

PATRÍCIA DIAS GAMES

**DETECÇÃO E ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS DE FOLHAS DE *Capsicum annum* L.
(pimentão 'Magali R')**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

PATRÍCIA DIAS GAMES

**DETECÇÃO E ISOLAMENTO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS DE FOLHAS DE *Capsicum annum* L.
(pimentão 'Magali R')**

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

APROVADA: 10 de Fevereiro de 2009.

Dr. Maura Vianna Prates

Prof. João Paulo Viana Leite

Prof.^o Reginaldo da Silva Romeiro
(Co-orientador)

Prof.^a Claudine Márcia Carvalho
(Co-orientadora)

Prof.^a Maria Cristina Baracat Pereira
(Orientadora)

“Existem homens que lutam um dia e são bons; existem outros que lutam um ano e são melhores; existem aqueles que lutam muitos anos e são muito bons. Porém, existem os que lutam toda a vida. Estes são os imprescindíveis.” “Bertolt Brechet”

Dedico minha dissertação a meus pais queridos, Selma e José, e à minha irmã Priscilla por todo apoio, incentivo e amor incondicional.

Agradecimentos

A Deus, por ter me iluminado nas horas mais difíceis, e ter me proporcionado saúde e empenho para seguir em frente.

À Universidade Federal de Viçosa, por transformar meus sonhos em realidade.

À minha orientadora Maria Cristina Baracat-Pereira, por toda a dedicação durante o percurso dessa caminhada, por todo o apoio nas horas em que mais precisei, e por toda a descontração nos momentos de seriedade. Muito obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador Professor Reginaldo da Silva Romeiro, por toda a ajuda e disponibilidade sempre, em todos os momentos.

À Maura Vianna Prates/EMBRAPA-CENARGEN, pela excepcional ajuda nos experimentos finais da minha dissertação.

Ao Professor Marcelo Matos Santoro/UFMG e ao Dr Agenor Valadares, pela colaboração nas análises de espectrometria de massa.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) e do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pelo excelente convívio e ajuda.

Ao Eduardo Monteiro, por nunca se esquecer de mim, por torcer sempre pela minha vitória.

Em especial ao meus pais e à minha irmã, que abraçaram esse sonho como se fosse deles. Amo vocês.

Ao Erick, por permanecer junto a mim nessa trajetória, me fazendo ser uma pessoa muito mais feliz.

À minha amiga Hebréia por me incentivar em tudo, por me proporcionar momentos inesquecíveis em Viçosa e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amigos inesquecíveis do Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas, Meire, Paulo, Hebréia, Nayara, Tânus, Marcos, Lanna, Mariana, Ana, Rubens, Fabiano e Thiago, por terem me ajudado bastante tanto, profissionalmente quanto pessoalmente.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela agradável convivência.

Aos meus amigos da turma do mestrado e de Viçosa, Rafael, Rita, Larissa, Izabela, Wendel, Ronny, Edvaldo e Amanda, por tornar todos os momentos agradáveis.

Aos meus amigos de outras cidades, que mesmo com a distância sempre me apoiaram em tudo. Obrigada, Sabrina, Ana Carla, Luiza, Milla, Carolina, Beatriz, Tatiana, Lucilene, Júlia, Ana Carolina, Palloma, Jucimar, Érica e Lidiane.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos da UENF, Mariângela, Suzanna, André, Érica, Luana, Izabela e Valdirene, por fazerem de mim uma profissional de verdade, obrigada pelo início da construção de minha carreira.

A todos os meus familiares e amigos, que de alguma forma contribuíram para esta conquista e à todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desse trabalho.

Biografia

PATRÍCIA DIAS GAMES, filha de José Mezine Games e Maria Selma Dias Games, nasceu no dia 11 de fevereiro de 1985, em Santo Antônio de Pádua, RJ.

Em março de 2003, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ, graduando-se como Bacharel em Ciências Biológicas em dezembro de 2006.

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2009.

Sumário

	Página
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xvi
1- Introdução	1
2- Revisão de Literatura	2
2.1- Peptídeos Antimicrobianos	2
2.2- Mecanismos de defesa em vegetais	6
2.3- Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos	7
2.4- <i>Capsicum annum</i> (Pimentão)	9
3- Material e Métodos	11
3.1- Material vegetal e microrganismos: cultivo e manutenção	11
3.2- Preparo dos extratos	12
3.3- Quantificação de Proteína Total	13
3.4- Redução e Alquilação	13
3.5- Obtenção da fração enriquecida em peptídeo por procedimentos cromatográficos	14
3.6- Ensaio antimicrobianos	15
3.7- Eletroforese desnaturante dos peptídeos na presença de SDS e Tricina	16
3.8- Protocolo de Coloração dos Géis pela Técnica da Prata	16
3.9- Protocolo de Coloração dos Géis por Coomassie G-250	17
3.10- Espectrometria de Massa	17
3.11- Determinação da seqüência de aminoácidos	18
4- Resultados	18
4.1- Fracionamento do extrato por procedimentos cromatográficos	18
4.2- Atividade antibacteriana	21
4.3- Fracionamento do extrato por procedimento de ultrafiltração	23

4.4- Ensaio antibacteriano e antifúngico	24
4.5- Cromatografia de Fase Reversa em coluna C18 e SDS-Tricina-PAGE	27
4.6- Cromatografia de Fase Reversa em coluna C4 , determinação da massa molecular e da seqüência de aminoácidos	31
5- Discussão	35
6- Conclusões	42
7- Referências Bibliográficas	44

Lista de Figuras

	Página
Figura 1- Cromatograma de exclusão molecular de ES1 (A) e EP1 (C) e SDS-Tricina-PAGE das frações de ES1 (B) e de EP1 (D).	20
Figura 2- Cromatograma de interação hidrofóbica do pool P2-ES1 (A) e do pool P2-EP1 (B) obtidos das CEM (Figuras 1A e 1C, respectivamente).	21
Figura 3- Atividade antibacteriana dos picos H1 a H8 de P2-EP1 contra <i>Ralstonia solanacearum</i> (A) e <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (B).	22
Figura 4- SDS-Tricina-PAGE de três fases das frações ES1-10 e EP1-10.	24
Figura 5- Atividade antibacteriana contra <i>Ralstonia solanacearum</i> (A), <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (B) e <i>Erwinia caratovora</i> subsp. <i>caratovora</i> (C e D) das frações ES1-10 ou EP1-10 de folhas de pimentão 'Magali R' depois de procedimentos de ultrafiltração.	26
Figura 6- Atividade antifúngica contra <i>Alternaria solani</i> das frações ES1-10 e EP1-10 obtidas de folhas de pimentão 'Magali R'.	27
Figura 7- Cromatograma de fase reversa em coluna C18-RP-HPLC das frações ES1-10 (A) e EP1-10 (B).	29
Figura 8- Cromatograma de fase reversa em coluna C18-RP-HPLC das frações ES1-10 R/A (A) e EP1-10R/A (B).	30

Figura 9- SDS-Tricina-PAGE de três fases dos picos após a separação por RP-HPLC das frações ES1-10.	31
Figura 10- Cromatograma de fase reversa em coluna C4-RP-HPLC do picos 2 (A), 3 (B), 4 (C), 6 (D), 10 (E) e 13(F) de ES1-10R/A.	32
Figura 11- Cromatograma de fase reversa em coluna C18-RP-HPLC do pico 3.1 reduzido e alquilado novamente com uréia 8M.	33
Figura 12- Prováveis seqüências N-terminal do pico 3.1 de ES1-10 R/A.	33

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1 – Percentagem de inibição do crescimento das bactérias <i>Ralstonia solanacearum</i> e <i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i> , pelas amostras após cromatografia hidrofóbica do P2-EP1	23
Tabela 2- Determinação das Massas Moleculares (MM) por espectrometria de massa (MALDI/TOF) dos picos de ES1-10 após C18-RP-HPLC	34
Tabela 3- Determinação das Massas Moleculares (MM) por espectrometria de massa (MALDI/TOF) dos picos de ES1-10R/A após C18-RP-HPLC	34
Tabela 4- Determinação das Massas Moleculares (MM) por espectrometria de massa (MALDI/TOF) da amostra 3.1 de ES1-10R/A após C18-RP-HPLC	35

Lista de Abreviaturas

- AMPs**- Peptídeos Antimicrobianos
- BCA**- Ácido bicinconínico
- BDA** - Batata-dextrose-ágar
- BSA**- Albumina sérica bovina
- DTT**- Ditioneitol
- CEM**- Cromatografia de exclusão molecular
- CH**- Cromatografia de interação hidrofóbica
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ES1** - Extrato solúvel da primeira extração
- EP1** - Extrato de parede celular da primeira extração
- ES2** - Extrato solúvel da segunda extração
- EP2** - Extrato de parede celular da segunda extração
- ES1-10**- Extrato solúvel contendo moléculas entre 1 e 10 kDa
- EP1-10**- Extrato de parede celular contendo moléculas entre 1 e 10 kDa
- ES1-10R/A**- Extrato solúvel contendo moléculas entre 1 e 10 kDa reduzido e alquilado
- EP1-10R/A**- Extrato de parede celular contendo moléculas entre 1 e 10 kDa reduzido e alquilado
- HCl**- Ácido clorídrico
- LiCl**- Cloreto de lítio
- MALDI-TOF/TOF**- Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser – Tempo de voo
- MDLC**- Cromatografia líquida multidimensional
- NH₄HCO₃**- Bicarbonato de amônio
- PMSF**- Fenilmetilsulfonilfluoreto
- SA**- Sulfato de Amônio
- SDS**- Dodecil sulfato de sódio
- PAGE**- Eletroforese em gel de poliacrilamida
- RP**- Cromatografia de fase reversa
- HPLC**- Cromatografia líquida de alta eficiência
- TDLC**- Cromatografia líquida bidimensional

TFA- Ácido trifluoracético

Tricina-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Tricina

Resumo

GAMES, Patrícia Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Detecção e isolamento de peptídeos antimicrobianos de folhas de *Capsicum annum* L. (pimentão 'Magali R')** Orientadora: Maria Cristina Baracat Pereira. Coorientadores: Claudine Márcia Carvalho, Luciano Gomes Fietto e Reginaldo da Silva Romeiro.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm atraído a atenção de pesquisadores como potenciais compostos de defesa para serem usados no agronegócio. Eles apresentam mecanismos de ação diferentes dos compostos disponíveis comercialmente. O objetivo deste trabalho foi, por técnicas proteômicas, bioprospectar o potencial antimicrobiano de frações enriquecidas em peptídeos de folhas de pimentão (*Capsicum annum* 'Magali R') contra fitopatógenos de importância comercial, objetivando aplicação biotecnológica. Folhas de pimentão foram maceradas com tampão Tris acrescido de inibidores de proteases, o homogenato foi centrifugado, e o sobrenadante foi nomeado extrato solúvel (ES). O precipitado foi ressuscitado em solução de LiCl contendo inibidores de proteases, o homogenato foi centrifugado e o sobrenadante foi denominado extrato de parede celular (EP). Com o objetivo inicial de confirmar a presença de AMPs, os extratos de pimentão foram fracionados com sal (Sulfato de Amônio) e por cromatografias de exclusão molecular (CEM) e hidrofóbica (CH). P2-ES1 e P2-EP1 obtidas após a CEM, deram origem respectivamente a nove (H1 a H9) e oito (H1 a H8) picos promissores à avaliação antimicrobiana quando separados por CH, observando-se que P2-EP1 corresponde a uma fração menos complexa enriquecida em peptídeos. As frações H3 e H4 de P2-EP1 apresentaram alta atividade inibitória para duas bactérias-teste avaliadas, *Ralstonia solanacearum* (Gram-negativa) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gram-positiva). Com o objetivo de simplificar o processo para futuras aplicações comerciais, procedimentos de ultrafiltração (1-10 kDa) substituíram os passos cromatográficos. Além das bactérias mencionadas acima, as frações recuperadas após ultrafiltração (ES1-10 e EP1-10) foram também capazes de inibir o crescimento da bactéria *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* e do fungo *Alternaria*

solani. O crescimento das bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, e dos fungos *Fusarium solani*, *Alternaria brassicicola*, *Pyricularia grisea* e *Rhizoctonia solani* não foi inibido pelo extratos peptídicos. O procedimento de ultrafiltração foi essencial para a recuperação de grande quantidade de amostra parcialmente fracionada enriquecida em peptídeos. A etapa de ultrafiltração corresponde a um procedimento fácil, rápido e de baixo custo. E especialmente permite a recuperação de amostras nativas para ensaios biológicos. Para estudos analíticos das amostras, ES1-10 e EP1-10 foram submetidos à cromatografia de fase reversa em HPLC usando resinas C18 e C4 para purificação dos extratos. Para ES1-10 foram encontrados 13 picos promissores, e para EP1-10, 2 picos após C18-RP-HPLC. Foi verificada a presença de bandas peptídicas após RP-C18-HPLC, principalmente no pico 3 de ES1-10, quando este foi resubmetido à RP-C4-HPLC, originando o pico 3.1, que foi então submetido ao sequenciamento de aminoácidos. Por espectrometria de massa (MALDI/TOF-TOF), foram encontradas massas moleculares inferiores a 10 kDa para diversos picos provenientes da C18-RP-HPLC, e as seqüências aminoacídicas encontradas até então não apresentaram similaridade a peptídeos antimicrobianos relatados na literatura. Estes extratos antimicrobianos podem ser biotecnologicamente explorados para aplicação comercial como compostos de defesa.

Abstract

GAMES, Patrícia Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2009. **Detection and isolation of antimicrobial peptides from leaves of *Capsicum annum* L. (bell pepper 'Magali R')**. Adviser: Maria Cristina Baracat Pereira. Coadvisers: Claudine Márcia Carvalho, Luciano Gomes Fietto and Reginaldo da Silva Romeiro.

Antimicrobial peptides (AMPs) have been considered by researchers as potential defense compounds to be used in agribusiness. They present action mechanisms different from that of the available commercial compounds. The objective of this work was, by using proteomic tools, to bioprospect the antimicrobial potential of peptide-enriched fractions from bell pepper (*Capsicum annum* 'Magali R') leaves against plant pathogens of commercial importance, aiming biotechnological application. Leaves of bell pepper were macerated with Tris buffer added of protease inhibitors, the homogenate was centrifuged, and the supernatant was named soluble extract (SE). The precipitate was resuspended in LiCl solution containing protease inhibitors, centrifuged and the supernatant was named cell wall extract (CWE). With the initial aim of assessing the presence of AMPs, the extracts of bell pepper were fractionated with salt, and by molecular exclusion (MEC) and hydrophobic (HC) chromatographies. P2-ES1 and P2-EP1 were obtained after MEC and produced respectively nine (H1-H9) and eight (H1-H8) promising antimicrobial peaks from HC. It could be observed that P2-EP1 is a less-complex peptide-enriched fraction. H3 and H4 fractions obtained from CWE1-P2 presented high inhibitory activity of two test-bacteria evaluated, *Ralstonia solanacearum* (Gram-negative) and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Gram-positive). With the aim also to simplify the process for further commercial application, ultra-filtration procedures (1-10 kDa) replaced the chromatographic steps. Besides the above mentioned bacteria, the recovered fractions after ultra-filtration (SE1-10 and CWE1-10) were also able to inhibit the bacterium *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and the fungus *Alternaria solani*. The growth of the bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, and of the fungi *Fusarium solani*, *Alternaria brassicicola*,

Pyricularia grisea and *Rhizoctonia solani* was not inhibited by the peptide extracts. The ultra-filtration procedure was essential for recovering great amounts of partially purified samples, that were enriched in peptides. The step of ultra-filtration corresponds to a easy, fast, and low cost procedure, and allows especially the recovering of native samples for biological assays. For analytical studies of these samples, SE1-10 and CWE1-10 were submitted to reversed-phase chromatographies on C18 and C4-column. When a C18-RP-HPLC column was used, 13 promising peaks were recovered from ES1-10, and 2 peaks from EP1-10. Peptide bands was detected mainly in the peak 3 from ES1-10. This peak was resubmitted to a RP-HPLC in a C4 column, the produced peak 3.1 was recovered and analyzed for the amino acid sequence. By mass spectrometry (MALDI / TOF-TOF), we found molecular weights smaller than 10 kDa to several peaks from the C18-RP-HPLC, and the amino acid sequences found so far showed no similarity to antimicrobial peptides reported in the literature. These antimicrobial extracts can be biotechnologically exploited for commercial application as defense compounds.

