relações filogenéticas das MCPs caracterizadas para o gênero *Meloidogyne*. Os clados das árvores são coloridos por tipo de MCP caracterizada e os valores de Bootstrap estão apresentados em cada ramo.

Uma sequência de cada tipo de MCP caracteriza para *M. hapla* e *M. incognita* foram modeladas com o intuito de estudar a interação delas com os ICPs da solanáceas (**C4 Figura 14**). Os modelos foram criados através do Phyre2, com a exceção do modelo g6640 de *M. incognita*, que foi produzido utilizando o AlphaFold. Todos os modelos foram submetidos a um rigoroso processo de validação e avaliação, demonstrando alta confiabilidade em todos os parâmetros analisados. Os detalhes específicos dos parâmetros para cada MCP estão disponíveis em (**C4 Arquivo Suplementar 5**). De forma geral, todas as proteínas apresentaram melhorias estruturais após passarem pelo processo de minimização de energia conduzido pelo Yassara. Notavelmente, o modelo g6640 foi obtido com sua estrutura proteica relaxada diretamente pelo AlphaFold, o qual obteve uma avaliação positiva tanto através dos parâmetros pLDDT quanto PAE gerados pelo programa. No contexto do alinhamento estrutural, todas as estruturas resultantes do Phyre2 exibiram valores de RMSD inferiores a 1, indicando uma boa concordância com os templates utilizados como referência na predição estrutural. A análise do gráfico de Ramachandran revelou que a maioria dos aminoácidos nas estruturas das MCPs modeladas foram posicionados nas regiões permitidas, concentrando-se nas regiões favoráveis. Em termos de qualidade global, todas as proteínas se posicionaram na faixa de alta

densidade no gráfico Z-score, o que sugere que os modelos estruturais se aproximam energeticamente das proteínas cujas estruturas já foram previamente caracterizadas. Considerando a avaliação da qualidade local, todos os modelos apresentaram gráficos de energia local com pontuações predominantemente negativas. No teste de Verify3D, para cada modelo, mais de 70% dos aminoácidos foram corretamente posicionados no espaço tridimensional em suas respectivas estruturas. Diante desses resultados, os modelos estruturais preditos para as proteínas MCPs, particularmente a MCP Y8 de *M. hapla* e a g6640 de *M. incognita*, foram selecionados para a investigação da interação com ICP-SMEL de *S. melongena*.



C4 Figura 14. Modelos preditos para MCPs de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne hapla*. **A)** Representação em cartoon das estruturas tridimensionais preditas para cada tipo de MCP de *M. incognita*. **B)** Representação em cartoon das estruturas tridimensionais preditas para cada tipo de MCP de *M. hapla*.

3.6. Interação ICP-SMEL com metalocarboxipeptidases do gênero

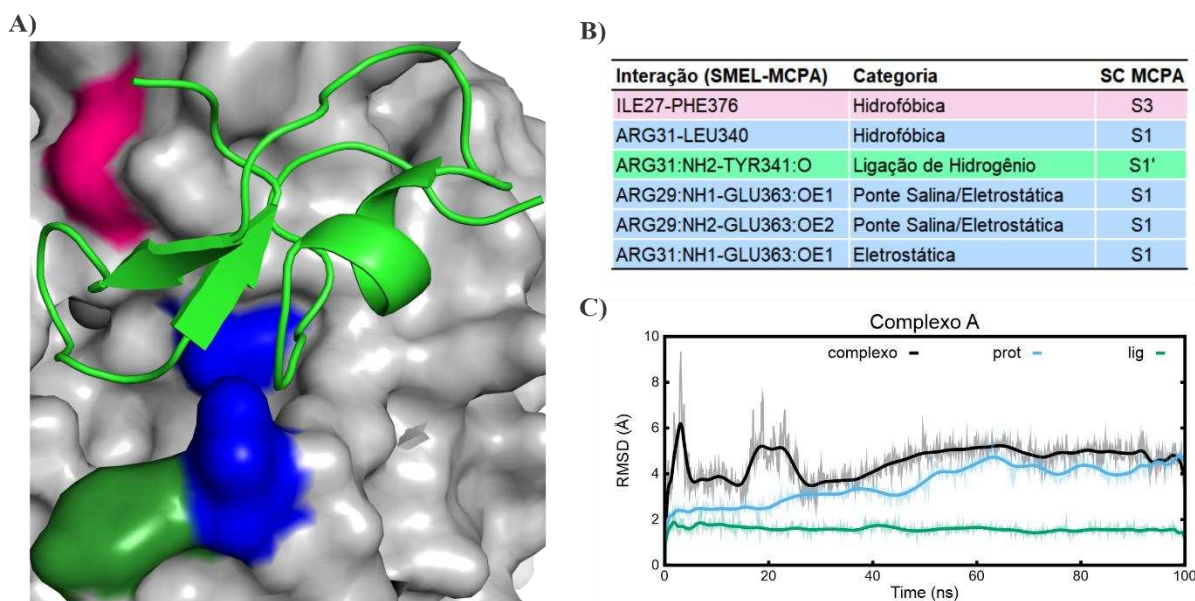
incognita e Y8 de *M. hapla*, destacando a sobreposição estrutural dos aminoácidos nos subsítios catalíticos das MCPs de *Meloidogyne* em relação à MCPA bovina. Esses aminoácidos foram mapeados com base nos subsítios catalíticos da região correspondente na MCPA bovina. Regiões de **R1** a **R6** marcam as regiões correspondentes aos subsítios catalíticos das MCPs analisadas, em que * em diferentes cores marcam aminoácidos de acordo com os subsítios catalíticos da MCP bovina.

De acordo com Auld (2013), o sítio catalítico de zinco encontrado nas metaloproteases surge da interação entre três átomos de nitrogênio provenientes de resíduos de histidina e um átomo de oxigênio proveniente do resíduo de glutamato, conhecido como motivo HxxE. Essa configuração é uma característica comum das carboxipeptidases A, que pertencem à família M14 de metaloproteases. Os resíduos essenciais para a promoção da catálise e a ligação ao substrato estão organizados em cinco subsítios distintos: S1' (com N144, R145, Y248 e Xaa255), que está presente em todas as MCPs da família M14, S1 (com R127, L/I247 e E270), S2 (com R71, D142, S197, Y198 e S199), S3 (contendo F279) e S4 (com E122, R124 e K128). Vale notar que esses subsítios foram caracterizados na MCPA bovina, que foi utilizada como modelo para mapear essa região nas MCPs de *Meloidogyne*.

Nesse contexto, a caracterização dos subsítios catalíticos das MCPs Y8 e g6640 de *M. incognita* e *M. hapla* foi conduzida, revelando uma alta conservação entre os subsítios em relação à MCPA bovina utilizada como modelo, tanto em termos de alinhamento de sequência quanto em alinhamento estrutural do domínio M14 entre as MCPs (**C4 Figura 15**). Na MCP g6640 de *M. incognita*, a região catalítica engloba os seguintes subsítios: S1 (com R280, L340 e E363), S1' (com N235, R236, Y241 e D348), S2 (com R111, D233, A289, Y290 e G291), S3 (com F376), S4 (com L203, G205 e H209) e Int-Zn (com H109, E112 e H288). Já na região catalítica da MCP Y8 de *M. hapla*, os subsítios são: S1 (com R171, L303 e E327), S1' (com N196, R197, Y304 e D311), S2 (com R187, D194, T252, Y253 e S254), S3 (com F336), S4 (com Q/E166, R168 e K172) e Int-Zn (com H185, E188 e H251). Essa caracterização desempenha um papel fundamental para compreender o mecanismo de interação dessas proteínas com seus inibidores alvo, bem como com seus substratos específicos. Essa compreensão pode orientar estratégias de manejo de fitopatógenos, tendo essas metaloproteases como alvos potenciais.

As análises de docking e dinâmica molecular do ICP-SMEL de *S. melongena* com MCP g6640 de *M. incognita* demonstraram a formação do complexo SMEL-g6640, onde o inibidor ancora-se na região do sítio ativo da MCP através de múltiplas interações (**C4 Figura 16A**). A interação do ICP-SMEL no sítio catalítico de g6640

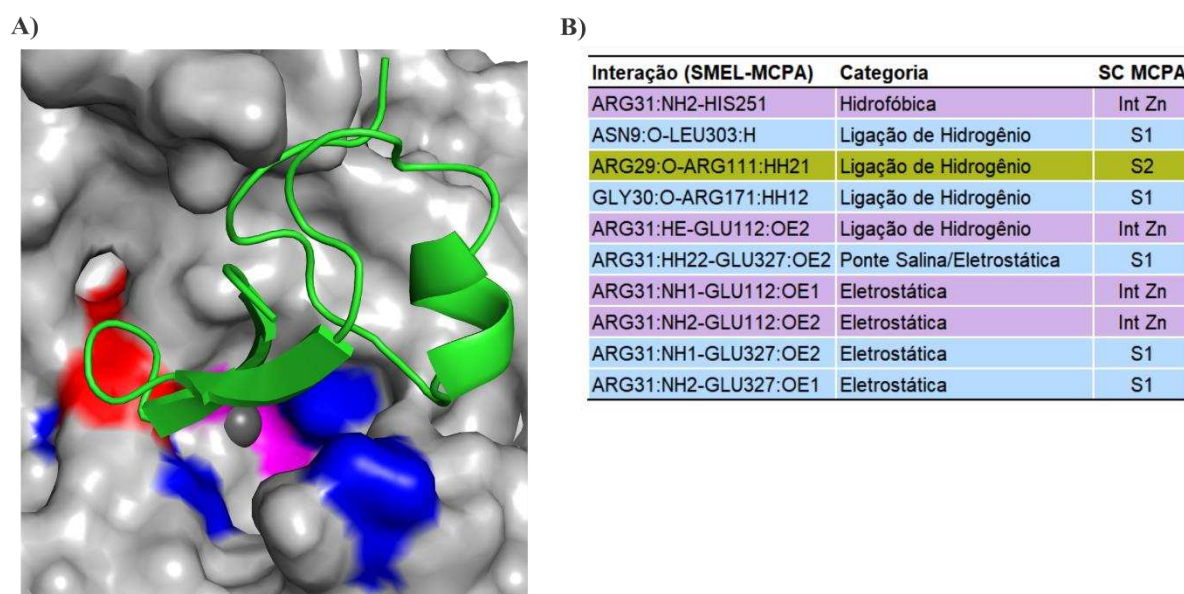
ocorre por meio de diversos tipos de interações intermoleculares, incluindo ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas tipo ponte salina, e interações hidrofóbicas que envolvem os resíduos I27, R29 e R31 nos subsítios S1 (L140 e E363), S1' (Y341) e S3 (F376) de g6640 (**C4 Figura 16B**). A análise de RMSD revela uma estabilização significativa do complexo ao longo dos 100 ns de simulação de dinâmica molecular, onde a flutuação conformacional se estabiliza em 4 Å. Tanto o RMSD para a proteína quanto para o peptídeo apresentam valores ainda mais baixos, destacando a forte interação entre ICP-SMEL e g6640 (**C4 Figura 16C**). As interações eletrostáticas, consideradas as mais robustas dentre as interações intermoleculares, são evidentes e desempenham um papel proeminente nessa interação. Essa interação é semelhante à discutida no capítulo 3 para o complexo A da interação entre a MCP bovina e o ICP-SMEL, sugerindo que esse peptídeo também pode inibir essa enzima de *M. incognita* por meio de um mecanismo de inibição competitiva. Estudos com simulações de dinâmica molecular mais prolongadas são necessários para confirmar a estabilidade do complexo SMEL-g6640, mas já é possível inferir que o ICP-SMEL possui um alto potencial para inibir a metaloprotease de *M. incognita*.



C4 Figura 16. Complexo SMEL-g6640 – Interação entre ICP-SMEL de *Solanum melongena* e a metalocarboxipeptidase de *Meloidogyne incognita* g6640. **A)** Visualização da estrutura do complexo SMEL-g6640, composto pelo cluster resultante da simulação de dinâmica molecular (MD) de 100ns. A ligação de ICP-SMEL no sítio catalítico da MCP do nematoide das galhas é destacada, onde g6640 é representada em estrutura de superfície em cinza claro e os subsítios catalíticos onde ICP-SMEL interage estão representados em diferentes cores; S1 de azul, S1' de verde, S3 de rosa e o átomo de Zn em estrutura de esfera na cor cinza escuro. **B)** Interações identificadas no complexo representado em **A** em que as interações estão coloridas de acordo com os subsítios catalíticos. **C)** Gráfico de RMSD (Desvio Quadrático Médio) ao longo da simulação de dinâmica de MD do complexo SMEL-g6640. O

RMSD revela a flutuação conformacional do complexo, só da proteína e só do peptídeo, que estabilizam em torno de 4 Å durante os 100 ns de simulação.

O resultado do docking molecular para a interação entre o ICP-SMEL de *S. melongena* e a MCP Y8 de *M. hapla* exibe uma notável semelhança com o resultado da análise de MD realizado para o complexo SMEL-g6640 (C4 Figura 16C4 Figura 17). A interação do ICP-SMEL no sítio catalítico de Y8 envolve uma variedade de interações intermoleculares, que incluem ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas do tipo ponte salina, bem como interações hidrofóbicas. Essas interações abrangem os resíduos N9, R29, G30 e R31 nos subsítios S1 (R171, L303 e E327), S2 (R111) e Int Zn (E112 e H251) de Y8 (C4 Figura 17B). Essa similaridade com o complexo SMEL-g6640 é evidente tanto na abundância de interações eletrostáticas quanto na região de interação do ICP-SMEL, que se localiza na curvatura de sua estrutura, entre as duas folhas, antes de chegar à região carboxiterminal. Esses indícios apontam para uma alta conservação no mecanismo de interação entre o ICP-SMEL e as MCPs do gênero *Meloidogyne*. Essa constatação sugere um potencial significativo não somente para o ICP-SMEL, mas também para outros ICPs, em inibir MCPs de diferentes espécies dentro do gênero, bem como em outros tipos de fitonematoides.



