



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LÍVIA MARIA BATISTA VILELA

**SELEÇÃO DE GENES DAS CLASSES PR PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS (AMPs) A PARTIR DE PLANTAS DA FAMÍLIA FABACEAE**

Recife

2018

LÍVIA MARIA BATISTA VILELA

**SELEÇÃO DE GENES DAS CLASSES PR PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS (AMPs) A PARTIR DE PLANTAS DA FAMÍLIA FABACEAE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração:
Biotecnologia/Biologia Celular e Molecular

Orientador(a): Dr^a Ana Maria Benko Iseppon

Coorientadores: Dr^a Cláudia Sampaio de Andrade Lima
Dr. Sergio Crovella

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Vilela, Livia Maria Batista

Seleção de genes das classes PR para obtenção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) a partir de plantas da família Fabaceae / Livia Maria Batista Vilela - 2018.

157 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ana Maria Benko-Iseppon

Coorientadores: Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Sergio Crovella

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndices.

1. Fabaceae 2. Defensina 3. Atividade antimicrobiana.

I. Benko-Iseppon, Ana Maria (orient.) II. Lima, Cláudia Sampaio de Andrade (coorient.) III. Crovella, Sergio (coorient.) IV. Título

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-294

LÍVIA MARIA BATISTA VILELA

**SELEÇÃO DE GENES DAS CLASSES PR PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS (AMPS) A PARTIR DE PLANTAS DA FAMÍLIA FABACEAE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 23/07/18.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Benko Iseppon
(Orientadora - Departamento de Genética Vegetal – UFPE)

Prof^o. Dr. Antônio Mauro Rezende
(Examinador Externo - Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães – Fiocruz)

Dr^a. Isabelle Freire Tabosa Vianna
(Examinador Externo - Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães – Fiocruz)

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Paiva Guedes
(Examinador Interno – Departamento de Bioquímica – UFPE)

Prof^o. Dr. João Pacífico Bezerra Neto
(Examinador Interno – Departamento de Genética Vegetal – UFPE)

Dedico este trabalho a Deus, por ter sido o meu supremo mentor, a toda minha família: meu esposo Carlos André e meus pais Maria José e Leonardo, bem como aos meus irmãos Lécio, Laelson, Leide Jane e Lidiane.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, por toda força, incentivo e inspiração. Meu Senhor e meu Deus, não tenho nem palavras para agradecer o que o Senhor fez na minha vida! Muito obrigada por ter realizado um dos meus maiores sonhos!

A minha orientadora Dr.^a Ana Maria Benko Iseppon pela imensa oportunidade dada, pela construção do conhecimento, pela confiança, exemplo de competência e por estar sempre presente e disposta a me ajudar, o meu muito obrigada!

Ao meu coorientador professor Dr. Sérgio Crovella pela oportunidade, incentivo e experiências vividas.

To my supervisor during the doctorate sandwich in Italy, professor Dr. Alessandro Tossi for the given support, guidance and knowledge gained.

A minha coorientadora Cláudia Sampaio pela oportunidade dada.

Ao meu esposo e companheiro de pesquisa Carlos André, por estar presente em todos os momentos, pela aprendizagem e contribuição científica, pelos conselhos e ombro amigo, incentivo e por sempre acreditar em mim e na conclusão deste trabalho, muitíssimo obrigada!

Aos meus pais, Leonardo e Maria José, pela paciência, amor e incentivo.

Aos meus irmãos: Lidiane, Leide Jane, Laelson e Lécio, pela compreensão, paciência e incentivo.

A minha avó pela sua paciência e todas as bênçãos desejadas.

A todos os meus familiares e amigos, pela paciência e compreensão por inúmeras vezes ter me ausentado.

A minha amiga Jéssica Barbosa, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas, experiências vividas e por estar sempre disposta a ajudar, muito obrigada!

Ao meu amigo Marx pela aprendizagem, contribuição científica e disponibilidade em ajudar.

Ao meu amigo João Pacífico pela força, conselhos, experiências vividas e contribuição científica.

A minha amiga Roberta, pela construção do conhecimento e ajuda nos experimentos, pelas conversas, experiências vividas e disponibilidade em ajudar.

A Vanessa Cristina, pelos conselhos e acolhimento.

Aos alunos de iniciação científica Lucas Matos e Thaís Ferreira pela ajuda nos experimentos e por ajudarem principalmente nas etapas iniciais do trabalho.

Aos meus amigos de pesquisa do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal que levarei para toda a vida: Flávia Araújo, Mitalle, Artemisa, Carol e todos os outros membros, pela aprendizagem vivida.

Ai miei amici del Laboratorio di Scienze della Vita di Trieste (Italia), in particolare la mia amica Ottavia per l'apprendimento, le conversazioni, l'incoraggiamento e per le conoscenze acquisite durante il dottorato, così come le amiche Sharade e Giulia, per averle conosciute e per le esperienze vissute insieme.

Ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV), onde foram desenvolvidas a maioria das análises, pela experiência vivida e construção do conhecimento.

Ao Laboratório de Biofísica Química (LBQ), pelo espaço, materiais e equipamentos cedidos, bem como a experiência vivida com os colegas Rafael Padilha, Renan, Natália Onofre, Isabella e todos os membros na construção do conhecimento.

Ao Laboratório de Bioquímica, na pessoa da professora Patrícia Paiva, professor Tiago Henrique e doutora Polyanna, pelo apoio e ajuda nos experimentos, espaço, materiais e equipamentos cedidos e pela experiência vivida.

Ao engenheiro agrônomo Arci, pela ajuda na parceria das coletas do material vegetal, pelas conversas e experiências vividas.

Ao seu Jacó, que tanto nos ajudou nas coletas de material vegetal realizadas, pela aprendizagem e experiências vividas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e seus professores, pela aceitação e conhecimentos transmitidos.

A Adenilda e Marcelo pelo apoio técnico administrativo cedido.

A FACEPE pelo apoio financeiro durante o doutorado.

A Capes pelo financiamento da bolsa de doutorado sanduíche (o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001).

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada!

RESUMO

A flora tropical, incluindo a do Brasil, abriga uma imensa diversidade vegetal, incluindo diversos ecossistemas, cada um deles compreendendo espécies adaptadas e em muitos casos endêmicas, com enorme potencial fitoterápico e biotecnológico. Apesar dessas potencialidades, há poucos estudos envolvendo a prospecção de moléculas bioativas da flora dos trópicos. Alternativas naturais ou baseadas em modelos moleculares encontradas na natureza têm ganhado destaque pelo potencial gerador de moléculas bioativas capazes de combater microrganismos resistentes. Diante disso, os peptídeos antimicrobianos (AMPs, *Antimicrobial Peptides*) destacam-se por seu importante papel na defesa contra infecções microbianas (especialmente bactérias e fungos) em eucariotas multicelulares, sendo considerados menos susceptíveis aos processos de resistência bacteriana do que os antibióticos tradicionais, com potencial para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes terapêuticos. A família Fabaceae destaca-se por possuir uma grande diversidade biológica e um significativo arsenal em moléculas bioativas. A espécie *Cajanus cajan* é uma leguminosa de grande importância nutricional e de interesse econômico, utilizada na medicina popular brasileira. Apresenta genoma sequenciado e depositado em banco de dados, tornando-se disponível para estudos funcionais e estruturais. O presente trabalho objetivou identificar e isolar genes codificantes de AMPs da família Fabaceae, além de avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de espécies dessa família. Foram amplificadas oito sequências de *C. cajan* via PCR a partir do DNA genômico foliar. Dentre essas, quatro apresentaram similaridade com defensinas. Os peptídeos identificados foram convertidos em sequências proteicas e submetidos à modelagem tridimensional por homologia 3D. Uma entre as quatro defensinas foi reduzida mantendo-se uma ponte dissulfídica a fim de obter um peptídeo de menor peso molecular, sendo enviada para síntese. Testes antimicrobianos realizados apresentaram resultados promissores, com uma MIC de 16 e 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cepas de *S. aureus* ATCC e resistente, respectivamente e 256 e 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa* ATCC e resistente. A atividade bactericida (MBC) foi 64 e >1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus* ATCC e resistente, respectivamente e 512 e >1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *P. aeruginosa* ATCC e resistente. Diante do exposto, o peptídeo sintetizado no âmbito deste trabalho,

corresponde a um candidato promissor, com potencial para o futuro desenvolvimento de um novo composto antimicrobiano.

Palavras-chave: Proteína Relacionada à Patogênese (PR). Defensina. Modelagem. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The tropical flora, including the Brazilian one, is home to immense plant diversity, including several ecosystems, each comprising species highly adapted and in many cases endemic, with enormous phytotherapeutic and biotechnological potential. Despite these potentialities, there are still few studies involving the prospection of bioactive molecules of the tropical flora. Natural alternatives or candidates based on model molecules found in nature have gained prominence due to their potential to generate bioactive molecules capable of fighting resistant microorganisms. In this scenario, antimicrobial peptides (AMPs) stand out for their important role in defense against microbial infections (especially bacteria and fungi) in multicellular eukaryotes, being considered less susceptible to bacterial resistance than traditional antibiotics, with potential for the development of a new class of therapeutic agents. The Fabaceae family stands out for having a great biological diversity and a significant arsenal in bioactive molecules. The *Cajanus cajan* legume species is of nutritional importance and economic interest, being used in Brazilian popular medicine. It presents a sequenced genome that is deposited in a database, making it available for functional and structural studies. The present work aimed to identify and isolate AMP coding genes from the Fabaceae family, besides evaluating the antimicrobial activity of extracts of species of this family. Eight sequences of *C. cajan* were amplified via PCR from foliar genomic DNA. Among these, four presented similarity with defensins. The identified peptides were converted into protein sequences and submitted to homology 3D modeling. One of the four defensins was reduced by maintaining a disulfide bridge in order to obtain a lower molecular weight peptide used as template for synthesis. Antimicrobial tests performed showed very promising results, with a MIC of 16 and 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for strains of *S. aureus* ATCC and resistant, respectively, and 256 and 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for *P. aeruginosa* ATCC and resistant. The bactericidal activity (MBC) was 64 and >1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for *S. aureus* ATCC and resistant, respectively, whereas for *P. aeruginosa* ATCC and resistant it regarded 512 and >1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Considering the results, the peptide synthesized in this work can be considered as a promising candidate, with potential for the future development of a new antimicrobial compound.

Key words: Pathogenesis Related (PR) Protein. Defensin. Modeling. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Espécies de relevância econômica e nutricional da família Fabaceae (a) *Pisum sativum*; (b) *Caesalpinia echinata*; (c) grãos de *Glycine max* (d) *Cajanus cajan* (e) grãos de espécies diversas do gênero *Phaseolus*. Fonte: <https://www.google.com.br/imghp?hl=pt-BR&tab=wi>..... 25
- Figura 2 - Interações da Resistência Sistêmica Adquirida com diferentes tipos de patógenos. As plantas normalmente reagem contra agentes patogênicos biotróficos ativando a via do ácido salicílico (SA) e produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS). Esta ação pode levar a uma resposta hipersensível localizada com consequente morte celular programada a fim de isolar os agentes patogênicos e evitar a proliferação para as demais partes da planta, ativando também a SAR. As vias do ácido jasmônico (JA) e do etileno (ET) uma vez ativadas, contrapõem-se à via SA, evitando a morte celular programada, sendo então ativadas para lidar com patógenos necrotróficos e predação por insetos. (Adaptado de CHEN et al. (2014))..... 31
- Figura 3 - Peptídeos antimicrobianos naturais caracterizados por grupos estruturais. (A) α -hélice; (B) pino-pino; (C) Motivo cisteína; (D) CS $\alpha\beta$ (β -defensina 1 humana); (E) α -hairpinin; (F) Estrutura estendida em forma de barco. Os peptídeos estão representados como fita plana: α -hélice (vermelho); Folhas β (azul); Loop (verde); espiral aleatório (cinza). As cadeias laterais de cisteína estão representadas como bastão e as pontes dissulfeto em amarelo. Fonte: Hansen (2017)..... 38
- Figura 4 - Esquema geral da síntese de peptídeos de plantas..... 40
- Figura 5 - Sistemas de membrana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e os mecanismos de ação de AMPs na membrana citoplasmática. Em bactérias Gram negativas, os AMPs precisam permeabilizar a membrana exterior da célula antes de penetrar a membrana citoplasmática; já em Gram positivas, os AMPs

	necessitam apenas penetrar pela camada de peptidoglicanos formando nanoporos. Infiltrado na membrana citoplasmática, eles podem agir através da formação de poros em barril, poro toroidal, ou desfragmentando a membrana. Fonte: Adaptado de Li et al. (2017).....	46
Figura 6 -	Esquema resumido da síntese de peptídeos em fase sólida.....	48
Figura 7 -	Alinhamento múltiplo do domínio conservado (<i>Gama-thionin</i>) de defensinas identificadas em <i>C. cajan</i> . As linhas acima do alinhamento predizem as possíveis pontes dissulfeto indicadas pelo <i>Disulfind</i> e <i>DIANNA</i> . Em azul, estão representadas as regiões conservadas dentro do peptídeo maduro. Abaixo do alinhamento encontra-se a predição da estrutura secundária onde é possível observar três folhas-beta (setas em lilás) e uma alfa hélice (espiral em verde). Abaixo da estrutura secundária encontram-se o gráfico de conservação e a sequência-consenso do alinhamento.....	71
Figura 8 -	Análise fenética gerada a partir de sequências de defensinas de plantas (Tabela 3. Material suplementar). Árvore gerada utilizando o método de Neighbor-Joining com valor de bootstrap em nível de 2000 replicações. Os números dos ramos representam os valores de bootstrap obtidos. As cores verde, azul, violeta e vermelho escuro dos ramos representam os grupos. Os números 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, representam os subgrupos formados na análise fenética..	74
Figura 9 -	Modelagem 3D das Def_Caj1, Def_Caj2 e Def_Caj5 sobrepostos. (A) Sobreposição dos modelos destacando a conservação das estruturas tridimensionais (em azul as estruturas similares entre os modelos, em vermelho as regiões diferentes entre os modelos); (B) Sobreposição dos modelos mostrando a similaridade entre as sequências de aminoácidos (em azul os aminoácidos conservados e em vermelho os aminoácidos não conservados); (C) Sobreposição dos modelos mostrando o modelo Caj1 em amarelo, Caj2 em vermelho e Caj5 em azul e as quatro pontes dissulfeto em verde.....	76

Figura 10 - Modelagem 3D das Def_Caj1 (A) e Def_Caj2 (B) e Def_Caj5 (C) evidenciando o potencial eletrostático de superfície. Em azul resíduos carregados positivamente; em vermelho resíduos carregados negativamente; em branco resíduos apolares e em verde resíduos neutros polares.....	77
Figura 11 - Gráfico de Ramachandran das Def_Caj1, Def_Caj2 e da Def_Caj5, respectivamente. As regiões em vermelho indicam as áreas favoráveis ao dobramento do peptídeo em relação à posição dos aminoácidos.....	78
Figura 12 - Eficiência dos genes de referência nos diferentes tecidos analisados.....	81
Figura 13 - Valores médios de estabilidade de expressão gerado pelo GeNorm.....	85
Figura 14 - Determinação do número de genes de referência ideal para normalização dos dados de expressão.....	85
Figura 15 - Curva de eficiência dos genes alvos (Caj1 e Caj4).....	87
Figura 16 - Expressão relativa dos Caj1 e Caj4 nos tecidos alvo.....	87
Figura 17 - Graphics of DM analyzes of the three models generated. A and B show the Root Mean Square Deviation (RMSD) in overlap. In C the Root Mean Square Fluctuation (RMSF) of the amino acid residues of each model. In D, number of beta-sheets.....	104
Figura 18 - Graphics of the Dictionary of Protein Secondary Structure (DSSP) showing in red the beta sheets of the three models tested. To the right the 3D structure of the three models showing in blue the cationic surface of the models generated.....	105
Figura 19 - 3D model of 1GPT and PDef-Caj1. In A the model of the PDB (1GPT), in B the model PDef-Caj1. In C the predominant cationic surface charge (in blue) of the PDef-Caj1, in red the anionic wastes. In D the antiparallel beta-sheets overlap of 1GPT and PDef-Caj1 with a RMSD of 0.59 nm.....	106
Figura 20 - CD spectra of PDef-Caj1. The spectra were taken for a 20 μ M solution in the following conditions: (—) black: water; (—) blue: 10 mM SDS (micelles); (—) red: 50% TFE in water. Spectra are the mean of three scans and subject to smoothing.....	107

Figura 21 - Cellular viability (in %), considering different concentrations of PDef-Caj1 against rat macrophage cells.....	109
Figura 22 - Hemolytic activity test of Pdef-Caj1 in different concentrations.....	109
Figura 23 - RP-HPLC chromatograms. Acids extracts and Fractions monitoring at 214 (violet), 250 (red) and 280 (blue) nm.....	129
Figura 24 - Mass spectrometry of the acids extracts or RP-HPLC fractions of the <i>Mimosa candollei</i> and <i>Amburana cearensis</i>	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Peptídeos identificados em espécies de Fabaceae com atividade antimicrobiana.....	53
Tabela 2 -	Sequências de primers forward e reverse utilizados para a caracterização molecular de defensinas.....	66
Tabela 3 -	Predição de atividade antimicrobiana das oito sequências de defensinas identificadas no genoma de <i>Cajanus cajan</i> . Sigla das abreviações dos programas: SVM= <i>Support Vector Machine</i> ; RFC= <i>Random Forest Classifier</i> ; ANN= <i>Artificial Neural Network</i> ; DAC= <i>Discriminant Analysis Classifier</i>	72
Tabela 4 -	Genes de referência e genes alvos, anotações e sequências dos primers.....	82
Tabela 5 -	Parâmetros provenientes da análise de RT-qPCR.....	83
Tabela 6 -	Valores obtidos pela análise dos softwares NormFinder e BestKeeper para os GRs.....	86
Tabela 7 -	Predição de atividade antimicrobiana utilizando os quatro algoritmos do software CAMPR ₃	102
Tabela 8 -	Number of generated models and their respective disulfide bonds.....	103
Tabela 9 -	Energy values of the three models tested in MD.....	105
Tabela 10 -	Antimicrobial activity of PDef-Caj1 against different pathogens tested, considering Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) for each tested strain.....	108
Tabela 11 -	Phytochemical constituents of Fabaceae extracts.....	127
Tabela 12 -	Percentage inhibition (%) of the bacteria by plant ethanol extract.....	131
Tabela 13 -	Antimicrobial activity of acid extract of plants of the family Fabaceae (10 mg.mL ⁻¹).....	133