1- Introdução

As doenças em plantas são consideradas um problema econômico em culturas no campo e durante o armazenamento de alimentos, em função dos danos que causam. O surgimento crescente de patógenos resistentes a antibióticos tem aumentado a busca de compostos antimicrobianos com um modo de ação não elucidado. Uma potencial fonte de novos compostos de defesa são os peptídeos antimicrobianos (AMPs), que têm recebido especial atenção pois promovem a morte dos microrganismos facilmente por meio do rompimento físico de suas membranas celulares e em geral têm baixa toxicidade contra células de mamíferos (Monroc *et al* 2006).

Os AMPs possuem cadeias polipeptídicas curtas, geralmente menores que 10 kDa e uma grande variedade de organismos produzem esses peptídeos como parte de sua primeira linha de defesa. Eles vêm sendo isolados de microrganismos, insetos, plantas, anfíbios, peixes, mamíferos, entre outros (Montesinos 2007).

Embora seu preciso modo de ação não seja plenamente entendido, tem sido proposto que sua carga positiva permite interações com os fosfolípidios de membrana carregados negativamente, enquanto que sua habilidade para assumir estruturas anfipáticas favorece a inserção nas membranas microbianas. A permeabilização da membrana ocorre tanto por rompimento tipo-detergente da membrana celular bacteriana ou por formação transiente de canais ou poros. O desenvolvimento de resistência a estes peptídeos antimicrobianos é pouco provável já que exigiria alteração significativa da composição de lipídios das membranas microbianas, o que não pode ocorrer facilmente (Monroc *et al* 2006).

A vasta quantidade de peptídeos e proteínas produzidos por plantas com potencial efeito inibitório no crescimento e desenvolvimento de outros organismos mostrou ser uma fonte com um alto potencial para estudos envolvendo melhorias de diferentes variedades de plantas. Estudos devem ser desenvolvidos com o objetivo de avaliar a participação real de peptídeos de diferentes classes no controle de pragas e patógenos. Há evidências de

que o mecanismo de defesa em plantas envolve a ação integrada de várias moléculas, com ação sistêmica e local.

Algumas variedades de solanáceas são poucos susceptíveis à infecção microbiana, com destaque para pimenta (*Capsicum annum* L.), pimentão (*Capsicum annum* L.) e berinjela (*Solanum melongena* L.) e peptídeos antimicrobianos podem estar envolvidos nessa capacidade de defesa (Almeida *et al* 2007). Os peptídeos antimicrobianos isolados de pimentão podem ser utilizados como princípios ativos para o desenvolvimento de agentes de defesa para diferentes variedades vegetais.

Ainda, como os pimentões estão entre as hortaliças mais consumidas no Brasil e também por sua importância nas exportações, os peptídeos antimicrobianos como forma de defesa correspondem a bons candidatos para o desenvolvimento de defensivos agrícolas naturais, já que existem inúmeras perdas das culturas em função das doenças originadas de fungos, bactérias, nematóides e vírus (Ribeiro e Cruz 2002). Assim, é objetivo identificar peptídeos extraídos de folhas de pimentão que apresentem expressiva ação antimicrobiana e amplo espectro de ação, para caracterizações bioquímica, estrutural, microbiológica e toxicológica, para estudos posteriores dos mecanismos de ação desses agentes de defesa, para a produção comercial de defensivos para a agroindústria, utilização como agentes terapêuticos nas indústrias veterinária, de cosméticos, entre outras.

2- Revisão de Literatura

2.1- Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são importantes componentes da defesa natural da maioria dos organismos vivos contra a invasão de patógenos, sendo constitutivamente expressos ou induzidos por infecção. AMPs compõem o sistema de defesa, que tem sido conservado durante a evolução. Eles formam uma linha chave da defesa contra patógenos em

plantas e animais. São relativamente pequenos, apresentam massas moleculares inferior a 10 kDa e possuem comprimento, seqüência e estrutura variável (Yannick *et al* 2009). São amplamente distribuídos em animais, plantas, fungos e bactérias (Zhang 2008). Estes peptídeos são obtidos de diferentes fontes, como macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, parede celular de plantas, entre outras (Minardi *et al* 2007).

Dez grupos de peptídeos de defesa foram identificados em plantas (García-Olmedo *et al* 1998; 2001), tioninas, defensinas, proteínas transportadoras de lipídios, peptídeos tipo heveína, peptídeos tipo knotina, MBP1, IbAMP, snakinas, sheferdinas e peptídeos macrocíclicos (Broekaert *et al* 1997). Muitos são caracterizados como catiônicos, ricos em cisteína, órgão-específicos e contêm até 50 % de resíduos hidrofóbicos. Essas características podem facilitar a interação com membranas celulares (Hancock *et al* 1998; 2002).

As Tioninas correspondem ao primeiro grupo de peptídeos identificados com atividade antimicrobiana (Fernandez de Caleyá *et al* 1972). Estes peptídeos são altamente básicos, ricos em cisteína, contendo 45 a 47 resíduos de aminoácidos. Elas podem ser encontradas em vários órgãos de plantas após ataque por patógenos. São tóxicas para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, leveduras ou diferentes tipos de células de mamíferos (Thevissen *et al* 1996).

As proteínas transportadoras de lipídios não específicas (nsLTPs) correspondem a uma família de peptídeos de cerca 7 a 9 kDa, contendo de 70 a 95 resíduos de aminoácidos, são encontradas em diversos tecidos de muitas espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas e estão envolvidas em mecanismos de defesa de plantas contra patógenos (Terras *et al* 1992; Carvalho *et al* 2001; Diz *et al* 2006; Lin *et al* 2007).

Peptídeos tipo heveína possuem 43 resíduos de aminoácidos e são ricos em cisteína/glicina (Broekaert *et al* 1992). Os AMPs com padrão de enovelamento *Knotin-like*, denominadas knotinas, possuem de 36 a 37 resíduos de aminoácidos e três ligações dissulfeto (Broekaert *et al* 1990).

Ambas as famílias de peptídeos inibem o crescimento de uma ampla gama de fungos e de bactérias Gram-positivas *in vitro*, e suas atividades são revertidas por cátions bivalentes (Cammue *et al* 1992). Duas outras famílias de AMPs contendo quatro ligações dissulfeto foram relatadas: MBP-1, com 33 resíduos de aminoácidos e extraído do milho, e o grupo de peptídeos de 20 resíduos de aminoácidos, Ib-AMPs, isolados de sementes de *Impatiens balsamina*, popularmente conhecida como beijo-de-frade, bálsamo-de-jardim, não-me-toques (Tailor *et al* 1997). Snakinas (St-SN1), extraído de batatas, representam outra família de AMPs com 63 resíduos de aminoácidos e seis ligações dissulfeto, são ativos contra fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Segura *et al* 1999). A família das Sheferdinas é composta por peptídeos lineares ricos em glicina/histidina, isoladas de raízes de *Capsella bursa-pastoris* (conhecida como bolsa-de-pastor, bucho-de-boi, chapéu-de-frade, panacéia), possuem de 28 a 38 resíduos de aminoácidos e são ativas contra bactérias e fungos (Park *et al* 2000). Os peptídeos macrocíclicos, outra família de AMPs, foram purificados de diferentes plantas das famílias Rubiaceae (como membros dessa família podemos citar o café, a gardênia, o mata-pasto etc) e Violaceae (como membro mais conhecido dessa família podemos citar a violeta), possuem de 28 a 37 resíduos de aminoácidos, três ligações dissulfeto e são ativos contra bactérias Gram-positivas e moderada ação contra fungos (Tam *et al* 1999; Craik *et al* 2006; Mulvenna *et al* 2006).

As defensinas de plantas são outra família de AMPs e representam a família melhor caracterizada. São peptídeos ricos em cisteína, com carga líquida positiva e massa molecular em torno de 5 kDa, apresentam propriedades estruturais e funcionais semelhantes às das defensinas de insetos e de mamíferos e um amplo espectro de ação contra fungos e/ou bactérias. São classificadas em quatro grupos de acordo com sua atividade antimicrobiana, atuam numa faixa de concentração micromolar e possuem em geral, baixa toxicidade para células de animais e de plantas (García-Olmedo *et al* 1998).

Esses peptídeos exibem amplo espectro de atividade contra uma larga escala de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, protozoários, leveduras, fungos e vírus (Reddy 2004), eles causam a morte dos microrganismos rapidamente, restringindo a indução de resistência microbiana. Conseqüentemente, peptídeos antimicrobianos emergem como candidatos em potencial para o desenvolvimento de futuros compostos terapêuticos (Wang *et al* 2009). Interessantemente, alguns peptídeos de plantas exibem não somente atividade antimicrobiana contra patógenos de plantas, mas também contra patógenos humanos (Thevissen *et al* 2007).

Além da função antimicrobiana dos peptídeos, a eles têm sido atribuída uma função de moduladores do sistema imunológico atuando, por exemplo, no aumento da fagocitose e mostrando uma atividade quimiostática. Claramente, as reais funções fisiológicas destes peptídeos ainda estão por ser determinadas em muitos casos (Battison *et al* 2008).

A evidência do princípio para o uso de peptídeos antimicrobianos como agentes terapêuticos já foi estabelecida. Dois peptídeos catiônicos derivados de bactérias, a gramicidina S e a polimixina B, já são encontrados em medicamentos de uso tópico em creme e em soluções. Os peptídeos catiônicos tiveram uma história variada na clínica e somente cinco testes clínicos de tratamento tópico estão adiantados. Estes incluem um teste fase III para terapia, por uma molécula protegrina-like, IB-367, de mucosite oral, uma dolorosa ulceratite de infecção polimicrobiana mais comumente associada com radioterapia ou quimioterapia para o câncer. Eles oferecem uma enorme ação variando de antimicrobiano a imunomodulador. Os AMPs estão prosseguindo para a clínica como agentes antibióticos tópicos. Entretanto, a elucidação de sua importância biológica na imunidade inata e a realização de seu pleno potencial clínico exigirá ainda grandes esforços (Hancock 2001).

2.2- Mecanismos de defesa em vegetais

Muitos microrganismos são capazes de causar doenças em plantas e são responsáveis por danos importantes nas culturas ao redor do mundo. Entretanto, uma proporção relativamente pequena desses patógenos invade as plantas hospedeiras com sucesso e causa doenças. Não como os animais, que podem mover-se de um lugar para o outro para encontrar o melhor para sua sobrevivência, as plantas devem viver nas circunstâncias locais ditadas pelo ambiente. As superfícies dos órgãos das plantas, tanto acima e como abaixo do solo, são constante e permanentemente expostas a um número diverso de organismos, incluindo patógenos microbianos, nematóides e insetos. As plantas não possuem células circulantes, portanto, o reconhecimento do patógeno deve ser uma capacidade de cada célula do organismo, podendo ser passado de uma célula a outra. Plantas possuem uma variedade de mecanismos de defesa, que incluem defesas pré-formadas, tais como ceras, componentes da parede celular e metabólitos secundários. Durante a detecção de patógenos, as plantas ativam um número de defesas como resposta hipersensível, (aumentando a expressão de genes relacionados com defesa, produção de compostos antimicrobianos, formação de lignina e uma “explosão oxidativa”) (Feys e Parker 2000). Assim, a resistência é entendida como uma combinação de barreiras físicas e químicas que são tanto pré-formadas ou induzidas após a infecção. De forma diferente, doenças resultam tanto por fracasso no evento de reconhecimento ou na capacidade do patógeno em evitar ou superar a resposta de resistência (Gómez-Gómez 2004).

O elaborado sistema de defesa e adaptação das plantas pode então atuar de três formas. A primeira, a resistência constitutiva, ocorre mesmo sem a ação de agentes agressores: recebida por herança dos ancestrais, ela torna as plantas imunes (ou não-hospedeiras) à maioria dos patógenos. As outras formas são a resistência localizada, ativada no ponto onde ocorre a agressão, e a resistência sistêmica, que protege a planta contra ataques subseqüentes (Margis-Pinheiro 1999).

A resistência local pode ser reconhecida pela chamada reação de hipersensibilidade (*hypersensitive reaction*, ou HR), com a morte de células situadas nos locais por onde o agressor entra no vegetal. Com isso, a planta impede o acesso do patógeno a células vizinhas, limitando a infecção. Embora essa reação tenha sido identificada há quase 100 anos, não está claro se sua característica primária (morte celular) tem alguma função direta na resistência ou é consequência de mecanismos de sinalização que de fato levariam aos eventos capazes de inibir a ação do patógeno (Margis-Pinheiro 1999).

Comuns a todas as plantas e a diferentes patógenos, os aspectos fisiológicos da HR incluem o aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, a perda de íons potássio (K^+) e ganho de íons hidrogênio (H^+) pelas células, a destruição de compartimentos e o espessamento das paredes celulares e da cutícula, além da síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à defesa (conhecidas como proteínas PR, de *pathogenesis related*).

Já a resistência sistêmica adquirida, conhecida como SAR (de *systemic acquired resistance*), protege a planta, junto com a resistência local, contra novos ataques de um mesmo patógeno. Induzida por diferentes agentes, após uma primeira infecção, a SAR torna a planta resistente, por várias semanas, a infecções posteriores. A proteção é eficaz contra um grupo de patógenos, mas não todos, e varia de acordo com a espécie vegetal (Margis-Pinheiro 1999).

Os AMPs dentro dos mecanismos de defesa em vegetais participam como parte da barreira constitutiva, e também como resposta induzida por infecção, e podem interagir um com o outro de forma aditiva ou antagônica (Garcia-Olmedo *et al* 1998; 2001).

2.3- Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos formam estruturas anfipáticas catiônicas, tipicamente α -hélices e folhas β , que podem interagir com membranas

microbianas por meio de interações eletrostáticas. A rápida permeabilização da membrana induzida pelo peptídeo pode favorecer os mecanismos de ação antimicrobiana.

Podemos citar quatro características que são requeridas pelos peptídeos antimicrobianos para atuarem como o primeiro passo de defesa contra a invasão de microrganismos patogênicos: (1) toxicidade seletiva: os peptídeos devem discriminar entre o hospedeiro e as células microbianas; (2) rápida morte: o tempo necessário para a morte bacteriana deve ser muito menor do que tempo de duplicação da bactéria alvo, que no caso da *Escherichia coli* é de 20 min; (3) amplo espectro antimicrobiano: desejavelmente um único tipo de peptídeo é efetivo contra muitas espécies de microrganismos; (4) nenhum desenvolvimento de resistência: o peptídeo deve ter um mecanismo de ação de tal forma que a bactéria não possa desenvolver facilmente resistência contra ele (Matsuzaki 1999).