C4 Figura 17. Complexo SMEL-Y8 – Interação entre ICP-SMEL de *Solanum melongena* e a metalocarboxipeptidase de *Meloidogyne hapla* Y8. **A)** Visualização da estrutura do complexo SMEL-Y8, resultando do docking molecular. A ligação de ICP-SMEL no sítio catalítico da MCP de *M. hapla* é destacada, onde Y8 é representada em estrutura de superfície em cinza claro e os subsítios catalíticos onde ICP-SMEL interage estão representados em diferentes cores; S1 de azul, S2 de vermelho, sítio de Int Zn em lilás e o átomo de Zn em estrutura de esfera na cor cinza escuro. **B)** Interações

identificadas no complexo representado em **A** em que as interações estão coloridas de acordo com os subsítios catalíticos.

4. CONCLUSÃO

Em síntese, este estudo ressalta de maneira contundente a relevância das metaloproteases como fatores determinantes na virulência de patógenos vegetais, ao mesmo tempo em que reforça a importância dos ICPs das solanáceas como poderosos agentes de defesa. A pesquisa enfatiza a necessidade premente de se aprofundar na análise da interação intrincada entre patógenos e plantas, explorando as complexas relações entre proteínas e seus inibidores como base para o desenvolvimento de estratégias altamente focadas no controle de fitopatógenos, incluindo os fitonematoides. Os resultados abrangentes emergem como uma promissora indicação do potencial dos ICPs de *Solanum tuberosum* (TUB) e *Solanum melongena* (SMEL) como poderosos agentes nematicidas, com notáveis efeitos sobre o nematoide *M. incognita*, incluindo inibição da eclosão de ovos e mortalidade de juvenis em concentrações elevadas. Além disso, observa-se uma pequena atividade antimicrobiana. As análises detalhadas das interações com microrganismos, incluindo padrões específicos de crescimento bacteriano e de leveduras para P10, SMEL e TUB, destacam as complexidades dessas relações. A inibição eficaz da eclosão e mortalidade de juvenis de nematoides aponta para possíveis aplicações práticas como alternativas de controle valiosas. Ao mesmo tempo, a sugestão da atividade antimicrobiana realça a natureza multifuncional dos ICPs, ampliando ainda mais suas possibilidades de aplicação. Mesmo diante de desafios, como a contaminação na fração P10, os resultados enfatizam a vital importância da precisão nas abordagens experimentais. A busca por soluções inovadoras no combate aos fitonematoides evidencia claramente a importância dos ICPs como alvos promissores para estratégias futuras de controle. A investigação das metalocarboxipeptidases (MCPs) em diversas espécies de nematoides revela padrões interessantes e conservação de tipos específicos, independentemente da espécie. Isso lança luz sobre o potencial abrangente dos ICPs para inibir alvos em diferentes espécies de nematoides, reforçando seu valor como terapêuticos ou ferramentas de manejo. A validação dos modelos estruturais de MCPs, com ênfase na conservação dos sítios catalíticos, oferece valiosas pistas para possíveis alvos dos ICPs. A análise de interações por docking e dinâmica molecular entre ICP-SMEL e MCP g6640 de *M. incognita* fortalece

a hipótese de um mecanismo de inibição competitiva, semelhante ao observado para a MCP bovina. Esses padrões se repetem na interação entre ICP-SMEL e MCP Y8 de *M. hapla*, apontando para um potencial amplo dos ICPs como inibidores de MCPs em diversas espécies de *Meloidogyne* e, possivelmente, outros fitonematoides. Estes achados inovadores ressaltam a importância crucial da pesquisa das interações entre MCPs de nematoides e ICPs, abrindo caminho para promissoras estratégias de controle de fitonematoides. A alta conservação dos sítios catalíticos sugere que os ICPs desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de abordagens de manejo eficazes, oferecendo soluções alternativas para lidar com ameaças agrícolas de magnitude significativa.

5. REFERÊNCIAS

- ABDEEN, Ashraf; VIRGÓS, Ariadna; OLIVELLA, Elisenda; VILLANUEVA, Josep; AVILÉS, Xavier; GABARRA, Rosa; PRAT, Salomé. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteínase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, S. Prat, Departamento Genet. Molec. de Plantas, Ctro. Nac. de Biotecnologia-CSIC, Campus Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain, v. 57, n. 2, p. 189–202, 2005. DOI: 10.1007/s11103-004-6959-9. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L40572926-&from=export>.
- AFROZ, Mohasana; AKTER, Sanzida; AHMED, Asif; ROUF, Razina; SHILPI, Jamil A.; TIRALONGO, Evelin; SARKER, Satyajit D.; GÖRANSSON, Ulf; UDDIN, Shaikh Jamal. Ethnobotany and Antimicrobial Peptides From Plants of the *Solanaceae* Family: An Update and Future Prospects. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 11, n. May, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.00565.
- ALI, Tauheed; MUBEEN, Mustansar; JAMIL, Yasha; AHMAD, Usama. An overview of root-knot nematodes and their management. [S. l.], n. January, 2021.
- ALMEIDA, H. O.; MATTOS, E. C.; BARBOSA, M. O.; TEIXEIRA, F. R.; MAGALHÃES, R. D. M.; ROMEIRO, R. S.; FONTES, E. P. B.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Peptide fraction inhibiting plant pathogen growth predominated in cell wall extracts from young plants or in soluble cell fraction from expanded leaves from eggplants. **Journal of Phytopathology**, [S. l.], v. 155, n. 11–12, p. 735–737, 2007. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2007.01308.x.
- ALTSCHUL, Stephen F.; GISH, Warren; MILLER, Webb; MYERS, Eugene W.; LIPMAN, David J. Basic Local Alignment Search Tool 2Department of Computer Science. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 215, p. 403–410, 1990. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- AULD, David S. Catalytic Mechanisms for Metallopeptidases. *In: Handbook of Proteolytic Enzymes*. [s.l.] : Elsevier, 2013. v. 1p. 370–396. DOI: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00078-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123822192000788>.

BAERMANN, G. A simple method for detecting *Ankylostomum* (nematode) larvae in soil samples. *Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indië*. 57, 131–137, 1917.

BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.

BASILE, Giancarlo; PETICCA, Manuela. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. **Molecular Biotechnology**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 273–278, 2009. DOI: 10.1007/s12033-009-9213-5.

BATEMAN, Alex et al. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 49, n. D1, p. D480–D489, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkaa1100.

BEST, Robert B.; ZHU, Xiao; SHIM, Jihyun; LOPES, Pedro E. M.; MITTAL, Jeetain; FEIG, Michael; MACKERELL, Alexander D. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 3257–3273, 2012. DOI: 10.1021/ct300400x.

BIOVIA, D. S. BIOVIA Discovery Studio. San Diego: Dassault Systèmes, release 2021.

BOMAN, Hans G. Antibacterial peptides: Basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, [S. l.], v. 254, n. 3, p. 197–215, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x.

CARTER, Morgan E.; BOGDANOVA, Adam J.; INNES, Roger W.; WISE, Roger P. A confounding effect of bacterial titer in a type III delivery-based assay of eukaryotic effector function. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 31, n. 11, p. 1115–1116, 2018. DOI: 10.1094/MPMI-05-18-0128-LE.

CASTAGNONE-SERENO, Philippe; DELEURY, Emeline; DANCHIN, Etienne G. J.; PERFUS-BARBEOCH, Laetitia; ABAD, Pierre. Data-mining of the *Meloidogyne incognita* degradome and comparative analysis of proteases in nematodes. **Genomics**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 29–36, 2011. DOI: 10.1016/j.ygeno.2010.10.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.10.002>.

CHANDAN, C.; PARDHE, H. A.; GOWTHAMARAJAN, K.; ... Systematic approach & Application in relevance to Economic & Therapeutic actions of Proteolytic Enzyme: A Review. **Journal of Positive ...**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 10476–10486, 2022. Disponível em: <https://www.journalppw.com/index.php/jpsp/article/view/9675%0Ahttps://www.journalppw.com/index.php/jpsp/article/download/9675/6311>.

CHANDRASEKARAN, Murugesan; THANGAVELU, Boopathi; CHUN, Se Chul; SATHIYABAMA, Muthukrishnan. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. **Journal of General Plant Pathology**, SHIROYAMA TRUST TOWER 5F, 4-3-1 TORANOMON, MINATO-KU, TOKYO, 105-6005, JAPAN, v. 82, n. 5, p. 233–239, 2016. DOI: 10.1007/s10327-016-0672-9. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-8498286-3313&doi=10.1007%2Fs10327-016-0672-9&partnerID=40&md5=cbc14a172842f90a-cf1f3089518d6242>.

CHERENE, Milena Bellei et al. Structural and Biochemical Characterization of Three

Antimicrobial Peptides from *Capsicum annuum* L. var. *annuum* Leaves for Anti-Candida Use. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [S. l.], n. 0123456789, 2023. DOI: 10.1007/s12602-023-10112-3.

COTABARREN, J.; LUFRANO, D.; PARISI, M. G.; OBREGON, W. D. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **PLANT SCIENCE**, Univ Nacl La Plata, Ctr Invest Proteínas Vegetales CIProVe, Dept Ciencias Biol, CICPBA, Fac Ciencias Exactas, 47 & 115 S-N, B1900AVW, La Plata, Buenos Aires, Argentina, v. 292, 2020. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110398 WE - Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED).

DE CASTRO, Edouard; SIGRIST, Christian J. A.; GATTIKER, Alexandre; BULLIARD, Virginie; LANGENDIJK-GENEVAUX, Petra S.; GASTEIGER, Elisabeth; BAIROCH, Amos; HULO, Nicolas. ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 34, n. WEB. SERV. ISS., p. 362–365, 2006. DOI: 10.1093/nar/gkl124.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms." **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 3, p. 297–306, 2009.

DE OLIVEIRA, Tatiana Aparecida; SILVA, Walmir Da; DA ROCHA TORRES, Nancy; BADARÓ DE MORAES, João Victor; SENRA, Renato Lima; DE OLIVEIRA MENDES, Tiago Antônio; JÚNIOR, Abelardo Silva; BRESSAN, Gustavo Costa; FIETTO, Juliana Lopes Rangel. Application of the LEXSY *Leishmania tarentolae* system as a recombinant protein expression platform: A review. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 87, n. November 2018, p. 164–173, 2019. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.08.019.

FIGAJ, D.; AMBROZIAK, P.; PRZEPIORA, T.; SKORKO-GLONEK, J. The role of proteases in the virulence of plant pathogenic bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, J. Skorko-Glonek, Department of General and Medical Biochemistry, Faculty of Biology, University of Gdansk, Wita Stwosza 59, Gdansk, Poland, v. 20, n. 3, 2019. DOI: 10.3390/ijms20030672. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L2001558568&from=export>.

GASTEIGER, Elisabeth; HOOGLAND, Christine; GATTIKER, Alexandre; DUVAUD, Séverine; WILKINS, Marc R.; APPEL, Ron D.; BAIROCH, Amos. The Proteomics Protocols Handbook. **The Proteomics Protocols Handbook**, [S. l.], p. 571–608, 2005. DOI: 10.1385/1592598900.

GERNGROSS, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. **Nature biotechnology**, v. 22, p. 1409–1414, 2004.

GRAZIOSE, Rocky; ROJAS-SILVA, Patricio; RATHINASABAPATHY, Thirumurugan; DEKOCK, Carmen; GRACE, Mary H.; POULEV, Alexander; ANN, Mary; SMITH, Peter; RASKIN, Ilya. Antiparasitic compounds from *Cornus florida* L. with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae*. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 142, n. 2, p. 456–461, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2012.05.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.017>.

GRIMSHAW, Jeremy M. et al. Pravila PRISMA 2020. **Medicina Fluminensis**, [S. l.],

v. 57, n. 4, p. 444–465, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01626-4>.

GROMACS 2020.4 Manual. [S. l.], 2020. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.-4054996>. Disponível em: <http://manual.gromacs.org/documentation/5.1.4/%0Ahttp://files/1243/5.1.html%0Ahttp://manual.gromacs.org/2019-current/manual-2019.6.pdf>.

GUPTA, Sudheer; KAPOOR, Pallavi; CHAUDHARY, Kumardeep; GAUTAM, Ankur; KUMAR, Rahul; RAGHAVA, Gajendra P. S. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. e73957, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0073957. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073957>.

HOU, Tianyu; SANA, Siva Sankar; LI, Huizhen; XING, Yun; NANDA, Anima; NETALA, Vasudeva Reddy; ZHANG, Zhijun. Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 47, n. April, p. 101716, 2022. DOI: 10.1016/j.fbio.2022.101716. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101716>.

HUANG, Jing; MACKERELL, Alexander D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 2013. DOI: 10.1002/jcc.23354.

HUSSEY, R.S; BARKER K.R. A comparasion of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025–1028, 1973.

IMANDI, Swathi; BAHADUR, Vijay. A review on mechanism and genetics of resistance and multiple resistance in Brinjal. **The Pharma Innovation Journal**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 567–571, 2023. Disponível em: <https://www.thepharmajournal.com/archives/-2023/vol12issue3/PartF/12-2-339-497.pdf>.

JUDD, R. C. Electrophoresis of peptides, in: Walker, J.M. (Eds.), **Methods in molecular biology: basic protein and peptide protocols**. Humana Press, Totowa, p 49–57, 1994.

JURRUS, Elizabeth et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 112–128, 2018. DOI: 10.1002/pro.3280.

KELLEY, Lawrence A.; MEZULIS, Stefans; YATES, Christopher M.; WASS, Mark N.; STERNBERG, Michael J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. DOI: 10.1038/nprot.2015.053. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>.

KOZAKOV, Dima et al. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature protocols**, v. 12, n. 2, p. 255, 2017.