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AMP	<i>Antimicrobial peptides</i> (peptídeo antimicrobiano)
ANN	<i>Artificial Neural Network</i> (Rede neural artificial)
AVR	<i>Avirulence factor</i> (fator de virulência)
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i> (Ferramenta básica de busca de alinhamento local)
C-C	Ponte dissulfeto
cDNA	DNA complementar
CFU	<i>Colony forming units</i> (Unidades formadoras de colônia)
CS $\alpha\beta$	<i>Cysteine Stabilized $\alpha\beta$</i> (Cisteína $\alpha\beta$ estabilizada)
Cys	<i>Cysteine</i> (cisteína)
DAC	<i>Discriminant Analysis Classifier</i> (Classificador de Análise Discriminante)
DAMPS	<i>Damaged associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a danos)
DMSO	Dimethyl sulfoxide (Dimetilsulfóxido)
DOPE	<i>Discrete optimized protein energy</i>
DSSP	<i>Dictionary of Secondary Structure for Proteins</i> (Dicionário de Estrutura Secundária para Proteínas)
ETI	<i>Effector triggered immunity</i> (Imunidade desencadeada por efetor)
Fmoc	<i>Fluorenylmethyloxycarbonyl</i> (Fluorenilmetiloxicarbonilo)
Gly	<i>Glycine</i> (Glicina)
His	<i>Histidine</i> (Histidina)
HR	<i>Hypersensitive response</i> (Resposta hipersensitiva)
IR	Complexo insulina proteico
KDa	Quilodalton
LC-MS	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i> (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa)
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i> (lipopolissacarídeos)
LPWG	<i>Legume Phylogeny Working Group</i> (Grupo de trabalho de filogenia de leguminosas)

LRR	<i>Leucine-Rich Repeat</i> (Repetição rica em leucina)
LTPs	<i>Lipid transport proteins</i> (Proteínas transportadoras de lipídeo)
MALDI TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of flight</i> (Ionização assistida por dessorção a laser matricial por tempo de voo)
MAMPs	<i>Microbial associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a micróbios)
MBC	<i>Minimal bactericidal concentration</i> (Concentração bactericida mínima)
MH	<i>Müller Hinton</i>
MHA	Ágar Müller Hinton
MOPS	<i>Sulphonic morpholinopropane acid</i> (Ácido morfolinopropano sulfônico)
matK	<i>Megakaryocyte-Associated Tyrosine Kinase</i> (Tirosina quinase associada a megacariócitos)
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> (Concentração mínima inibitória)
miRNA	microRNA
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometria de Massa)
NBS-LRR	<i>Nucleotide-binding site leucine-rich repeat</i> (sítio de ligação nucleotídica com repetição rica em leucina)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informação em Biotecnologia)
ncRNAs	<i>Non-coding RNA</i> (RNA não codificante)
NJ	<i>Neighbor Joining</i>
NPAA	<i>Non-protein amino acids</i> (aminoácidos não proteicos)
ORF	<i>Open reading frame</i> (quadro de leitura aberta)
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a patógenos)
PDB	<i>Protein database</i> (Banco de dados de peptídeos)
PPV	<i>Personalized peptide vaccination</i> (Vacinação peptídica personalizada)
PR	<i>Pathogenesis-related</i> (relacionado à patogênese)
PSK	<i>Phytosulfuron</i> (Fitossulfokina)
PSI-BLAST	<i>Position-Specific Iterated BLAST</i>
PTI	<i>Immunity triggered by PAMP</i> (Imunidade desencadeada por PAMP)

RFC	<i>Random Forest Classifier</i>
RMN	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear)
RMSD	<i>Root mean square deviation</i> (Desvio quadrado médio)
RMSF	<i>Root mean square fluctuation</i> (Flutuação da raiz quadrada média)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécie reativa de oxigênio)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RP-HPLC	<i>Reversed-Phase High-performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa)
SAR	<i>Acquired systemic resistance</i> (Resistência sistêmica adquirida)
SDA	<i>Sabouraud dextrose agar</i> (Ágar sabouraud dextrose)
SVM	<i>Support Vector Machine</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecilsulfato de sódio)
sPEPs	<i>Short peptides encoded by ORFs</i> (Peptídeos curtos codificados por ORFs)
SPPS	<i>Synthesis of solid phase peptides</i> (síntese de peptídeos de fase sólida)
TA	<i>Theoicoic acid</i> (Ácido teicóico)
TM-score	<i>Template modeling score</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	OBJETIVOS.....	22
1.1.1	Geral.....	22
1.1.2	Específicos.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	FAMÍLIA FABACEAE.....	24
2.1.1	Taxonomia e diversidade.....	24
2.1.2	Importância Agroeconômica e medicinal.....	26
2.2	DEFESA VEGETAL CONTRA PATÓGENOS.....	28
2.2.1	Resposta hipersensível (HR).....	29
2.2.2	Resistência Sistêmica Adquirida (SAR).....	30
2.2.3	Metabólitos secundários em plantas.....	32
2.3	PRINCIPAIS GENES DE DEFESA VEGETAL.....	33
2.3.1	Genes R (<i>Resistance</i>).....	34
2.3.2	Genes PR (<i>Pathogenesis Related</i>).....	35
2.4	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPS) DE PLANTAS.....	36
2.4.1	Classificação.....	36
2.4.2	Origem e estrutura dos AMPs.....	39
2.4.3	Defensinas.....	40
2.4.4	Mecanismos de ação dos AMPs de plantas.....	43
2.4.5	Síntese de peptídeos.....	46
2.4.6	Potencial terapêutico/farmacêutico.....	48
2.4.7	Peptídeos identificados em Fabaceae.....	51
2.4.8	Purificação de peptídeos.....	54
2.4.9	Resistência de AMPs contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.....	57
2.4.10	Ferramentas de Bioinformática na construção de modelos estruturais.....	58
3	NOVAS DEFENSINAS DE <i>CAJANUS CAJAN</i>: IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO.....	61

4	NOVEL ANTIMICROBIAL PEPTIDE MODIFIED FROM DEFENSIN <i>CAJANUS CAJAN</i> WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY.....	95
5	PROSPECTING OF BIOACTIVE MOLECULES WITH ANTIMICROBIAL POTENTIAL FROM PLANTS OF THE FABACEAE FAMILY.....	119
6	CONCLUSÕES.....	140
	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	141
	REFERÊNCIAS.....	142
	APÊNDICE A - SEQUÊNCIAS SONDA COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PREDITA NO PHYTAMP.....	154
	APÊNDICE B - CONTIG E SINGLET DE DEFENSINAS DE FABACEAE.....	155
	APÊNDICE C - DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA FABACEAE UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO.....	156
	APÊNDICE D - SEQUÊNCIAS DE DEFENSINAS VEGETAIS UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FENÉTICA.....	157

1 INTRODUÇÃO

As plantas superiores (angiospermas) estão presentes em todos os ecossistemas, cada um deles compreendendo espécies adaptadas e em muitos casos endêmicas, com enorme potencial fitoterápico e biotecnológico (BENKO-ISEPPON E CROVELLA, 2010). Apesar destas potencialidades, ainda há poucos estudos envolvendo a prospecção de peptídeos antimicrobianos e outras moléculas bioativas da flora de países tropicais (WINK, 2016). Entre os processos celulares de destaque em vegetais, chamam a atenção os mecanismos de resistência naturais na defesa contra o ataque de patógenos, incluindo barreiras morfológicas, síntese de metabólitos secundários (por exemplo, fitoalexinas) e de proteínas antimicrobianas que, em combinação, prejudicam ou impedem a invasão de patógenos (BENKO-ISEPPON et al., 2010).

Entre os grupos vegetais de grande relevância, a família Fabaceae é reconhecida na literatura como portadora de moléculas fitoquímicas bioativas (GÜÇLÜ-USTÜNDAĞ E MAZZA, 2007; AHUJA et al., 2012), além da capacidade de suas raízes em fixar nitrogênio, ajudando na reposição dos nutrientes e manutenção do solo, bem como beneficiando a agricultura sustentável (WINK, 2013). Esta família também é conhecida pelo seu número de espécies, sendo a terceira maior família dentre as angiospermas (AZANI et al., 2017). Suas espécies são conhecidas pelo potencial etnobotânico e uso na medicinal popular, assim como na indústria farmacológica apresentando benefícios como, atividades associadas ao tratamento de afecções do aparelho gastrointestinal, incluindo a ação de metabólitos secundários conhecidos como saponinas, com outros inúmeros benefícios descritos na literatura (GULEWICZ et al., 2014). Além disso, as leguminosas detêm uma relevante movimentação nas exportações mundiais totais no mercado agroeconômico e suas culturas colhidas na forma de sementes secas mais que dobraram entre 1990 e 2012, passando de 6,6 para 13,4 milhões de toneladas, sendo que em 2012 o valor dessas exportações foi estimado em US\$ 9,5 bilhões (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS "OCDE/FAO", 2015).

As técnicas de biotecnologia, aliadas ao melhoramento genético podem contribuir significativamente para o aumento do desenvolvimento vegetativo e da biomassa das plantas, fornecendo suporte para as exigências atuais e futuras de

segurança alimentar, o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e a preservação dos recursos naturais (RUANE E SONNINO, 2011). A utilização dessas técnicas tem trazido benefícios, porém, o uso indiscriminado de pesticidas e antibióticos em alimentos, associado ao uso inadequado de antibióticos em terapias clínicas, têm gerado a aquisição de resistência em microrganismos que acometem vegetais e animais, incluindo humanos. Tal resistência tem sido motivo de preocupação, tornando-se um dos principais anseios da medicina terapêutica que luta contra a alarmante crise de resistência aos antibióticos já consolidados no mercado farmacêutico (CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (US), 2013).

Diante disso, alternativas naturais ou baseadas em modelos moleculares encontrados na natureza têm ganhado destaque pela grande fonte geradora de moléculas bioativas capazes de combater microrganismos resistentes. Dentre as fontes naturais, os peptídeos antimicrobianos (AMPs, *Antimicrobial Peptides*) destacam-se por seu importante papel na defesa contra infecções microbianas (especialmente bactérias e fungos) em eucariotos multicelulares. Tais compostos são considerados menos susceptíveis aos processos de resistência bacteriana do que os antibióticos tradicionais, apresentando potencial para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes terapêuticos (CÂNDIDO et al., 2014).

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar, isolar e avaliar AMPs de membros da família Fabaceae, fornecendo conhecimentos sobre suas principais características moleculares, estruturas conformacionais, expressão tecidual, bem como sua potencial atividade antimicrobiana.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Identificar, caracterizar e avaliar peptídeos antimicrobianos responsáveis pela defesa contra o ataque de patógenos em no mínimo duas espécies selecionadas da família Fabaceae, inferindo sobre sua estrutura, função, expressão diferencial e potencial antimicrobiano, com vistas a futuro uso agropecuário ou medicinal.

1.1.2 Específicos

- Selecionar duas espécies da família Fabaceae com base na bibliografia etnobotânica especializada e na facilidade de obtenção e cultivo das espécies candidatas.
- Avaliar perfis cromatográficos e fitoquímicos das espécies selecionadas, avaliando a abundância e diversidade das moléculas observadas.
- Selecionar e analisar a diversidade de sequências dos principais peptídeos-alvo usando-as como sonda (*seed-sequences*) para a identificação de ortólogos nos bancos de dados públicos e de acesso restrito envolvendo leguminosas tropicais.
- Identificar e descrever os domínios, assinaturas e regiões conservadas das sequências identificadas, comparando-as com os depositados nos bancos de dados, bem como reconhecer e analisar quadros de leitura aberta das sequências selecionadas, inferindo sobre seus padrões estruturais.
- Isolar genes envolvidos na defesa das espécies de interesse via amplificação, clonagem e sequenciamento dos produtos obtidos, permitindo inferências sobre sua estrutura genômica, análise de ORF, predição funcional e modelagem molecular.
- Analisar o padrão de expressão dos genes identificados como diferencialmente expressos *in silico*, através da técnica de RT-qPCR, utilizando bibliotecas de DNA complementar (cDNA) disponíveis a partir de diferentes tecidos das referidas espécies submetidas a inoculação por patógenos.
- Sintetizar pelo menos um peptídeo previamente identificado e sequenciado a partir de uma espécie da família Fabaceae.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos selecionados contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos selecionados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA FABACEAE

2.1.1 Taxonomia e diversidade

A família Fabaceae é conhecida por ser uma das grandes famílias de plantas floríferas do reino vegetal sendo a terceira maior dentre as angiospermas, sendo superada apenas pelas Asteraceae e Orchidaceae (AZANI et al., 2017) comportando uma diversidade de mais de 770 gêneros e entre 19.000 e 19.700 espécies. Apresenta grande diversidade fenotípica (Figura 1), incluindo árvores, arbustos e ervas que colonizam os mais diversos habitats (LEWIS, 2005; HERENDEEN et al., 2013). Esta família também é alternativamente conhecida por Leguminosae, nome originado da literatura europeia antiga, relativa à característica do fruto em forma de vagem desta família (LEWIS, 2005).

De acordo com dados filogenéticos moleculares e morfológicos, a família Fabaceae é um grupo monofilético (LEWIS, 2005; WERNER et al., 2014), sendo seus gêneros agrupados em 36 tribos e três subfamílias, sendo elas as subfamílias Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae, tomando por base as diferenças de divisão foliar, tipo de inflorescência e morfologia floral (LEWIS, 2005). Os membros de Caesalpinioideae são agrupados em quatro tribos, a Caesalpinieae, Cassieae, Cercideae e Detarieae que compõem 170 gêneros e 2250 espécies. A subfamília Mimosoideae é agrupada em duas tribos, a Ingeae e Mimoseae com 80 gêneros e 3270 espécies, enquanto a Papilionoideae consiste de 28 tribos com 480 gêneros e 13800 espécies (ANDREWS E ANDREWS, 2017).

Uma recente classificação da família de leguminosas proposta por Azani et al. (2017) reconhece seis subfamílias monofiléticas com base nas sequências de genes matK plastidiais, incluindo amostragem de sequências que representam 3696 das cerca de 19500 espécies conhecidas e 698 dos 765 gêneros reconhecidos. As seis subfamílias propostas são as recircunscritas Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae e Papilionoideae. Nesta classificação, a subfamília Mimosoideae é reconhecida como um clado distinto aninhado dentro da recircunscrita Caesalpinioideae.

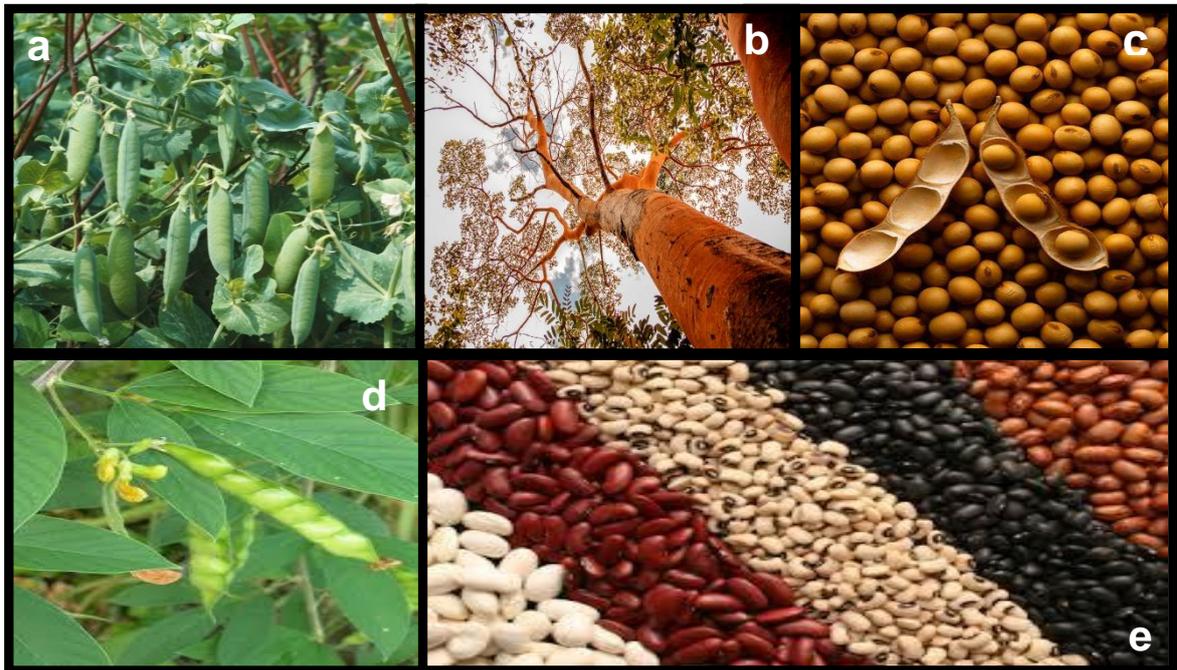


Figura 1 - Espécies de relevância econômica e nutricional da família Fabaceae (a) *Pisum sativum*; (b) *Caesalpinia echinata*; (c) grãos de *Glycine max* (d) *Cajanus cajan* (e) grãos de espécies diversas do gênero *Phaseolus*. Fonte: <https://www.google.com.br/imghp?hl=pt-BR&tab=wi>

Espécies da família Fabaceae foram introduzidas em diversas regiões e continentes através da ação antropogênica (RICHARDSON et al., 2011). No entanto, evidências morfológicas e moleculares também mostram que a capacidade dessa família em realizar simbiose rizobiana evoluiu de uma única origem há mais de 59 milhões de anos. Postula-se que sua origem foi seguida de ganhos e perdas frequentes na capacidade de fixar o nitrogênio simbioticamente através de clados múltiplos (WERNER et al., 2014) podendo-se assim comparar diretamente a permanência de espécies de Fabaceae simbióticas ou não em áreas não nativas. Um exemplo de leguminosa de importância nutricional, econômica e ecológica é a espécie *C. cajan* (ver Figura 1d), a qual foi introduzida no Brasil para cultivo, sendo originária da África.