Uma variedade de técnicas tem sido usada para avaliar os mecanismos de atividade dos peptídeos antimicrobianos. Entretanto cada método fornece uma visão diferente da atividade do peptídeo e nenhuma técnica sozinha é capaz de determinar adequadamente o mecanismo de ação dos peptídeos. Como exemplo de técnicas utilizadas para o estudo dos mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos destacam-se: (Brogden 2005).

- Microscopia: análises microscópicas têm mostrado que diferentes peptídeos antimicrobianos têm diferentes efeitos nas células microbianas, o que indica que diferentes peptídeos têm diferentes sítios-alvo ou mecanismos de atividade (Brogden 2005).

- Estudos com membranas-modelo: a avaliação da interação de peptídeos antimicrobianos com fosfolipídios em membranas-modelo fornece informações sobre mecanismos de atividade mais relevantes do que o uso de microscopia eletrônica para determinar o tipo de dano celular induzido por peptídeos. Puros ou em mistura, os lipídios são preparados como membranas ou vesículas, e incubados com peptídeos antimicrobianos. A

atração, a inserção e a orientação do peptídeo, assim como a orientação dos lipídios e a espessura e a integridade da bicamada lipídica podem ser medidas por cristalografia de raio-X, espectroscopia de RMN (ambos peptídeos em solução e na presença de bicamadas lipídicas sólidas), entre outros. A relevância desses métodos para a atividade dos peptídeos contra microrganismos varia com a técnica. Estes métodos utilizados mostram que há definida composição do peptídeo e atividades relacionadas que podem ser relevantes no design e na síntese de futuros compostos antimicrobianos farmacêuticos (Brogden 2005).

- Formação de canal iônico: monitoramento de canais dependentes de voltagem na bicamada da membrana é outra técnica útil para avaliar a formação e a estabilidade de um poro induzido por peptídeo antimicrobiano. A habilidade dos peptídeos em se ancorar e penetrar na bicamada é medida por condutividade de uma corrente elétrica gerada através do poro subsequentemente formado. Além dessas existem outras técnicas. (Brogden 2005).

-Microcalorimetria: geralmente é utilizada em ensaios com membranas plasmáticas miméticas. A calorimetria diferencial de varredura é utilizada para investigar a influência do peptídeo sobre propriedades de fase de transição de sistemas de membranas miméticas, a partir do qual a natureza das interações lipídio-peptídeo pode ser avaliada (Lohner *et al* 1997).

2.4- *Capsicum annum* (Pimentão)

Capsicum é um gênero de plantas pertencentes à família das solanáceas (Solanaceae). Algumas plantas desse gênero são usadas como temperos, alimentos ou plantas medicinais. O fruto das plantas de *Capsicum* pode ter uma variedade de nomes, dependendo do lugar e do tipo, comumente chamado de pimenta e pimentão. Uma das diferenças entre as pimentas e os pimentões é que a pimenta possui uma substância chamada capsaicina (metil-vanilil-nonenamida), um composto químico lipofílico que pode ocasionar uma forte sensação de ardência na boca, enquanto os

pimentões contêm um gene recessivo que elimina a capsaicina do fruto (Faustino, *et al* 2007).

O pimentão é uma importante cultura comercial em todo o mundo, sendo uma das dez hortaliças mais importantes economicamente no Brasil (Viana *et al* 2007). O cultivo de pimentões é uma atividade significativa para o setor agrícola brasileiro. Anualmente, cerca de 12.000 ha são cultivados com esta hortaliça, com uma produção de aproximadamente 280.000 toneladas de frutos. A produção de pimentão existe em todos os Estados da Federação, mas concentra-se nos estados de São Paulo e Minas Gerais que plantam, em conjunto, cerca de 5.000 ha, alcançando uma produção de 120 mil toneladas. Somente o mercado nacional de sementes de pimentão movimenta US\$ 1,5 milhão (Ribeiro e Cruz 2002).

Existem algumas variedades de pimentão que são pouco susceptíveis a doenças, isso torna uma boa característica para a busca de peptídeos antimicrobianos atuando como forma de defesa.

À semelhança dos outros vegetais, as plantas de pimentão possuem vários mecanismos de defesa contra patógenos, entre eles a ativação e a síntese de peptídeos e proteínas de defesa (Lamb *et al* 1989; Dixon e Harrison 1990).

Assim o objetivo maior desse trabalho foi extrair, purificar e avaliar a potencialidade de peptídeos presentes em folhas maduras de pimentão da variedade comercial 'Magali R'. A variedade de pimentão 'Magali R' foi usada como fonte protéica por ser uma variedade comercial com atrativas características agrônômicas, como fácil cultivo, baixa susceptibilidade a doenças de plantas, e resistência ao vírus Y da batata (PVY), já que doenças virais constituem um importante obstáculo para a produção de pimentão no mundo (Rodríguez *et al* 2007).

3- Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa, essencialmente no Laboratório de Proteômica do Instituto de

Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, com a colaboração do Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico de Plantas do Departamento de Fitopatologia da UFV, e do Centro Nacional de Recursos Genéticos – CENARGEN da EMBRAPA/Brasília-DF. O cultivo das plantas foi na casa-de-vegetação do BIOAGRO. Os reagentes utilizados foram de alta pureza, e os solventes cromatográficos foram de grau espectrofotométrico.

3.1- Material vegetal e microrganismos: cultivo e manutenção

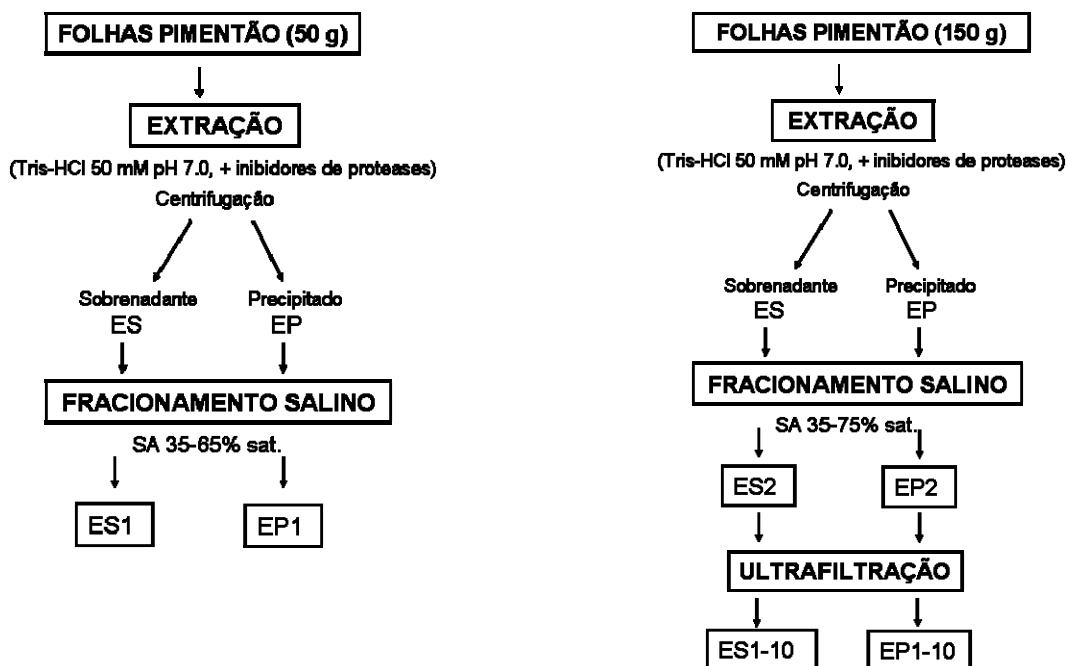
Plantas de pimentão (*Capsicum annum* 'Magali R'), obtidas da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER-MG), foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Deonir Luiz Dullpai e cultivadas em casa-de-vegetação sob condições controladas. Folhas (60 dias) foram coletadas, adicionadas de nitrogênio líquido e estocadas a -80°C para posterior utilização como fonte de peptídeos. A bactéria Gram-positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e as Gram-negativas *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, e os fungos *Fusarium solani* (Ordem: Hypocreales), *Alternaria brassicicola* (Ordem: Pleosporales), *Pyricularia grisea* (Ordem: Sordariomycetes), *Rhizoctonia solani* (Ordem: Polyporales), e *Alternaria solani* (Ordem: Pleosporales), foram fornecidos pelo Professor Reginaldo da Silva Romeiro do Departamento de Fitopatologia da UFV, e utilizados como patógenos de plantas nos ensaios antimicrobianos “*in vitro*”. Os microrganismos foram estocados em 30% (v/v) de glicerol e congelados a -80°C. As bactérias foram retiradas da cultura-estoque e crescidas em meio nutriente LB a 28°C e os fungos foram crescidos em BDA (batata-dextrose-ágar) a 25°C de acordo com Teixeira *et al* (2006) e Almeida *et al* (2007).

3.2- Preparo dos extratos

A obtenção de extratos protéicos brutos foi de acordo com Teixeira *et al* (2006). Duas extrações foram realizadas. Para a primeira extração, 50 g

de folhas congeladas foram maceradas em almofariz e pistilo na presença de nitrogênio líquido e extraídas (1:4) com Tris-HCl 50 mM pH 7.0, EDTA 10 mM, PMSF 1mM, benzamidina 1mM e tiouréia 2mM. Após centrifugação a 20.300 g por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi denominado Extrato Solúvel (ES1). O precipitado obtido foi lavado com 200 mL de água, sob centrifugação, por duas vezes. Os dois sobrenadantes aquosos obtidos foram descartados e o precipitado foi extraído (1:2,5) com LiCl 1,5 M, EDTA 10mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM e tiouréia 2 mM, por 2 h a 4°C, sob agitação. O homogenato foi centrifugado nas mesmas condições e o sobrenadante resultante foi recuperado como Extrato de Parede Celular (EP1). ES1 e EP1 foram fracionados com sulfato de amônio 35-65% de saturação por 2 h a 4°C sob agitação contínua e centrifugados como previamente descrito. ES1 e EP1 foram fracionados por procedimentos cromatográficos.

Por meio de uma nova extração, à semelhança ES2 e EP2 foram obtidos a partir de 150 g de folhas congeladas, que foram maceradas e o homogenato foi precipitado com sulfato de amônio 35-75% de saturação. ES2 e EP2 recuperados foram fracionados por ultrafiltração (AMICON /Millipore – EUA), usando duas membranas com poros de volumes de exclusão diferentes (10 kDa, seguida de 1kDa, AMICON/Millipore – EUA), produzindo ES1-10 e EP1-10, que foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana.



3.3- Quantificação de Proteína Total

A proteína total de ES1-10 e EP1-10 (alíquota) foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) (Smith *et al* 1985), ajustado para microensaio em placas de 96 poços, a 560 nm. Albumina sérica bovina (BSA) foi usada como padrão protéico na região de 5 e 100 µg. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4- Redução e Alquilação

Algumas frações de ES1-10 e EP1-10 foram submetidos aos processos de redução e alquilação e denominados ES1-10R/A e EP1-10R/A para posterior sequenciamento automático de aminoácidos. A redução e a alquilação das frações peptídicas ocorreu pela adição de 20 µL de NH_4HCO_3 0,4 M, seguida da adição de 5 µL de ditioneitol (DTT) 45 mM e da incubação a 50°C. Após 50 min, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e adicionada de 5 µL de iodoacetamida 100 mM, foi incubada à temperatura ambiente, protegido da luz por 15 min.

3.5- Obtenção da fração enriquecida em peptídeo por procedimentos cromatográficos

ES1 e EP1 foram individualmente submetidos à cromatografia de exclusão molecular (CEM) em coluna Sephadex G-50 (Amersham/GE-EUA, 2,0 cm diâmetro, 200mL, h= 150 cm), equilibrada e eluída em Tris-HCl 5mM, pH 7,0. Amostras, correspondendo a 5 mL de ES1 ou 7,5 mL de EP1, foram separadas a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e o eluato foi coletado em frações de 1 mL. A presença de peptídeos foi monitorada a 214 e 280 nm em espectrofotômetro. As frações eluídas correspondente a picos foram reunidas e analisadas por SDS-Tricina-PAGE.

O pool 2 que foi recuperado da separação de ES1 (P2-ES1) e o pool 2 de EP1 (P2-EP1) foram usados como amostras para o próximo passo cromatográfico. A cromatografia de interação hidrofóbica (CH) das frações P2-ES1 e P2-EP1 foi desenvolvida em coluna Phenyl Sepharose (Amersham/GE-EUA, 2,0cm diâmetro, 150 mL, h = 50 cm), equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,0. A eluição de proteínas foi em gradiente salino decrescente formado por passos de 20, 15, 10, 5 e 0% de sulfato de amônio, a um fluxo de 1,5 mL min⁻¹. Nove picos para P2-ES1 e oito picos para P2-EP1 foram recuperados e nomeados H1 a H9 para ES1 e H1 a H8 para EP1, que foram dialisados por duas vezes (em membrana de volume de exclusão de 1.000 Da, SIGMA-EUA) contra Tris-HCl 5mM, pH 7,0, para posterior uso em atividades antimicrobianas.

ES1-10 e EP1-10 e ES1-10R/A e EP1-10R/A foram submetidos a cromatografias de fase reversa em resina C₁₈ (C₁₈-RP-HPLC) (coluna analítica *Shim-pack* CLC-ODS, Shimadzu-Japão) em equipamento HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) marca Waters-EUA. A coluna foi equilibrada com solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (solução A) e a eluição foi realizada em gradiente crescente com uma solução de TFA 0,1% / acetonitrila 80% (solução B), sob fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. O volume de amostra injetado foi de 200 µL e os peptídeos eluídos foram acompanhados pela A₂₁₄ e A₂₈₀. Alguns picos dos perfis cromatográficos obtidos foram submetidos a

análises por espectrometria de massa e submetidos a cromatografia de fase reversa em C₄ (C₄-RP-HPLC) (coluna analítica YMC-pack, YMC-Japão) em HPLC marca Waters - EUA. A coluna foi equilibrada e eluída à semelhança da C₁₈, conforme acima descrito.