KRIEGER, Elmar; JOO, Keehyoung; LEE, Jinwoo; LEE, Jooyoung; RAMAN, Srivatsan; THOMPSON, James; TYKA, Mike; BAKER, David; KARPLUS, Kevin. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, [S. l.], v. 77, n. SUPPL. 9, p. 114–122, 2009. DOI: 10.1002/prot.22570.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; LI, Michael; KNYAZ, Christina; TAMURA, Koichiro. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms.

Molecular Biology and Evolution, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

LAI, Jing Yi; KLATT, Stephan; LIM, Theam Soon. Potential application of *Leishmania tarentolae* as an alternative platform for antibody expression. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 380–394, 2019. DOI: 10.1080/07388551.2019.1566206.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993. DOI: 10.1107/s0021889892009944.

LELIS, Tiago; PENG, Jingyu; BARPAGHA, Inderjit; CHEN, Ruoxi; HAM, Jong Hyun. The Virulence Function and Regulation of the Metalloprotease Gene prtA in the Plant-Pathogenic Bacterium *Burkholderia glumae*. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 32, n. 7, p. 841–852, 2019. DOI: 10.1094/MPMI-11-18-0312-R.

LEONARD, Miriam et al. *Verticillium longisporum* Elicits Media-Dependent Secretome Responses With Capacity to Distinguish Between Plant-Related Environments. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01876. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85089809-846&doi=10.3389%2Fmicb.2020.01876&partnerID=40&md5=a24dee2fe6618cb227bbd5dfd5ed3784>.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 127–128, 2007. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl529.

LETUNIC, Ivica; KHEDKAR, Supriya; BORK, Peer. SMART: Recent updates, new developments and status in 2020. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 49, n. D1, p. D458–D460, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkaa937.

LI, Guang; LI, Xiaofen; ZHANG, Tongfang; YU, Jia; HOU, Hongxiao; YI, Lanhua. Controlling soft rot of postharvest chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) by an antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* S917: Efficacy and action mode. **Biological Control**, [S. l.], v. 178, n. December 2022, 2023. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2022.105133.

LOGACHEVA, M. D.; VALIEJO-ROMAN, C. M.; PIMENOV, M. G. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. **Plant systematics and evolution = Entwicklungsgeschichte und Systematik der Pflanzen**, [S. l.], v. 270, n. 3–4, p. 783–791, 2008. DOI: 10.1080/00837792.1905.10669550.

LÜTHY, Roland; BOWIE, James U.; EISENBERG, David. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, [S. l.], v. 356, n. 6364, p. 83–85, 1992. DOI: 10.1038/356083a0. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/356083a0>.

MADEIRA, Fábio et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 47, n. W1, p. W636–W641, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz268.

MARITS, R.; KOIV, V.; LAASIK, E.; MAE, A. Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. **MICROBIOLOGY-SGM**, 14-16

MEREDITH ST, LONDON, ENGLAND, v. 145, n. 8, p. 1959–1966, 1999. DOI: 10.1099/13500872-145-8-1959.

MARITS, Reet; TSHUIKINA, Marina; PIRHONEN, Minna; LAASIK, Eve; MÄE, Andres. Regulation of the expression of prtW::gusA fusions in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Microbiology (Reading, England)**, England, v. 148, n. Pt 3, p. 835–842, 2002. DOI: 10.1099/00221287-148-3-835.

MEHER, Prabina Kumar; SAHU, Tanmaya Kumar; SAINI, Varsha; RAO, Atmakuri Ramakrishna. Predicting antimicrobial peptides with improved accuracy by incorporating the compositional, physico-chemical and structural features into Chou's general PseAAC. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. January, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1038/srep42362.

MISTRY, Jaina et al. Pfam: The protein families database in 2021. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 49, n. D1, p. D412–D419, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkaa913.

NEVES, Wânia dos Santos; DALLEMOLE-GIARETTA, Rosangela; ZOOCA, Ronaldo João Falcão; COUTINHO, Marcelo Magalhães. Effect of botanical extracts over hatching and juvenile's inactivation of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. **Revista Trópica**, [S. l.], v. 4, p. 3–7, 2010. Disponível em: <http://www.ccaa.ufma.br/revistatropica/ArtigosV3N1/efeitoExtrato.pdf>.

OEKMEN, Bilal et al. Dual function of a secreted fungalysin metalloprotease in *Ustilago maydis*. **The New phytologist**, 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA, England, v. 220, n. 1, p. 249–261, 2018. DOI: 10.1111/nph.15265. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85051248792&doi=10.1111%-2Fnph.15265&partnerID=40&md5=541b257aa38cab4142856ef7becbeb7b>.

OLIVEIRA, Arielle Pinheiro Bessiatti Fava; RESENDE, Larissa Maximiano; RODRIGUES, Rosana; DE OLIVEIRA MELLO, Érica; TAVEIRA, Gabriel Bonan; DE OLIVEIRA CARVALHO, André; GOMES, Valdirene Moreira. Antimicrobial peptides of the genus *Capsicum*: a mini review. **Horticulture Environment and Biotechnology**, [S. l.], v. 63, n. 4, p. 453–466, 2022. DOI: 10.1007/s13580-022-00421-x.

ORMANCEY, Mélanie et al. Complementary peptides represent a credible alternative to agrochemicals by activating translation of targeted proteins. **Nature Communications**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–13, 2023. DOI: 10.1038/s41467-023-35951-0.

PASCALE, Alberto; PROIETTI, Silvia; PANTELIDES, Iakovos S.; STRINGLIS, Ioannis A. Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: The Basis for Targeted Disease Suppression and Plant Growth Promotion. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 10, n. January, p. 1–23, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2019.01741.

QUILIS, Jordi; LÓPEZ-GARCÍA, Belén; MEYNARD, Donaldo; GUIDERDONI, Emmanuel; SAN SEGUNDO, Blanca. Inducible expression of a fusion gene encoding two proteínase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, B. San Segundo, v. 12, n. 3, p. 367–377, 2014. DOI: 10.1111/pbi.12143. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L1052878110&from=export>.

QUILIS, Jordi; MEYNARD, Donaldo; VILA, Laura; AVILÉS, Francesc X.;

GUIDERDONI, Emmanuel; SAN SEGUNDO, Blanca. A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 537–553, 2007. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2007.00264.x.

SAMBROOK, J., FRITCASH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2. ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 3v. 3104p, 1989.

SCHOINA, C.; RODENBURG, S. Y. A.; MEIJER, H. J. G.; SEIDL, M. F.; LACAMBRA, L. T.; BOUWMEESTER, K.; GOVERS, F. Mining oomycete proteomes for metalloproteases leads to identification of candidate virulence factors in *Phytophthora infestans*. **Molecular plant pathology**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 551–563, 2021. DOI: 10.1111/mp.13043. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L634486051&from=export>.

SEPPEY, Mathieu; MANNI, Mosè; ZDOBNOV, Evgeny M. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. In: **Notes on the Greek Text of Genesis**. [s.l.] : SBL Press, 2019. v. 1962p. 227–245. DOI: 10.1007/978-1-4939-9173-0_14. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/j.ctvfxvc64.18>.

SZITENBERG, Amir; SALAZAR-JARAMILLO, Laura; BLOK, Vivian C.; LAETSCH, Dominik R.; JOSEPH, Soumi; WILLIAMSON, Valerie M.; BLAXTER, Mark L.; LUNT, David H. Comparative genomics of apomictic root-knot nematodes: Hybridization, ploidy, and dynamic genome change. **Genome Biology and Evolution**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 2844–2861, 2017. DOI: 10.1093/gbe/evx201.

TAHERI, Parissa; SOWEYZI, Marjan; TARIGHI, Saeed. Application of Essential Oils to Control Some Important Fungi and Bacteria pathogenic on Cereals. **Journal of Natural Pesticide Research**, [S. l.], v. 6, n. July, p. 100029, 2023. DOI: 10.1016/j.napere.2023.100029.

VARADI, Mihaly et al. AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 50, n. D1, p. D439–D444, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkab1061.

WANG, Guangshun; LI, Xia; WANG, Zhe. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkv1278.

WHIGHAM, Ehren et al. Broadly Conserved Fungal Effector BEC1019 Suppresses Host Cell Death and Enhances Pathogen Virulence in Powdery Mildew of Barley (*Hordeum vulgare* L.). **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, United States, v. 28, n. 9, p. 968–983, 2015. DOI: 10.1094/MPMI-02-15-0027-FI.

WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 35, n. SUPPL.2, p. 407–410, 2007. DOI: 10.1093/nar/gkm290.

WILLIAMS, Holly L.; STURROCK, Rona N.; ISLAM, Muhammad A.; HAMMETT, Craig; EKRAMODDOULLAH, Abul K. M.; LEAL, Isabel. Gene expression profiling of candidate virulence factors in the laminated root rot pathogen *Phellinus sulphurascens*. **BMC GENOMICS**, CAMPUS, 4 CRINAN ST, LONDON N1 9XW, ENGLAND, England, v. 15, n. 1, p. 603, 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-603. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L53251099&from>

=export.

YANG, Xu; CHENG, Yu Fu; DENG, Cao; MA, Yan; WANG, Zhi Wen; CHEN, Xue Hao; XUE, Lin Bao. Comparative transcriptome analysis of eggplant (*Solanum melongena* L.) and turkey berry (*Solanum torvum* Sw.): Phylogenomics and disease resistance analysis. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 0–12, 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-412.

ZHANG, Y. et al. The highly conserved barley powdery mildew effector BEC1019 confers susceptibility to biotrophic and necrotrophic pathogens in wheat. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 18, 2019. DOI: 10.3390/ijms20184376. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85071756095&doi=-10.3390%2Fijms20184376&partnerID=40&md5=56-5121111a0ad3fd2bb173b05fbf1eeb>.

ZHANG, Yi Meng; YE, De Xing; LIU, Yan; ZHANG, Xin Yuan; ZHOU, Yuan Lin; ZHANG, Li; YANG, Xin Ling. Peptides, new tools for plant protection in eco-agriculture. **Advanced Agrochem**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 58–78, 2023. DOI: 10.1016/j.aac.2023.01.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aac.2023.01.003>.

CONCLUSÃO GERAL

Ao longo dos capítulos, foi firmemente estabelecido que os inibidores de carboxipeptidase de solanáceas (ICPs) desempenham um papel crucial como ferramenta valiosa para a defesa e o controle de patógenos agrícolas. A análise estrutural e filogenética dos ICPs destacou sua notável presença evolutiva e habilidade de interação precisa com alvos específicos, notadamente as metalocarboxipeptidases. Através de investigações moleculares e bioquímicas, emergiu um quadro complexo das interações entre ICPs e proteínas-alvo, ampliando assim suas propriedades inibitórias e sinalizando aplicações potenciais promissoras, tanto como agentes antimicrobianos quanto nematicidas. Os ICPs originários de *Solanum melongena* (berinjela) e *Solanum tuberosum* (batata) surgiram como potentes biomoléculas para uso na biotecnologia agrícola. A caracterização estrutural e funcional destes ICPs, evidenciou marcantes semelhanças com outros inibidores já reconhecidos, ampliando assim sua eficácia enquanto agentes de defesa. O potencial intrínseco desses ICPs, foi ressaltado pelo papel significativo da berinjela e outras solanáceas como fontes de moléculas naturais não tóxicas com capacidade de combate aos fitopatógenos.

O amplo espectro de ação dos ICPs, englobando atividades nematicidas e antimicrobianas, promove sua adaptação flexível no âmbito do manejo integrado de pragas e doenças agrícolas. Esta linha de exploração natural traça um caminho promissor em direção a estratégias mais seguras e sustentáveis, em plena sintonia com a crescente demanda por alternativas ambientalmente amigáveis e menos prejudiciais à saúde humana. Por conseguinte, a pesquisa contínua acerca dos ICPs e sua aplicação prática no contexto agrícola desempenham um papel de destaque na garantia da segurança alimentar e na promoção da produção agrícola de cunho sustentável. Num panorama mais abrangente, estes estudos sublinham o iminente potencial da pesquisa contínua dos ICPs para aplicação nas esferas da agricultura, biotecnologia e saúde humana. O entendimento cada vez mais profundo das interações entre plantas e microrganismos, aliado a uma análise minuciosa das propriedades dos ICPs, cimenta uma base sólida para investigações futuras e o desenvolvimento consequente de produtos inovadores. Nesse contexto, o potencial biotecnológico dos ICPs, fomenta seu uso em práticas cultivares e de manejo sustentáveis que são necessárias na produção quanto no equilíbrio ambiental.