Cajanus cajan é cultivada em diversos países dos continentes Asiático, Africano e Americano, sendo utilizado para múltiplos fins, tanto na alimentação quanto como forrageira (TEKALE et al., 2016). Sua maior produção está situada na Índia com cerca de 73% de sua produção global (ALI, 1990). O *C. cajan* também é conhecido por suas propriedades antioxidantes, quelantes (ferro) e conteúdo

fenólico, como descrito por Tekale e colaboradores (2016). Seus estudos mostraram a atividade antioxidante utilizando o ensaio de eliminação de radicais do tipo DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazilo) mostrando 71,3% de inibição e 65,8% de atividade quelante de ferro. Cerca de 37 compostos químicos foram identificados, incluindo alguns peptídeos curtos (252 a 468 Da) extraídos da fração ativa purificada de sementes de *C. cajan*.

2.1.2 Importância Agroeconômica e medicinal

No âmbito econômico, a família Fabaceae é a segunda mais importante ficando atrás apenas da família Poaceae (Azani et al. 2017). Para isso, a domesticação de um conjunto de culturas alimentares de grande importância global foi realizada, tendo espécies como a soja (*Glycine max* L. Merr., ver Figura 1b), feijão (gênero *Phaseolus*, Figura 1e), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), lentilha (*Lens culinaris* Medik.), grão-de-bico (*Cicer arietinum* L., Figura 1c) e ervilha (*Pisum sativum* L., Figura 1a) bem consolidadas no mercado agroeconômico (Herendeen et al. 2013). Segundo a FAO (2015), os grãos de leguminosas fazem parte da alimentação básica no Brasil. Na última década, a produção de grãos variou entre 2,8 Mt (megatoneladas) e um recorde de 3,6 Mt alcançado em 2011, sendo o valor estimado das exportações brasileiras de US\$ 9,5 bilhões. Foi ainda estimado que até 2023/24, a produção deve permanecer estável em cerca de 3,2 Mt, podendo aumentar para cerca de 3,6 Mt.

As sementes de leguminosas são importantes fontes de proteínas (contêm cerca de 20% a 30% de proteína) e óleos, como, por exemplo, a soja (*G. max*) e o amendoim (*A. hypogaea*) que juntos produzem mais de 35% do óleo processado no mundo, além de gorduras rica em ácidos graxos insaturados, carboidratos, vitaminas e microelementos reconhecidos pelo valor nutricional (GRAHAM E VANCE, 2003; GULEWICZ et al., 2014). Além da importância nutricional das leguminosas, elas também são conhecidas pela importância ecológica na fixação do nitrogênio pela realização do processo de simbiose, pois, convertem o nitrogênio atmosférico em compostos nitrogenados úteis, utilizados no crescimento da planta a partir de bactérias do gênero *Rhizobium* presentes nos nódulos radiculares de espécies da família (AHMAD et al., 2016). São exemplos de leguminosas fixadoras de nitrogênio e essenciais na restauração florestal, melhoramento do solo e agroflorestamento

espécies dos gêneros *Calliandra* Benth., *Acaciella* Britton & Rose, *Gliricidia* Kunth, *Inga* Mill., *Leucaena* Benth. (HERENDEEN et al., 2013).

Em contrapartida, as leguminosas também podem causar problemas na dieta humana se não preparadas corretamente, devido às proteínas de armazenamento que são fontes de aminoácidos durante a germinação da planta (THIBEAULT et al., 2017). As leguminosas possuem uma limitação em aminoácidos sulfurados e contêm fatores antinutricionais, incluindo lectinas e fatores de flatulência, e são comumente difíceis de cozinhar (GRAHAM E VANCE, 2003). Nutricionalmente, essas proteínas são de difícil digestão em animais e pessoas, provocadas por suas propriedades estruturais. Além disso, algumas dessas proteínas têm sido associadas à alergia e intolerância alimentar (YAGAMI et al., 2015). A faseolina, uma proteína presente principalmente em feijões comuns, também é conhecida por ser resistente à digestão proteolítica (CARBONARO et al., 2000).

Árvores e arbustos de Fabaceae apresentam múltiplos usos, sendo selecionadas e aperfeiçoadas para o uso em forragem, ornamentação, combustível, fortalecimento do solo, para sombreamento de vias, além de serem usadas em grandes construções como casas, barcos, travessias ferroviárias, carpintaria, entre outras utilidades (LEWIS, 2005).

Outro aspecto funcional na família Fabaceae envolve seu potencial medicinal, que vem sendo explorado nas últimas décadas a fim de encontrar novas opções terapêuticas menos invasivas para tratamento de doenças e também como uma nova fonte de moléculas bioativas para a indústria farmacêutica. Além disso, evidências científicas indicam que dietas enriquecidas com grãos integrais e seus produtos podem reduzir doenças crônicas, obesidade, diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (MALAGUTI et al., 2014).

Em um estudo realizado por Mojica et al. (2017) foi obtido um extrato de feijão-preto (*Phaseolus vulgaris* L.) rico em antocianina que possui um potencial biológico para diminuir a geração de espécies reativas de oxigênio (> 80%). O extrato também mostrou potencial por inibir enzimas degradadoras de amido como α -glucosidase e α -amilase. A soma das bioatividades potenciais desse extrato rico em antocianinas contribui para o seu potencial antidiabético, podendo também servir como uma boa fonte de pigmentos naturais que poderiam substituir corantes sintéticos usados na indústria alimentícia, desta forma beneficiando a saúde do

consumidor. Kumar et al. (2015) realizaram um estudo a partir da semente em pó da espécie *Trigonella foenum graecum* associado ao ortovanadato de sódio (inibidor de proteínas). Sua ingestão resultou na diminuição da taxa de insulina no sangue de ratos. O resultado da associação do extrato em pó na alimentação dos camundongos, somado ao ortovanadato (administrado na água dos mesmos) durante três semanas apresentou uma significativa estabilização do sistema de defesa. Isto provavelmente ocorreu pelo potencial antioxidante testado no estudo, evidenciando que a terapia combinada serviu para a redução da taxa hiperglicêmica dos ratos tratados.

As saponinas presentes em leguminosas têm efeitos benéficos ao aparelho gastrointestinal (GULEWICZ et al., 2014), embora esses metabólitos sejam conhecidos como antinutrientes pela sua atividade hemolítica e por serem inibidores de enzimas digestivas, pesquisas atuais tem mostrado evidências promissoras sobre suas atividades hipocolesterolêmicas, anti-inflamatórias, antitumorais, imunomoduladoras, antibacterianas, antivirais, antifúngicas e antiparasitárias (GULEWICZ et al., 2014; SINGH et al., 2018).

2.2 DEFESA VEGETAL CONTRA PATÓGENOS

De maneira geral, as plantas possuem mecanismos específicos de defesa desenvolvidos ao longo de sua evolução, os quais continuam sendo modificados de acordo com o tipo de dano sofrido, sendo estes usualmente caracterizados por fatores físicos, químicos ou biológicos. Esses mecanismos de defesa diferem de acordo com o desenvolvimento da planta, tipo de invasão, dano causado ao longo de seu desenvolvimento ou de seus diversos estágios de vida (MACHO E ZIPFEL, 2014).

Como um componente específico, fundamental e primário na proteção contra fatores externos em plantas, a parede celular desempenha um importante papel na absorção e transporte de solutos, defesa, comunicação intercelular, regulação metabólica, detecção ambiental e crescimento (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2016) e ainda funciona como uma barreira mecânica que pode ser estimulada através de modificações de outros polímeros ligados à parede celular tais como suberina, lignina, calose e fenóis (DURRANT E DONG, 2004).

Em contrapartida, os patógenos desenvolveram inúmeros mecanismos de ação. As bactérias patogênicas, por exemplo, penetram nos poros gasosos ou aquosos (estômatos e hidatódios, respectivamente) e se multiplicam nos espaços intercelulares depois de penetrá-los, podendo ainda ter acesso ao meio intracelular através de feridas; os nematódeos e pulgões invadem a planta inserindo seu estilete na superfície da planta adentrando à célula vegetal; já os fungos podem invadir diretamente as células epidérmicas da planta, através da difusão de suas hifas. Assim, as diversas classes de patógenos liberam moléculas efetoras (fatores de virulência) no ato da invasão para melhorar sua aptidão microbiana (JONES E DANGL, 2006).

Diante dos ataques sofridos ao longo do seu ciclo vida, a planta depende da imunidade inata das células e dos sinais sistêmicos que emanam dos sítios de infecção ativados a partir de diversas vias metabólicas (AUSUBEL, 2005). A imunidade inata da planta está dividida em duas vertentes, uma está estritamente ligada à estratégia de defesa envolvida no conjunto de padrões de reconhecimento de receptores (PRRs), conhecidos como receptores de reconhecimento de patógenos ou padrões (MAMPS ou PAMPs) que reconhecem moléculas associadas ao patógeno; a outra vertente atua principalmente dentro da célula, usando os produtos polimórficos de proteínas de ligação de nucleotídeos ricas em leucina (NB-LRR) que são codificadas pela maioria dos genes *R* (JONES E DANGL, 2006); MOFFETT, 2009). Os chamados genes de Resistência (*R*) são responsáveis por ativar determinados mecanismos de defesa e por isso são essenciais para a sobrevivência da planta, pois representam a primeira interação entre a planta e o patógeno, podendo ativar também uma resposta hipersensível (HR), que por sua vez pode desencadear a resistência sistêmica adquirida (SAR) (BENKO-ISEPPON et al., 2010).

2.2.1 Resposta hipersensível (HR)

O sistema de defesa das plantas está associado a uma rede interligada de mecanismos que podem ser constitutivos ou induzidos (WANDERLEY-NOGUEIRA et al., 2017). Os mecanismos constitutivos são compostos intrínsecos ao crescimento da planta como hormônios, metabólitos primários, dentre outros. Por outro lado, os mecanismos induzidos podem ser desencadeados após tensões

causadas por danos mecânicos (como alimentação por herbívoros), permitindo a invasão de patógenos e disseminação de doenças por toda a planta (ASAI et al., 2017). A reação causada pelas defesas induzíveis pode desencadear diversas alterações moleculares, bem como bioquímicas e morfológicas, que podem ativar uma reação oxidativa, expressão de genes relacionados com a defesa, produção de compostos antimicrobianos, assim como a morte celular programada (VAN LOON et al., 2006).

De maneira geral, as respostas induzidas por PRRs estão ligadas a imunidade induzida por PAMP (PTI), sendo geralmente de pequena intensidade e suficientes para inferir resistência à maioria dos patógenos (CHISHOLM et al., 2006). Porém, agentes microbianos mantidos no hospedeiro são capazes de burlar os mecanismos da PTI através da ação das chamadas proteínas efetoras e quando isto acontece, uma segunda linha de defesa da planta é induzida e outro mecanismo de resistência é ativado, sendo chamado de imunidade desencadeada por efetor (ETI). Este tipo de mecanismo é ativado quando o gene *R* reconhece o produto gênico específico do patógeno, sendo este codificado por um gene de avirulência (*Avr*). O reconhecimento do patógeno – após a ativação das linhas de defesa PTI e ETI – culmina na indução de um tipo de morte celular programada, a resposta hipersensível (MOFFETT, 2009).

2.2.2 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)

As plantas utilizam diferentes respostas de defesa para lidar com diversos tipos de agentes patogênicos, sendo alguns fatores externos indutores que podem estimular a SAR. Os indutores de imunidade são constituídos de uma série de compostos imunoativos em plantas, que podem ser divididos de acordo com sua origem, em biológicos e não-biológicos (DEWEN et al., 2017). Os não biológicos geralmente compreendem moléculas elicitoras sintetizadas na defesa da planta, tais como ácido jasmônico, o ácido 2,6-dicloro-isonicotínico e o etileno (CHEN et al., 2014; BEKTAS E EULGEM, 2015). Os compostos imunoativos biológicos são pequenas moléculas ativas produzidas durante a interação patógeno-hospedeiro que podem ser constituídos por metabólitos, oligossacarídeos, proteínas, polipeptídeos, lipídeos e outros componentes celulares (DEWEN et al., 2017). Estes indutores são reconhecidos por receptores nas superfícies das células vegetais e

desencadeiam respostas de defesa da planta, resultando em resistência sistêmica (HEESE et al., 2007). A SAR pode ser desencadeada por grande parte dos patógenos que causam necrose tecidual, como parte da HR ou como sintoma de uma doença (DURRANT E DONG, 2004). As vias de defesa das plantas contra patógenos estão também relacionadas a interações com micróbios presentes na rizosfera, como mostra a Figura 2.

De maneira geral a SAR está ligada ao aumento *in situ* de ácido salicílico (SA) que induz a ativação de diversos genes *PR* (DURRANT E DONG, 2004). Apesar do acúmulo de ácido salicílico ser essencial em tecidos injuriados e não injuriados para desencadear a SAR, o hormônio SA não se mostra capaz de servir como sinalizador em tecidos mais distantes do órgão infectado (BEKTAS E EULGEM, 2015).

Outra característica particular da SAR é a distribuição da capacidade de resistência ao longo dos órgãos distais das plantas que não foram inoculados ou infectados (RYALS et al., 1996). Além de servir como padrão para a transdução de sinal e praticidade na defesa de plantas, a SAR funciona como a memória da planta que pode ser ativada em caso de invasão pelo mesmo patógeno (CONRATH, 2006).

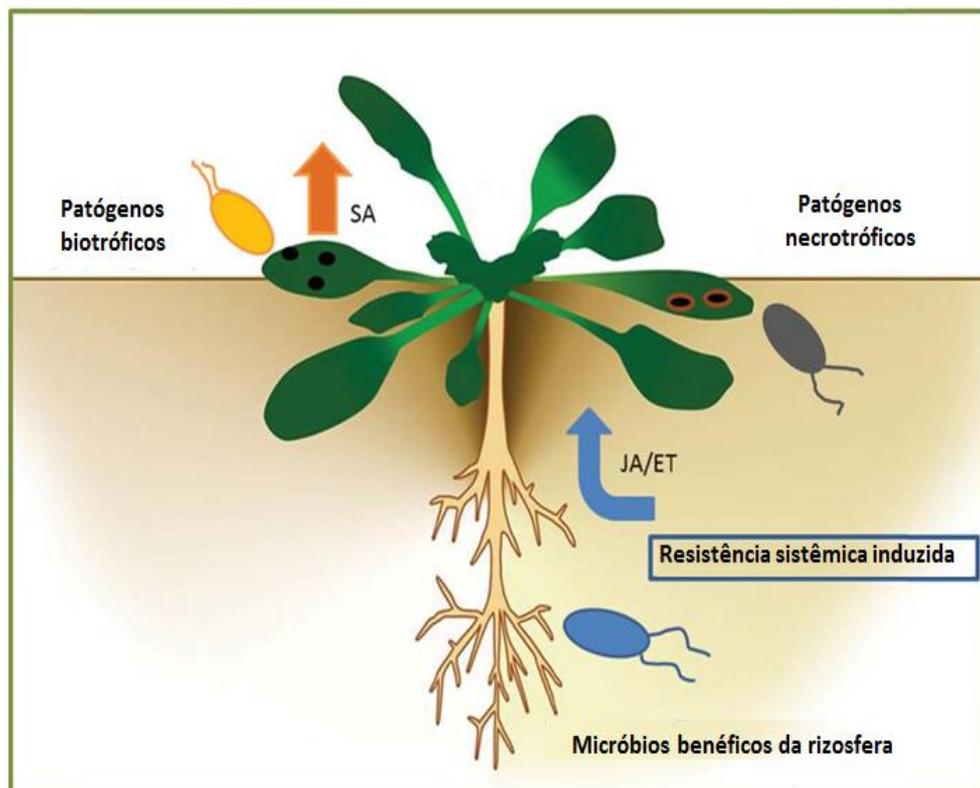


Figura 2 - Interações da Resistência Sistêmica Adquirida com diferentes tipos de patógenos. As plantas normalmente reagem contra agentes patogênicos biotróficos ativando a via do ácido salicílico (SA) e produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS). Esta ação

pode levar a uma resposta hipersensível localizada com conseqüente morte celular programada a fim de isolar os agentes patogênicos e evitar a proliferação para as demais partes da planta, ativando também a SAR. As vias do ácido jasmônico (JA) e do etileno (ET) uma vez ativadas, contrapõem-se à via SA, evitando a morte celular programada, sendo então ativadas para lidar com patógenos necrotróficos e predação por insetos. Adaptado de CHEN et al. (2014).

2.2.3 Metabólitos secundários em plantas

As plantas desenvolveram ao longo de sua evolução maneiras de lutar contra agentes invasores e estresses bióticos ou abióticos, para os quais foram selecionados diversos mecanismos de defesa. Neste sentido, os metabólitos secundários são conhecidos por participar de mecanismos de defesa que desencadeiam uma complexa rede de reações bioquímicas ao longo do ciclo de vida da planta (WINK, 2013). Porém, o número de estudos realizados para identificação desses compostos não tem sido proporcional à quantidade de metabólitos secundários disponíveis na natureza. Estima-se que apenas cerca de 20% das plantas foram estudadas fitoquimicamente através de técnicas como espectrometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) e que provavelmente a quantidade de estruturas de metabólitos secundários ultrapasse 200.000 moléculas (WINK, 2016).

Os metabólitos secundários são desenvolvidos a partir dos metabólitos primários (WINK, 2016) que são compostos essenciais para o crescimento das plantas. Alguns exemplos de aminoácidos como a lisina, arginina, fenilalanina, tirosina, triptofano são precursores de alcaloides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminas; já os precursores fenólicos são os aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina (WINK, 2016). Os metabólitos secundários de plantas são classificados em três principais grupos de acordo com o processo de biossíntese de cada um deles, podendo ser (I) terpenos ou isoprenoides, (II) compostos fenólicos como fenilpropanoides ou flavonoides e (III) compostos nitrogenados como alcaloides, glucosinolatos ou glicosídeos cianogênicos (XIN et al. 2011).

Neste contexto, a família Fabaceae desponta como grande fonte de moléculas fitoquímicas bioativas, que incluem saponinas e compostos fenólicos (GÜÇLÜ-USTÜNDAĞ E MAZZA, 2007; AHUJA et al., 2012). Como família fixadora de nitrogênio, as leguminosas produzem mais metabólitos secundários contendo nitrogênio do que outras famílias de plantas (WINK, 2013). Em seu trabalho de

revisão Wink (2013) cita alguns metabólitos secundários nitrogenados como o grupo dos alcaloides, aminas (quinolizidina, pirrolizidina, indolizidina, piperidina, piridina, pirrolidina, indol simples, eritrina, alcaloides simples e alcaloides de imidazol, poliaminas, feniletilamina, tiramina e derivados de triptamina), e aminoácidos não proteicos (NPAA). Também são citados metabólitos secundários não nitrogenados dos grupos fenólicos (fenilpropanoides, flavonoides, isoflavonas, catequinas, antocianinas, taninos, ligninas, cumarinas e furanocumarinas), antraquinonas e terpenoides (especialmente triterpenoides, saponinas esteroides, tetraterpenos). Outras leguminosas produzem alcaloides de quinolizidina em tecidos fotossinteticamente ativos como o parênquima clorofiliano das folhas, os quais podem ser armazenados em diferentes tecidos, especialmente nas sementes (WINK 1992; WINK, 2013).