3.6- Ensaios antimicrobianos

A atividade inibitória de frações enriquecidas em peptídeos foi avaliada contra as bactérias anteriormente mencionadas pelo Teste em Microplacas (Teixeira *et al* 2006). Para os picos H1 a H8 do P2-EP1 foram testadas as bactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Ralstonia solanacearum*, e para as demais amostras foram testadas todas as bactérias citadas acima. As bactérias da suspensão celular em análise ($A_{560}=1,0$) foram cultivadas em meio de cultura LB líquido a 28°C e 10 µL foram transferidos para placas de poliestireno descartáveis (placa de 96 poços, de fundo plano, estéreis e tampadas) contendo 50 µL de meio líquido LB (2x) e 40 µL das frações peptídicas. As placas foram incubadas a 28°C e o crescimento bacteriano foi monitorado pela A_{560} . O meio de cultura estéril e a cultura líquida bacteriana foram usados como controle do meio e controle da cultura, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicatas. Para a representação gráfica, valores de A_{560} iniciais foram padronizados em zero para todos os ensaios. Para a atividade antifúngica, os ensaios foram realizados em placas de Petri contendo BDA. Uma suspensão micelial foi distribuída sobre o meio de cultura na placa e uma alíquota de 50 µL de cada fração peptídica (ES1-10 ou EP1-10) ou de água ou de Tris-HCl 25 mM pH7,0 (controles da cultura) foram adicionados em cada poço (Romeiro 2007). As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias. Para a avaliação da atividade antifúngica, a presença de halos de inibição foi observada ao redor dos poços. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.7- Eletroforese desnaturante dos peptídeos na presença de SDS e Tricina

Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante na presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE) (Judd 1994), foi utilizada para avaliar o nível de purificação das frações obtidas depois da CEM, a composição das frações ES1-10 e EP1-10 obtidas após ultrafiltração e o nível de purificação de ES1-10 obtido após RP. As amostras contendo peptídeos foram fervidas por 10 min em tampão de amostra (SDS 1%, glicerol 5% (v/v), Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol 0,05%). As amostras foram separadas em gel de três fases, que consiste de um gel de separação (16,5% T e 3,0% C), um gel intermediário (9,9% T e 3,0% C) e um gel de concentração (5,12% T e 2,6% C). Os tampões dos géis foram Tris-HCl 1M, pH 8,9 para os géis de separação e intermediário, e Tris-HCl 0,123 M, pH 6,8 para o gel de concentração. O tampão de corrida do catodo foi composto de Tris 0,1M, Tricina 0,1M e SDS 0,1%, pH 8,25, o e tampão do anodo consistiu de Tris 0,2M, pH 8,9. A eletroforese foi realizada a 100V (30min), 80V (20 min) e 60 V (150min). Marcadores de massa de ampla faixa molecular Broad-Range (Biorad) (6,5 kDa - Aprotinina; 14,4 kDa - Lisozima; 21,0 kDa - Inibidor de tripsina; 31,0 kDa - Tioredoxina redutase, 45,0 kDa - MBP2; 66,2 kDa - Soroalbumina; 116,2 – β -Galactosidade e baixa faixa molecular Ultra-Low-Range (SIGMA) (6,5 kDa - Aprotinina; 14,2 kDa - α -Lactoalbumina; 17,0 kDa - Mioglobina; 26,6 kDa - Triofosfato isomerase) foram usados e as bandas peptídicas foram coradas pela técnica de nitrato de prata (Heukeshoven e Dernick 1985) ou pela técnica de coomassie coloidal G-250 (Neuhoff 1988).

3.8 - Protocolo de Coloração dos Géis pela Técnica da Prata

Os géis foram submetidos a diversas etapas de fixação, sensibilização, reação com nitrato de prata, desenvolvimento e parada de reação. Foram utilizados 50,0 mL de cada uma das soluções empregadas. Esse volume é suficiente para a coloração de apenas um mini-gel de 0,75 mm de espessura, de dimensões comportadas pela cuba *Mini-Protean III* da

BIORAD (7x10x0,1 cm). Além disso, manteve-se o gel sob agitação branda, quando imerso em alguma solução ou água, em todas as etapas do protocolo (baseado no trabalho de Heukeshoven & Dernick 1985).

De todas as soluções, somente a fixadora e a de parada da reação podem ser preparadas com antecedência. Todas as demais devem ser preparadas durante a realização do protocolo.

3.9- Protocolo de Coloração dos Géis por Coomassie G-250

Foram utilizados 100 mL de cada uma das soluções empregadas nas etapas do protocolo descrito a seguir. Além disso, deve-se manter o gel sob agitação branda, quando imerso em alguma solução em todas as etapas do protocolo.

Fixador I: Manter o gel em solução fixadora [ácido ortofosfórico 2% (v/v) e metanol 30% (v/v)] por 30 min. Repetir esse processo por três vezes.

Fixador II: Substituir a solução fixadora I pela fixadora II [ácido ortofosfórico 2% (v/v)], deixando o gel imerso por 20 min. Repetir esse processo por duas vezes.

Fixador III: Descartar a solução II e adicionar a solução III [ácido ortofosfórico 2% (v/v), metanol 30% (v/v), sulfato de amônio 15%(p/v)], manter nesta solução por 30 min e depois adicionar 1 mL da solução 2% de Coomassie G-250.

Manter os géis na solução III com o Coomassie G-250 por cinco dias ou até o aparecimento das bandas.

3.10- Espectrometria de Massa

Os experimentos para a identificação por espectrometria de massa foram realizados no Núcleo de Biomoléculas do ICB/UFMG, com a orientação do Prof. Marcelo Matos Santoro, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da UFMG. As análises por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF foram realizadas em um espectrômetro de massa Autoflex

III Smartbean (Bruker Daltonics®) com o auxílio técnico e operacional do Dr. Agenor Valadares.

Alíquotas das amostras selecionadas para a análise foram liofilizadas em microtubos individualizados. Foram misturados 1 µL da amostra contida no microtubo com 1 µL de matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (5 µg.mL⁻¹ em 50% de acetonitrila e TFA 0,1%) no poço da placa de aço MTP Anchor Chip TM 600/384 TF (Bruker Daltonics®) do espectrômetro de massa. Para que os espectros obtidos possam ter a maior precisão e confiabilidade, foi realizada a calibração externa com o padrão “Peptide calibration standard II ” (Bruker Daltonics®) que foi alíquotado com a mesma matriz em um outro poço da placa de aço. Esse padrão é composto pelas proteínas bradicinina (757 Da), angiotensina II (1046 Da), angiotensina I (1296 Da), substância P (1347 Da), bombesina (1619 Da), ACTH clip 1-17 (2093 Da), ACTH clip 18-39 (2465 Da) e somatostatina (3147 Da). Os espectros foram editados manualmente usando o programa FlexAnalysis.

3.11- Determinação da seqüência de aminoácidos

Foi empregada a metodologia introduzida e desenvolvida por Edman (1950). As frações polipeptídicas de interesse (pico 3.1) foram submetidas ao sequenciamento automático de Edman (N-terminal) em um seqüenciador PPSQ-23 Shimadzu, segundo instruções do fabricante.

4- Resultados

4.1- Fracionamento dos extratos por procedimentos cromatográficos

Os extratos protéicos foram com sucesso submetidos ao fracionamento salino para a remoção de debris celulares e de outras moléculas não protéicas, seguido por uma separação por cromatografia líquida bidimensional (TDLC), envolvendo as cromatografias de exclusão molecular (CEM) (Figura 1) e hidrofóbica (CH) (Figura 2). Comparando os

perfis de eluição de CEM de ES1 e EP1 a 214 nm (Figura 1A e 1C, respectivamente), similaridades foram observadas para os picos eluídos na porção final do cromatograma (depois da fração 150), enquanto o primeiro pico estava apenas presente no perfil de ES1 (Figura 1A), que corresponde a proteínas com massas moleculares maiores. SDS-Tricina-PAGE das amostras da CEM (Figura 1B e 1D) indicaram que os peptídeos estavam distribuídos aproximadamente da fração 80 à 220 para ES1 (Figura 1A, P2-ES1), e da fração 150 à 230 para EP1 (Figura 1C, P2-EP1). Assim, o pool P2-ES1 e o pool P2-EP1, que mostraram ser frações enriquecidas em peptídeos foram submetidos à cromatografia hidrofóbica (Figura 2). Nove picos (H1 a H9) do P2-ES1 (Figura 2A) e oito picos (H1 a H8) do P2-EP1 (Figura 2B) mostraram altas concentrações de peptídeos, e foram selecionados para ensaios de atividade antimicrobiana. Cinco dos oito picos de P2-EP1 apresentaram comportamento similar, uma vez que todos foram eluídos em 15% de sulfato de amônio (Figura 2B).

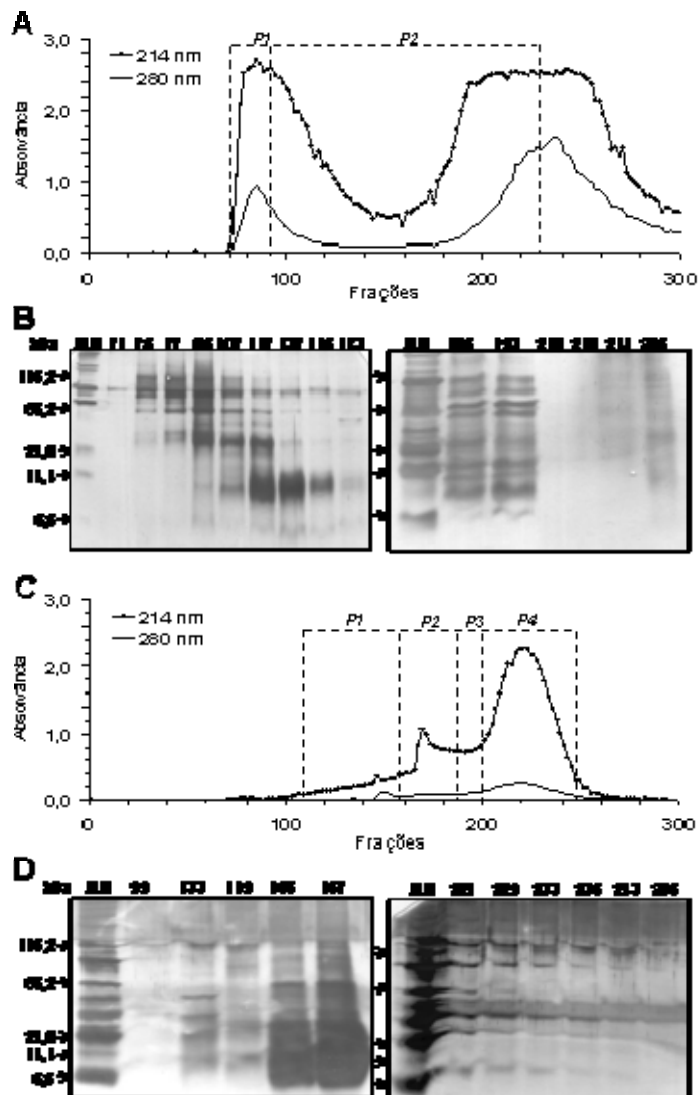


Figura 1- Cromatograma de exclusão molecular de ES1 (A) e EP1 (C) e SDS-Tricina-PAGE das frações de ES1 (B) e de EP1 (D). Foi utilizada a coluna (Sephadex-G50 Amersham/GE, 200 mL, 2,0 cm diâmetro, h= 150,0 cm). O cromatograma foi separado em pools e as frações estão indicadas por números acima da linha. Os números a esquerda dos géis indicam os marcadores moleculares de ampla faixa e os géis foram revelados pela técnica de coloração por prata.

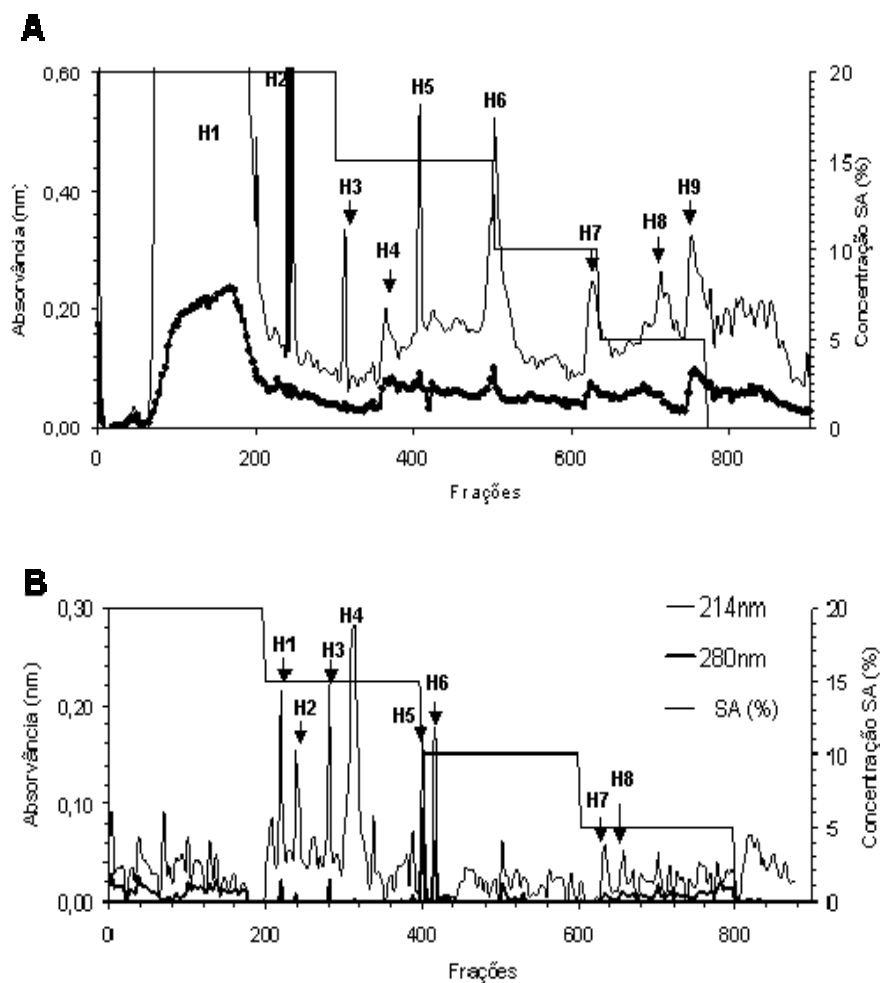


Figura 2- Cromatograma de interação hidrofóbica do pool P2-ES1 (A) e do pool P2-EP1 (B) obtidos das CEM (Figuras 1A e 1C, respectivamente). Foi utilizada a coluna Phenyl Sepharose, Amersham/GE, 150 ml, 2,0 cm diâmetro, h = 50 cm). Os picos H1 a H8 de P2-EP1 apontados foram testados quanto à atividade antibacteriana.

4.2- Atividade antibacteriana

O grau de inibição do crescimento das bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pelas frações H1 a H8 de P2-EP1 foi comparado no tempo de cultivo de 10 h, que correspondeu ao início da estabilização da cultura (Figuras 3A e 3B) (Tabela

1). H3 e H4 foram capazes de inibir o crescimento de ambas as bactérias em duas concentrações avaliadas, que equivaleram a 1 g e 2 g de folhas frescas de pimentão (Figura 3A e 3B). Para *R. solanacearum* (Figura 3A), H3 promoveu inibição do crescimento bacteriano de 33,9% e 41,9% para 1 e 2 g de folhas, respectivamente, enquanto H4 inibiu 61,3% e 53,2% para as mesmas concentrações, respectivamente, quando comparado com o controle da bactéria. Para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Figura 3B), H3 inibiu 16,5% e 32,6% para 1 e 2 g de folhas, respectivamente, e H4 inibiu 22,6% e 41,3% para 1 e 2 g de folhas, respectivamente, quando comparado com o controle da bactéria.

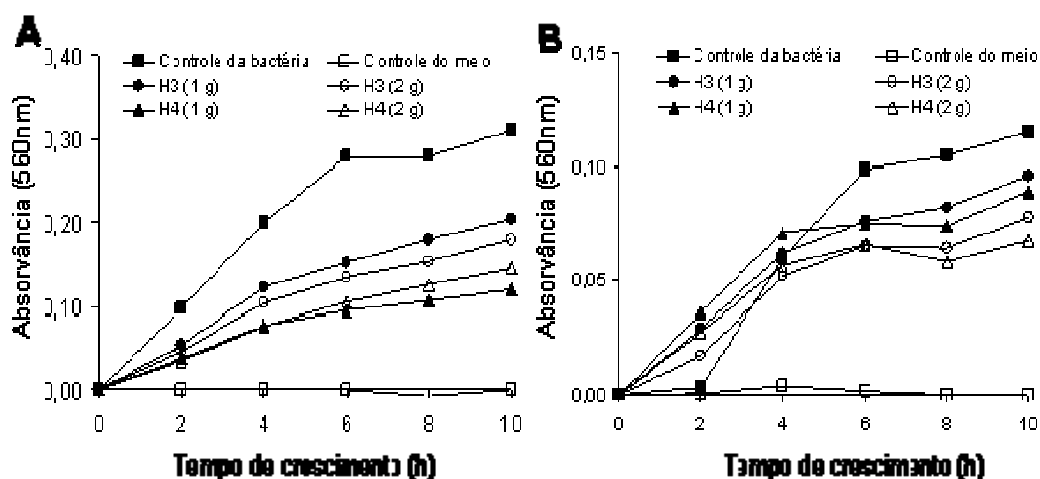


Figura 3- Atividade antibacteriana dos picos H1 a H8 de P2-EP1 contra *Ralstonia solanacearum* (A) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (B). Foram utilizadas quantidades de extrato referentes a 1g e 2g de folhas frescas usados para a preparação do extrato. O controle da bactéria foi a cultura líquida bacteriana, e o controle do meio foi somente o meio de cultura estéril. As placas foram incubadas a 28°C e o crescimento monitorado a A_{560} .