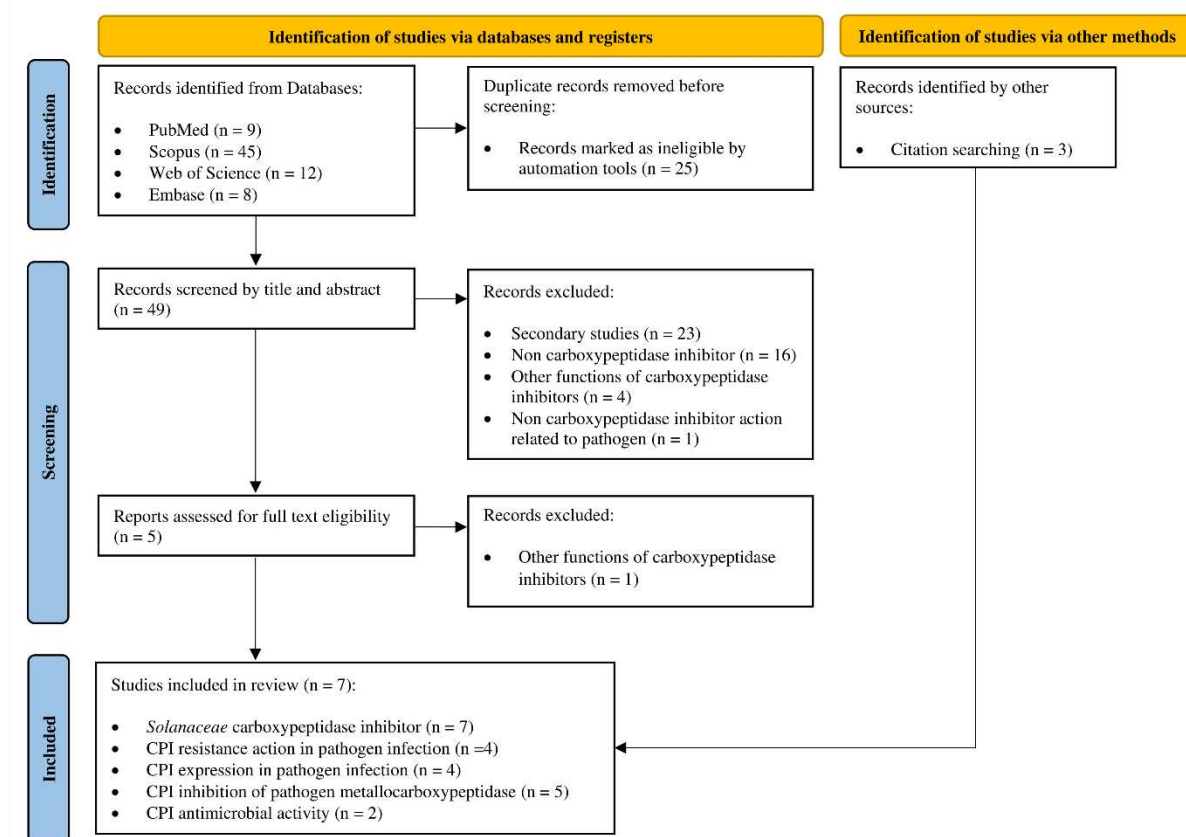
APÊNDICE

APÊNDICE A: Material Suplementar Capítulo 1

C1 Supplementary File S1: Fasta sequences of *Solanaceae* carboxypeptidase inhibitor used in the study.

https://drive.google.com/file/d/1yRG-KI1rBluBL5r4kAC_FzZiDIsKG8Ss/view?usp=drive link

C1 Supplementary Figure S1: Flow diagram of bibliographic search strategy of studies related to *Solanaceae* CPIs activities against pathogens. The methodology followed an adaptation of PRISMA guidelines (Grimshaw et al., 2021).



C1 Supplementary Table1: Detailed search strategy with search filters and number of studies recovered in electronic databases.

	PubMed-MEDLINE – Search filters	Records
#1	Metalloproteinase inhibitor: (“metalloproteinase inhibitor”[Title/Abstract]) OR (“metalloproteinase inhibitor”[Title/Abstract]) OR (“carboxypeptidase inhibitor”[Title/Abstract])	2,488
#2	<i>Solanaceae</i>: (<i>Solanaceae</i> [MeSH Terms]) OR (potato[Title/Abstract]) OR (tomato[Title/Abstract]) OR (<i>Solanum</i> *[Title/Abstract]) OR (<i>Capsicum</i> *[Title/Abstract]) OR (<i>Nicotiana</i> *[Title/Abstract]) OR (<i>Datura</i> *[Title/Abstract]) OR (<i>Hyoscyamus</i> *[Title/Abstract]) OR (tobacco[Title/Abstract]) OR (pepper[Title/Abstract])	210,654

#3 Pathogen: (pathogen*[Title/Abstract]) OR (phytopathogen*[Title/Abstract]) OR ("plant pathogen"*[Title/Abstract])	1,112,620
#4 Combined search: #1 AND #2 AND #3	9
SCOPUS – Search filters	Records
#1 Metalloprotease inhibitor: TITLE-ABS-KEY ("metalloprotease inhibitor*" OR "metalloproteinase inhibitor*" OR "carboxypeptidase inhibitor*")	134,089
#2 Solanaceae: TITLE-ABS-KEY (<i>Solanaceae</i> OR potato OR tomato OR <i>Solanum</i> * OR <i>Capsicum</i> * OR <i>Nicotiana</i> * OR <i>Datura</i> * OR <i>Hyoscyamus</i> * OR tobacco OR pepper)	450,354
#3 Pathogen: TITLE-ABS-KEY (pathogen* OR phytopathogen* OR "plant pathogen*")	1,640,381
#4 Combined search: #1 AND #2 AND #3	45
Web of Science – Search filters	Records
#1 Metalloprotease inhibitor: ((TS=("metalloprotease inhibitor*")) OR TS=("metalloproteinase inhibitor*")) OR TS=("carboxypeptidase inhibitor*")	4,498
#2 Solanaceae: (((((((((TS=(<i>Solanaceae</i>)) OR TS=(potato)) OR TS=(tomato)) OR TS=(<i>Solanum</i> *)) OR TS=(<i>Capsicum</i> *)) OR TS=(<i>Nicotiana</i> *)) OR TS=(<i>Datura</i> *)) OR TS=(<i>Hyoscyamus</i> *)) OR TS=(tobacco)) OR TS=(pepper))	406,500
#3 Pathogen: (((TS=("pathogen*")) OR TS=(phytopathogen*)) OR TS=("plant pathogen*"))	1,180,123
#4 Combined search: #1 AND #2 AND #3	12
EMBASE – Search filters	Records
#1 Metalloprotease inhibitor: 'metalloprotease inhibitor':ti,ab,kw OR 'metalloproteinase inhibitor':ti,ab,kw OR 'carboxypeptidase inhibitor':ti,ab,kw	3,007
#2 Solanaceae: <i>Solanaceae</i> :ti,ab,kw OR potato:ti,ab,kw OR tomato:ti,ab,kw OR ' <i>Solanum</i> ':ti,ab,kw OR ' <i>Capsicum</i> ':ti,ab,kw OR ' <i>Nicotiana</i> ':ti,ab,kw OR ' <i>Datura</i> ':ti,ab,kw OR ' <i>Hyoscyamus</i> ':ti,ab,kw OR tobacco:ti,ab,kw OR pepper:ti,ab,kw OR <i>Solanaceae</i> /de	242,752
#3 Pathogen: 'pathogen':ti,ab,kw OR 'phytopathogen':ti,ab,kw OR 'plant pathogen':ti,ab,kw OR 'phytopathogen'/de	1,389,574
#4 Combined search: #1 AND #2 AND #3	8

Database searches were finalized on July 01st, 2023 at 19:37 pm.

C1 Supplementary Table 2: Main findings of studies (n=7) showing *Solanaceae* CPIs activities against pathogens.

Studies	CPI	Species	Pathogen	Main Findings
Abdeen et al., 2005	PCI	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	<i>Heliothis obsoleta</i> (insect) <i>Liriomyza trifolii</i> (insect)	<ul style="list-style-type: none"> • Tomato homozygous transgenic lines expressing PCI presented high levels of resistance against <i>H. obsoleta</i> and <i>L. trifolii</i>; • In <i>H. obsoleta</i> homo transgenic PCI lines caused 30.4% larvae death, reduced larval weight and consumed leaf area in 40% and inhibit the development stage of larvae fed in more than 70%; • PCI inhibited nearly 75% of <i>L. trifolii</i> carboxypeptidase catalytic function in a concentration of 25 μM; • In <i>L. trifolii</i> the resistance was similar to that in <i>H. obsoleta</i>.
Bayés et al., 2003	PCI	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	<i>Helicoverpa armigera</i> (insect)	<ul style="list-style-type: none"> • PCI inhibited 100% the metallocarboxypeptidase CPAHa activity of <i>H. armigera</i> in concentration of 5μM; • PCI presented K_i value of 65 pM (competitive inhibition) displaying highly sensitive inhibition in a 10^{-12} concentration ratio. • PCI inhibited 100% the metallocarboxypeptidase CPBAe1 catalytic activity of <i>A. aegypti</i> in concentration of 697 nM;
Gavor et al., 2021	PCI	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	<i>Aedes aegypti</i> (insect)	<ul style="list-style-type: none"> • In inhibition PCI presented K_i value of 14.70 nM (competitive inhibition) and IC_{50} of 25 nM; • PCI displayed highly sensitive in the inhibition of the insect CPB in a 10^{-9} concentration ratio. • Potato MCPI exhibited significant expression (274.4-fold) in potato diploid resistant cultivar DG 00–270 after <i>D. solani</i> infection;
Lebecka et al., 2019	MCPI	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	<i>Dickeya solani</i> (bacteria)	<ul style="list-style-type: none"> • MCPI could contribute to resistance of cultivar DG 00–270 due to its higher abundance in this cultivar than in DG 08–305, indicating the defensive role of these proteins in the response to bacterial inoculation.
Quilis et al., 2007	PCI	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	<i>Chilo suppressalis</i> (insect) <i>Fusarium verticillioides</i> (fungi) <i>Magnaporthe oryzae</i> (fungi)	<ul style="list-style-type: none"> • PCI antifungal activity inhibited in 70% the growth of <i>M. oryzae</i> and in 40% of <i>F. verticillioides</i> in the concentrations of 45 μM and 40μM, respectively; • <i>M. oryzae</i> cultures in the presence of PCI revealed severe changes in fungal morphology, such as hyphal shortening and abnormal bed-like structures of hyphae;

Quilis et al., 2014	MPI-PCI	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	<i>Chilo suppressalis</i> (insect) <i>Magnaporthe oryzae</i> (fungi)	<ul style="list-style-type: none"> • Transgenic rice plants expressing the PCI gene display enhanced resistance in <i>M. oryzae</i> and <i>F. verticillioides</i> inhibiting the fungal growth and so causing symptoms diminution of the blast and bakanae diseases of rice, respectively; • PCI inhibits <i>M. oryzae</i> CPB in 98% by the concentration of 2.5 μM; • Transgenic rice lines expressing PCI decreased in 50% the level of CPB activity present in the gut extracts of <i>C. suppressalis</i>. • Transgenic rice expressing hybrid mpi-pci gene revealed a significant reduction between 64.6%–39.6% in weight gain in the <i>C. suppressalis</i> larvae fed on this rice of and also in their development; • Transgenic rice expressing mpi-pci showed reduction in infestation by <i>C. suppressalis</i>; • MPI-CPI transcript accumulation in leaves indicates that mpi promoter drive high level of transgene expression in <i>C. suppressalis</i> infested rice plants; • MPI-PCI Transgenic rice reduced in 50% the formation of empty panicles, a condition of <i>C. suppressalis</i> disease; • Expression of MPI-PCI in rice drives resistance against <i>M. oryzae</i> showing reduction in disease symptoms as small lesions and diminution of leaves affected area. • SIKnot1 and SIKnot2 knottin like peptides showed 100% sequence identity to the metallo- carboxypeptidase inhibitors of tomato;
Slezina et al., 2021	SIKnot1 SIKnot2	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomato)	<i>Fusarium oxysporum</i> (fungi) <i>Fusarium sambucinum</i> (fungi)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>F. oxysporum</i> infestation in tomato plants up-regulate the expression of SIKnot2 gene and suppress SIKnot1; • <i>F. sambucinum</i> infestation in pretreated plants up-regulate the expression of both 1 and 2 SIKnot genes, more significantly it enhanced expression of the SIKnot2 gene.

APÊNDICE B: Material Suplementar Capítulo 2

C2 Supplementary File 1: Data biological essays.

[https://docs.google.com/spreadsheets/d/1TZH7LVZDoNlry1UFQzRYTb6TYJsa0htQ/edit?usp=drive link&ouid=110755918564842086019&rtpof=true&sd=true](https://docs.google.com/spreadsheets/d/1TZH7LVZDoNlry1UFQzRYTb6TYJsa0htQ/edit?usp=drive_link&ouid=110755918564842086019&rtpof=true&sd=true)

C2 Supplementary Fig. 1: Sequence characterization of the identified *Solanum melongena* leaves peptide. (A) Sequence (19 aa) resulted from Edman sequencing and the same sequence complemented (30 aa) based on alignments with known peptides. (B) tBLASTn result between the 30-residue sequence and *S. melongena* genome (GenBank code GCA_000787875.1). (C) Nucleotide sequence (contig BAUBAUE0110730.1) of the *S. melongena* genome corresponding to the 30-residue proposed sequence. (D) Alignment (Clustal Omega) between 30-residue sequence and its genome translated sequence. * indicates same aminoacids in the same position; : indicates similar aminoacids in the same position; empty space indicates different aminoacids in the same position. (E) Complete and functional final sequence of the identified *Solanum melongena* leaves peptide, which is called ICP-SMEL.



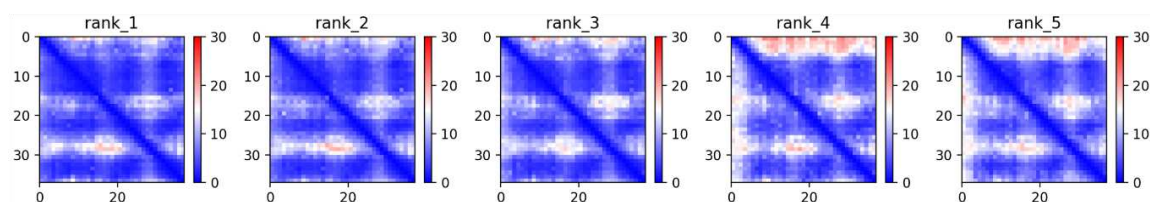
C2 Supplementary Table 1: Physicochemical properties prediction of ICP-SMEL.