Além de serem utilizados na defesa vegetal, os metabólitos secundários são importantes na comunicação entre plantas (alelopatia), na secreção de compostos sinalizadores para atrair insetos polinizadores, animais dispersores de sementes e bactérias rizobiais. Podem ainda estocar nitrogênio e proteger a planta contra raios UV, além de atuarem como agentes antioxidantes (MEURER et al., 1988; VOGT, 2010; YANG et al., 2012). Além disso, os metabólitos de plantas da família Fabaceae possuem potenciais benefícios para a saúde, que incluem efeitos anticancerígenos, antimicrobianos, antiobesidade e antidiabéticos (GEPTS et al., 2005).

2.3 PRINCIPAIS GENES DE DEFESA VEGETAL

O sucesso da defesa vegetal é resultado da ativação de genes como um componente fundamental de resistência adquirida. Um conjunto de genes classificados como genes de defesa em plantas (VAN LOON E VAN STRIEN, 1999), pode ser ativado em interações com patógenos hospedeiros e não-hospedeiros. Moléculas liberadas pelos patógenos ou por interações ocorridas na planta no curso da infecção podem servir como sinais para o reconhecimento de defesa. A ligação de moléculas elicitoras a sítios-alvo combinados a receptores de superfície das células da planta desencadeiam ciclos de transdução de sinais que resultam na ativação de genes de defesa (PANSTRUGA et al., 2009).

2.3.1 Genes R (*Resistance*)

As plantas respondem ao ataque de patógenos através de dois tipos de resposta imune, sendo estas por resistência basal ou específica ao patógeno (JONES E DANGL, 2006). Dependendo dessa resposta, os genes envolvidos nestas reações podem participar de duas linhas de defesa, sendo a primeira, a dos receptores que desencadeiam uma resposta inespecífica ao produto gerado pela reação entre os produtos dos genes do hospedeiro e do patógeno, responsáveis pelo reconhecimento de MAMPs ou PAMPs e de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). E em uma segunda linha de defesa, os genes *R* desencadeiam uma resposta específica a um determinado ataque dos patógenos após o reconhecimento das moléculas elicitoras intracelulares, em que o produto do gene *R* induz alterações nos níveis de expressão dos genes, que por sua vez redefine o conjunto de proteínas expressas ou determina as modificações pós-traducionais das proteínas disponíveis (BENSCHOP et al., 2007).

Em resposta à invasão, as plantas podem usar produtos desses genes *R* para reconhecer a presença ou atividade de virulência de patógenos (BENSCHOP et al., 2007). Assim, uma proteína de virulência secretada por um microrganismo pode interagir com o produto de um gene *R* da planta, desencadeando mecanismos de resistência como a SAR e outros genes relacionados à patogênese (WANDERLEY-NOGUEIRA et al., 2017).

Alguns genes *R* codificam proteínas que compartilham um reduzido número de motivos e domínios bem conservados. Dentre as famílias de genes *R* bem estudadas, encontramos as redutases, serina ou treonina quinases, repetições ricas em leucina ligadas a nucleotídeos (NBS-LRR), repetições ricas em leucina LRR, LRR-quinases e ainda genes *R* que codificam proteínas distintas (JONES E DANGL, 2006). Wanderley-Nogueira et al. (2012) agrupam esses cinco primeiros membros descritos anteriormente considerando a sua estrutura e a presença de domínios conservados. Os genes *R* atuam codificando uma proteína ancorada na membrana composta por uma LRR extracelular, atuando na região inserida na membrana (transmembranar) terminada em uma pequena região C terminal (WANDERLEY-NOGUEIRA et al., 2017).

2.3.2 Genes PR (*Pathogenesis Related*)

O termo “proteínas PR” é utilizado para definir proteínas que em condições de tecidos saudáveis são detectáveis somente em níveis basais, entretanto, há um acúmulo dessas proteínas em situações patológicas (VAN LOON E VAN STRIEN, 1999); VAN LOON et al., 2006; SELS et al., 2008). Tratam-se, portanto, de “proteínas induzidas por defesa” (VAN LOON et al., 2006).

Alguns critérios utilizados para determinar a inclusão de novas famílias de PRs são: a proteína deve ser estimulada por um patógeno em tecidos que normalmente não a expressam, e deve-se demonstrar que a expressão induzida ocorre em pelo menos duas combinações diferentes de plantas-patógenos, ou uma única combinação de expressão entre a planta e o patógeno deve ser confirmada independentemente (VAN LOON E VAN STRIEN, 1999).

Aproximadamente 17 famílias de proteínas PR foram identificadas com base em características estruturais, sorológicas e atividades biológicas (Zhang et al. 2017). As funções variam desde características morfológicas como indução de maior rigidez da parede celular até a transdução de sinal e atividade antimicrobiana (CHRISTENSEN et al., 2002).

A classe PR 12 está relacionada as proteínas de defesa da planta chamadas de defensinas, tendo como função principal ação antimicrobiana, que deu origem à sua classe. Esta classificação foi determinada quando Terras e colaboradores, (1995) demonstraram que duas defensinas homólogas extraídas do rabanete (*Raphanus sativus*-antifúngica 3; Rs-AFP3 e Rs-AFP4) apresentaram atividade antifúngica quando submetidas a testes *in vitro*, sendo estas expressas na parede celular e nas camadas celulares externas de diferentes tecidos da semente. Verificou-se que esses transcritos e suas proteínas correspondentes foram pouco detectáveis em folhas saudáveis, porém, acumularam em níveis elevados logo após a submissão à infecção fúngica. Após este experimento, os transcritos foram agrupados e classificados como sendo a família PR-12.

2.4 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) DE PLANTAS

2.4.1 Classificação

Os AMPs podem ser classificados de acordo com sua origem ou fonte (protozoários, bactérias, arqueobactérias, fungos, plantas e animais), pelo seu desempenho biológico (atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiparasitas, espermicidas e inseticidas), pelas suas características em geral (carga, comprimento, resíduo hidrofóbico e estrutura tridimensional), pela afinidade de ligação (membranares e não membranares) e mecanismos de interação (KAAS et al., 2010). Eles são referidos muitas vezes como proteínas menores que 100 aminoácidos, porém, esta restrição de comprimento é um pouco artificial, já que existem peptídeos com um número maior de aminoácidos. O banco de dados *PhyTAMP* considera o tamanho dos peptídeos dentro de uma faixa que vai de cinco até 100 aminoácidos (TAVORMINA et al., 2015).

Com base na sua carga, os AMPs podem ser classificados em catiônicos e aniônicos. Em plantas, a maioria deles possuem cargas positivas, podendo ser devido à interação peptídica com a membrana lipídica exposta na superfície de alguns patógenos (KAAS et al., 2010).

Além de suas estruturas primárias carregadas positivamente, os AMPs de plantas exibem uma gama típica de motivos de estrutura secundária observados em proteínas, incluindo α -hélices, cadeias β , folhas β pregueadas e alças. Além desses, apresentam estruturas secundárias e muitas vezes estruturas terciárias bem definidas, na maioria das vezes como resultado de restrições de ligações dissulfeto ou, em alguns casos, por ciclização do esqueleto peptídico (KAAS et al., 2010).

Peptídeos lineares curtos formam grupos de até 20 a 40 aminoácidos, que podem formar estruturas como α -hélices anfipáticas em uma determinada solução (BROEKAERT et al., 1997). Estes peptídeos são conhecidos por se associarem com membranas lipídicas de células alvo, podendo transitoriamente formar canais iônicos (MATSUZAKI et al., 1995).

De acordo com Wang (2017) os AMPs naturais podem ser classificados em quatro grandes famílias: α , β , $\alpha\beta$ e não- $\alpha\beta$. Os que pertencem à família α possuem estruturas α -helicoidais, já a família β contém uma grande quantidade de AMPs com estruturas de folhas β , usualmente estabilizadas por pontes dissulfeto (BROEKAERT

et al., 1997; WANG, 2012). Os peptídeos de plantas pertencem a família β e apresentam o motivo α -hairpinina formados geralmente, por α -hélices antiparalelas estabilizadas por duas pontes dissulfeto (TERRAS et al., 1992), as quais oferecem uma maior resistência à degradação enzimática, química ou térmica (VRIENS et al., 2014).

Peptídeos da família $\alpha\beta$ possuem estruturas α e β , podendo ou não envolver-se em um único dobramento, sendo as pontes dissulfeto fundamentais para estabilizar sua estrutura. Os peptídeos que não pertencem ao grupo $\alpha\beta$ não possuem estruturas α ou β claramente definidas (WANG, 2012). Um exemplo bem conhecido de peptídeos formados por estruturas $\alpha\beta$ são as defensinas, compostas geralmente por um motivo $\alpha\beta$ estabilizado por cisteínas ($CS\alpha\beta$), uma α -hélice e uma folha β antiparalela de cadeia tripla estabilizada em sua maioria por quatro pontes dissulfeto (BRUIX et al., 1995).

Além disso, os AMPs de plantas são também divididos em famílias com base na sua similaridade de sequências, motivos cisteínas (Cys) e padrões distintivos de ligações dissulfeto que, por sua vez, determinam o dobramento da estrutura terciária (TAM et al., 2015). Esse é o caso das tioninas, defensinas, peptídeos do tipo heveína, knotina (linear e cíclico), proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs), snakinas, famílias de α -hairpinina, β -barrelinas e AMPs ricos em Cys não classificados ((BROEKAERT et al., 1997; TAM et al., 2015). Além desses, também são descritos AMPs não ricos em Cys, que podem ser ricos em outros aminoácidos, incluindo o peptídeo rico em Gly (*Pg-AMP1*), os peptídeos ricos em Gly e histidina (*His*) e peptídeos com menos de 10 aminoácidos, tais como *Cn-AMP1* e *Cr-ACP1* (TAM et al., 2015). Na Figura 3 são representados alguns exemplos de AMPs pertencentes a diferentes famílias.

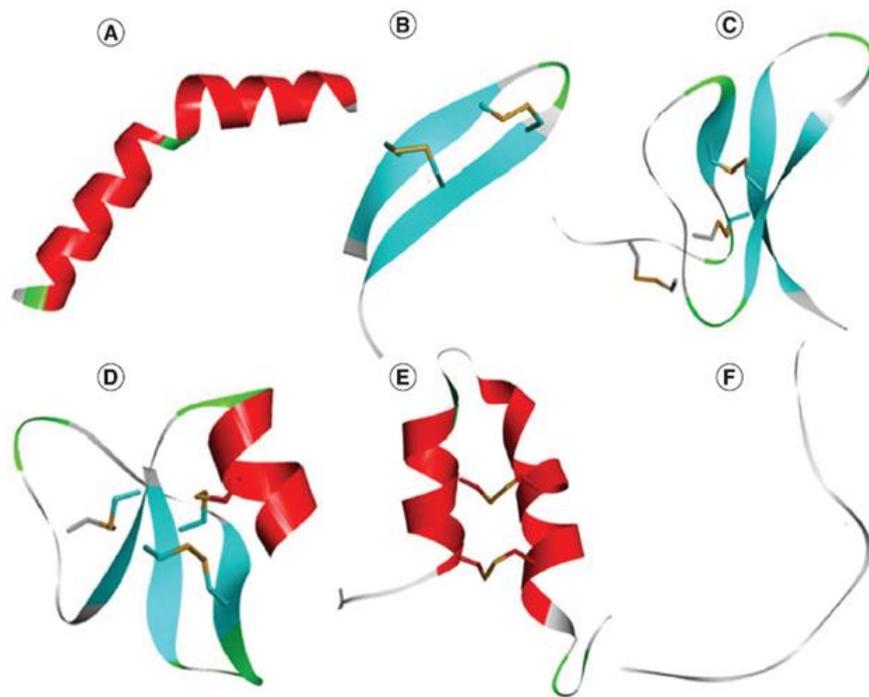


Figura 3 - Peptídeos antimicrobianos naturais caracterizados por grupos estruturais. (A) α -hélice; (B) pino-pino; (C) Motivo cisteína; (D) CS $\alpha\beta$ (β -defensina 1 humana); (E) α -hairpin; (F) Estrutura estendida em forma de barco. Os peptídeos estão representados como fita plana: α -hélice (vermelho); Folhas β (azul); Loop (verde); espiral aleatório (cinza). As cadeias laterais de cisteína estão representadas como bastão e as pontes dissulfeto em amarelo. Fonte: Hansen (2017).

Os AMPs de plantas possuem várias características em comum com os de microrganismos, insetos e animais e incluem características tais como as suas formas moleculares, carga positiva e natureza anfipática. Tais características estão intrinsecamente ligadas ao papel defensivo como antifúngicos ativadores da membrana, antibacterianos e antivirais. Estas características, além de serem ricas em motivos Cys, são bem representadas por duas famílias de AMPs de plantas: as tioninas e as defensinas (TAM et al., 2015).

Diversas famílias de AMPs de plantas podem agir de forma diferente dos de animais, como por exemplo, as do tipo heveína, que se ligam a quitinas (um polissacarídeo), e as do tipo knotina que atuam na inibição de enzimas como proteases, ou ainda as LTPs que se associam aos lipídeos para bloquear a penetração microbiana nas membranas celulares (TAM et al., 2015).

Uma grande parte dos AMPs pertence à família de defensinas, as quais se caracterizam por apresentar de seis a oito cisteínas conservadas, formando três ou quatro pontes dissulfeto (SUAREZ-CARMONA et al., 2015) e um amplo espectro

antimicrobiano, incluindo atividade contra bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas, fungos (COBO E CHADEE, 2013), parasitas e vírus (MENG et al., 2013).

2.4.2 Origem e estrutura dos AMPs

O conhecimento inicial sobre a identificação de um peptídeo não traducional veio à tona com a descoberta do sistema de defesa de tomateiro em 1991, através da ação de um peptídeo sinal identificado na planta (PEARCE et al., 1991). Sua descoberta foi possível a partir de um processo de purificação desenvolvido em um bioensaio, que surpreendeu os biólogos da época utilizando procedimentos bioquímicos capazes de elucidar a comunicação entre as células, embora o peptídeo descoberto não tenha sido de origem pós traducional (MATSUBAYASHI, 2014). Posteriormente, em 1996, o peptídeo fitossulfokina (PSK) foi purificado e sua função associada à proliferação celular (MATSUBAYASHI E SAKAGAMI, 1996), sendo este o primeiro pequeno peptídeo identificado através de modificação pós-traducional (MATSUBAYASHI, 2014).

Tavormina et al. (2015) relataram que os peptídeos de plantas ribossomalmente sintetizados originam-se a partir de proteínas precursoras não funcionais ou são traduzidos a partir de ORFs incorporadas nas transcrições. Peptídeos derivados de proteínas precursoras não funcionais podem ser originados por um pré-propeptídeo que resulta no peptídeo maduro depois da eliminação da sequência N-terminal do peptídeo sinal, sequência esta que endereça o precursor desde as organelas produtoras até a via secretora (MATSUBAYASHI, 2011; TAVORMINA et al., 2015).

Outros peptídeos derivam de precursores funcionais e podem ser originados também de pré-propeptídeos que ao sofrerem modificação enzimática resulta em um peptídeo maduro (MATSUBAYASHI, 2011; TAVORMINA et al., 2015). Levando em consideração a estrutura da sequência N-terminal dos peptídeos secretados, pode-se ainda classificá-los em peptídeos modificados pós-tradução, peptídeos ricos em cisteína e peptídeos não ricos em cisteína (Figura 4) (MATSUBAYASHI, 2014; TAVORMINA et al., 2015). Matsubayashi (2011) e Tavormina et al. (2015) relataram as modificações pós-traducionais de peptídeos-sinais secretados por plantas como a sulfatação de tirosina, hidroxilação de prolina e arabinosilação (glicosilação) de hidroxiprolina (Figura 4).

Outros peptídeos de plantas não são originados por proteínas precursoras, sendo alguns deles traduzidos por ORFs, sendo denominados "peptídeos curtos codificados por ORFs" (sPEPs) (ANDREWS E ROTHNAGEL, 2014). Essas pequenas ORFs traduzidas são encontradas dentro das sequências líderes do gene, de transcritos primários de micro RNAs (miRNA) ou em diversos transcritos que previamente eram considerados RNAs não codificantes (ncRNAs), incluindo transcritos intergênicos e RNAs não codificados (TAVORMINA et al., 2015; ANDREWS E ROTHNAGEL, 2014). A Figura 4 apresenta um esquema simplificado da origem de alguns peptídeos de maneira genérica.

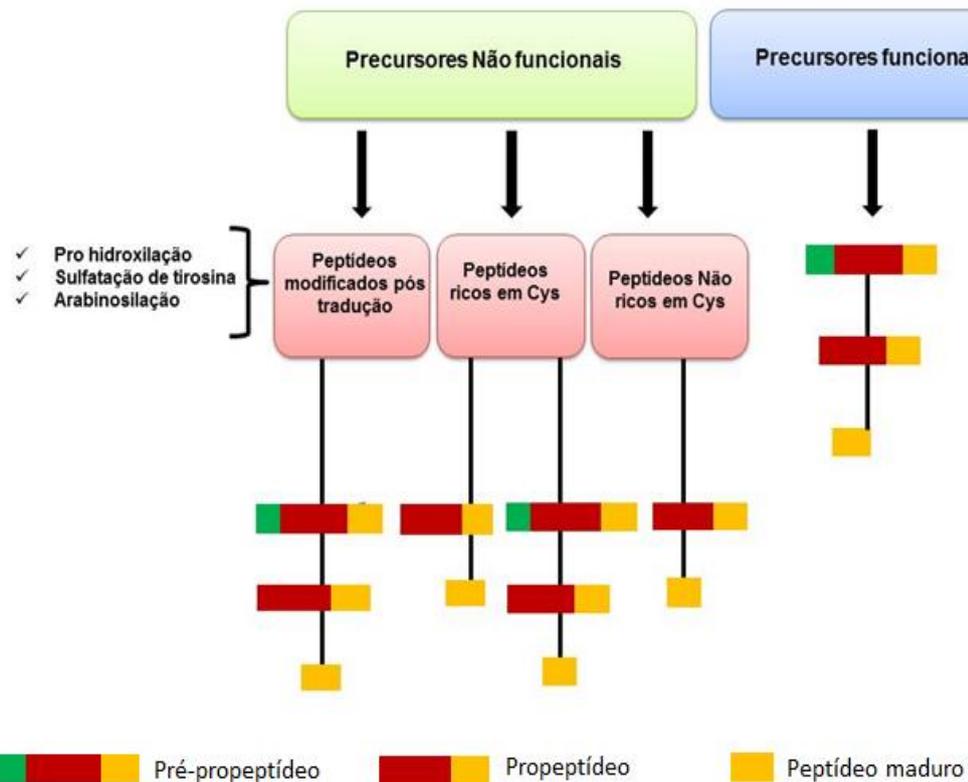


Figura 4 - Esquema geral da síntese de peptídeos de plantas.