Tabela 1 – Percentagem de inibição do crescimento das bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, pelas amostras após cromatografia hidrofóbica do P2-EP1 em 10 h de cultivo, e o ensaio foi realizado em triplicata

Amostras (P2 – EP1)	% inibição <i>R. solanacearum</i>	% inibição <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
Controle da bactéria	0	0
Controle do meio	100	100
H1 (1g)	-15,3	-40,9
H1 (2g)	-35,8	-63,9
H2 (1g)	-12,4	-16,1
H2 (2g)	-36,1	-30
H3 (1g)	33,9	16,5
H3 (2g)	41,9	32,6
H4 (1g)	61,3	22,6
H4 (2g)	53,2	41,3
H5 (1g)	-25,5	-6,1
H5 (2g)	-28,1	-23,0
H7 (1g)	-32,6	-2,6
H7 (2g)	-37,4	-29,1
H8 (1g)	-21,3	-7,8
H8 (2g)	-23,1	-67,0

4.3- Fracionamento do extrato por procedimento de ultrafiltração

As frações peptídicas nativas ES1-10 e EP1-10 (1 a 10 kDa), recuperada depois de passos de ultrafiltração, foram usadas para a atividade de bioprospecção antimicrobiana contra patógenos de plantas e foram visualizadas em SDS-Tricina-PAGE, para a verificação da eficiência da ultrafiltração. ES1-10 e EP1-10 apresentaram enriquecimento de bandas peptídicas na região de 6 kDa indicando que a ultrafiltração de 1 a 10 kDa foi efetiva (Figura 4).

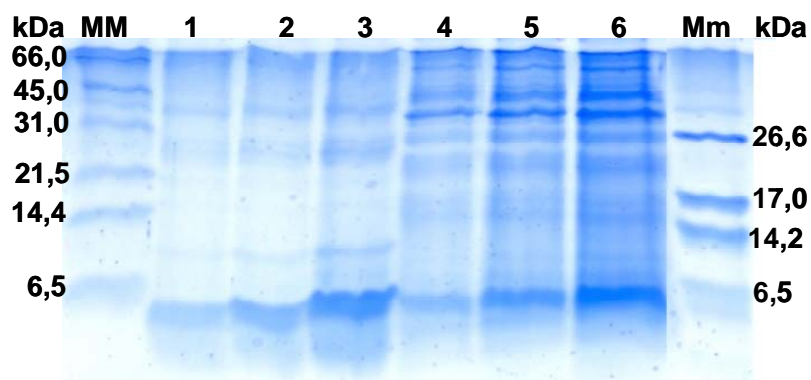


Figura 4- SDS-Tricina-PAGE de três fases das frações ES1-10 e EP1-10. As amostras foram: MM (3 μ l de Marcador Molecular Broad-Range – BioRad); linha 1 (ES1-10, 5 μ g); linha 2 (ES1-10, 10 μ g); linha 3 (ES1-10, 15 μ g) linha 4 (EP1-10, 5 μ g); linha 5 (EP1-10, 10 μ g); linha 6 (EP1-10, 15 μ g) Mm (3 μ l de Marcador Molecular Ultra-Low BioRad). O gel foi revelado pela técnica de coomassie blue coloidal.

4.4- Ensaios antibacteriano e antifúngico

ES1-10 e EP1-10 promoveram a inibição do crescimento das bactérias *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Figura 5), e do fungo *Alternaria solani* (Figura 6). Nenhuma inibição do crescimento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi observado até 24 h de cultivo, sob as condições avaliadas (dados não mostrados). Similarmente, para os fungos *Fusarium solani*, *Alternaria brassicicola*, *Pyricularia grisea* e *Rhizoctonia solani*, não foi observada inibição do crescimento até 7 dias de cultivo sob as condições avaliadas (dados não mostrados).

A inibição do crescimento de *R. solanacearum* em 10 h de cultivo não foi dependente da concentração do extrato protéico avaliado sob as condições avaliadas, tendo sido observado cerca de 30% de inibição para

ES1-10 (10 e 20 µg) e 40% para EP1-10 (10 e 20 µg) (Figura 5A). Para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, a inibição foi dependente da concentração de ES1-10, com 40% e 50% de inibição para as concentrações dos extrato protéicos de 10 µg e 20 µg, respectivamente, e inibição de cerca de 30% e 40% para 10 µg e 20 µg de EP1-10, respectivamente (Figura 5B). Para *E. carotovora* subsp. *carotovora*, a inibição do crescimento foi observada nos extratos ES1-10 (Figura 5C) e EP1-10 (Figura 5D) somente na maior concentração avaliada (8 µg). A atividade antifúngica de ES1-10 (25, 50, e 75 µg, Figura 6A) e (50, 100, e 200 µg, Figura 6B), e EP1-10 (10, 15 e 20 µg, Figura 6A) contra *A. solani* foi observada pela formação de halos de inibição ao redor dos poços contendo as frações peptídicas em todas as concentrações avaliadas (Figura 6). O maior halo de inibição foi verificado para a maior concentração de EP1-10 (20 µg) (Figura 6A, poço 3). Água (Figura 6A, poço C) e Tris-HCl pH7,0 (nas mesmas concentrações das amostras analisadas, Figura 6B, poços 1 a 3) foram usados como controles, e não foram capazes de inibir o crescimento fúngico.

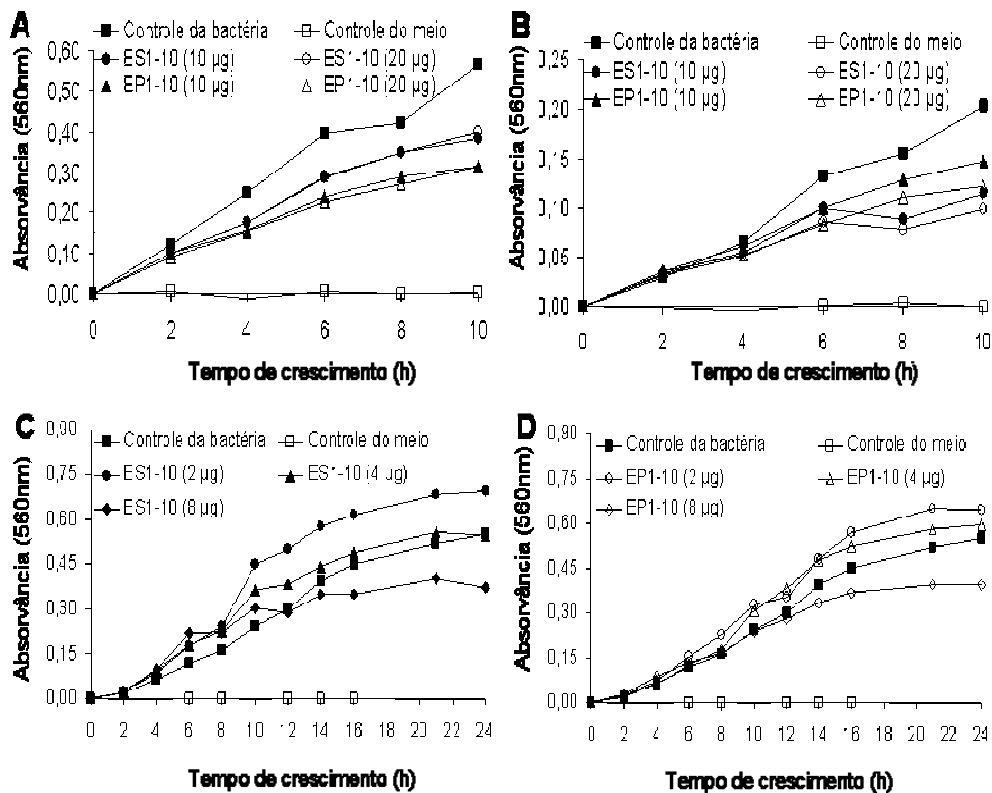


Fig.5- Atividade antibacteriana contra *Ralstonia solanacearum* (A), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (B) e *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (C e D) das frações ES1-10 ou EP1-10 de folhas de pimentão ‘Magali’ R depois de procedimentos de ultrafiltração. As concentrações de proteína utilizadas para cada ensaio são indicadas (em µg). O controle da bactéria foi a cultura líquida bacteriana, e o controle do meio foi somente o meio de cultura estéril. As placas foram incubadas a 28°C e o crescimento foi monitorado a A_{560} . O ensaio foi realizado em triplicata.

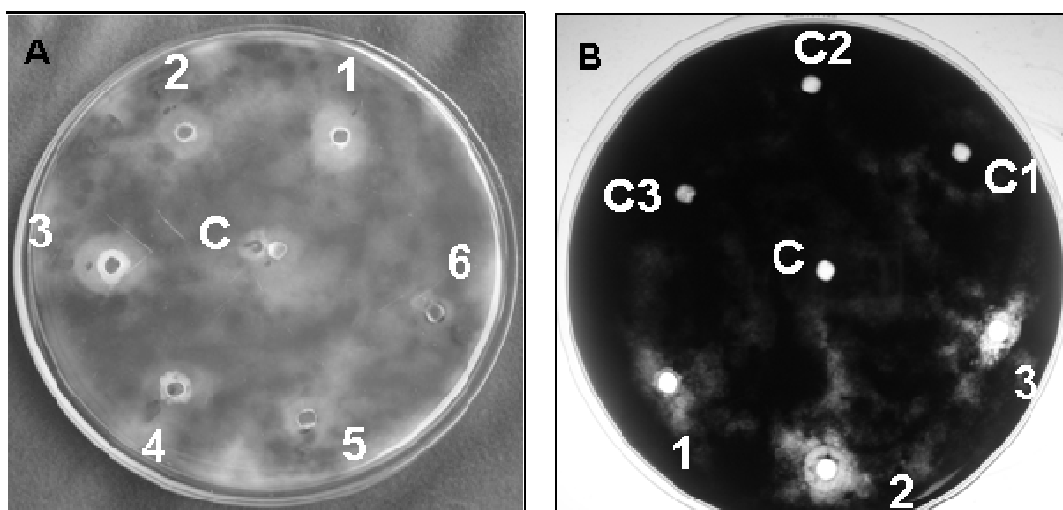


Fig.6- Atividade antifúngica contra *Alternaria solani* das frações ES1-10 e EP1-10 obtidas de folhas de pimentão 'Magali R'. As amostras são: (A) C: água; 1: EP1-10, 10 µg; 2: EP1-10, 15 µg; 3: EP1-10, 20 µg; 4: ES1-10, 25 µg; 5: ES1-10 50 µg; 6: ES1-10, 75 µg; (B) C: água; C1: Tris-HCl 5 mM; C2: Tris-HCl 10 mM; C3: Tris-HCl 20 mM; 1: ES1-10, 50 µg; 2: ES1-10, 100 µg; 3: ES1-10, 200 µg. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias.

4.5- Cromatografia de Fase Reversa em coluna C₁₈ e SDS-Tricina-PAGE

Os extratos protéicos ES1-10, EP1-10 (Figura 7) e ES1-10R/A e EP1-10R/A (Figura 8) foram submetidos a cromatografia de fase reversa em coluna C₁₈ analítica em HPLC. Com a finalidade de obter-se frações com maior grau de pureza para caracterizações estruturais e outras, visando aplicação biotecnológica.

No perfil cromatográfico de ES1-10 (Figura 7A) foram selecionados 13 picos aproximadamente, individualizados e com valores de A₂₁₄ altos de forma a permitir as caracterizações por espectrometria de massa e sequenciamento automático. Já em EP1-10 (Figura 7B) observam-se 2 picos selecionados demonstrando ser EP1-10 um extrato menos complexo, o que pode favorecer caracterizações das biomoléculas. As cromatografias em C₁₈

de ES1-10R/A e EP1-10R/A com a finalidade da retirada de interferentes durante a redução e a alquilação das amostras para após serem submetidas ao sequenciamento de aminoácidos, evidenciam que o perfil de ES1-10R/A (Figura 8A) foi semelhante ao de ES1-10 na região entre 40 e 60% de acetonitrila e que o perfil de EP1-10 R/A (Figura 8B) diferiu do EP1-10, sugerindo a presença de ligações dissulfeto nas proteínas em estudo.

Todos os picos recuperados das C₁₈-RP-HPLC, 1 a 13 de ES1-10, 1 e 2 de EP1-10, 1 a 13 de ES1-10 R/A e de 1 a 5 de EP1-10R/A, foram submetidos a análises de espectrometria de massa (MS) na UFMG, e as massas moleculares (MM) obtidas estão descritas nas Tabelas 2 e 3. Não foi possível obter valores de MM para os picos não descritos na tabela, ou obter seqüência desses picos analisados na UFMG. Tentativas de sequenciamento vem sendo feitas por seqüenciador automático de Edman na EMBRAPA/CENARGEN, Brasília-DF, em colaboração com a Dra. Maura Vianna Prates, e por espectrometria de massa (MS/MS) na UFV, no Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol/CCB/UFV)

Para visualizar o nível de purificação destes extratos foi realizada SDS-Tricina-PAGE com todos os picos obtidos após cromatografia, podendo ser visualizadas bandas peptídicas em apenas alguns picos (Figura 9), o pico 3 evidenciou uma banda peptídica com massa molecular de 6 kDa, que é característica de algumas classes de peptídeos de defesa, incluindo defensinas de plantas.