ProtParam		ToxinPred			iAMPred – Antimicrobial action		
pI ^a	mm ^b	charge	toxicity	hydrophobicity	antibacterial	antiviral	antifungal
8.65	4089.81 Da	+3	toxic	-0.24	0.99	0.93	0.99

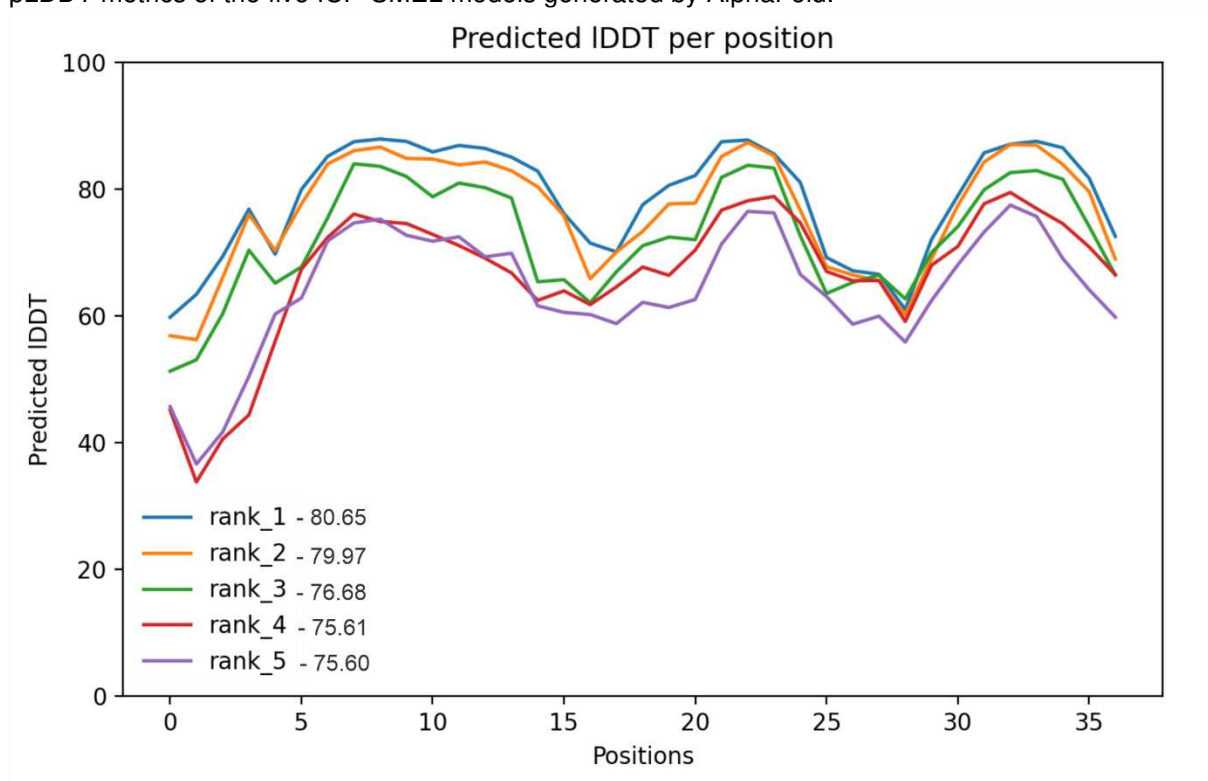
^a pI – isoelectric point

^b mm – molecular mass

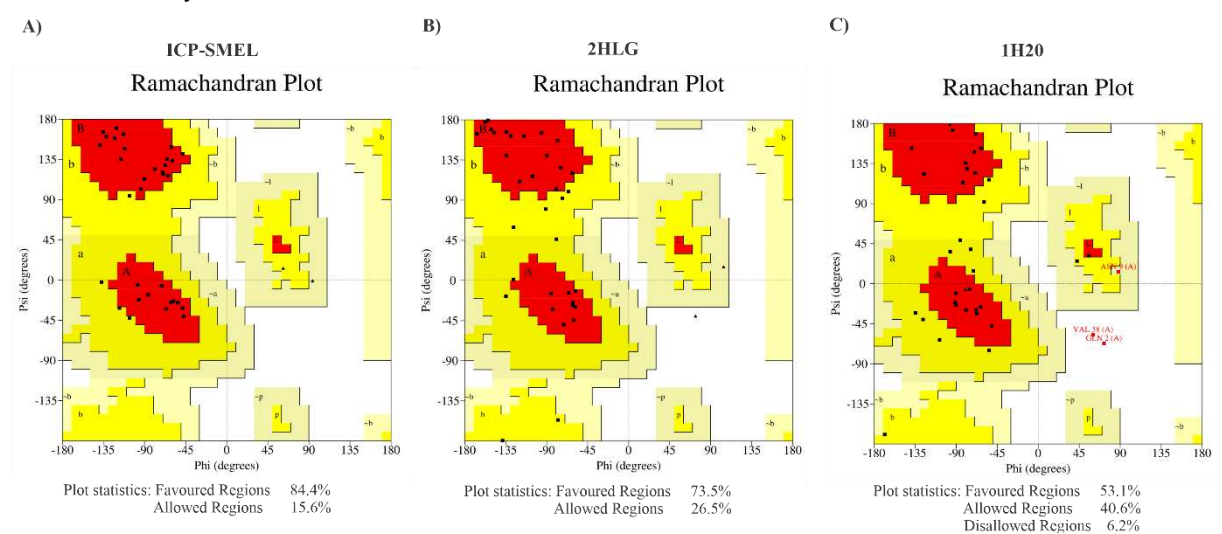
C2 Supplementary Fig. 2: PAE (predicted aligned error) metric of ICP-SMEL structure generated by AlphaFold modeling software. This metric gives a distance error for every pair of residues estimating the position error at residue x when the predicted and true structures are aligned on residue y. Values range from 0 - 35 Å. The graphs show PAE metrics of the five ICP-SMEL models generated by AlphaFold.



C2 Supplementary Fig. 3: pLDDT (predicted local distance difference test) metric of ICP-SMEL structure generated by AlphaFold modeling software. This metric corresponds to the model's predicted score that produces a per-residue estimate of its confidence on a scale from 0 - 100. The graph shows pLDDT metrics of the five ICP-SMEL models generated by AlphaFold.

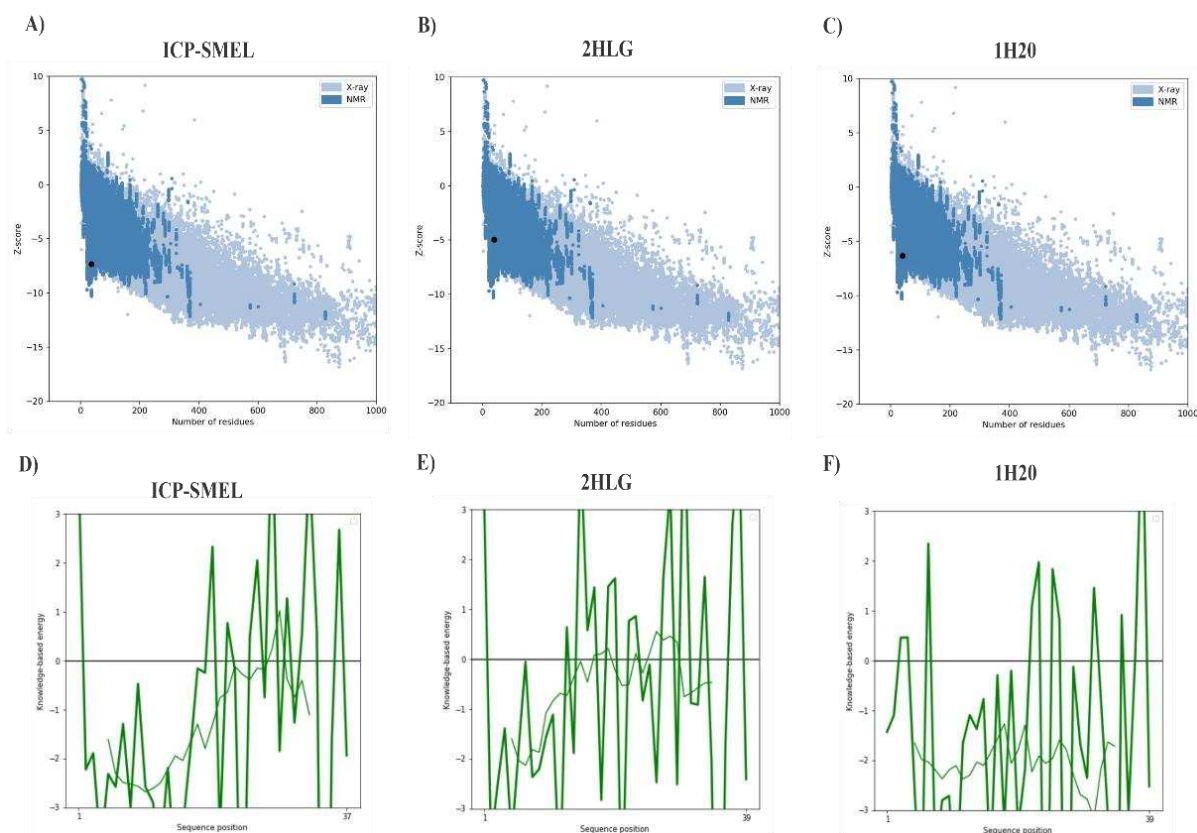


C2 Supplementary Fig. 4: Ramachandran plot of ICP-SMEL structure and others similar ICPs by PROCHECK software. (A) Ramachandran plot of ICP-SMEL structure. (B) Ramachandran plot of the ICP structure (PDB 2HLG) of *Solanum lycopersicum*. (C) Ramachandran plot of the ICP structure (PDB 1H20) of *Solanum tuberosum*. The Ramachandran plot shows the allowed and disallowed regions of protein backbone torsion angles phi (Φ) and psi (Ψ) for a protein structure that describes the stereochemistry of the molecule.



C2 Supplementary Fig. 5: Quality of ICP-SMEL structure and others similar ICPs by ProSA software. (A) and (D) shows the global and local quality of ICP-SMEL structure. (B) and (E) shows the global and local quality of ICP structure (PDB 2HLG) of *Solanum lycopersicum*. (C) and (F) shows the global and local quality of ICP structure (PDB 1H20) of *Solanum tuberosum*. The overall quality is displayed in a

plot that shows the scores of all experimentally determined protein currently available in PDB in which relates the score of a specific model to the scores computed from all experimental structures of PDB. The energy plot shows the local model quality by plotting energies as a function of amino acid sequence position, in which problematic parts of a model are given by positive values in the plot.



APÊNDICE C: Material Suplementar Capítulo 3

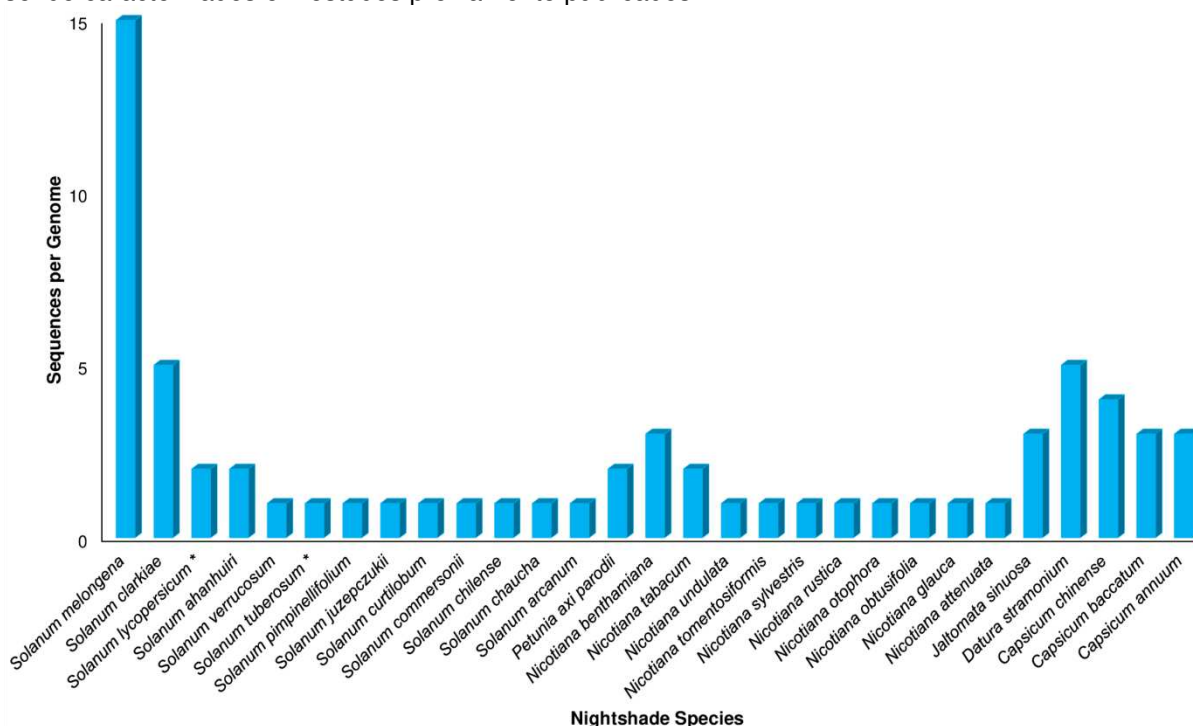
C3 Arquivo Suplementar 1: Aminoácidos sítio catalítico metalocarboxipeptidase bovina utilizados docking molecular.

- S1'(Asn144, Arg145, Tyr248 e Xaa255); S1(Arg127, Leu/Ile247 e Glu270); S2 (Arg71, Asp142, Ser197, Tyr198 e Ser199); S3 (Phe279); S4 (Glu122,Arg124 e Lys128); Glu72 His69 H196 interação com Zn.