Fonte: Adaptado de Matsubayashi (2014) e Tavormina (2015).

2.4.3 Defensinas

As primeiras defensinas de plantas foram isoladas a partir de grãos de trigo e cevada, sendo chamadas inicialmente de γ -hortotioninas, pois, eram constituídas de um polipeptídeo rico em cisteína de massa molecular e sequência de aminoácidos semelhantes às γ -tioninas, com quatro pontes dissulfeto e com tamanho aproximado

de 5 kDa (MENDEZ et al., 1990). Apesar de existir similaridade entre as estruturas de γ -hortotioninas e γ -tioninas encontradas na cevada e no trigo, verificado através de alinhamento sequencial a γ -hortotionina apresentou várias outras características estruturais diferentes de tioninas homólogas, enquanto que tioninas da cevada e trigo apresentaram um alto grau de similaridade entre si (73-83%) (MENDEZ et al., 1990). Em paralelo a isso, no trabalho de Terras et al. (1995) foi observado que estruturas primárias e terciárias de proteínas com atividades antifúngicas extraídas de sementes de rabanete possuíam uma maior similaridade com defensinas de insetos e de mamíferos do que com as tioninas de plantas. Broekart et al. (1995) também descreveram em seu trabalho de revisão que as defensinas vegetais representavam uma nova classe de peptídeos antimicrobianos descoberta na época e que possuíam similaridades homólogas funcionais e estruturais compartilhadas entre animais, insetos e mamíferos, além de apresentar envolvimento comprovado na defesa do hospedeiro sendo induzidas em condições de estresse biótico.

As defensinas vegetais são as mais conhecidas e provavelmente as mais abundantes, de todos os AMPs de plantas com funções membranolíticas (TAM et al., 2015). De maneira geral, são peptídeos catiônicos de 45 a 54 aminoácidos com quatro a cinco pontes dissulfeto (PELEGRINI E FRANCO, 2005; BROEKAERT et al., 1995), conhecidos pela sua atividade antimicrobiana a concentrações baixas de micromolaridade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, vírus e protozoários parasitas (BROGDEN, 2005). As defensinas partilham estruturas terciárias notavelmente semelhantes entre si, que tipicamente apresentam uma folha β antiparalela de cadeia tripla, enoveladas uma α -hélice e confinada por pontes dissulfeto intramoleculares (SHAFEE et al., 2017).

A descoberta da origem evolutiva das defensinas é ainda obscura, pois as sequências, estruturas, conexões entre as pontes dissulfeto, homologia e funções das defensinas são extremamente divergentes, dificultando o conhecimento sobre sua origem, podendo divergir de um ancestral comum, ou análogo, convergindo de múltiplas origens independentes (SHAFEE et al., 2016). Porém, Shafee et al. (2016) apresentaram evidências de que as defensinas podem ser evolutivamente independentes e por isso, foram divididas em duas superfamílias separadas, com semelhanças funcionais e estruturais que surgiram pela evolução convergente. Os autores ainda afirmam que a análise de similaridade de estruturas terciárias e secundárias e suas orientações demonstram a existência de duas origens

independentes (SHAFEE et al., 2016). A primeira superfamília consiste em proteínas α β estabilizadas por cisteínas de plantas, fungos e invertebrados (SHAFEE et al., 2016; SHAFEE et al., 2017). A segunda superfamília de defensinas consiste de vertebrados α , β , θ e grandes defensinas de invertebrados. Estas duas superfamílias independentes mostram um número notável de características análogas na sua estrutura, função e evolução (SHAFEE et al., 2016). Desde que as defensinas foram enquadradas em ambos os grupos e classificadas como independentes evolutivamente, puderam ser classificadas em duas superfamílias *cys*-defensina e *trans*-defensina. Os autores ainda afirmam que nas *cys*-defensinas, a ligação entre os resíduos de cisteína (C-C) faz com que o espaçamento entre elas forme as pontes dissulfeto dando estabilidade à estrutura α -hélice. Nas *trans*-defensinas, o espaçamento entre as cisteínas constrange as pontes dissulfídicas e as orienta em sentidos opostos ligando-se a diferentes elementos da estrutura secundária (SHAFEE et al., 2017).

Lay et al. (2003) afirmaram que o motivo das defensinas de plantas serem divididas em duas grandes classes se deve à presença e ausência de um domínio C-terminal. Os autores descreveram que defensinas obtidas da clonagem por cDNAs de tecidos florais foram diferentes das defensinas verificadas nas sementes devido à presença um domínio C-terminal adicional, constituído de 33 aminoácidos, além do domínio típico de defensina que apresenta cerca de 47 ou 48 aminoácidos. A primeira classe é formada por uma proteína precursora que é composta de uma sequência sinal e um domínio maduro de defensina endereçado ao retículo endoplasmático; já a segunda classe de defensinas conserva as características da primeira classe e, em adição, é constituída de um pro domínio C-terminal de aproximadamente 33 aminoácidos (LAY et al., 2003; LAY E ANDERSON, 2005; LAY et al., 2014). As defensinas pertencentes à segunda classe estão expressas constitutivamente em tecidos florais e em sua maior parte por espécies de solanáceas em frutos (MILLIGAN E GASSER, 1995), podendo ainda serem expressas por estresse salino induzido em folhas de algumas espécies de *Nicotiana*, também da família Solanaceae (KOMORI et al., 1997).

As defensinas de plantas possuem vários tipos de atividade biológica *in vitro* incluindo atividade antifúngica, antibacteriana, inibitória enzimática, inseticida, antiproliferativa, bloqueadora dos canais iônicos e associada à síntese proteica (CARVALHO E GOMES, 2009). Oddepally e Guruprasad (2015) observaram que o

peptídeo *Tf-AFP* isolado da semente *Trigonella foenum-graecum* (Fabaceae) apresentou forte atividade antifúngica inibindo o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*.

2.4.4 Mecanismos de ação dos AMPs de plantas

Peptídeos antimicrobianos atuam diferencialmente de acordo com a membrana alvo do patógeno, sua configuração, carga iônica entre outros fatores, sendo necessário conhecer a formação superficial de camadas lipídicas de patógenos-alvo para uma melhor compreensão de seus diversos mecanismos de ação (BERTELSEN et al., 2012).

Um exemplo bastante fundamentado são os mecanismos de ação em bactérias. As bactérias são amplamente classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas e apresentam diferenças significativas em seus envelopes celulares, assim como apresentam semelhança em suas camadas internas ou nas características citoplasmáticas (LI et al., 2017). Ambos os tipos de bactérias possuem uma membrana citoplasmática envolvida por uma parede celular. Existe um espaço entre as duas camadas onde se localiza o periplasma, que possui uma grande variedade de íons e proteínas fundamentais em diversas funções como transporte celular, hidrólise de substrato, degradação e desintoxicação (MALANOVIC E LOHNER, 2016). As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa adicional, sendo o periplasma localizado entre a membrana plasmática e a membrana externa.

A membrana externa das Gram-negativas é composta por uma bicamada lipídica, cuja camada interna é constituída por fosfolípidios e a camada externa por lipopolissacarídeos (LPS) (HANCOCK, 1984). Em microrganismos Gram-negativos, os AMPs necessitam adentrar ou romper a membrana externa e a interna (ambas citoplasmáticas), realizando um processo bem mais complexo (SCHWECHHEIMER E KUEHN, 2015). Moléculas LPS presentes na camada externa da membrana externa possuem um elevado número de grupos fosfatos carregados negativamente que estão envolvidos em pontes salinas com cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}), formando uma rede eletrostática (NIKAIDO, 2003).

A região eletrostática funciona como uma barreira inicial contra a maioria dos antibióticos hidrofóbicos, ocasionando uma baixa permeabilidade. As interações

entre os AMPs e a membrana externa das bactérias Gram-negativas é pouco compreendida devido à estrutura complexa das moléculas de LPS, compostas por um lipídeo A e outras subunidades (LI et al., 2017).

De maneira geral, para espécies bacterianas, o contato inicial com AMPs depende de uma atração eletrostática entre as moléculas aniônicas na superfície da célula bacteriana e os resíduos catiônicos dentro dos peptídeos. Especificamente, os AMPs são atraídos para as LPS encontradas na membrana externa de espécies Gram-negativas e por ácidos lipoteicóicos da parede celular de espécies Gram-positivas (HANEY et al., 2017).

Uma característica específica em bactérias Gram positivas é a presença de ácido teicoico (carregado negativamente) junto à parede celular que pode estar associada a glicolipídeos ligados à membrana plasmática (MALANOVIC E LOHNER, 2016). A camada de peptidoglicanos em bactérias Gram positivas é maior, formando uma matriz espessa que mantém a rigidez da célula nas bactérias Gram positivas (LI et al., 2017). A forma em que a camada de peptidoglicanos está associada a ácidos teicoicos, pode facilitar a acumulação de AMPs na superfície da membrana citoplasmática devido a interações favoráveis entre ácido teicoico e AMPs catiônicos, favorecendo a ação de antibióticos em bactérias Gram positivas (MALANOVIC E LOHNER, 2016).

A ação dos AMPs pode estar bastante relacionada à composição de aminoácidos que determina as propriedades físico-químicas do peptídeo em relação à carga, à anfipaticidade, hidrofobicidade, flexibilidade e adesão ao hidrogênio, como fatores cruciais para o seu modo de ação e seletividade em relação às células patogênicas (FINDLAY et al., 2010). Para que os peptídeos iniciem seu mecanismo de ação é necessário um limiar de concentração que independe do modelo de interação da membrana (LEONTIADOU et al., 2006; MELO et al., 2009). Muitos peptídeos se acumulam na superfície da membrana do invasor entre segundos ou até microssegundos, formando poros. A formação de poros membranares resulta na perda de potencial da membrana alvo o que ocasiona uma rápida liberação de componentes intracelulares e morte (LI et al., 2017).

O modo de ação dos AMPs depende de suas interações com a membrana alvo e da geometria dos poros formada consecutivamente, correspondendo ao modelo de barril ou o modelo toroidal (LI et al., 2017) (Figura 5). A formação de poros pelo modelo de barril é conduzida pela combinação hidrofóbica dos AMPs (LI

et al., 2017) que se alinham com a cavidade dos poros em paralelo às cadeias fosfolipídicas, inserindo-se perpendicularmente na bicamada lipídica (MELO et al., 2009). Por sua vez, no modelo toroidal os AMPs penetram profundamente e perpendicularmente à membrana, devido à interação eletrostática dos peptídeos hidrofóbicos com as cabeças fosfolipídicas da membrana alvo, sendo os AMPs arrastados para a região interna formando uma curvatura interna na membrana e consequentemente gerando poros (SENGUPTA et al., 2008).

Outro mecanismo de ação é o modelo de tapete, onde a camada externa da membrana alvo é coberta por uma concentração superficial elevada de moléculas de AMPs, enquanto que a camada interior não possui ligação com AMPs, havendo um grande desequilíbrio de carga e tensão superficial que leva a membrana superficial a um colapso, desintegrando a membrana, ocasionando assim um vazamento do conteúdo citoplasmático, extravasando íons e biomoléculas (MELO et al., 2009; LI et al., 2017).

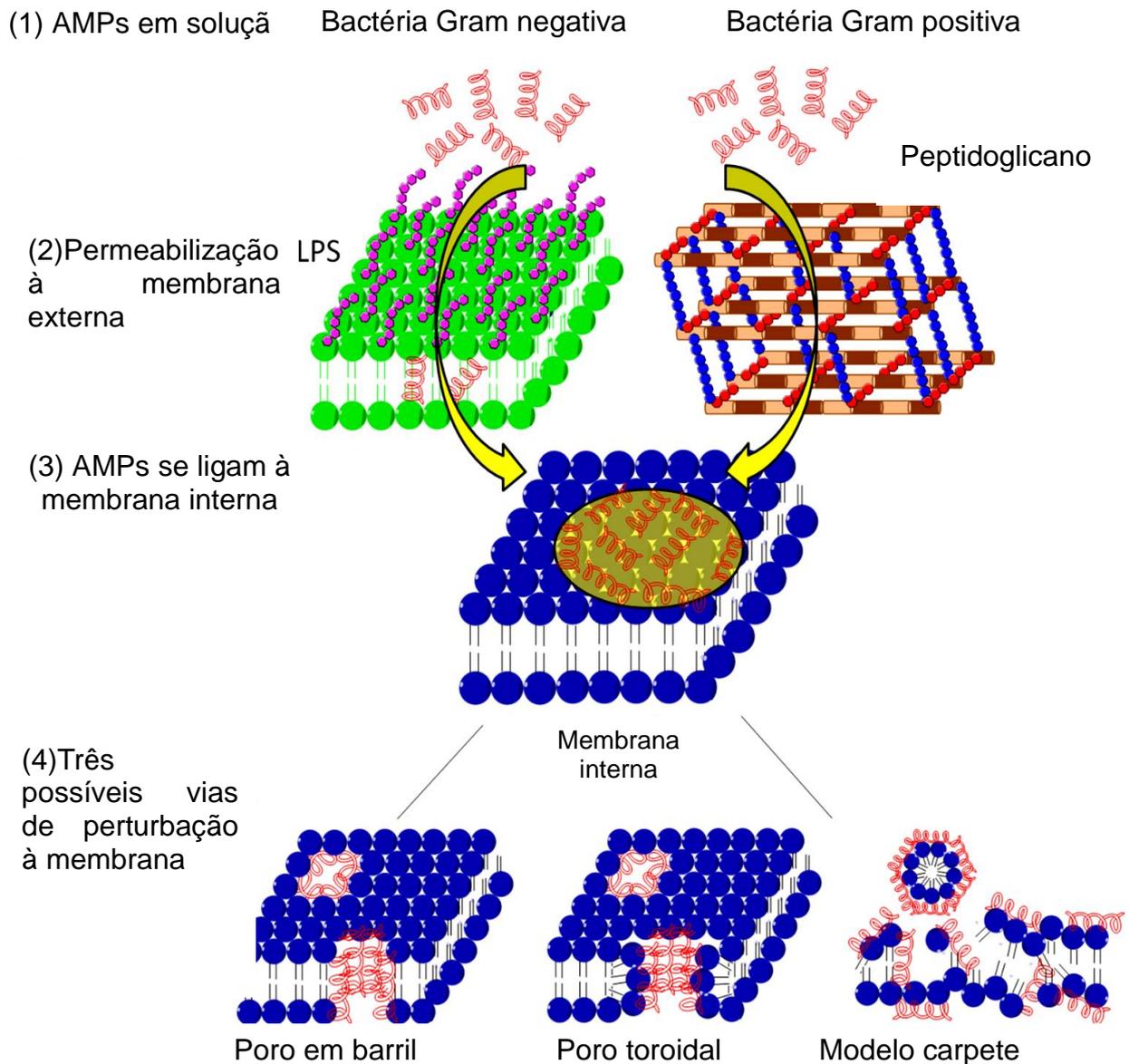


Figura 5 - Sistemas de membrana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e os mecanismos de ação de AMPs na membrana citoplasmática. Em bactérias Gram negativas, os AMPs precisam permeabilizar a membrana exterior da célula antes de penetrar a membrana citoplasmática; já em Gram positivas, os AMPs necessitam apenas penetrar pela camada de peptidoglicanos formando nanoporos. Infiltrado na membrana citoplasmática, eles podem agir através da formação de poros em barril, poro toroidal, ou desfragmentando a membrana. Fonte: Adaptado de Li et al. (2017).

2.4.5 Síntese de peptídeos

Várias formas de potencializar moléculas bioativas têm sido estudadas nas últimas décadas para combater agentes microbianos tais como bactérias resistentes, protozoários, fungos e vírus bem como no combate a patógenos que danificam e subfaturam os lucros no agronegócio. A associação entre técnicas eficientes e

moléculas bioativas de grande potencial antimicrobiano alia-se à indústria farmacêutica proporcionando a produção de novos fármacos. Diante deste cenário, a síntese de peptídeos surgiu como uma técnica promissora associando a facilidade de síntese em larga escala com amplo espectro de ação tornando-a um potencial candidato a novos antibióticos (WANG et al., 2016).

Em meados da década de 50, os primeiros peptídeos foram sintetizados a partir da síntese clássica (ou em solução) (DU et al., 1953). Este tipo de síntese envolve a obtenção de sucessivos passos intermediários, sendo necessárias etapas como extrações, cristalizações e caracterizações, o que torna este método muito mais laborioso, porém, ele ainda é bastante utilizado na indústria por proporcionar a obtenção de quantidades bastante significativas de peptídeos comerciais (ONG et al., 2014; CILLI et al., 2017).

Outro método de síntese de peptídeos foi introduzido por Bruce Merrifield, a chamada síntese de peptídeos de fase sólida (SPPS). Este método se destacou por simplificar os passos da sua realização, definindo uma estratégia de síntese através da adição gradual de aminoácidos protegidos por uma cadeia lateral (grupo protetor) ligada por ligação covalente a um suporte sólido (resina sólida) insolúvel nos solventes utilizados. Após a cadeia peptídica formada, outro passo é a purificação da reação através da eliminação do grupo protetor (MERRIFIELD, 1963) (ver Figura 6).