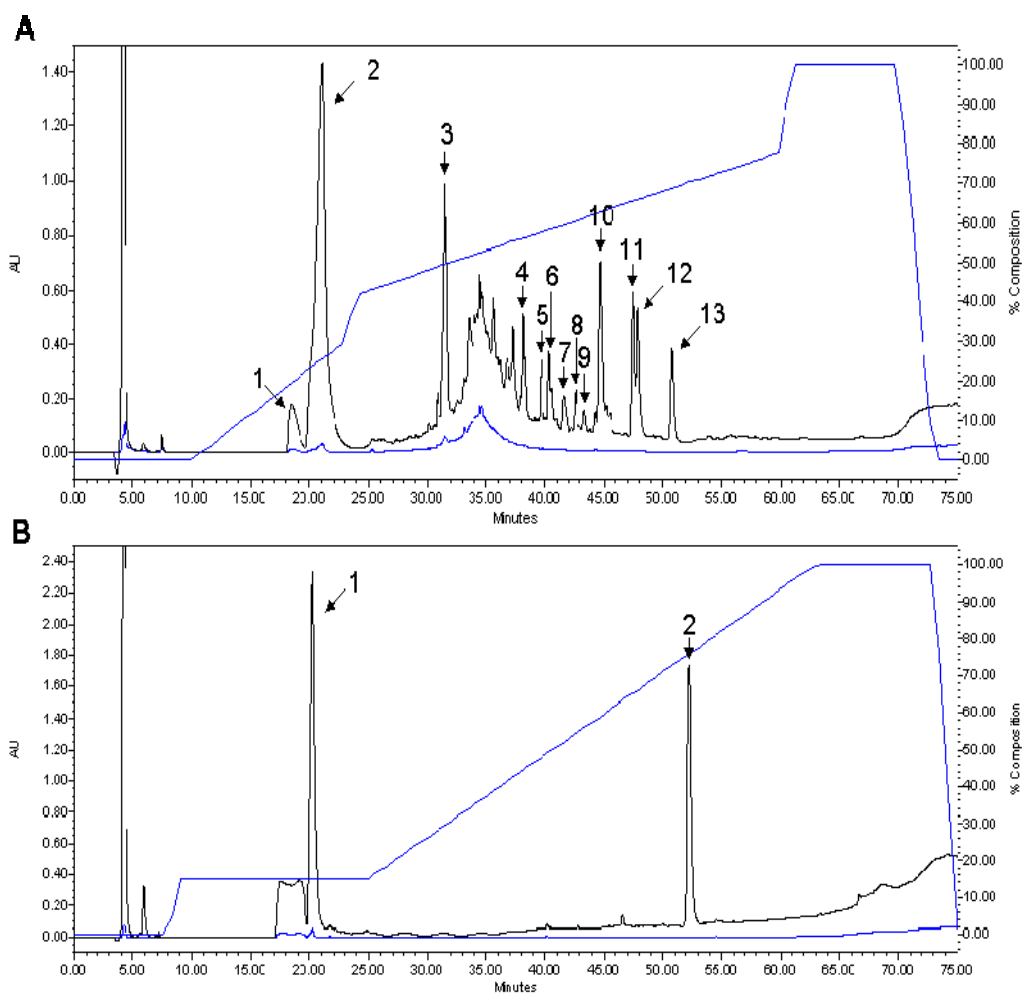


Figura 7- Cromatograma de fase reversa em coluna C₁₈-RP-HPLC das frações ES1-10 (A) e EP1-10 (B). A coluna foi equilibrada em 10% do solvente B e os peptídeos eluídos em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (linha crescente), a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e monitorada a 214 nm. Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v).

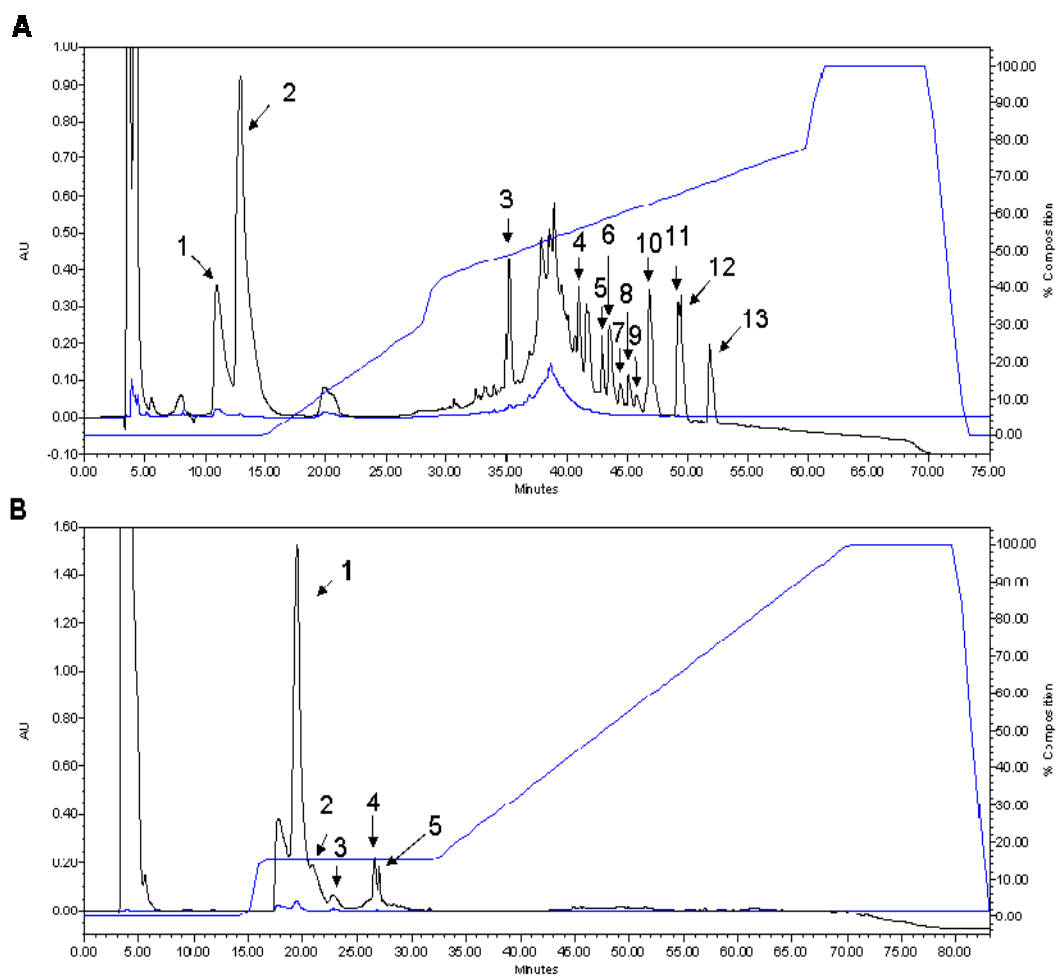


Figura 8- Cromatograma de fase reversa em coluna C₁₈-RP-HPLC das frações ES1-10 R/A (A) e EP1-10R/A (B). A coluna foi equilibrada em 10% do solvente B e os peptídeos eluídos em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (linha crescente), a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e monitorada a 214 nm. Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v).

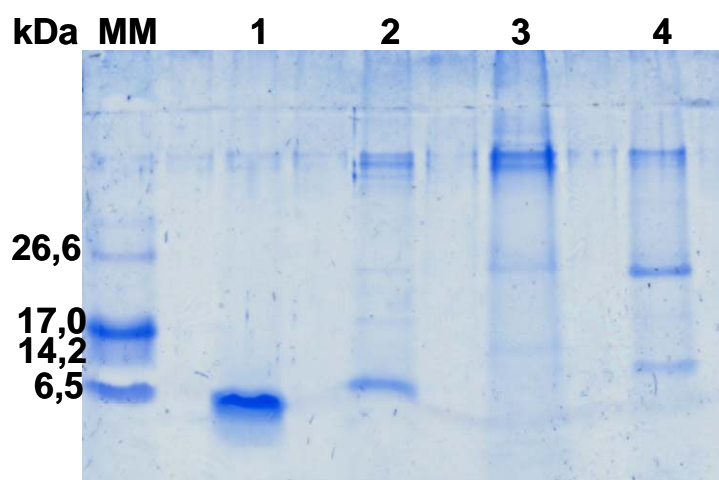


Fig.9- SDS-Tricina-PAGE de três fases dos picos após a separação por C₁₈-RP-HPLC das frações ES1-10. As bandas protéicas foram coradas com Coomassie G-250 (Coomassie Blue Coloidal). MM (5 µl Marcador molecular de baixo peso (Sigma), linha 1 (Pico 3), linha 2 (Pico 4), linha 3 (Pico 10), linha 4 (Pico 12).

4.6- Cromatografia de Fase Reversa em C₄, determinação da massa molecular e da seqüência de aminoácidos

Os picos após C₁₈-RP-HPLC com maiores absorvâncias foram submetidos à cromatografia de fase reversa em C₄ para obter peptídeos mais purificados. Foram submetidos os picos 2, 3, 4, 6, 10 e 13 de ES1-10R/A (Figura 10). O pico 3 apresentou um perfil pouco complexo e o pico 3.1 foi selecionado para análise posterior. O pico 3.1 foi novamente reduzido e alquilado com o mesmo protocolo (item 3.4), porém com a adição de uréia 8M para garantir a eficiência do procedimento. Para a retirada do sal e de outros interferentes o pico 3.1 foi submetido à cromatografia de fase reversa em C₁₈ (Figura 11), resultando em 6 picos nomeados A a F. Foram determinadas as massas moleculares em MALDI-TOF/TOF de alguns picos após C₁₈-RP-HPLC de ES1-10, ES1-10R/A e EP1-10R/A (Tabelas 2 e 3), e

também do pico D. O pico 3.1 foi submetido ao sequenciamento automático de Edman obtendo três seqüências que diferem uma da outra, demonstrando ser uma seqüência contaminada. Novas tentativas estão sendo feitas. O pico D teve massa molecular experimental de aproximadamente 4.240 Da, verificada em espectrômetro tipo Ion Trap, Bruker Daltonics HCT, ETD II e em espectrômetro TOF/TOF Bruker Daltonics Ultra Flex III.

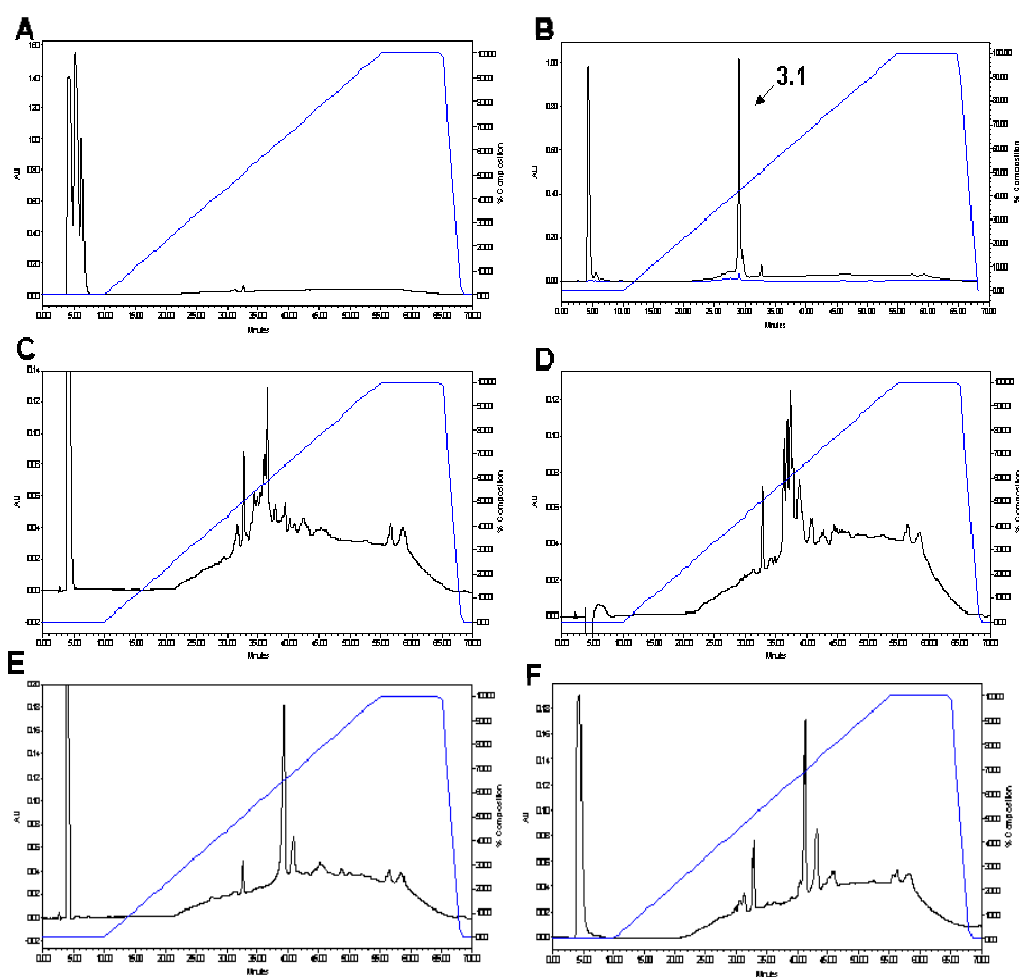


Figura 10- Cromatograma de fase reversa em coluna C₄-RP-HPLC do picos 2 (A), 3 (B), 4 (C), 6 (D), 10 (E) e 13(F) de ES1-10R/A. A coluna foi equilibrada em 10% do solvente B e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (linha crescente), a um fluxo de 1,0

mL.min⁻¹ e monitorada a 214 nm. Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v).

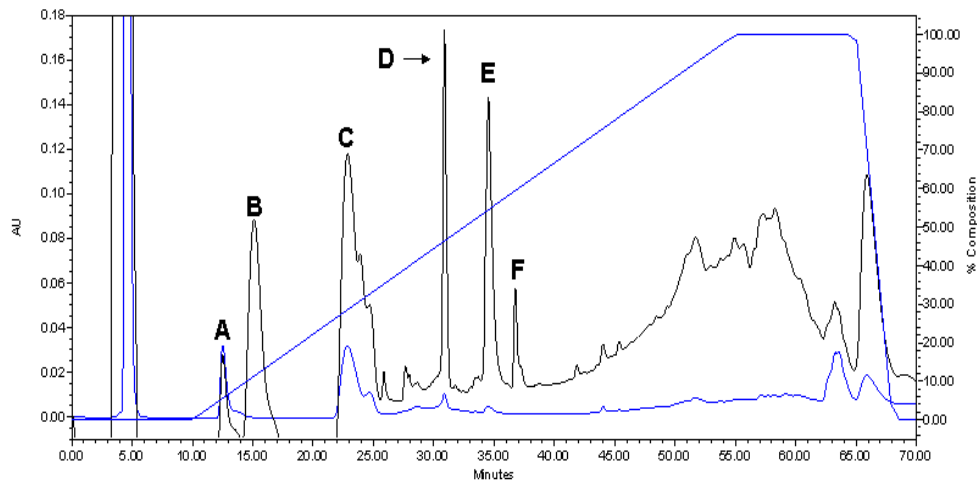


Figura 11- Cromatograma de fase reversa em coluna C₁₈-RP-HPLC do pico 3.1 reduzido e alquilado novamente com uréia 8M. A coluna foi equilibrada em 10% do solvente B e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente de acetonitrila (linha crescente), a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e monitorada a 214 nm. Solvente A: TFA 0,1% (v/v); solvente B: TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v).

a)	G	I	T	E	N	Q	A	G	G	R	Q	S	N	N	R
b)	A	F	E	T	E	Y	Y	A	Y	D	V	Q	S	D	-
c)	Q	N	P	Y	R	R	R	D	D	Q	-	N	A	-	-

Figura 12- Prováveis seqüências N-terminal do pico 3.1 de ES1-10 R/A. Foi empregada a metodologia introduzida e desenvolvida por Edman (1950).