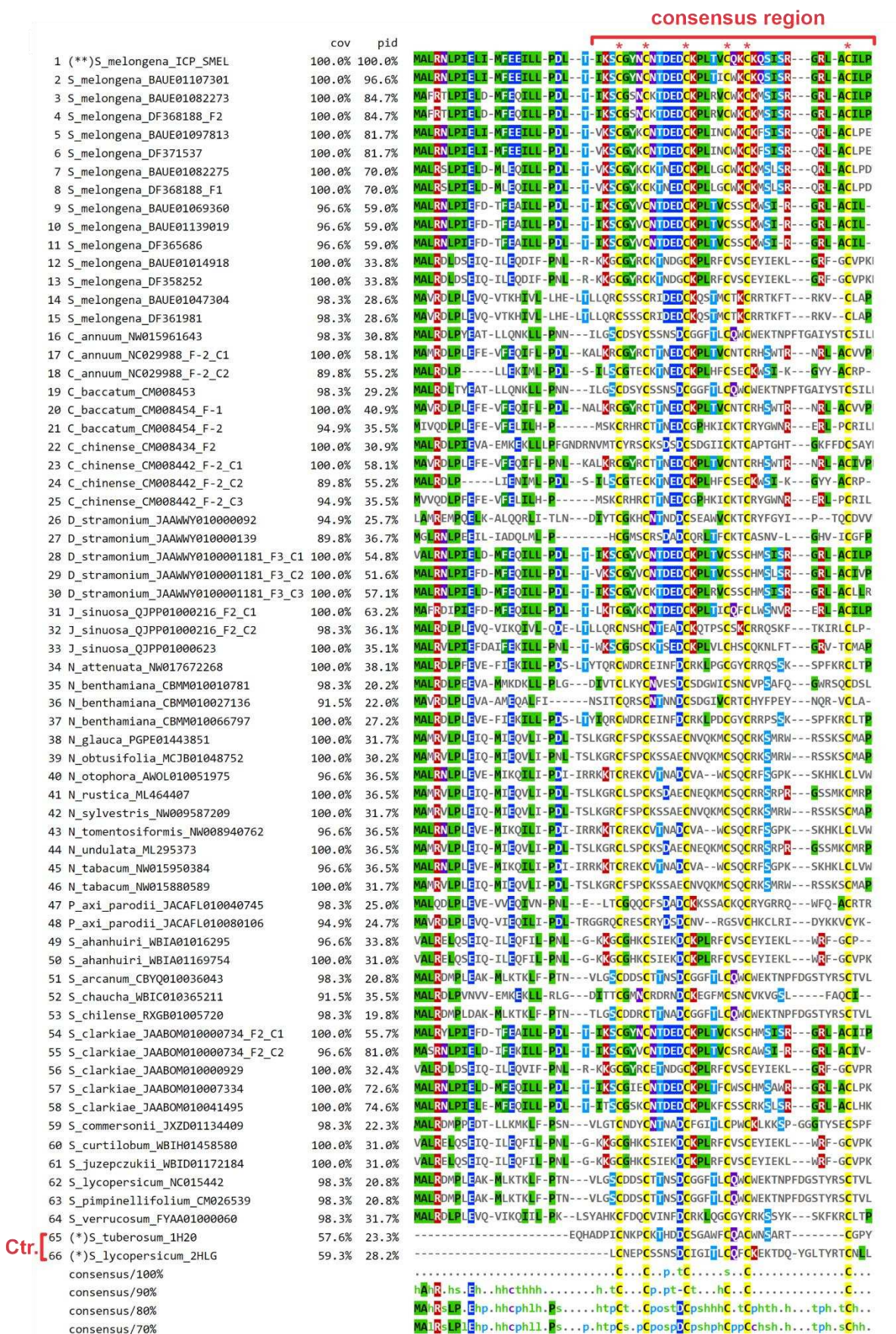
C3 Arquivo Suplementar 2: Aminoácidos regiões ICP-SMEL utilizados docking molecular.

- C-terminal (aa 29-37); Ao longo do peptídeo ao redor das C (aa 1-3 12 13 19 22 27 29 31 35-37)

C3 Figura Suplementar 1: Gráfico da abundância de seqüências ICPs encontradas em cada espécie de solanácea. O gráfico apresenta a quantidade de seqüências de ICPs encontradas em cada espécie de solanácea com genoma analisado. (*) Evidencia ICPs que foram utilizados como padrões nos estudos, os quais possuem estruturas já definidas e foram depositados no Protein Data Bank (PDB), sendo caracterizados em estudos previamente publicados.



C3 Figura Suplementar 2: Conservação das seqüências ICPs identificadas nas solanáceas. Alinhamento da região de maior similaridade dos ICPs identificados a partir das buscas nos genomas. O alinhamento global foi gerado no Clustal Omega e visualizado no software MView (MView 1.63, Copyright © 1997-2018 Nigel P. Brown). Os consensos 100%, 90%, 80% e 70% evidenciam a conservação entre seqüências alinhadas. O mapa de cores MView mostra os padrões de semelhança de aminoácidos (aa) por suas características químicas: **h** (aa hidrofóbico); **o** (aa função orgânica álcool); **p** (aa polar); **s** (aa pequeno); **t** (aa região de volta); **c** (aa carregados); **l** (aa alifáticos). **cov.:** porcentagem de cobertura; **pid.:** porcentagem de identidade. Marcação em vermelho evidencia a região de maior consenso do alinhamento correspondente à seqüência funcional de ICP-SMEL. **Ctrl.** e **(*)** indicam seqüências de ICPs com estruturas depositadas no Protein Data Bank (PDB) de *Solanum tuberosum* (1H20) e *Solanum lycopersicum* (2HLG), utilizadas como padrões nos estudos. **(**)** indica a seqüência de ICP-SMEL utilizada como modelo para a busca de outras seqüências ICPs nos genomas de espécies da família *Solanaceae*. * Indica posição de cisteínas conservadas.



C3 Tabela Suplementar 1. Qualidade dos genomas das solanáceas.

Espécies Solanáceas	Código Acesso GenBank	Tamanho do Genoma (Mb)	% GC	BUSCO
<i>Capsicum annuum</i>	GCA_000710875.1	2935.88	35,4%	C:97.6% [S:94.8%, D:2.8%], F:0.9%, M:1.5%, n:425
<i>Capsicum baccatum</i>	GCA_002271885.2	3215.61	35,4%	C:96.9% [S:94.8%, D:2.1%], F:2.1%, M:1.0%, n:425
<i>Capsicum chinense</i>	GCA_002271895.2	3070.91	34,9%	C:97.0% [S:94.4%, D:2.6%], F:2.1%, M:0.9%, n:425
<i>Datura stramonium</i>	GCA_016071745.1	1481.87	38,2%	C:96.2% [S:95.5%, D:0.7%], F:2.6%, M:1.2%, n:425
<i>Jaltomata sinuosa</i>	GCA_003996215.1	1443.20	37,9%	C:97.0% [S:94.6%, D:2.4%], F:2.1%, M:0.9%, n:425
<i>Nicotiana attenuata</i>	GCA_001879085.1	2365.68	41,3%	C:99.0% [S:96.9%, D:2.1%], F:0.2%, M:0.8%, n:425
<i>Nicotiana benthamiana</i>	GCA_000723945.1	61.95	39,6%	C:49.9% [S:39.1%, D:10.8%], F:37.6%, M:12.5%, n:425
<i>Nicotiana glauca</i>	GCA_002930595.1	3222.83	36,6%	C:83.1% [S:80.7%, D:2.4%], F:15.1%, M:1.8%, n:425
<i>Nicotiana knightiana</i>	GCA_005239525.1	2298.94	39,7%	C:94.8% [S:92.9%, D:1.9%], F:4.5%, M:0.7%, n:425
<i>Nicotiana obtusifolia</i>	GCA_002018475.1	1222.77	38,4%	C:96.7% [S:93.2%, D:3.5%], F:2.1%, M:1.2%, n:425
<i>Nicotiana otophora</i>	GCA_000715115.1	2689.35	39,1%	C:77.7% [S:75.3%, D:2.4%], F:16.5%, M:5.8%, n:425
<i>Nicotiana paniculata</i>	GCA_005239505.1	2190.56	39,4%	C:94.8% [S:92.2%, D:2.6%], F:3.5%, M:1.7%, n:425
<i>Nicotiana rustica</i>	GCA_005239535.1	4231.29	40,0%	C:97.7% [S:27.1%, D:70.6%], F:1.9%, M:0.4%, n:425
<i>Nicotiana sylvestris</i>	GCA_000393655.1	2221.99	39,7%	C:94.8% [S:92.2%, D:2.6%], F:3.8%, M:1.4%, n:425
<i>Nicotiana tabacum</i>	GCA_000715135.1	3643.47	39,2%	C:95.5% [S:25.9%, D:69.6%], F:2.4%, M:2.1%, n:425
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	GCA_000390325.2	1688.47	39,1%	C:94.4% [S:90.6%, D:3.8%], F:4.2%, M:1.4%, n:425
<i>Nicotiana undulata</i>	GCA_005239495.1	1914.30	40,0%	C:95.7% [S:93.6%, D:2.1%], F:3.3%, M:1.0%, n:425
<i>Petunia axillaris subsp. parodii</i>	GCA_013625405.1	2199.86	12,9%	C:88.9% [S:88.2%, D:0.7%], F:8.9%, M:2.2%, n:425
<i>Solanum ahanhuii</i>	GCA_009849805.1	828.90	35,8%	C:53.4% [S:49.6%, D:3.8%], F:35.1%, M:11.5%, n:425
<i>Solanum americanum</i>	GCA_900188915.1	9.01	36,2%	C:0.2% [S:0.0%, D:0.2%], F:0.0%, M:99.8%, n:425
<i>Solanum arcanum</i>	GCA_000612985.1	665.19	33,6%	C:90.3% [S:88.9%, D:1.4%], F:7.3%, M:2.4%, n:425
<i>Solanum bukasovii</i>	GCA_009849815.1	1144.31	34,9%	C:58.6% [S:41.9%, D:16.7%], F:31.5%, M:9.9%, n:425
<i>Solanum chaucha</i>	GCA_009849625.1	790.38	35,3%	C:49.6% [S:43.5%, D:6.1%], F:33.4%, M:17.0%, n:425
<i>Solanum chilense</i>	GCA_006013705.1	913.88	24,8%	C:91.5% [S:90.8%, D:0.7%], F:5.9%, M:2.6%, n:425
<i>Solanum clarkiae</i>	GCA_011800125.1	980.80	36,2%	C:80.0% [S:78.8%, D:1.2%], F:14.1%, M:5.9%, n:425

<i>Solanum commersonii</i>	GCA_001239805.1	729.60	34,7%	C:82.6% [S:78.4%, D:4.2%], F:10.8%, M:6.6%, n:425
<i>Solanum curtilobum</i>	GCA_009849645.1	1207.84	36,3%	C:44.5% [S:37.9%, D:6.6%], F:43.1%, M:12.4%, n:425
<i>Solanum habrochaites</i>	GCA_000577655.1	724.29	33,6%	C:93.7% [S:92.5%, D:1.2%], F:4.7%, M:1.6%, n:425
<i>Solanum juzepczukii</i>	GCA_009849685.1	1002.42	35,4%	C:58.3% [S:50.8%, D:7.5%], F:33.2%, M:8.5%, n:425
<i>Solanum lycopersicum</i>	GCA_000188115.3	828.35	35,7%	C:98.4% [S:97.2%, D:1.2%], F:1.2%, M:0.4%, n:425
<i>Solanum melongena</i>	GCA_000787875.1	833.08	36,2%	C:90.6% [S:88.5%, D:2.1%], F:5.4%, M:4.0%, n:425
<i>Solanum pennellii</i>	GCA_001406875.2	926.43	35,7%	C:92.0% [S:91.1%, D:0.9%], F:5.9%, M:2.1%, n:425
<i>Solanum phureja</i>	GCA_009849755.1	873.03	35,2%	C:67.3% [S:60.9%, D:6.4%], F:24.0%, M:8.7%, n:425
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	GCA_014964335.1	808.10	34,5%	C:98.8% [S:97.2%, D:1.6%], F:0.5%, M:0.7%, n:425
<i>Solanum pinnatisectum</i>	GCA_009887355.1	724.56	38,9%	C:96.7% [S:95.8%, D:0.9%], F:1.6%, M:1.7%, n:425
<i>Solanum sitiens</i>	GCA_016801875.1	1245.02	34,8%	C:98.3% [S:95.5%, D:2.8%], F:1.2%, M:0.5%, n:425
<i>Solanum stenotomum subsp. goniocalyx</i>	GCA_009849865.1	855.80	34,9%	C:93.2% [S:84.0%, D:9.2%], F:4.5%, M:2.3%, n:425
<i>Solanum tuberosum</i>	GCA_000226075.1	705.93	35,6%	C:97.4% [S:96.0%, D:1.4%], F:0.9%, M:1.7%, n:425
<i>Solanum verrucosum</i>	GCA_900185275.1	662.26	34,4%	C:98.3% [S:97.4%, D:0.9%], F:1.2%, M:0.5%, n:425

C3 Tabela Suplementar 2. Protocolos docking molecular entre ICP-SMEL e MCPA bovina e estabilização média de RMSD dos complexos durante dinâmica molecular (MD).

Programa	Protocolo	Complexos escolhidos MD	Estabilização 100ns			Estabilização 500ns		
			R1	R2	R3	R1	R2	R3
		0	6Å	5Å	15Å	---	---	---
	1) Sem nenhum direcionamento, default programa	2	>10Å	---	---	---	---	---
		15	6Å	6Å	6Å	6Å	>10Å	6Å
ClusPro	2) Direcionamento aminoácidos sítio catalítico MCP bovina - MCP código PDB 1M4L	1_sd	>10Å	---	---	---	---	---
		16_sd	6Å	6Å	6Å	6Å	8Å	>10Å
		0_ct	>10Å	---	---	---	---	---
	3) Direcionamento aminoácidos sítio catalítico MCP bovina e aminoácidos região C-terminal ICP-SMEL - MCP código PDB 4CPA	1_ct	>10Å	---	---	---	---	---
		2_ct	>10Å	---	---	---	---	---
		4_ct	6Å	10Å	6Å	---	---	---

	3) Direcionamento aminoácidos sítio catalítico MCP bovina e aminoácidos região C-terminal ICP-SMEL - MCP código PDB 4CPA	Smel_ref ^a	>10 Å	---	---	---	---	---
	4) Direcionamento aminoácidos sítio catalítico MCP bovina e aminoácidos ao redor cisteínas ICP-SMEL - MCP código PDB 4CPA	Cluster2_1	>10Å	---	---	---	---	---
Haddock	3) Direcionamento aminoácidos sítio catalítico MCP bovina e aminoácidos região C-terminal ICP-SMEL - MCP código PDB 4CPA	Cluster1_1_ct	10Å	>10Å	>10Å	---	---	---
		Cluster2_1_ct	>10Å	---	---	---	---	---
		Cluster3_1_ct	6Å	4Å	10Å	10Å	6 Å	>10Å

^aSmel_ref – complexo 07 resultante do protocolo 3) de docking que foi alinhada estruturalmente com PCI (ICP de batata) da estrutura 4cpa, resultando em uma pose direcionada pelo alinhamento com uma estrutura verdadeira que mostra a interação correta do PCI com a MCP bovina.