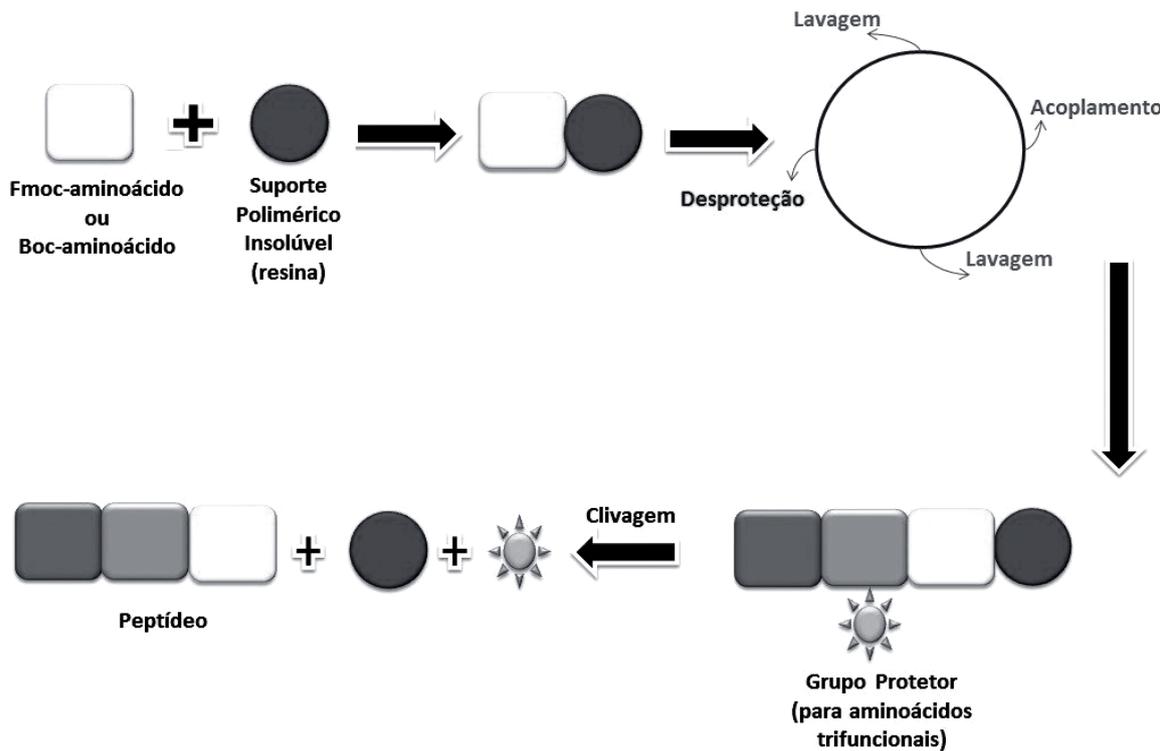


Figura 6 - Esquema resumido da síntese de peptídeos em fase sólida.
Fonte: Cilli et al. (2017)

O uso da resina insolúvel possibilita a eliminação de todos os reagentes que foram utilizados na reação, bem como os subprodutos gerados na síntese, através de filtração utilizando placa porosa. Este método também garante a eficiência nas reações, pois, as etapas da síntese já estão bem estabelecidas e padronizadas, permitindo sua reprodução por automação (HOWL, 2005).

2.4.6 Potencial terapêutico/farmacêutico

O mercado de peptídeos terapêuticos surgiu na década de 1970, quando foi lançado o fármaco *Lypressin*, um análogo da vasopressina (PICHEREAU E ALLARY, 2005). Kaspar e Reichert (2013) reportaram que o ano de 2012 foi notável no setor da terapia peptídica quando foram aprovados nos Estados Unidos seis peptídeos, sendo eles lucinactant, peginesatide, pasireotide, carfilzomib, linaclotida e teduglutide que estavam em fase de estudo desde o final da década de 1990. Cinco dos seis também foram aprovados na União Europeia (UE). Embora cada um tenha sido resultado de muitos anos de trabalho, as aprovações dos seis peptídeos no

mercado farmacêutico foram estimulantes e o número das recentes aprovações tende a aumentar (KASPAR E REICHERT, 2013).

Alguns fármacos derivados de peptídeos têm sido utilizados para tratamento médico de diversas doenças. As principais áreas de doenças que atualmente são conduzidas pelo uso terapêutico de fármacos peptídicos são as doenças metabólicas e oncológicas (FOSGERAU E HOFFMANN, 2015). A utilização de peptídeos farmacêuticos para o tratamento de doenças como diabetes e obesidade é devido ao grande interesse e investimento que a América do Norte possui no mercado farmacêutico. Além disso, o mercado farmacêutico também está investindo em pesquisas com peptídeos para doenças raras e fármacos órfãos, havendo uma tendência atual para as áreas de doenças infecciosas e inflamatórias (FOSGERAU E HOFFMANN, 2015).

A goserelina (um análogo de hormônio que libera gonadotropina sintética, comercializado como *Zoladex*) é aplicada no tratamento do câncer de mama e câncer de próstata, o acetato de glatiramer (um peptídeo sintético com quatro aminoácidos, *Copaxone*) é utilizado para esclerose múltipla e o Exenatide (um análogo sintético do peptídeo-1 do tipo glucagon, *Byetta*) para o diabetes tipo 2 (SUN, 2013). Tratam-se de apenas alguns exemplos de fármacos manipulados que foram obtidos a partir de peptídeos previamente isolados e purificados. Os mesmos, passaram por um processo de modificação química estrutural para adequar-se as necessidades do mercado farmacêutico e, sobretudo, aos parâmetros de eficácia e segurança (KASPAR E REICHERT, 2013).

Outra abordagem envolve as vacinas derivadas de peptídeos terapêuticos. Há uma potencial utilização de fragmentos não virulentos e inativos a partir de proteínas patogênicas (UHLIG et al., 2014). Adicionalmente, Riemer et al. (2004) relataram que as vacinas de peptídeos sintéticos são rentáveis, fáceis de produzir e podem ter qualidade controlada durante o processo de fabricação, além de serem quimicamente estáveis e de não conterem nenhum material oncogênico, tóxico ou infeccioso. Eles ainda demonstraram que os chamados mimótopos (que são peptídeos miméticos) podem possibilitar a formulação de novas vacinas, garantindo a subsequente indução de anticorpos, além de possibilitar tratamentos auxiliares e terapia de doenças avançadas.

Noguchi et al. (2013) chegaram à conclusão, em seu artigo de revisão, que vacinas peptídicas contra vários tipos de câncer possuem grande potencial quando o

estado imunológico do paciente é analisado antes da vacinação, visando à formulação com base no quadro clínico individual do paciente, devido à grande diversidade e complexidade no comportamento imunológico dos diversos tipos de tumores frente à resposta imune do paciente. Este tipo de vacinação é conhecido como vacinação peptídica personalizada (PPV), pois através da avaliação da resposta imune celular e humoral dos pacientes pode-se induzir uma potente imunidade anti-tumoral aplicando-se uma dose específica, já identificada na fase de ensaio III indicando resultados bem sucedidos.

Os peptídeos têm grande potencial para atender às expectativas por novos fármacos, uma vez que são altamente específicos para alvos proteicos individuais, passíveis de modificação específica do tecido alvo, por serem altamente seletivos (DI, 2015).

Peptídeos apresentam características peculiares de acordo com sua formação química e estrutural. Algumas características apresentam-se como vantagens intrínsecas quando comparadas a moléculas menores, atualmente sintetizadas em larga escala pela indústria farmacêutica. Os peptídeos geralmente oferecem maior eficácia, seletividade e especificidade sobre a molécula alvo (HUMMEL et al., 2006). Além disso, os produtos de degradação dos peptídeos são aminoácidos, minimizando assim os riscos de toxicidade sistêmica e de interações medicamentosas (LOFFET, 2002).

Peptídeos terapêuticos, que são derivados principalmente de peptídeos naturais, são agonistas dos receptores (HRUBY, 2002). Geralmente, pequenas quantidades destes peptídeos agonistas são necessárias para ativar os receptores alvos (LIEN E LOWMAN, 2003). Porém, alguns impasses precisam ser enfrentados pela indústria farmacêutica a partir do momento em que um peptídeo apresenta bons resultados em testes *in vitro* e apresenta-se como um bom candidato à transformação terapêutica. Estes impasses são apontados como fragilidades, visto que os peptídeos são quimicamente e fisicamente instáveis, propensos à hidrólise e oxidação, possuem tendência à agregação, apresentam meia-vida curta e rápida eliminação, podendo ser degradados rapidamente por proteases e eliminados rapidamente da corrente sanguínea (ANTOSOVA et al., 2009). Além disso os peptídeos normalmente não são disponíveis por via oral e possuem baixa permeabilidade de membranas (FOSGERAU E HOFFMANN, 2015), devido à característica hidrofílica de sua membrana superficial (UHLIG et al., 2014).

Mesmo diante de algumas características restritivas, os peptídeos estão cada vez mais sendo testados quanto sua eficácia nos estágios de descoberta e pré-clínicos, nas mais variadas indicações terapêuticas, sugerindo que esta classe de agentes terapêuticos em breve pode ocupar uma maior representatividade no mercado. Um conjunto de dados de aproximadamente 440 peptídeos foi acurado para melhor conhecimento em meados de fevereiro de 2013, contudo, foi observado que alguns dados (por exemplo, estado de desenvolvimento) mudou ao longo do tempo devido à natureza altamente dinâmica do *pipeline* clínico (KASPAR E REICHERT, 2013).

Ainda neste contexto de análise, durante a fase de testes clínicos para aprovação dos peptídeos na indústria farmacêutica é necessário ressaltar a importância da vigilância após aprovação de segurança do novo peptídeo terapêutico. Um exemplo foi o relato descrito por (KASPAR E REICHERT, 2013), onde no ano de 2012 de 6 peptídeos aprovados pela indústria farmacêutica um deles (a *peginesatide*) em menos de um ano, apresentou risco de imprevisibilidade no desenvolvimento de um fármaco. Após ter sido submetido a testes de pós-aprovação ocorreram reações de hipersensibilidade ao medicamento em pacientes logo após a administração da primeira dose, onde três casos resultaram em morte, quadro que não havia sido apresentado na fase de testes clínicos.

2.4.7 Peptídeos identificados em Fabaceae

Diante da enorme biodiversidade das espécies vegetais, a família Fabaceae destaca-se por sua grande importância tanto pelas suas características morfológicas como pelo seu potencial biotecnológico, o qual tem contribuído para o desenvolvimento de pesquisas no âmbito terapêutico devido à capacidade de suas espécies em produzir biomoléculas ativas contra uma ampla gama de microrganismos patogênicos (Tabela 1), dentre outras habilidades. Atualmente, evidências científicas demonstram que dietas favorecidas em produtos de grãos integrais em especial leguminosas, estão associadas à redução de doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes (MALAGUTI et al., 2014).

Uma gama de biomoléculas com potencial antimicrobiano são encontradas em plantas da família Fabaceae, dentre elas os peptídeos antimicrobianos

destacam-se por suas aplicações múltiplas, como na indústria alimentícia (CURIEL et al., 2015), agricultura e no âmbito terapêutico (CÂNDIDO et al., 2014).

Além da grande capacidade de defesa contra patógenos outros tipos de abordagens funcionais surgem à medida que novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas, como é o caso relatado por Rizello et al. (2017) que desenvolveram um composto em pó hidrolisado enzimaticamente, obtido a partir de uma mistura de farinha de leguminosas como lentilha, ervilha e fava. Este composto foi testado contra vários fungos (entre eles *Aspergillus parasiticus* CBS971.97, *Penicillium carneum* CBS 112297, *Penicillium paneum* CBS 101032, *Penicillium polonicum* 112490) sendo observado uma considerável inibição no crescimento de suas hifas. Diversos peptídeos (*nsLTP*, ubiquitina, lectina alfa-1, defensina-1, defensina-2) apresentaram atividade antifúngica sendo identificados por vários processos de purificação, além de uma mistura de peptídeos liberados no processo de hidrólise. O extrato obtido da farinha de leguminosas hidrolisada foi utilizado como bioconservante para fabricação de pães em condições piloto resultando em uma vida útil mais longa em relação ao controle.

Lo et al. (2016) identificaram previamente uma proteína de 68 resíduos de aminoácidos que se liga a receptores de insulina (IRC) a partir de *Momordica charantia*. Esta proteína exibiu efeitos hipoglicêmicos em camundongos interagindo com receptores de insulina (IR). Através de digestão *in vitro*, observou-se que o complexo proteico (mclRBP-19) aumentou a ligação entre a insulina e os IRs, estimulando tanto a absorção de glicose pelas células quanto a depuração da glicose em camundongos diabéticos. Tal complexo proteico mostrou uma relação por homologia com diversas plantas tendo estruturas similares de β -hairpinas e habilidades de ativação de quinase para IRs no mclRBP-19. Os autores concluíram que o mclRBP-19 é um peptídeo bioativo que age diminuindo a glicose no sangue através de sua potencial ligação aos IRs.

Nascimento et al. (2015) isolaram uma defensina (PvD1) de sementes de *Phaseolus vulgaris*, a qual foi testada contra o protozoário *Leishmania amazonenses*. Os resultados mostraram que, além de inibir a proliferação do protozoário na fase promastigota, PvD1 causou fragmentação citoplasmática, formação de múltiplos vacúolos citoplasmáticos e permeabilização da membrana nas células do protozoário, demonstrando que a defensina PvD1 foi introduzida nas células *L. amazonenses* como um possível alvo intracelular pelo peptídeo.

Tabela 1. Peptídeos identificados em espécies de Fabaceae com atividade antimicrobiana.

Tipo/Nome do peptídeo	Espécie / órgão	Atividade/Função	Microrganismo testado/célula/tecido	MIC/IC ₅₀	% inibição	Tipo de teste	Referência
Lectinas	<i>Phaseolus vulgaris</i> cv.	Anticâncer (inibiu carcinoma nasofaríngeo, mama e hepatoma)	*CNE2, *MCF7 e *MDA-MB-231, *HepG2, *WRL 68.	8,1, 6,07 e 7,49 µM durante 48 h (IC ₅₀)	Maior ou igual a 50%	<i>In vivo</i>	YIN E WONG (2015).
Defensinas (Tfgd2/RsA FP2)	<i>Trigonella foenum-graecum</i> e <i>Raphanus sativus</i>	Antifúngica	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Phaeoisariopsis personata</i>	40 µg/mL durante 48 h (MIC)	97,65; 95,45; 96,08 e 96,08%, respectivamente	<i>In vitro</i>	KARRI E BHARADWAJ (2013).
Defensinas (Vu-Defr/Vu-Def)	Sementes de <i>Vigna unguiculata</i>	Antiprotozoário	<i>Leishmania amazonensis</i> promastigotes	100 µg/mL (MIC)	54,3% e 46,9% em 24 e 48 h (Vu-Defr) 50% e 54,8% em 24 e 48 h (Vu-Def)	<i>In vitro</i>	SOUZA et al. (2013).
Defensina (PvD1)	Sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>	Antiprotozoário	<i>Leishmania amazonensis</i> promastigotes	300 e 600 µg/mL em 24 h e 48 h (MIC)	70 e 89% (300 µg/ml) 87% e 96,5% (600 µg/ml)	<i>In vitro</i>	NASCIMENTO et al. (2015).
Snakinas (SN2)	<i>Solanum lycopersicum</i>	Antimicrobiana	<i>Escherichia coli</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> , <i>Pichia pastoris</i> , <i>Fusarium solani</i>	0,9, 0,41, 0,11, 0,44, 0,91, 1,58 µM (IC ₅₀)	Maior ou igual a 50%	<i>In vitro</i>	HERBEL et al. (2015).
AMP purificado em Frações D1 e D2	<i>Anadathera pavonina</i>	Antifúngica	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida albicans</i>	25, 50 e 100 µg/mL; 50 e 100 µg/mL	37, 53 and 82% (FR D1) 32 and 79%	<i>In vitro</i>	SOARES et al. (2012)

*CNE2 - carcinoma nasofaríngeo; *MCF7 e *MDA-MB-231 - câncer de mama humano; *HepG2 – hepatoma; *WRL 68 – células de fígado de embrião humano.

2.4.8 Purificação de peptídeos

Existem vários métodos para purificar e isolar peptídeos, que variam de acordo com a natureza e complexidade de compostos moleculares presentes nas amostras (NICE et al., 2007). O processo de isolamento também é composto de vários passos desde a extração do composto de interesse através do uso de solventes até a separação de picos específicos por cromatografia e sua identificação por espectrometria de massa (DOMON, 2006).

A cromatografia é o método mais comum para separação e fracionamento de misturas biológicas complexas. Métodos de identificação também são utilizados em adição à separação de moléculas bioativas, como a espectrometria de massa. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) pode ser utilizada para mensurar a presença de moléculas bioativas com alta sensibilidade e seletividade, sendo adequado para quantificação e identificação de substâncias de difícil identificação (NICE et al., 2007).

Os primeiros registros de publicação sobre a cromatografia datam de 1906 quando o russo Tswetts publicou a técnica de cromatografia sólido-líquido utilizando uma membrana para filtração. Algumas décadas depois, em 1941, outra abordagem da cromatografia foi publicada por dois bioquímicos (Martin e Synge) da Universidade de Cambridge, a qual foi realizada a partir de uma solução de clorofórmio e água obtendo o primeiro método de destilação e extração por cromatografia líquida. Esses pesquisadores obtiveram um novo cromatograma através da microdeterminação de monoaminoácidos hidrolisados de proteínas e peptídeos simples (MARTIN E SYNGE, 1941). A partir daí a técnica mostrou-se eficaz, sendo aperfeiçoada continuamente através de novas abordagens na física e química que incluíram desde a utilização de outros tipos de colunas a novas formulações de cálculos que antes eram baseados na altura dos cromatogramas desenhados à mão.

Décadas depois, o princípio da técnica continuou sendo aplicado e vários tipos de peptídeos vêm sendo descobertos, como é o caso de Yokoyama et al. (2008) que purificaram e caracterizaram três tipos de peptídeos antimicrobianos (Cy-AMP1, Cy-AMP2 e Cy-AMP3) a partir da semente de *Cycas revoluta* utilizando uma solução de acetato de sódio, seguida por isolamento através da Cromatografia

líquida de alta eficiência de fase reversa (*RP-HPLC*) e espectrometria de massa por MALDI TOF. Eles observaram que 35% das sequências de aminoácidos dos Cy-AMP1 e Cy-AMP2 eram compostas de glicinas e cisteínas e suas sequências quando comparadas com defensinas de plantas foram muito semelhantes, enquanto que Cy-AMP3 possuía grande semelhança com proteínas transportadoras de lipídeos (*LTPs*). Os peptídeos antimicrobianos Cy-AMP1, Cy-AMP2 apresentaram resistência contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e contra fungos.