Tabela 2- Determinação das Massas Moleculares (MM) por espectrometria de massa (MALDI/TOF) dos picos de ES1-10 após C₁₈-RP-HPLC

Amostra	MM (Da)
Pico 2 ES1-10	9.434,803
Pico 3 ES1-10	2.120,546 4.239,093 4.396,658 5.664,966 8.565,383
Pico 4 ES1-10	4.249,309 5.734,082 7.088,429 7.464,860 8.549,346
Pico 13 ES1-10	8.202,253

Tabela 3- Determinação das Massas Moleculares (MM) por espectrometria de massa (MALDI/TOF) dos picos de ES1-10R/A após C₁₈-RP-HPLC

Amostra	MM (Da)
Pico 3 ES1-10R/A	4.241,572 4.322,570 4.397,668 8.478,642 8.473,024 12.724,123
Pico 10 ES1-10R/A	7.211,877
Pico1 EP1-10R/A	4.240,131 4.324,302 4.398,668

Tabela 4- Determinação das Massas Moleculares (MM) por espectrometria de massa (MALDI/TOF) da amostra 3.1 de ES1-10R/A após C₁₈-RP-HPLC

Amostra	MM (Da)
Pico D	4.242,2
	4.398,6

5- Discussão

A atividade antimicrobiana apresentada pelas frações enriquecidas em peptídeos de folhas de pimentão 'Magali R' contra uma espécie de bactéria Gram-positiva, e três Gram-negativas e contra o fungo *Alternaria solani* confirmou a potencialidade antimicrobiana do material-fonte utilizado e assim de algumas espécies de solanáceas para a prospecção de agentes de defesa de plantas, corroborando alguns resultados prévios em nosso laboratório. Propriedades antimicrobianas foram também relatadas por Teixeira *et al* (2006) para extratos enriquecidos em peptídeos de folhas de pimentão 'Sunshine' e 'Samara'. Os autores observaram alta inibição do crescimento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e *R. solanacearum* para extratos enriquecidos em peptídeos catiônicos. Potente atividade antimicrobiana também foi observada por Almeida *et al* (2007, 2008), quando extratos enriquecidos em peptídeos de folhas de berinjela foram utilizados contra essas duas bactérias. Foi confirmado também que as folhas de plantas são boas fontes constitutivas de peptídeos antimicrobianos, inversamente do descrito na literatura (García-Olmedo *et al.* 2001; Zasloff 2002), que mencionam as folhas como sendo fontes pobres em peptídeos. Ainda, Almeida *et al* (2007) observou essas atividades em extratos de parede celular de plantas jovens de berinjela (5 cm) enquanto Teixeira *et al* (2006) e Almeida *et al* (2007) detectaram potente atividade antimicrobiana em folhas com 60 dias de pimentão e berinjela, respectivamente. Estes compostos constitutivos são moléculas promissoras a serem exploradas para o desenvolvimento comercial de agentes de defesa de plantas contra

importantes fitopatógenos e um grande número de aplicações biotecnológicas.

A variedade de pimentão 'Magali R' foi usada como fonte protéica por ser uma variedade comercial com características agronômicas atrativas, como fácil cultivo, baixa susceptibilidade a doenças de plantas, e resistência ao vírus Y da batata (PVY), já que doenças virais constituem um importante obstáculo para a produção de pimentão no mundo (Rodríguez *et al* 2007). Considerando que os AMPs estão presentes em baixas concentrações no material-fonte e baixas quantidades de peptídeos são geralmente recuperados ao longo dos procedimentos de purificação, torna-se necessário usar grandes quantidades de folhas na extração para posterior purificação, a fim de obter peptídeos em concentração suficiente para realizar ensaios antimicrobianos, outros ensaios biológicos de interesse bem como caracterizações visando identificação da biomolécula.

Os procedimentos usados para a recuperação de frações enriquecidas em peptídeos de pimentão foram realizados com sucesso pelo emprego de técnicas peptidômicas e ultrafiltração. Extratos vegetais são amostras muito complexas que contêm muitos pequenos compostos naturais de defesa antimicrobiana. As técnicas propostas asseguram a remoção de compostos antimicrobianos de baixa massa molecular (menores que 1 kDa). Após a remoção dos debris celulares e outras moléculas não protéicas por salting-out, o fracionamento de ES e EP foi desenvolvido com sucesso por TDLC, quando a primeira separação cromatográfica foi por exclusão molecular (CEM) (Figuras 1A e 1C, respectivamente). Este fracionamento por tamanho das moléculas favoreceu o enriquecimento peptídico, considerando que os AMPs de plantas são moléculas pequenas (2 a 9 kDa). Também, o procedimento de ultrafiltração usando membranas com limites de exclusão definidos, 10.000 e 1.000 Da, promoveu a eliminação de moléculas e íons de baixa massa molecular (menores que 1kDa), seguindo a recuperação da fração enriquecida em peptídeos na faixa de 1 a 10 kDa. Com isso, assegura-se a remoção de compostos de massa molecular inferior

a 1 kDa. Preliminarmente a passos cromatográficos, etapas não refinadas de purificação como fracionamento salino e ultrafiltração são necessários para o sucesso da recuperação das frações peptídicas. A obtenção de um bom grau de separação de moléculas por técnicas peptidômicas é diretamente correlacionada com a preparação e a clarificação de extratos (Baggerman *et al* 2004).

A CEM promoveu a separação em dois grupos de proteínas, com grandes e pequenas massas moleculares, para ambas as separações de ES1 ou EP1, evidenciando que proteínas maiores foram especialmente apresentadas no perfil obtido de ES1, mas não no perfil de EP1 (Figuras 1A e 1C). Apesar dos picos obtidos no final da porção destes cromatogramas (depois da fração 150) tem mostrado similaridade, os perfis cromatográficos evidenciaram que ES1 é um extrato mais complexo que EP1, também na região peptídica. Estes resultados sugerem que a parede celular de plantas contém peptídeos (1 a 10 kDa) que poderiam apresentar função de defesa, uma vez que estão distribuídos na periferia das células, que é coerente com a função dos AMPs como barreira primária dos tecidos celulares contra a invasão de patógenos (Almeida *et al* 2008).

A presença de bandas peptídicas na primeira região de eluição do perfil de CEM para a separação de ES1 sugere a ocorrência de aglomerados de algumas formas de peptídeos que apresentam características hidrofóbicas (Figura 1B). A experiência prévia adquirida pelo nosso grupo de trabalho envolvendo peptídeos de diferentes fontes tem demonstrado que estes peptídeos estão provavelmente em associação uns com os outros ou mesmo com proteínas maiores, e são geralmente liberados sob condições desnaturantes como nos procedimentos de eletroforese. O efeito foi mais pronunciado em ES1, provavelmente em função da alta concentração de proteínas maiores presentes no extrato. Assim, EP1 foi selecionado para a bioprospecção da atividade antimicrobiana por ser um extrato menos complexo e também por considerar que os peptídeos antimicrobianos podem corresponder a defesa inata da planta e que a localização na parede celular

está de acordo com sua função biológica primária, mas ES também será explorado futuramente. As frações obtidas depois da CH foram eluídas em cerca de 15% de sulfato de amônio, que é característico de moléculas com caráter parcialmente hidrofóbico, similarmente a muitos AMPs descritos. Duas frações (H3 e H4) foram especialmente capazes de inibir o crescimento de *R. solanacearum* e *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, mas nem sempre tão dependente da concentração da amostra. Entretanto, considerando ser extratos impuros, como evidenciado nas separações por cromatografia de fase reversa (dados não mostrados), diferentes moléculas constituintes poderiam estar atuando por efeitos antagônicos associados, ocasionando simultaneamente a inibição e a ativação do crescimento bacteriano.

Deve ser salientado que diferentes peptídeos podem estar agindo em diferentes patógenos de plantas. As frações H3 e H4 foram efetivas contra bactérias-teste Gram-positiva e Gram-negativa em diferentes graus de inibição.

As técnicas peptidômicas usando cromatografia líquida multidimensional (MDLC) ou cromatografia líquida bidimensional (TDLC) são aplicadas com sucesso ao trabalho analítico. Entretanto, se quantidades maiores de peptídeos são requeridas para ensaios nativos, procedimentos cromatográficos são limitados, especialmente se envolver em CEM, uma técnica incapaz de separar grandes volumes de amostra e concentração de proteínas. Considerando o objetivo de bioprospectar a atividade antimicrobiana, são necessárias grandes quantidades de frações enriquecidas em peptídeos assim como para os ensaios de caracterização estrutural dos peptídeos. Assim, foram obtidas as maiores quantidades necessárias usando procedimento de ultrafiltração associado a técnicas peptidômicas. Alternativamente às cromatografias a fração peptídica (1 a 10 kDa) foi com sucesso obtida pela técnica de ultrafiltração (equipamento AMICON/ Millipore-EUA), usando sequencialmente duas membranas com tamanhos de poros definidos. Após o *salting-out*, ES2 e EP2 foram

ultrafiltrados em membrana 10 de kDa, o filtrado (fração de menor massa molecular) foi recuperado, seguido de um novo passo de ultrafiltração em membrana de 1 kDa, para a dessalinização, a concentração e a remoção de moléculas com massas moleculares inferiores a 1 kDa. A técnica de ultrafiltração não é onerosa, requer um equipamento muito simples e de baixo custo, que permite simultaneamente trocar a solução em uso, dessalinizar e obter amostras concentradas, associado à possibilidade de permitir o aumento da escala de produção, considerando que equipamentos industriais que empregam o mesmo princípio de separação são comercialmente disponíveis. Associa-se o fato de ser uma técnica rápida pois permite o processamento de grande quantidade de amostra simultaneamente o que pode ser limitantes em processos cromatográficos. As frações enriquecidas em peptídeos (1 a 10 kDa) nomeadas ES1-10 e EP1-10 foram diretamente empregadas na prospecção da atividade contra patógenos de plantas, pois já estão dessalinizadas e enriquecidas em peptídeos.

Resultados prévios obtidos por nosso grupo indicam que atividades antimicrobianas empreendidas por frações são dependentes da concentração de proteínas das amostras, o que foi corroborado por resultados obtidos aqui. Entretanto, deve ser ainda considerado que o grau de inibição não é somente dependente da concentração de agentes inibitórios presentes nas amostras, mas que peptídeos podem ser utilizados simultaneamente como fonte de carbono, aumentando o crescimento microbiano. Para a bactéria teste Gram-positiva *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, uma evidência da dependência do conteúdo protéico nas amostras foi observado quando as frações H3 e H4 (Figura 2B) e ES1-10 e EP1-10 (Figura 5B) foram avaliadas, em duas concentrações cada. Para a bactéria teste Gram-negativa *R. solanacearum*, a dependência do conteúdo protéico nas amostras não foi clara para as frações H3 e H4 (Fig. 2B), e ES1-10 e EP1-10 (Fig.5A). Ainda, peptídeos diferentes podem estar presentes, promovendo simultaneamente ativação e inibição do crescimento

microbiano. Ou, as concentrações utilizadas foram menores que a capacidade inibitória, como pode ter acontecido com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sugere-se a utilização dos constituintes das amostras protéicas como fonte de carbono para os microrganismos. Para *E. carotovora* subsp. *carotovora*, o grau de inibição foi claramente dependente de concentração de proteínas nas amostras ES1-10 e EP1-10 (Figura 5C e 5D), entretanto somente a maior concentração de extrato utilizado apresentou inibição para ES1-10 (Figura 5C) e também EP1-10 (Figura 5D). Muitos patógenos de plantas são bactérias Gram-negativas que são de difícil controle. Pode ser notado que somente quatro das dez classes de peptídeos antimicrobianos descritos em vegetais inibem bactérias Gram-negativas (García-Olmedo et al. 2001) o que indica que os resultados de inibição antimicrobianas aqui observados podem ser de grande valor biotecnológico, na forma de extratos enriquecidos em peptídeos ou após a identificação e caracterização das biomoléculas inibitórias.

Para o ensaio antifúngico, EP1-10 (10, 15, 20, 50, 100 e 200 µg de proteína) e ES1-10 (25, 50 e 75 µg de proteína) promoveu inibição do crescimento microbiano quando comparado com os controles (Figura 6), com resultados biotecnologicamente promissores dada a importância e a dificuldade de controle deste fitopatógeno. Água e Tris-HCl pH7,0, nas mesmas concentrações presentes nos testes como controles, não promoveram inibição do crescimento do fungo, sugerindo que são as biomoléculas presentes nas frações os responsáveis pela inibição fúngica. Não foi possível correlacionar os halos de inibição com a concentração nos extratos do agente inibidor (Figuras 6A e 6B). Como os peptídeos são moléculas grandes (1-10 kDa), suspeitou-se que possam ter dificuldades em penetrar no ágar. A inibição do crescimento do fungo *A. solani* aqui observado por estes extratos e uma vasta gama de aplicações em potencial para estas moléculas, incentiva a equipe de estudo a possíveis aplicações no controle do fungo utilizando estas frações, como na proteção comercial de sementes, na produção de drogas tópicas para a proteção de animais contra

fungos, na aplicação em plantas sob cultivo protegido, e outras aplicações de interesse no agronegócio.

Como citado anteriormente as técnicas peptidômicas usando cromatografias foram aplicadas com sucesso nas análises dos extratos peptídicos. Já a segunda parte do trabalho, foi destinada à purificação e caracterização dos peptídeos após a ultrafiltração e requer etapas analíticas para melhor purificação e caracterização das biomoléculas. ES1-10 e EP1-10 foram submetidos à cromatografia de fase reversa, passo necessário para o preparo da amostra para as análises espectrométricas. As proteínas foram cromatografadas em um gradiente descontínuo de acetonitrila, previamente ajustado empiricamente, com ênfase na região de eluição de peptídeos de defesa vegetais. No cromatograma de ES1-10 (Figura 7A), a eluição da maior parte dos picos selecionados ocorreu especialmente entre 20 e 50 % (v/v) de acetonitrila, que é uma característica das moléculas de interesse. Conforme intensivamente relatado, os peptídeos antimicrobianos catiônicos, em geral, têm cerca de 50% dos resíduos aminoacídicos apolares e são eluídos em concentrações de acetonitrila entre 20 e 40% (v/v) (Terras *et al* 1992; Almeida *et al* 2000; Carvalho *et al* 2001, Fogaça *et al* 2004). Já no cromatograma de EP1-10 (Figura 7B), dois picos selecionados a identificação dos peptídeos foram encontrados um na região hidrofílica e o outro na região hidrofóbica do perfil. Picos com valores muito baixos de absorvância foram detectados, e todos vêm sendo avaliados. ES1-10 e EP1-10 foram submetidos ao protocolo de redução e alquilação para posterior submissão ao sequenciamento de aminoácidos. Para a retirada de interferentes, os extratos foram submetidos à cromatografia de fase reversa em C₁₈. Os perfis de ES1-10R/A e ES1-10 apresentaram pequenas alterações, sugerindo a presença de baixo número de ponte dissulfeto nas amostras ou a não efetividade do processo de redução e alquilação. Para EP-10R/A, comparado com EP1-10, foram observados cromatogramas diferentes como resultantes dos processos redução e alquilação da amostra, sugerindo a presença de pontes dissulfeto nessas amostras.

Após a cromatografia de fase reversa em C₁₈, todos os picos foram submetidos à espectrometria de massa, com vistas à obtenção de múltiplas massas (Tabela 2 e 3), tendo sido necessária a continuidade da purificação por fase reversa em C₄ (Figura 10), visando melhorar o grau de pureza das amostras. As frações obtidas vem sendo analisadas por tentativas diversas. Por disponibilidade de tempo apenas o pico 3.1 foi submetido a espectrometria de massa o qual foi novamente reduzido e alquilado com adição de Uréia 8M, pois como foi discutido anteriormente os perfis do material sem reduzir e alquilar foram muito parecidos com o reduzido e alquilado, logo foi adicionado uréia para melhorar a eficiência. Duas amostras referentes ao pico 3.1 foram trabalhadas, uma foi submetida ao sequenciamento de aminoácidos, resultando em uma seqüência bastante contaminada, necessitando então de novos métodos de purificação, e a outra amostra também referente ao pico 3.1 reduzida e alquilada com uréia 8M foi submetida à cromatografia de fase reversa em C₁₈ para a retirada de sal e submissão a espectrometria de massa. Ela resultou em um perfil com vários picos (Figura 11), devido talvez a alguma proteólise da amostra, e observou-se que o pico D era o pico referente ao pico 3.1, devido ao tempo de eluição que foi em torno de 30 min para os dois picos. O pico D resultou em duas massas moleculares de 4.242,2 e 4.398,6 Da, condizente com as massas moleculares dos peptídeos antimicrobianos.