C3 Tabela Suplementar 3: Classificação subgrupos ICPs da filogenia de aminoácidos e nucleotídeos.

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1yCQ5zd5gX94pGtdVy8WNNEyBcg9Viq-6/edit?usp=sharing&oid=11075591856484208-6019&rtpof=true&sd=true>

C3 Arquivo Suplementar 3: Análises completas interações MDs dos complexos finais A e B.

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1xc0N99p6xdu4ICsN6Oe9I-z2JkAV3uEc/edit?usp=sharing&oid=1107559185648420860-19&rtpof=true&sd=true>

C3 Arquivo Suplementar 4: Plot RMSD ligante complexo A interação SMEL-MCPA.

https://drive.google.com/file/d/1ktVMGmspbkz8F2Vi7KFqppYJEhooDAE_/view?usp=sharing

C3 Arquivo Suplementar 5: Plot RMSD proteína complexo A interação SMEL-MCPA.

<https://drive.google.com/file/d/1zaX21WnYE0GFIKJWBH6W-bhqCkxbv6p4/view?usp=sharing>

C3 Arquivo Suplementar 6: Plot RMSF ligante complexo A interação SMEL-MCPA.

<https://drive.google.com/file/d/1NPVTTEgATGbEYfwxpSHumCdvNiLn2zp1/view?usp=sharing>

C3 Arquivo Suplementar 7: Plot RMSF proteína complexo A interação SMEL-MCPA.

<https://drive.google.com/file/d/1Og5UoR1Bv1oYufUca4c3LeDYXIo-MIW2/view?usp=sharing>

C3 Arquivo Suplementar 8: Plot RMSD ligante complexo B interação SMEL-MCPA.

https://drive.google.com/file/d/1DNA5klR-DoQ48qA7HedIASYtfvd2HK_3/view?usp=sharing

C3 Arquivo Suplementar 9: Plot RMSD proteína complexo B interação SMEL-MCPA.

<https://drive.google.com/file/d/1Zle4XRCzOm5StjfT3PLFgAyg4Npo90rK/view?usp=sharing>

C3 Arquivo Suplementar 10: Plot RMSF ligante complexo B interação SMEL-MCPA.

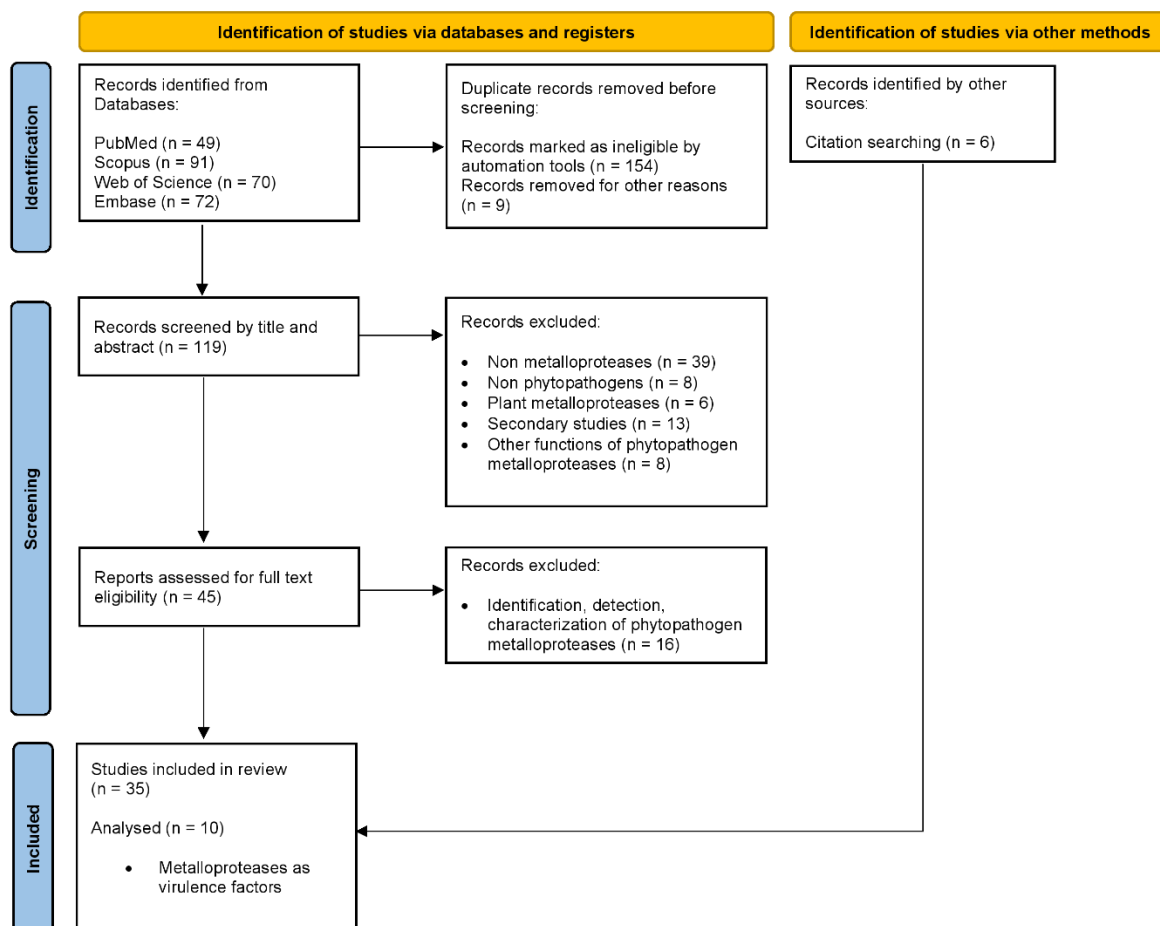
<https://drive.google.com/file/d/1Wc2ShEHQj7yTJxFZ-ENkUYADv4IKbbdV/view?usp=sharing>

C3 Arquivo Suplementar 11: Plot RMSF proteína complexo B interação SMEL-MCPA.

<https://drive.google.com/file/d/1pyllyVKrstDXIWGG-NKFJ0LuXaFOvgU/view?usp=sharing>

APÊNDICE D: Material Suplementar Capítulo 4

C4 Figura Suplementar 1: Fluxograma da estratégia de busca bibliográfica de estudos relacionados à função das metaloproteases como fator de virulência na infecção de patógenos em plantas. A metodologia seguiu uma adaptação das diretrizes PRISMA (Grimshaw et al., 2021).



C4 Tabela Suplementar 1. Estratégia de busca detalhada com filtros de busca e número de estudos recuperados em bases de dados eletrônicas.

PubMed-MEDLINE – Filtros de pesquisa	Registros
#1 Metalloprotease: ((((((metalloexopeptidase[MeSH Terms])) OR (carboxypeptidase[MeSH Terms])) OR (metalloprot*[Title/Abstract])) OR (metallopeptid*[Title/Abstract])) OR (metalloexopeptid*[Title/Abstract])) OR (metallocarboxypeptid*[Title/Abstract]) OR (carboxypeptid*[Title/Abstract]) OR ("zinc peptid*[Title/Abstract])	114,334
#2 Phytopathogen: (phytopathogen*[Title/Abstract]) OR ("plant pathogen*[Title/Abstract])	21,941
#3 Combined search: #1 AND #2	49
SCOPUS – Filtros de pesquisa	Records

#1 Metalloprotease: TITLE-ABS-KEY (metalloprot* OR metallopeptid* OR metalloexopeptid* OR metallocoxypeptid* OR carboxypeptid* OR "zinc peptid*")	295,932
#2 Phytopathogen: TITLE-ABS-KEY ("phytopathogen*" OR "plant pathogen*")	39,426
#3 Combined search: #1 AND #2	91

Web of Science – Filtros de pesquisa	Records
#1 Metalloprotease: (((((TS=("metalloprot*")) OR TS=("metallopeptid*")) OR TS=("metallocoxypeptid*")) OR TS=("zinc peptid*")) OR TS=("metalloexopeptid*")) OR TS=("carboxypeptid*"))	126,635
#2 Phytopathogen: (TS=("phytopathogen*")) OR TS=("plant pathogen*")	34,886
#3 Combined search: #1 AND #2	70

EMBASE – Filtros de pesquisa	Records
#1 Metalloprotease: 'metalloprot*':ti,ab,kw OR 'metallopeptid*':ti,ab,kw OR 'metallocoxypeptid*':ti,ab,kw OR 'zinc peptid*':ti,ab,kw OR 'metalloexopeptid*':ti,ab,kw OR 'carboxypeptid*':ti,ab,kw OR 'carboxypeptidase'/de OR 'metalloproteínase'/de	126,965
#2 Phytopathogen: 'phytopathogen*':ti,ab,kw OR 'plant pathogen*':ti,ab,kw OR 'phytopathogen'/de OR 'plant pathogen interaction'/de	23,496
#3 Combined search: #1 AND #2	72

A pesquisa no banco de dados PubMed-Medline foi concluída em 13 de novembro de 2022 às 16h15. As pesquisas nos bancos de dados Scopus, Web of Science e Embase foram concluídas em 14 de novembro de 2022 às 22h40.

As buscas no banco de dados foram finalizadas em 14 de novembro de 2022 às 22h40.

C4 Arquivo Suplementar 1: Análise das sequências de ICPs encontradas no genoma das solanáceas com predição das propriedades físico-químicas e potencial antimicrobiano.

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1odvukz302KpGEsW6x1dTqivWtfSLa6vY/e-dit?usp=sharing&oid=110755918564842086019&rtpof=true&sd=true>

C4 Arquivo Suplementar 2: Dados testes antimicrobianos em *Meloidogyne incognita*.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/16kLUXYQr54bsEhgcuHZGCu1Xbtdr_meF/edit?usp=sharing&oid=110755918564842086019&rtpof=true&sd=true

C4 Arquivo Suplementar 3: Dados testes antimicrobianos em bactérias e leveduras.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1Nj8XwhAYsHFpZRleY9_-XRVMqgfciv0e/-dit?usp=sharing&oid=110755918564842086019&rtpof=true&sd=true

C4 Arquivo Suplementar 4: Sequências de MCPs caracterizadas a partir do proteoma traduzido do genoma de *Meloidogyne incognita*.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1UeDQoceWir35yBB4mztbbeUpkUD7WX_/edit?usp=sharing&oid=110755918564842086019&rtpof=true&sd=true

C4 Tabela Suplementar 2. Principais achados de estudos (n=10) que apresentam função de metaloproteases como fator de virulência na infecção de patógenos em plantas.

Estudos	Espécie	Metaloprotease	Principais achados
Lelis T, et al (2019)	<i>Burkholderia glumae</i> - bactéria	ptrA	<ul style="list-style-type: none"> • O gene ptrA, de acordo com análise genética, codifica uma serina metaloprotease; • A cepa <i>B. glumae</i> ptrA- não apresentou atividade de protease; • A atividade proteolítica em ptrA- foi restaurada por um clone ptrA (pBB5ptrA), indicando que ptr-A era a única protease extracelular presente em <i>B. glumae</i> avaliado; • Todos os mutantes ptrA- <i>B. glumae</i> apresentaram redução significativa na gravidade da doença da planta; • O clone ptrA pBB5ptrA apresentou virulência comparável ao WT-ptrA, indicando que o ptrA é necessário para a virulência total de <i>B. glumae</i>. • MEP1 e MEP2, de acordo com análise genética, foram identificados como metaloproteases das famílias M36 e M43, respectivamente; • MEP1 e MEP2 foram secretados em <i>V. longisporum</i> apenas em meio de cultura enriquecido com seiva do xilema de <i>Brassica napus</i>;
Leonard M, et al (2020)	<i>Verticillium longisporum</i> and <i>Verticillium dahliae</i> - fungos	MEP1 e MEP2	<ul style="list-style-type: none"> • ΔMEP1 <i>V. dahliae</i> mostrou sintomas de doença menos graves em comparação com a infecção WT, indicando que MEP1 contribui para a patogenicidade de <i>V. dahliae</i>; • Os outros mutantes ΔMEP2 e ΔMEP1/2 não apresentaram perda significativa de sintomas de doença em comparação com WT, concluindo que ambas as enzimas desempenham funções diferentes na virulência. <p>Análise de similaridade de sequência de ptrW com outros genes ptr e atividade de inibição de protease por EDTA de <i>E. carotovora</i> SCC3193 confirmou que ptrW é uma metaloprotease;</p>
Marits R, et al (1999)	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> - bactéria	ptrW	<ul style="list-style-type: none"> • O gene ptrW foi fortemente induzido em cepas de <i>E. carotovora</i> na presença de extratos de plantas; • SCC6004 exibiu redução de 40% na maceração de tubérculos de batata em comparação com SCC3193, sugerindo que PrtW melhora a capacidade da cepa SCC3193 de macerar tecido vegetal; • A virulência do mutante prtW também foi reduzida no desenvolvimento de sintomas de podridão mole em plântulas de tabaco, indicando que 37% das plantas infectadas com SCC6004 não mostraram nenhum sintoma.
Marits R, et al (2002)	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> - bactéria	ptrW	<ul style="list-style-type: none"> • A introdução do plasmídeo prtW (pROT3) em SCC6004 restaura a atividade de protease nesta cepa de <i>E. carotovora</i>;