Mandal et al. (2009) isolaram três peptídeos (Cn-AMP1, Cn-AMP2, Cn-AMP3) a partir da água de côco verde (*Cocos nucifera*) utilizando a técnica a *RP-HPLC*. O peptídeo Cn-AMP1 foi extremamente eficiente quando testada sua atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas mesmo em concentração mínima inibitória (*MIC*). As sequências foram identificadas por análise de MALDI TOF onde foi feito um sequenciamento dos três peptídeos e encontrados seus pesos moleculares. Os pesos moleculares dos Cn-AMPs foram calculados e sequenciados e em seguida as sequências foram comparadas com o banco de dados NCBI através de um BLAST, mostrando que não houve similaridade entre elas; somente o Cn-AMP1 teve uma baixa similaridade de 30% quando comparado ao banco de dados de *AMPs*. A carga líquida total de Cn-AMP1 foi +1, enquanto que os demais peptídeos apresentaram propriedades ácidas, sugerindo que as cargas catiônicas encontradas em Cn-AMP1 foram responsáveis pela maior atividade antibacteriana, comparativamente a Cn-AMP2 e 3.

Santos et al. (2010) descreveram a purificação de um peptídeo a partir de sementes de *Vigna unguiculata*, assim como a expressão de um peptídeo recombinante em um vetor. Ambos os peptídeos foram purificados a partir de métodos cromatográficos. Tanto a defensina natural como a recombinante foram submetidas à ação da alfa amilase e foi verificado que a defensina purificada da semente de *V. unguiculata* inibiu as alfa amilases dos gorgulhos *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* na concentração de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto que a defensina recombinante inibiu apenas a alfa amilase do gorgulho *C. maculatus*. Estas espécies de bruquídeos causam perda significativa na colheita em espécies de feijão e por isso são de grande importância agroeconômica.

Aliahmadi et al. (2011) descreveram um método simples para a triagem de peptídeos antimicrobianos de dez sementes de plantas diferentes. As proteínas extraídas por solução aquosa foram submetidas a ensaios de géis SDS-PAGE e Tricine-SDS, a fim de obter uma resolução mais alta das proteínas e peptídeos de baixo peso molecular. O produto obtido na extração de proteínas solúveis em água foi também submetido à saturação por sulfato de amônio. Além disso, foram realizados ensaios de sobreposição de ágar a fim de verificar a atividade antimicrobiana dos peptídeos separados nos géis, obtendo-se bons resultados para *Medicago sativa L.* e *Onobrychis sativa Lam.* contra as estirpes de *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Kulikova et al. (2015) isolaram um peptídeo biologicamente ativo de folhas de *Anethum graveolens*, através de métodos bioquímicos a partir de uma coluna C18 (por cromatografia líquida), logo após submetido a eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (PAGE) e também à análise do peso molecular dos peptídeos através da técnica MALDI TOF. O peptídeo foi testado em células do fígado de ratos e induziu o aumento do tamanho da área celular indicando interações de adesão intercelular e atividade da área de hematogênese com função protetora mesmo em doses muito baixas.

Dellavalle et al. (2011) utilizaram sementes e flores de 10 plantas que apresentavam efeito na medicina tradicional do Uruguai e testaram contra fungos fitopatogênicos do gênero *Alternaria*. Eles realizaram três tipos de extração: ácida, aquosa e salina. Os resultados obtidos através dos extratos brutos ácidos de *Salvia sclarea*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* apresentaram compostos bioativos eficazes para a inibição do crescimento dos fungos mesmo em baixas concentrações (MIC 1,25 µg.mL⁻¹) sendo os resultados praticamente iguais ao do fungicida comercial utilizado como controle positivo. No entanto, as moléculas bioativas extraídas no estudo não foram identificadas por análises químicas específicas. Diante disso, a técnica de extração ácida de peptídeos foi utilizada no atual trabalho a fim de obter moléculas bioativas com características de peptídeos antimicrobianos já que extrações ácidas favorecem a obtenção de proteínas e peptídeos que usualmente possuem uma significativa atividade antimicrobiana.

2.4.9 Resistência de AMPs contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos

Desde que o primeiro antibiótico foi descoberto por Alexander Fleming em 1949, o uso inadequado de antibióticos se tornou um fator fundamental para desencadear uma enorme resistência bacteriana e tem se tornado cada vez mais frequente, causando um grande problema de saúde pública.

Neste sentido, houve uma contribuição humana no desencadeamento da resistência bacteriana, mas também ocorreu uma evolução de forma natural sem interferência humana (FAIR E TOR, 2014). Alguns exemplos de resistência natural foram a penicilina G (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (US), 2013) e a estreptomicina (JACOB E GAYNES, 2010), observados em antibióticos de primeira classe ainda na fase de isolamento inicial.

Com o desenvolvimento das técnicas de clonagem e sequenciamento associadas à bioinformática, foi possível observar a conservação de um grande número de genes homólogos pertencentes à enzima β -lactamase transferidos vertical e horizontalmente para seus microrganismos descendentes (LYON E SKURRAY, 1987; FAIR E TOR, 2014; CHANDRA et al., 2017). Estes genes foram conservados diretamente entre bactérias e indiretamente mediados pela invasão de bacteriófagos que os infectaram (LYON E SKURRAY, 1987). A descoberta da diversidade genética dos genes de resistência à penicilina surgiu com as análises filogenéticas que sugeriram a evolução e a origem dessas enzimas (FAIR E TOR, 2014).

Na maioria das vezes peptídeos são carregados positivamente, interagindo com componentes na superfície de bactérias carregadas negativamente, sendo estes componentes lipopolissacarídeos (*LPS*) em bactérias Gram-negativas e ácido teicóico (*TA*) nas bactérias Gram-positivas. Entretanto, as bactérias desenvolveram mecanismos induzíveis para evitar essas interações, modificando sua carga de superfície (PANDIN et al., 2016). Muitos organismos Gram-negativos evoluíram através de estratégias de modificação de *LPS*, permitindo que os mesmos se adaptassem a ambientes imprevisíveis e, muitas vezes, hostis (RAETZ et al., 2007). De modo geral, alguns mecanismos utilizados por bactérias resistentes a *AMPs* são a captura de peptídeos por moléculas sinalizadoras, destruição total de *AMPs* por

proteólise, transporte ativo através da célula para remoção de *AMPs* e modificações na estrutura da superfície celular a fim de bloquear as interações com os *AMPs* (NAWROCKI et al., 2014). Em contrapartida, os peptídeos possuem diversas formas de atuação contra essas bactérias, tais como: inativação de antibióticos, modificação do alvo e mecanismos de resistência por efluxo (CHANDRA et al., 2017).

Segundo Needham e Trent (2013) durante e depois do tráfego do lípido A (um dos domínios formadores dos *LPSs* localizado na porção endotóxica passível de modificações) em bactérias Gram-negativas para a superfície da célula bacteriana, o mesmo pode ser submetido a um extenso processo de remodelagem, resultando numa grande variedade de estruturas desse lipídeo. Essas alterações no lipídeo A afetam diretamente a patogênese, alterando a permeabilidade da membrana externa, promovendo resistência a peptídeos antimicrobianos, e interferindo na capacidade do hospedeiro em reconhecer *LPS* como um padrão molecular associado ao microrganismo (MAMP) (RAETZ et al., 2007).

2.4.10 Ferramentas de Bioinformática na construção de modelos estruturais

Com o advento da bioinformática, o número de ferramentas computacionais bem como o aumento na capacidade de processamento de computadores tem permitido que estudos de modelos estruturais de biomoléculas tenha cada vez mais sucesso (CAPRILES et al., 2014). Isto destaca a importância de estudar a bioinformática estrutural para o estudo das proteínas, suas funções estruturais, enzimáticas, de transporte e regulatórias da célula para tentar entender a interação de moléculas, o sistema proteína receptor, processos de disfunção bem como simulações de predição antimicrobiana para ajudar na criação de novos fármacos (JOTHI, 2012).

As proteínas tem papel essencial nos processos biológicos da manutenção da vida tais como crescimento, divisão celular, maturação, mobilidade e defesa. Para entender a função das proteínas em detalhes, em nível molecular, é importante conhecer suas estruturas tridimensionais (JOTHI, 2012).

Ordinariamente a utilização da predição de estruturas proteicas foi classificada em modelagem comparativa, *threading* e *ab initio*. As duas primeiras abordagens constroem modelos de proteínas alinhando as sequências *query* com as

estruturas de modelo resolvidos. Se os modelos estiverem ausentes no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), precisam ser construídos do zero, ou seja, por modelagem *ab initio*, sendo menos utilizada por adotar procedimentos mais difíceis de predição de estruturas proteicas. Utilizando o método de modelagem comparativa, a sequência-alvo inserida é identificada nos programas que estão relacionados com estrutura resolvida por sequência ou comparação de perfil de sequência e constroem modelos de estrutura baseados no suporte fornecido por esses modelos (KÄLLBERG et al., 2012). Vários softwares e servidores são especializados no processo de modelagem comparativa, como o SWISS-MODEL e o MODELLER, sendo os mais utilizados (WEBB E SALI, 2016). Embora a automação torne a modelagem comparativa acessível a especialistas e iniciantes, alguns ajustes ainda são necessários na maioria dos casos para maximizar a precisão dos modelos, principalmente nos casos de proteínas mais complexas (WEBB E SALI, 2016).

Os métodos de modelagem por *threading* baseiam-se no princípio de estruturas proteicas conhecidas e parecem compreender um conjunto limitado de enovelamentos, sendo frequentemente encontrado elementos de similaridade em proteínas evolutivamente distantes ou não relacionadas. Os servidores mais usados que utilizam este método são: MUSTER (WU E ZHANG, 2008), SPARKS X (YANG et al. 2011), RAPTORX (KÄLLBERG et al. 2012) e ProSa II (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007), isso tem sido demonstrado em alguns casos, onde a incorporação de informações estruturais para combinar a sequência usada na pesquisa com possíveis modelos permite que a similaridade no enovelamento seja detectada, apesar da falta de uma relação evolutiva explícita.

Quando não se tem um modelo resolvido que possa servir de base é necessário utilizar outra abordagem de modelagem, sendo o método *ab initio* o mais indicado. Os métodos *ab initio* visam prever a estrutura apenas a partir da informação da sequência, sem qualquer assistência direta de estruturas previamente conhecidas. Esses métodos geralmente visam prever o melhor modelo baseado na energia mínima para uma função de energia potencial por meio da amostragem da superfície de energia potencial através de várias técnicas de busca de informações (WU et al., 2007; WANG, 2017). Estes tipos de abordagens encontram dificuldades em produzir modelagem de alta resolução, que é essencial para determinar o

enovelamento nativo de uma proteína e sua interpretação bioquímica. As novas previsões de dobramentos destacam de alguma forma a tendência de que métodos *ab initio* usando conhecimento de estruturas existentes foram mais bem-sucedidos do que métodos de minimização de energia pura, métodos clássicos ou puros (JOTHI, 2012). Dos servidores e programas mais utilizados para modelagem *ab initio*, destacam-se: ROSETTA (KAUFMANN et al., 2010), TOUCHSTONE II (YANG et al., 2003) e mais notavelmente o I-TASSER (YANG, 2008).

CAPÍTULO I

Novas defensinas de *Cajanus cajan*: identificação, caracterização e análise da expressão

Lívia Maria Batista Vilela¹; Carlos André dos Santos Silva¹; Roberta Lane Oliveira Silva¹; Sérgio Crovella¹; Ana Maria Benko-Iseppon^{1*}

¹ Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 50.670-423, Recife, PE, Brazil.

*Corresponding Author's e-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

RESUMO

As defensinas são peptídeos antimicrobianos que desempenham papel importante na imunidade inata de animais e plantas apresentando potencial antimicrobiano. Em plantas os AMPs compreendem componentes essenciais na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos, sendo alguns expressos constitutivamente. A espécie *Cajanus cajan* (leguminosa) desponta pela sua importância econômica, nutricional e uso na medicina popular, destacando-se por apresentar genoma sequenciado e disponível em banco de dados. Este trabalho teve como objetivo prospectar e identificar sequências de defensinas de *C. cajan*, avaliadas quanto à sua estrutura e analisadas quanto à sua expressão em alguns tecidos selecionados. Para isso, sequências de defensinas de *C. cajan* foram identificadas, caracterizadas *in silico*, amplificadas por PCR e submetidas a sequenciamento, dando origem a dois *contigs* e um *singlet*, que foram modelados posteriormente. Apesar da diferença entre as sequências de aminoácidos, as três obtiveram uma estrutura anfipática com predominância de resíduos catiônicos. Os modelos gerados apresentaram um domínio Gamma-thionina, formando três folhas β e uma alfa hélice com três a quatro pontes dissulfeto. Os modelos tridimensionais foram avaliados através de três diferentes ferramentas de caracterização estrutural

onde foi possível observar que os aminoácidos estavam localizados nas regiões mais favoráveis para o dobramento das proteínas. Em paralelo, foi realizada uma análise da expressão (RT-qPCR) de defensinas em diferentes tecidos de *C. cajan*, onde foi possível validar genes de referência como β TUB, UBQ, UBQ10 e EF1, bem como realizar expressão diferencial em diferentes tecidos de *C. cajan*. Os novos peptídeos antimicrobianos identificados serão analisados quanto à sua atividade, com vistas a seu uso biotecnológico.

Palavras-chave: defensina, bioinformática, modelagem proteica, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Defensins are antimicrobial peptides that play an important role in the innate immunity of animals and plants with antimicrobial potential. In plants AMPs comprise essential components in host defense against pathogens, some of which are constitutively expressed. The species *Cajanus cajan* (legume) stands out for its economic, nutritional importance and use in folk medicine, standing out for presenting sequenced genome and available in database. This work aimed to prospect and identify *C. cajan* defensin sequences, evaluated for their structure and analyzed for their expression in some selected tissues. For this, *C. cajan* defensin sequences were identified, characterized in silico, PCR amplified and sequenced, resulting in two contigs and one singlet, which were later modeled. Despite the difference between amino acid sequences, the three obtained an amphipathic structure with predominance of cationic residues. The generated models presented a Gamma-thionin domain, forming three β leaves and one alpha helix with three to four disulfide bridges. The three-dimensional models were evaluated through three different structural characterization tools where it was possible to observe that the amino acids were located in the most favorable regions for protein folding. In parallel, an analysis of defensin expression (RT-qPCR) was performed in different *C. cajan* tissues, where it was possible to validate reference genes such as β TUB, UBQ, UBQ10 and EF1, as well as to perform differential expression in different *C. cajan* tissues. The new identified antimicrobial peptides will be analyzed for their activity, with a view to their biotechnological use.

Key-words: Defensin. Bioinformatics. Protein modeling. Antimicrobial activity.

INTRODUÇÃO

A capacidade dos seres vivos em responder a estímulos ambientais é essencial para sua sobrevivência frente a diversos estresses. No caso das plantas, as respostas a potenciais micróbios dependem apenas da imunidade inata, visto que estas não possuem sistema imune especializado (Macho e Zipfel 2014). Os mecanismos de resistência natural de plantas incluem barreiras morfológicas que são desempenhadas pela parede celular, síntese de metabólitos secundários e de proteínas antimicrobianas que, sozinhas ou em combinação, prejudicam ou impedem a invasão de patógenos (Benko-Iseppon e Crovella 2010; Wanderley-Nogueira et al. 2017). Tais proteínas são chamadas de peptídeos antimicrobianos (AMPs), sendo encontrados em todos os grupos de organismos, desde bactérias, fungos, até plantas e animais.

Em plantas, os AMPs compreendem componentes essenciais na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos, sendo alguns expressos constitutivamente enquanto outros são induzidos em tecidos específicos ou após a percepção do patógeno pela planta (Bahar e Ren 2013). As defensinas de plantas são um grupo de AMP bastante conhecido pelas diversas funções desempenhadas, como atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos, vírus e parasitas protozoários (Brogden 2005), além de possuir atividade inibitória enzimática, inseticida, antiproliferativa, bloqueadora dos canais iônicos, estando também associada à síntese proteica (Carvalho e Gomes 2009).

Defensinas de plantas pertencem a uma superfamília diversificada de proteínas chamada cis-defensin que são caracterizadas por derivar de duas pontes dissulfeto que confinam uma folha β unida a uma α -hélice (Parisi et al. 2019); (Shafee et al. 2016). Apresentam geralmente carga catiônica, com um domínio conservado contendo de 45 a 54 aminoácidos e três a quatro pontes dissulfeto (Broekaert et al. 1995; Pelegrini e Franco 2005). As defensinas de plantas partilham estruturas terciárias semelhantes entre si, que tipicamente apresentam folhas β antiparalelas de cadeia tripla, enoveladas por uma α -hélice e confinada por pontes dissulfeto intramoleculares (Shafee et al. 2017). Normalmente, estão localizadas em partes da planta que são frequentemente expostas a patógenos, como folhas, raízes, sementes, cascas, vagens, tubérculos, frutas e tecidos florais (Holly et al.

2017; Lay et al. 2003). Estão presentes nas mais diversas famílias vegetais, incluindo a família Fabaceae que desponta como uma das fontes mais promissoras, pelo seu diverso arsenal de moléculas bioativas (Duranti 2006) e seu extenso uso etnomedicinal (Benko-Iseppon e Crovella 2010).

Um exemplo de leguminosa de importância nutricional, econômica e ecológica é a espécie *Cajanus cajan* (L.) Millsp. conhecida popularmente como feijão-guandu, destacando-se por suas propriedades antioxidantes, quelantes e como produtora de metabólitos secundários e peptídeos antimicrobianos, tendo sido identificados inúmeros compostos bioativos, incluindo alguns peptídeos extraídos da fração ativa da semente desta espécie (Tekale et al. 2016).

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar *in silico* molecular e estruturalmente as defensinas do genoma de *C. cajan*, avaliando sua expressão diferencial tecido específico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização das sequências

Sequências modelo de defensinas foram obtidas do banco de dados para peptídeos antimicrobianos vegetais PhytAMP (Hammami et al. 2009), priorizando-se sequências com atividade antimicrobiana predita (Apêndice A). Posteriormente, as sequências foram alinhadas contra o genoma de *C. cajan* disponível no GenBank (Benson et al. 2007) sendo obtidas as sequências candidatas. Os candidatos (em formato FASTA) foram caracterizados pela presença e localização do peptídeo sinal através da ferramenta *SignalP* versão 4.0 (Petersen et al. 2011), a predição de pontes dissulfeto pelas ferramentas *Disulfind* (Ceroni et al. 2006) e *DiANNA* (Ferre e Clote 2005), bem como a identificação do domínio conservado com a ferramenta *CD_Search* (Marchler-Bauer e Bryant 2004). Além disso, foi avaliada a predição de atividade antimicrobiana através da ferramenta *CAMP_{R3}* (Waghu et al. 2016) usando quatro algoritmos diferentes: *Support Vector Machine* (SVM), *Random Forest Classifier* (RFC), *Artificial Neural Network* (ANN), *Discriminant Analysis Classifier* (DAC). Estes algoritmos escritos em *R* são responsáveis por prever a atividade antimicrobiana diante de determinadas sequências submetidas pelo usuário.