6- Conclusões

Folhas de pimentão parecem ser uma boa fonte de peptídeos antimicrobianos constitutivos, que são fisiologicamente importantes para a proteção de plantas, mas que biotecnologicamente pode ser exploradas para aplicação comercial como agentes químicos para a agricultura, agentes para a proteção de sementes, defesa de frutos e grãos no pós-colheita, ou para produtos agrícolas obtidos sob cultivo protegido, como vegetais, entre diversas outras aplicações. Como características especiais, a inibição promovida por AMPs ocorre por mecanismos de defesa que são diferentes

daqueles usados por antibióticos disponíveis comercialmente, correspondendo a uma nova estratégia no desenvolvimento de produtos biotecnológicos para o controle de patógenos de plantas, sem indução de resistência. Muitos AMPs são compostos facilmente biodegradáveis, que podem ser usados na alimentação humana, o que seriam degradados por enzimas proteolíticas sintetizadas por esses organismos e portanto não sendo acumulados no ambiente ou nos tecidos vivos.

O uso de abordagens proteômicas que envolvem técnicas e equipamentos mais sofisticados, como a cromatografia líquida, desenvolvida a média e alta pressões, foi essencial para o isolamento e a avaliação de características de moléculas para aplicação biotecnológica. Entretanto, a ultrafiltração através de membranas, dirigida por ar comprimido, é uma técnica não refinada que possui vantagens por ser um procedimento simples, rápido, de baixo custo, por permitir a recuperação de grandes quantidades de amostras em pequeno tempo e, especialmente, de forma nativa, concentrada permitindo a troca de tampão. Assim, esta técnica é apropriada para recuperar amostras para ensaios biológicos, o que é essencial para definições de metas de bioprospecção e para estudos em genômica funcional por meio de abordagens proteômicas. Para aplicações industriais, equipamentos de ultrafiltração operando a alto fluxo estão disponíveis comercialmente, uma vez que o processo é de baixo custo e adequado para operação em larga escala.

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

que para a descoberta de qual peptídeo estaria agindo biologicamente seria necessário a utilização de técnicas cromatográficas como a fase reversa, técnicas de espectrometria de massa e de sequenciamento de aminoácidos.

Plantas de pimentão podem ser facilmente cultivadas para obter matéria-prima vegetal de interesse comercial. A super expressão de peptídeos antimicrobianos em plantas pode levar à obtenção de bioprodutos de AMPs para a defesa de plantas. Seqüências aminoácidas de AMPs efetivamente identificadas como agentes de defesa podem ser clonadas, peptídeos superexpressados, e extratos parcialmente purificados são usados como compostos antimicrobianos para vários propósitos. Considerando a possível ocorrência de efeitos de sinergismo ou aditivo de AMPs nessas amostras, a presença de diferentes peptídeos na mesma fração, parcialmente purificados, pode ser benéfica para a aplicação dos conhecimentos em biotecnologia.

7- Referências Bibliográficas

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.

Almeida, H. O., Teixeira, F. R., Romeiro, R. S., 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.

Almeida, M. S., Cabral, K. M. S., Zingali, R. B., Kurtenbach, E. (2000) Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 378:278-286.

Baggerman, G., Verleyen, P., Clynen, E., Huybrechts, J., De Loof, A., Schoofs, L. (2004). Review – Peptidomics. *The Journal of Chromatography B* 803:3-16.

Battison, A. L., Summerfield, R., Patrzykat, A. (2008) Isolation and characterisation of two antimicrobial peptides from haemocytes of the

American lobster *Homarus americanus*. *Fish & Shellfish Immunology* 25:181-187.

Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A., Vanderleyden, J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.* 69:55-60.

Broekaert, W. F., Mariën, W., Terras, F. R. G., De Bolle, M. F. C., Proost, P., Damme, J. V., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. (1992) Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry* 31:4308-4314.

Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx, G. W., Osborn, R. W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sc.* 16:297-323.

Brogden, A. K. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3.

Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Terras, F. R. G., Proost, P., Damme, J. V., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Broekaert, W. F. (1992) Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* 267:2228-2233.

Carvalho, A. O., Machado, O. L. T., Cunha, M. D., Santos, I. S., Gomes, V. M. (2001) Antimicrobial peptides and immunocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 39:137-146.

Craik, D. J., Cemazar, M., Wang, C. K., Daly, N. L. (2006) The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. *Biopolymers* 84:250-266.

Dixon, R. A. e Harrison, M. J. (1990). Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv Genet.* 28:165-234.

Diz, M. S., Carvalho, A. O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A. G., Da Cunha, M., Alves, E. W., Okorokova-Facanha, A. L., Oliveira, M. A., Perales, J., Machado, O. L. Gomes, V. M. (2006) Antimicrobial peptides from chili pepper seeds cause yeast plasma membrane permeabilization and inhibit the acidification of the medium by yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1760:1323-1332.

Edman, P. (1950). Method for determination of amino acid sequences in peptides. *Acta Chem. Scandinavia* 28:283-293.

Faustino, J. M. F., Barroca, M. J., Guiné, R. P. F. (2007) Study of the drying kinetics of green bell pepper and chemical characterization. *Food and Bioproducts Processing* 85:163–170.

Fernandez de Caleyá, R., Gonzales-Pascual, B., Garcia-Olmedo, F., Carbonero, P. (1972) Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothins in vitro. *Appl. Microbiol.* 23:998-1000.

Feys, B. J., Parker, J. E. (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genetic.* 10:449-455.

Fogaça, A. C., Lorenzini, D. M., Kaku, L. M., Esteves, E., Bulet, P., Daffre, S. (2004) Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev. Comp. Immunol* 28:191–200.

García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., Rodríguez-Palenzuela, P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* 47: 479-491

Garcia-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J. M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., Poza-Carrión, C. (2001) Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Letters* 498:219 – 222.

Gómez-Gómez, L., (2004) Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Molecular Immunology* 41:1055–1062.

Hancock, R. E. W., Lehrer, R. (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology* 16: 82-88.

Hancock, R. E. W. (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infectious Diseases* 1:156-164.

Hancock, R. E. W., Rezek, A. (2002) Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters* 206:143-149.

Heukeshoven, J., Dernick, R. (1985). Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis* 6:103.

Jones, J. B., Stall, R. E., Bouzar, H. (1998) Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annual Review of Phytopathology* 36:41-58.

Judd, R. C., (1994) Electrophoresis of peptides. In: Methods in Molecular Biology, vol. 32: Basic Protein and Peptide Protocols, Ed. J. M. Walker Copyright, *Humana Press Inc*, Totowa, NJ 49-57.

Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M. e Dixon, R. A., (1989). Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56:215-24.

Lin, P., Xia, L., Ng, T. B. (2007) First isolation of an antifungal lipid transfer peptide from seeds of a *Brassica* species. *Peptides* 28:1514-1519.

Margis-Pinheiro, M., Sandroni, M., Lummerzheim, M., Oliveira, D, E. (1999) A defesa das plantas contra as doenças. *Ciência Hoje* 147.

Lohner, K., Latal, A., Lehrer, R. I., Ganz, T. (1997) Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry* 36:1525-1531.

Matsuzaki, K. (1999) Why and how are peptide lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1462:1-10.

Minadi, D., Ghiselli, R., Cirioni, O., Giacometti, A., Kamysz, W., Orlando, F., Silvestri, C., Parri, G., Kamysz, E., Scalise, G., Saba, V., Giovanni, M. (2007) The antimicrobial peptide Tachyplesin III coated alone and in combination with intraperitoneal piperacillin-tazobactam prevents ureteral stent *Pseudomonas* infection in a rat subcutaneous pouch model. *Peptides* 28:2293-2298.

Monroc, S., Badosa, E., Feliu, L., Planas, M., Montesinos, E., Bardaji, E. (2006) De novo designed cyclic cationic peptides as inhibitors of plant pathogenic bacteria. *Peptides* 27:2567-2574

Montesinos, E. (2007) Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol Lett* 270:1-11.

Mulvenna, J. P., Mylne, J. S., Bharathi, R., Burton, R. A., Shirley, N. J. Fincher, G. B., Anderson, M. A., Craik, D. J. (2006) Discovery of cyclotide-like protein sequences in graminaceous crop plants: ancestral precursors of circular proteins? *Plant Cell* 18:2134-2144.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 9:255-62.

Park, C. J., Park, C. B., Hong, S. S., Lee, H. S., Lee, S. Y., Kim, C. (2000) Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant. Mol. Biol.* 44:187-197.

Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., Aranha, C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises, *International Journal of Antimicrobial Agents* 24:536-547.

Ribeiro, C. S. C., Cruz, D. M. R. (2002) Tendências de mercado. *Cultivar Hortaliças e Frutas* 14.

Rodríguez, Y., Depestre, T., Gómez, O. (2007). Obtaining bell pepper lines (*Capsicum annum*) resistant to viral diseases as progenitors of F1 hybrids, based on the study of four sub-populations. *Cienc Inv Agr* 34:193-198.

Romeiro, R. S., (2007) Controle Biológico de enfermidades de plantas: procedimentos. Viçosa: *Ed. UFV* 95-100.

Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A., García-Olmedo, F. (1999) Snakin-1 a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molec. Plant-Microbe Int.* 12:16-23.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 15:76-85.

Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P. A., Evans, I. J., Osborn, R. W., Ray, J. A., Rees, S. B.,; Broekaert, W. F. (1997) A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biol. Chem.* 272:24480-2448.

Tam, J. P., Yi-An, L., Jin-Long, Y., Koiu-Wei, C. (1999) An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8913-8918.

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. *J. Phytopathol.* 154 :418-421.

Terras, F. R. G., Schoofs, H. M. E., De Bolle, M. F. C., Leuven, F. V., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F. (1992) Analysis os two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267:15301-15309.

Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G. W., Brownlee, C., Osborn, R. W., Broekaert, W. F. (1996) Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.* 271:15018-15025.

Thevissen, K., Kristensen, H. H., Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A., François, I. E. J. A. (2007) Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discovery Today* 12:21-22.

Viana, F. M. P., Freire, F. C. O., Parentez, G. B. (2007) Controle das Principais Doenças do Pimentão Cultivado nas Regiões Serranas do Estado do Ceará. *ISSN 1679-6535*

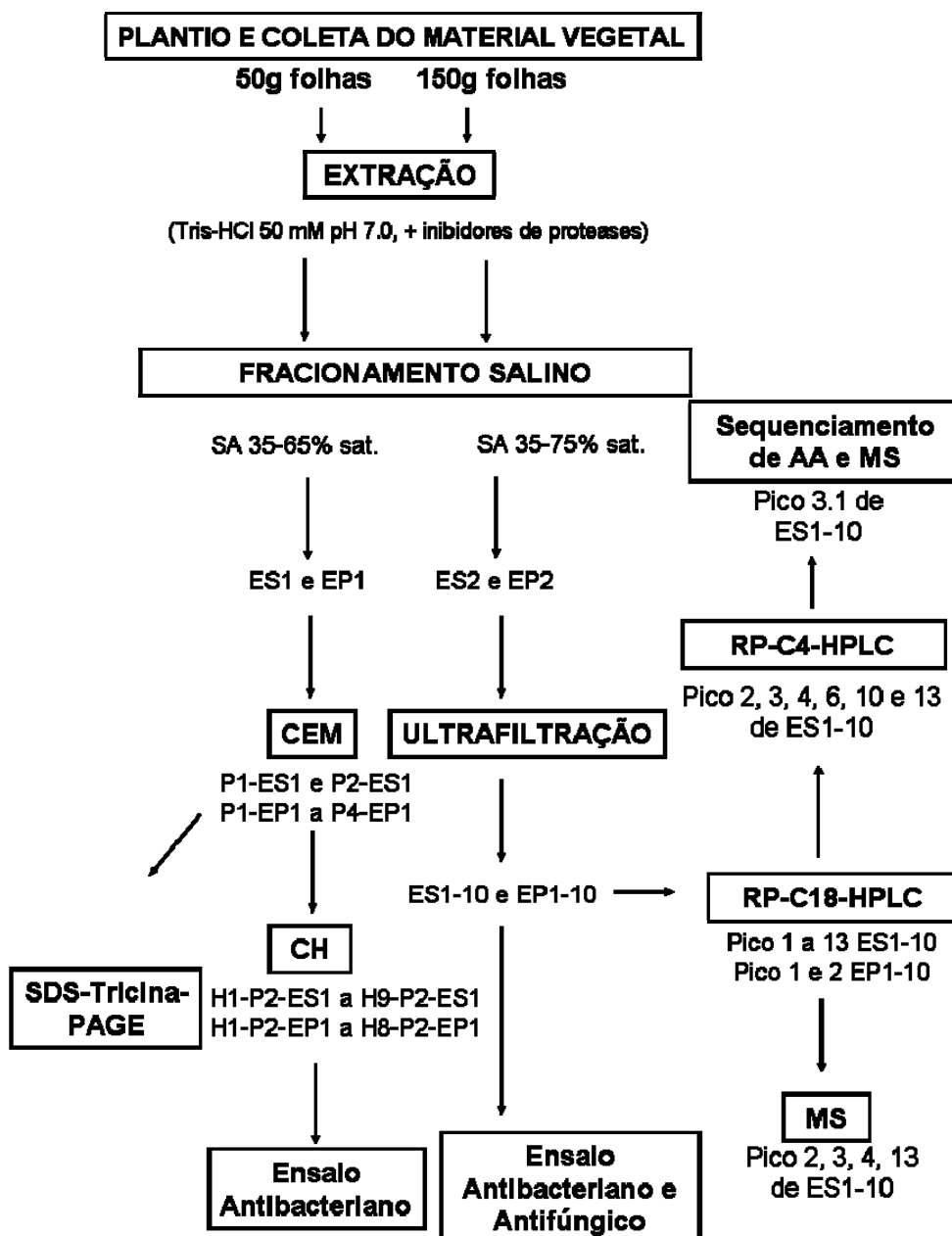
Wang, H., Lu, Y., Zhang, X., Hu, Y., Yu, H., Liu, J., Sun, J. (2009) The novel antimicrobial peptides from skin of Chinese broad-folded frog, *Hylarana latouchii* (Anura:Ranidae) *Peptides* 30:273-282.

Yannick, G., Bernard, R., Julie, F., Paulina, S., Delphine, D. G., Franck, V., Philippe, B., Evelyne, B. (2009) Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Molecular Immunology* 46 516–522.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.

Zhang, B., Xie, C., Yang, X. (2008) A novel small antifungal peptide from *Bacillus* strain B-TL2 isolated from tobacco stems. *Peptides* 29:350-355.

Apêndice 1 - Fluxograma representativo dos procedimentos experimentais utilizados. CEM: cromatografia de exclusão molecular; CH: cromatografia hidrofóbica; MS: espectrometria de massa; RP-C₁₈-HPLC: fase reversa em resina C₁₈ em *High Performance Liquid Chromatography*; RP-C₄-HPLC: fase reversa em resina C₄; AA: aminoácidos.



Apêndice 2 - Fluxograma representativo dos procedimentos experimentais utilizados. MS: espectrometria de massa; RP-C₁₈-HPLC: fase reversa em resina C₁₈ em *High Performance Liquid Chromatography*; RP-C₄-HPLC: fase reversa em resina C₄; AA: aminoácidos.