Ökmen B, et al (2018)

Ustilago maydis - fungofungisilina
UmFly1

- A atividade de β -glucuronidase foi maior no início da fase exponencial de crescimento de células na presença de extratos de batata em comparação com a presença de poligalacturonato (PGA), confirmando que ptrW foi induzido na presença de extrato de batata em comparação com PGA;
- As respostas diferenciais da expressão de prtW ao extrato de batata e ao PGA parecem depender do repressor KdgR e do regulador de resposta ExpA, de acordo com o nível de expressão de pROT5, pROT6 e pROT8 em cepas de *E. carotovora* SCC3193, SCC510, SCC3060 e SCC500;
- O gene ptrW apresenta uma rede regulatória que permite a flexibilidade de sua expressão durante diferentes estágios de infecção.
Análise in silico mostrou que o proteoma de *U. maydis* revelou a presença de UMAG06098, chamado UmFly1, previsto como uma proteína fungisilina/termolisina com domínio de metaloprotease M36;
- A análise filogenética mostrou que homólogos de Fly1 são conservados em todo o reino fúngico, incluindo espécies com diferentes estilos de vida, como saprófitos e endófitos, além de fungos patogênicos de plantas e animais;
- UmFly1 confirmou ser necessário para a clivagem de quitinases de milho durante a infecção de *U. maydis*, mostrando clivagem de ZmChiA (expressa pela planta de milho) em cepas SG200 e nenhuma clivagem em cepas SG200 Δ umfly1-C e SG200 Δ umfly1-C;
- O gene umfly1 foi reintroduzido em SG200 Δ umfly1-C e mostrou clivagem de ZmChiA indistinguível de SG200, verificando que a clivagem de ZmChiA dependia especificamente do gene umfly1;
- UmFly1 clonado de *U. maydis* mostrou clivagem semelhante de ZmChiA, como encontrado para extratos de cultura SG200;
- A expressão de umfly1 também foi aumentada durante a infecção de *U. maydis* em comparação com a cultura axênica, com maior expressão atingindo o pico em 6 dpi, quando também as três quitinases de milho (ZmChiA, -B e -C) apresentam seu maior nível de expressão;
- SG200 Δ umfly1 e SG200 Δ umfly1-Cmut apresentaram formação significativamente reduzida de tumores normais em plântulas de milho em comparação com SG200 em 12 dpi, SG200 Δ umfly1 causou principalmente clorose e formação de pequenos tumores (<2 mm), e a cepa SG200 Δ umfly1-C causou sintomas de doença semelhantes a SG200, confirmando a especificidade do fenótipo causado pela deleção do gene umfly1, esses resultados confirmaram UmFly1 como um fator de virulência de *U. maydis* e mostraram que a atividade enzimática de UmFly1 é necessária para a virulência total do fungo.

Schoina C, et al (2021)	<i>Phytophthora infestans</i> - fungo	M03, M08, M12, M48, M14 e M79	<ul style="list-style-type: none"> • Análise in silico revelou que os <i>Oomicetos</i> têm uma grande diversidade de metaloproteases (MPs), identificando 4.140 MPs em 241 genomas fúngicos sequenciados, com média de 90 MPs por espécie (variação de 50 a 265 MPs por espécie); • A maior família de MPs presente no conjunto de dados é a M13, com 285 membros de 42 espécies, estando presente em todos os 37 <i>Oomicetos</i> e na maioria das espécies codificando até cinco cópias da proteína M13; • Em <i>P. infestans</i>, 91 genes que codificam MPs foram encontrados exclusivamente em <i>Oomicetos</i>, esses genes também foram encontrados em espécies <i>Albugo</i> e <i>Saprolegnia</i>. Metade desses genes MPs apresentou os maiores níveis de expressão transcricional em estágios iniciais ou tardios da infecção de plantas por <i>P. infestans</i>; • A expansão da lesão causada por <i>P. infestans</i> após a inoculação de folhas de <i>Nicotiana benthamiana</i> expressando cDNAs completos de genes MPs foi monitorada, os resultados mostraram que as lesões foram significativamente maiores em nove casos (MPs das famílias M08, M12, M48, M14 e M79), indicando um efeito positivo desses MPs na virulência de <i>P. infestans</i>. Em três casos, foram consistentemente registradas lesões menores (famílias M14 e M03), sugerindo um efeito inibitório.
Whigham E, et al (2015); Carter ME, et al (2018)	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>Hordei</i> - fungo	BEC1019 e Bgh	<ul style="list-style-type: none"> • Homólogos de BEC1019 estão presentes em 96 de 241 genomas fúngicos sequenciados, incluindo patógenos de plantas, patógenos humanos e não patógenos de vida livre, análise revelou variação em várias posições de aminoácidos correlacionadas ao estilo de vida fúngico e várias altamente conservadas; • O tratamento com a construção BSMV:1019 após 12 dias de inoculação em plantas de cevada Mla 9 mostrou crescimento significativamente menor de <i>B. graminis hordei</i> em comparação com o tipo selvagem BSMV:00. A eliminação do gene Bgh reduziu em 50% a infecção em comparação com o tipo selvagem; • A eliminação de Bgh também reduziu o crescimento hifal nas células epidérmicas, indicando um papel essencial de BEC1019 na capacidade de <i>B. graminis hordei</i> colonizar o hospedeiro.
Williams HL, et al (2014)	<i>Phellinus sulphurascens</i> - fungo	Ps	<ul style="list-style-type: none"> • Onze transcritos compostos por cinco grupos de metaloproteases foram identificados em bibliotecas de cDNA construídas após ensaios de infecção de <i>P. sulphurascens</i> em raízes de Douglas-fir; • A metaloprotease JO317766 foi fortemente down regulada durante todo o ensaio de infecção de sete dias, e um segundo conjunto de três metaloproteases quase idênticas (JK317066, JK317067 e JO317767) foi significativamente down regulado na segunda metade do ensaio de infecção;

Zhang Y, et al (2019) *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* - fungos BEC1019, Bgt e Ggt

- A down regulação ao longo do curso do tempo de infecção indica que as metaloproteases carecem de um papel-chave no processo patogênico de *P. sulphurascens*;
- Apesar da down regulação, as metaloproteases de *P. sulphurascens* são reprimidas durante a patogênese. JO317766 (Met0030) foi intensamente reprimida imediatamente, aproximadamente 25 vezes ao longo do curso do tempo, enquanto três metaloproteases altamente homólogas JK317066, JK317067 e JO317767 (Met0115 a-c) foram ligeiramente reprimidas durante a segunda metade do ensaio de infecção.
- As sequências de DNA e proteína de BEC1019 Bgt e Ggt são completamente idênticas às de Bgh BEC1019 (Whigham, et al. 2015), confirmando que são sequências homólogas e codificam metaloproteases;
- Os níveis de transcritos de BEC1019 foram abundantemente induzidos concomitantemente com a formação de haustórios em Bgt e o desenvolvimento de necrose em plantas infectadas por Ggt;
- A superexpressão de BEC1019 aumentou a susceptibilidade do trigo a Bgt e Ggt, enquanto o silenciamento desse gene usando silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro aumentou significativamente a resistência do trigo a Bgt e Ggt, associada à acumulação de peróxido de hidrogênio, morte celular e expressão de genes relacionados à patogênese;
- As sequências completas e parciais de BEC1019 podem induzir a morte celular em folhas de *Nicotiana benthamiana*;
- Bgt e Ggt podem usar BEC1019 como um efetor de virulência para promover a colonização da planta, e esses genes representam novos alvos promissores no melhoramento de cultivares de trigo com resistência de amplo espectro.

C4 Arquivo Suplementar 5: Validações das estruturas tridimensionais preditas para as MCPs de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne hapla*.
<https://docs.google.com/presentation/d/1yKfKEZezN-CjXEZ-zXi4WQr-jGoGbkN6/edit?usp=sharing&oid=110755918564842086019&rtpof=true&sd=true>

APÊNDICE E: Scripts análises bioinformática

Script 1: Modelagem ICP-SMEL – programa AlphaFold.

https://drive.google.com/file/d/1QWCAScGdED_7fa4UWle9ofQViq8d3p0Tx/view?usp=sharing

Script 2: Análise qualidade genomas das solanáceas – programa Busco.

https://drive.google.com/file/d/1A7qNy9gEV7NkQB-ajmGp_xdPQ_GUhvCc/view?usp=drive_link

Script 3: Análise protonação estruturas para MD – programa Python.

<https://drive.google.com/file/d/184PtZMfO9wKoyxO9ZZ5uYWcvNj4Y9pOe/view?usp=sharing>

Script 4: Preparo arquivos para simulação MD – programa Gromacs.

https://drive.google.com/file/d/1g6f0S6m7SJidhZksmnVSbDjGTg_9Cee7/view?usp=drive_link

Script 5: Simulação MD 100ns – programa Gromacs.

https://drive.google.com/file/d/15_GN3dLH80lCoHOLdJowczKcvsdTmXr/view?usp=drive_link

Script 6: Simulação MD 500ns – programa Gromacs.

https://drive.google.com/file/d/109eU_FpeXFJvg86uNiT8T9j2p9WbkbQK/view?usp=sharing

Script 7: Análise resultados MD – programa Gromacs.

<https://drive.google.com/file/d/1qjK37ZYND3Zw1UNenp6gwY7KCEIApHHC/view?usp=sharing>

Script 8: Plot RMSD resultado MD – GnuPlot.

https://drive.google.com/file/d/1UUEQvUI4rCFRNVBEO7SWAyMv_UKYb2wK/view?usp=sharing

Script 9: Plot RMSF resultado MD – GnuPlot.

https://drive.google.com/file/d/13fhYgiO-7leKV-K_ROY1YcnD7xRqkLMF/view?usp=drive_link

Script 10: Clusterização de estruturas MD parte 2 (junção do cluster em uma estrutura) – programa Python.

https://drive.google.com/file/d/15ve1y2xax1MqX_MbUKhnAyz3eL0BKX4u/view?usp=drive_link

Script 11: Clusterização de estruturas MD parte 3 (retirada H e nomeação de cadeias) – programa Python.

https://drive.google.com/file/d/1238r6ARk9nQQdA9iVILHncHNppiJwjQE/view?usp=drive_link

Script 12: Mapeamento interações ao longo da MD parte 1 (resume interações em diferentes réplicas da MD) – programa PLIP.

<https://drive.google.com/file/d/1gSdatYDF5ODyFh7fv2yCyiLPX9xYSsQM/view?usp=sharing>

Script 13: Mapeamento interações ao longo da MD parte 2 (gera interações da cadeia escolhida contra o arquivo pdb) – programa PLIP.

https://drive.google.com/file/d/1E8W_ZgK3Y5oi7lxqdiHRleVrSBsRWOu3/view?usp=sharing

Script 14: Análise qualidade proteoma *Meloidogyne incognita* – programa Busco.

https://drive.google.com/file/d/1rN7AH_CJDVVQSHSCoaFmymeRj3ZAPBBD/view?usp=sharing

Script 15: Protocolo completo da busca de MCPs proteoma de *Meloidogyne incognita* traduzido do seu genoma.

<https://drive.google.com/file/d/12W94klp-w7FtjamSMc36vd0gpce6QEdF/view?usp=sharing>

Script 16: rps-Blast 1.

https://drive.google.com/file/d/1UhfI4JSDvRbK_REoYSJuGyEXHNo5LjwE/view?usp=sharing

Script 17: rps-Blast 2.

https://drive.google.com/file/d/1UGU_yYYqP5PMjGJM5gQ33LkHxc1_A-OM/view?usp=sharing

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo submetido na Revista Frontiers in Molecular Biosciences

Your manuscript submission - 1259026

1 mensagem

Frontiers in Molecular Biosciences <molecularbiosciences.editorial.office@frontiersin.org>
 Responder a: Frontiers in Molecular Biosciences <molecularbiosciences.editorial.office@frontiersin.org>
 Para: Geniana Gomes <geniana.gomes@ufv.br>

14 de julho de 2023 às 19:58

Dear Dr Gomes

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "Carboxypeptidase inhibitors from Solanaceae as a new subclass of pathogenesis related peptide aiming biotechnological targets for plant defense" to be considered for publication in Frontiers in Molecular Biosciences, section Protein Biochemistry for Basic and Applied Sciences.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:
<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

If you have already created a Frontiers account using a different email address, please add this one as a secondary email to your Frontiers profile following this link:
<https://loop.frontiersin.org/settings/email>

For any questions on the above, you can contact support@frontiersin.org

You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you receive access the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript. If the required number of reviewers endorse your manuscript in the Independent Review stage, their tabs will be closed and the manuscript will be forwarded to the Review Finalized stage, where you will be able to interact with the handling editor via the Editor tab.

Best regards,
 Your Frontiers in Molecular Biosciences Team,

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
 Avenue du Tribunal Fédéral 34
 1005 Lausanne Switzerland

For technical issues please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (helpcenter.frontiersin.org)

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: Carboxypeptidase inhibitors from Solanaceae as a new subclass of pathogenesis related peptide aiming biotechnological targets for plant defense
 Manuscript ID: 1259026
 Submitted By: Maria Cristina Baracat-Pereira
 Authors: Geniana da Silva Gomes, Paula Corrêa Esposito and Maria Cristina Baracat-Pereira
 Journal: Frontiers in Molecular Biosciences, section Protein Biochemistry for Basic and Applied Sciences
 Research Topic: Plant Antimicrobial Peptides (PAMPs) as Biotechnological Tools: Volume II
 Article type: Original Research
 Submitted on: 14 Jul 2023

-----ADDITIONAL INFORMATION-----

In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:
https://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=1541&name=protein_biochemistry_for_basic_and_applied_sciences

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article. Please see here for more information: https://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf

If you encounter any technical issue, contact support@frontiersin.org, with IsulEZlkweuSXjk as reference.