Desenho de primers para Reação de cadeia em polimerase (PCR) e de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

O programa *Primer3Plus* (Untergasser et al. 2007) foi usado para desenho dos pares de primers (*forward* e *reverse*) genômicos e de RT-qPCR (exons preditos com ORF-Finder) com o objetivo de amplificar defensinas de *C. cajan* usando os seguintes parâmetros: tamanho do amplicon (*default*), temperatura de *Melting* [entre 55 °C (mínima), 60 °C (ótima) e 62 °C (máxima)], e conteúdo de GC [entre 40-60 % (ótimo de 50 %)]. Para o desenho de primers RT-qPCR foram usados os seguintes parâmetros: o comprimento da extensão do amplicon foi estabelecido em 70-150 pb, as temperaturas de *melting* foram entre 55 °C (mínimo), 60 °C (ótimo) e 65 °C (máximo), e o conteúdo CG variou entre 55 a 65% (ótimo de 60%). Todos os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen® (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequências de primers forward e reverse utilizados para a caracterização molecular de defensinas

Accession nr.	Primer	Forward/Reverse sequences	Tamanho nt esperado/obtido	Forward/Reverse RT-qPCR sequences	Tamanho nt esperado/obtido
8433	Caj 1	(F)ATGCATGCAGCGGTGGTTTG (R)GAACCCCTGATTGCGGAGTTG	1011/1015	(F)TGCAGACTGAGGGAAGATTGTGTGAG (R)TTCCTGCAAACCAGAGCACAGTTG	91
26812	Caj 2	(F)CGTAAGCCAGGTCATAGACTGTGTCAAG (R)GCCAGCGACATTATTGACATGTAGCAC	1027/1030	(F)TGCTTCGCAAGAAGGCATGG (R)CGCCACCAATGAAACCATCG	91
37310	Caj 3	(F)GCAGCTTGCATGCCTTGTGG (R)AACGCGCAACAGTAAGAAACACG	808/850	(F)TGGTGCAAAGCTGAGGCAAAGACG (R)ATCGCAGCTGCCAGTGGTGAAG	80
25245	Caj 4	(F)ACACGATGTCTGAAGAGAGTAGCAAGAAC (R)AATACAAAGGGACCGAAACCTCATTC	1300/1400	(F)CCGTTTCAAGGGACCATGTGTG (R)ACGGAAGCCACGGCAATGTC	91
26813	Caj 5	(F)GCTCTATTTAAGACAAACCAGCTCCATTTT (R)TCACATTCACACACTCCCTCGAATC	1038/1200	(F)TGGTGGTAGAAACGGAGGGAAGG (R)TTCAACATGGCAAACGGAACC	143
8434	Caj 6	(F)AACTCCCACTCGGGCTTTTCG (R)TGTGGATAACCGCGTAACCGATG	1324/1400	(F)GCACAACCTTGTCAATGCCGTAG (R)CTGCGCTTTCCAATCGTATGC	101
14413	Caj 7	(F)TGGCCACATCAAATGGGTGTAAC (R)GCAATAAGCATGGTTTCTTTGCTC	997/1000	(F)CGTGGAAGGGCTTTTCTGCTC (R)TGACAGGCTCCATGATTTGCAC	94
19507	Caj 8	(F)CAATGTGACGAGCCCTCTCTCC (R)TGCAACAAACTCAAGGCCAATTC	1223/750	- -	- -

- Não desenhado

Material vegetal

O material vegetal da espécie *C. cajan* foi coletado no assentamento Chico Mendes no Município de Paudalho no estado de Pernambuco, Brasil (49°NE 7°57'35" S 35°6'18" O). As exsicatas foram depositadas no herbário UFP, sob o número 78.924, tendo sido identificadas pelo Dr. Marcus Alves.

Extração e amplificação do material vegetal

O DNA genômico de folhas de *C. cajan* foi extraído de acordo com o protocolo descrito por (Weising et al. 2005) com modificações conforme (Benko-Iseppon et al. 2003). As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL, incluindo: 1 µL da amostra de DNA (20 ng/µL), 2 µL de *Buffer* 10x, 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,2 µL de dNTPs (10 mM), 0,6 µL de cada primer (5 µM), 0,1 µL de Taq polymerase (5 U/µL) e 14,9 µL de água ultrapura. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo (amostra sem DNA) para cada par de *primers* testado. A amplificação foi realizada em termociclador *Techne* sob o seguinte programa: desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55-62 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 min, e extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com *Blue-Green Loading Dye* (LGC Biotechnology®) em corrida a 60 V por 60 minutos.

Sequenciamento, análise e tratamento das sequências

O sequenciamento foi realizado em sequenciador *Sanger*, modelo ABI 3500 *Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*). Após o sequenciamento, as sequências foram submetidas a uma análise utilizando programas de montagem de sequências e edição de *contigs* como o *Bioedit 7.1* (Hall 1999) e o *CodonCode Aligner* para retirada das extremidades de baixa qualidade e geração de *contigs*. Os *contigs* montados e o *singlet* foram submetidos a um alinhamento local via BLASTn (Altschul 1997) que foram submetidos contra o banco de dados não redundante do NCBI, visando à anotação do fragmento sequenciado. Após a anotação, as sequências obtidas pelo banco de dados foram traduzidas em suas respectivas sequências

peptídicas via *ORF finder* (Rombel et al. 2002) e submetidas a uma nova anotação via BLASTp (Altschul 1997), seguida da modelagem tridimensional.

Modelagem comparativa das sequências

Para fins de modelagem 3D, as estruturas dos *contigs* e do *singlet* gerados foram preditas pelo *Swiss Model Server* (Arnold et al. 2006; Bordoli et al. 2009) visando encontrar o melhor *template* para a construção do modelo comparativo, sendo selecionado aquele com maior identidade da sequência. Após a modelagem, o modelo gerado foi refinado pelo servidor ModRefiner (Xu e Zhang 2011) a fim de melhorar a qualidade física das estruturas e em seguida foi analisada a estereoquímica do modelo do gráfico de Ramachandran, utilizando a ferramenta PROCHEK (Laskowski et al. 1993). Sendo a qualidade da modelagem analisada através dos servidores ProQ e Verify3D.

Alinhamento e análise de *Neighbor Joining* (NJ)

Inicialmente, sequências de defensinas foram obtidas a partir do GenBank e identificadas por meio de um PSI-BLAST (*Position-Specific Iterated* BLAST), utilizando as sequências isoladas no presente trabalho como *seed sequences*. O alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos para as defensinas foi realizado utilizando o programa *ClustalW* (versão 1.82) (Larkin et al. 2007) e visualizado no Jalview. Utilizando o programa MEGA7, foi construída uma árvore fenética, utilizando o método de *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei 1987) com *bootstrap* de 2000 replicações.

Isolamento de RNA total, Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído a partir da associação do protocolo CTAB-Acetato (Zhao et al. 2012) e do Kit SV Total RNA Isolation System (Promega) utilizando aproximadamente 200 mg de três tipos de tecido: (1) foliar; (2) semente e (3) plântula. As amostras de RNA foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific) e fluorímetro Qubit® (Life Technologies).

A integridade do RNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose a 1,5 % com corante *blue-green* (LGC Biotechnology). A síntese de cDNA foi realizada empregando-se o Kit GoScript™ *Reverse Transcription System* (Promega) seguindo instruções do fabricante.

Análise da expressão diferencial por RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas em equipamento CFX96 Touch Real-Time (BioRad), utilizando sistema de detecção SYBR Green. Em todas as reações foram usadas triplicatas técnicas e um controle negativo (NTC) para cada *primer*. Os valores de eficiência de amplificação ($E = 10^{-1/\text{slope}}$), coeficiente de correlação (R), *interception* (y) e *slope* foram calculados pelo método da curva padrão utilizando diluições seriadas (1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}). O *mix* de reação compreendeu 1 μL de cDNA, 5 μL de Go-Taq SYBR Green qPCR Master Mix 2x (Promega), 3,4 μL de água ultrapura e 0,6 μL de cada primer (2,5 μM), em um volume final de 10 μL . As reações foram submetidas a uma etapa inicial de desnaturação de 95 °C por 2 min, seguida por 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s, utilizando placas de 96 poços. As curvas de dissociação foram analisadas a 65–95 °C por 10 min. Genes normalizadores e alvos de interesse foram validados via RT-qPCR e analisados pelo método do $\Delta\Delta\text{Ct}$. Para as análises de expressão relativa, foram utilizados três genes de referência para a normalização dos resultados. As validações por RT-qPCR foram realizadas de acordo com as orientações do *The Minimum Information for Publication of Quantitative RealTime PCR Experiments* (MIQE) (Bustin et al. 2009) visando aumentar a transparência e a confiabilidade dos resultados obtidos.

Seleção de genes de Referência

Os potenciais genes de referência foram avaliados pelos softwares GeNorm (versão 3.5) (Vandesompele et al. 2002), NormFinder (versão 0.953) (Andersen, Jensen, e Ørntoft 2004) e BestKeeper (versão 1) (Pfaffl et al. 2004), indicando o número de GR candidatos necessários para a normalização dos dados de expressão gênica. Para a utilização no BestKeeper e NormFinder, os dados de

entrada foram baseados nos valores de Cqs obtidos nas reações, já para o GeNorm os dados foram transformados conforme recomendações de (Vandesompele et al. 2002)). O software GeNorm determina o valor de estabilidade de expressão (M), assim como a combinação entre o melhor par e todos os outros genes de referência. O NormFinder identifica e classifica os genes mais adequados para a normalização entre o conjunto de candidatos, considerando as variações intragrupo e intergrupos (Andersen, Jensen, e Ørntoft 2004). O software BestKeeper aplica o Coeficiente de correlação de Pearson (média geométrica dos valores de Cq dos genes candidatos), calculando o desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação (CV) em todo o conjunto de dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização das sequências

Foram identificadas oito sequências candidatas no genoma de *C. cajan* disponível no *GenBank*. Foi possível observar através das ferramentas *in silico* uma similaridade estrutural entre as sequências de *C. cajan* através das regiões conservadas. A estrutura secundária formada por três folhas beta localizadas em regiões padrão, uma alfa hélice e as ligações de três a quatro pontes dissulfeto localizadas entre as cisteínas C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C8, sugerem ser padrão entre as sequências alinhadas (Figura 7). A região do domínio conservado foi similar entre as defensinas identificadas, onde o número de resíduos mostrou-se entre 45 a 55 aminoácidos, corroborando com o trabalho de Almeida et al. (2002).

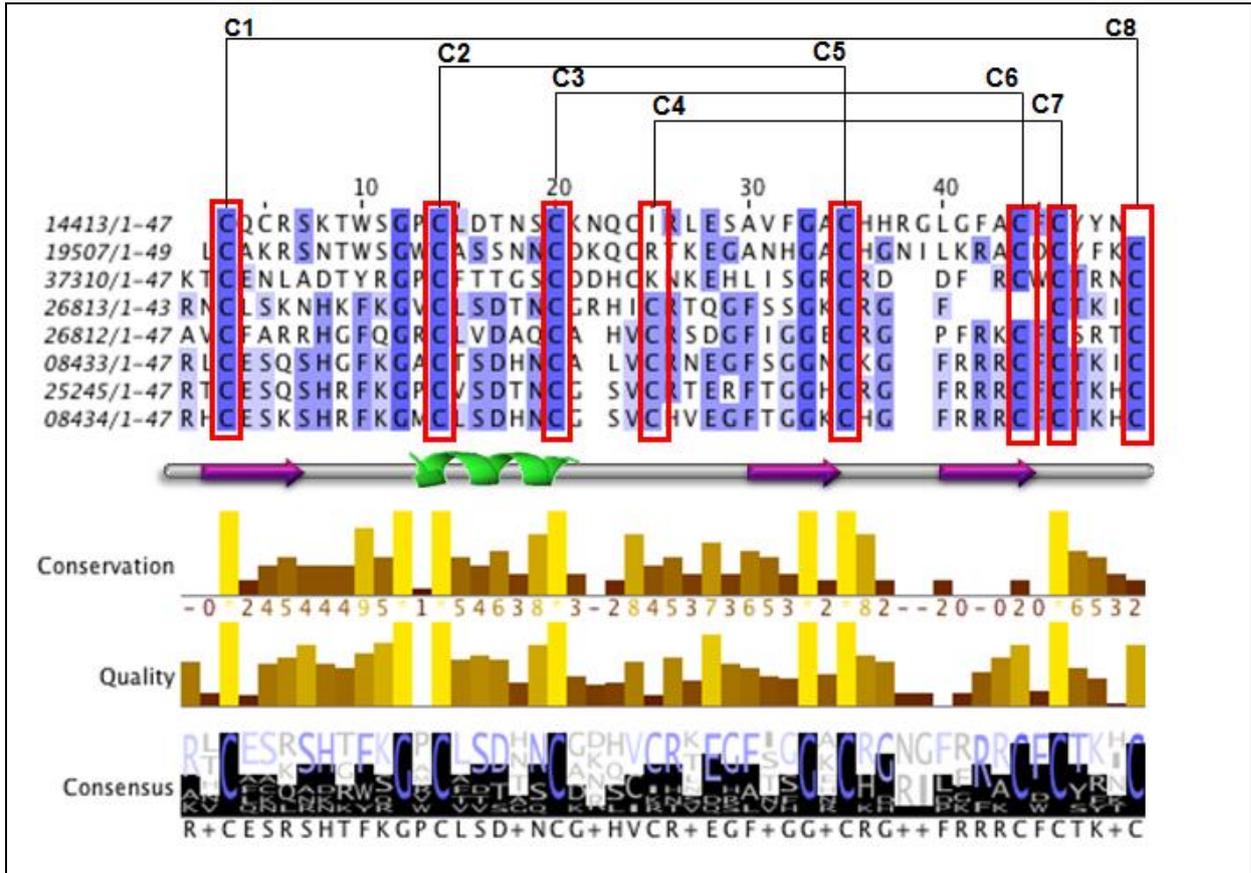


Figura 7 - Alinhamento múltiplo do domínio conservado (*Gama-thionin*) de defensinas identificadas em *C. cajan*. As linhas acima do alinhamento predizem as possíveis pontes dissulfeto indicadas pelo *Disulfind* e *DIANNA*. Em azul, estão representadas as regiões conservadas dentro do peptídeo maduro. Abaixo do alinhamento encontra-se a predição da estrutura secundária onde é possível observar três folhas-beta (setas em lilás) e uma alfa hélice (espiral em verde). Abaixo da estrutura secundária encontram-se o gráfico de conservação e a sequência-consenso do alinhamento.

Após a realização da caracterização, foi realizada a predição de atividade antimicrobiana com o auxílio da ferramenta *CAMP_{R3}*, utilizando quatro algoritmos diferentes, como mostra a Tabela 3. Estes quatro algoritmos são o *Support Vector Machine* (SVM) que é um método específico de aprendizado de máquina e tem como objetivo classificar os dados maximizando a margem entre eles em classes com um espaço de alta dimensão; *Random Forest Classifier* (RFC) é uma análise não paramétrica baseada em árvores, aliando ideias combinadas entre vizinhos, adaptando-as para uma inferência de dados eficiente; *Artificial Neural Network* é baseado no processamento de informações do sistema nervoso biológico, sendo composto de elementos de processamento altamente interconectados (neurônios ou nós) que trabalham juntos para resolver problemas específicos; por último o *Discriminant Analysis Classifier* que através de um conjunto de equações de

predição baseadas em variáveis independentes são usadas para classificar os indivíduos em grupos (Lin e Jeon 2006; Karasuyama e Takeuchi 2010; Ding et al. 2013).

Tabela 3 - Predição de atividade antimicrobiana das oito sequências de defensinas identificadas no genoma de *Cajanus cajan*. Sigla das abreviações dos programas: SVM=*Support Vector Machine*; RFC=*Random Forest Classifier*; ANN=*Artificial Neural Network*; DAC=*Discriminant Analysis Classifier*.

Defensinas	Identidade da Sequência	Domínio <i>gamma-thionin</i>			
		SVM	RFC	ANN	DAC
Caj 1	8433	0.971	0.939	AMP	1.000
Caj 2	26812	0.969	0.899	AMP	1.000
Caj 3	37310	0.755	0.935	AMP	0.471
Caj 4	25245	0.965	0.786	AMP	0.990
Caj 5	26813	0.968	0.949	AMP	1.000
Caj 6	8434	0.910	0.795	AMP	0.997
Caj 7	14413	0.949	0.815	AMP	0.974
Caj 8	19507	0.984	0.851	AMP	0.997

Todas as sequências apresentaram uma pontuação relevante para a predição de atividade antimicrobiana, exceto a sequência do Caj3, considerando o algoritmo DAC (0,471).

Análise de Neighbor Joining (NJ)

A partir das defensinas identificadas no GenBank e isoladas no presente trabalho, foi possível gerar uma árvore fenética utilizando o método de *Neighbor-Joining* (Figura 8). A análise fenética agrupou as defensinas em quatro grupos distintos, formando subgrupos (Figura 8). O grupo IV (ramos em verde) foi formado por sequências de defensinas de espécies na sua maioria da família Fabaceae agrupadas em um subgrupo derivado que incluiu duas sequências de *C. cajan* (ID 25245 e XP 020229972.1) em conjunto com sequências de outras leguminosas (bootstrap 58), havendo um subgrupo mais basal incluindo sequências de Rosaceae, Curcubitaceae e Solanaceae, respectivamente, porém com um bootstrap baixo (29). O terceiro grupo de defensinas (ramos em azul) foi formado por

sequências oriundas das famílias Brassicaceae e Solanaceae com bootstrap de 57, sendo esse grupo subdividido nos subgrupos 4 e 3, respectivamente. O grupo II, em violeta, foram formadas seis sequências de *C. cajan*, com dois ramos internos. Por sua vez o primeiro grupo (ramos em vermelho escuro) foi formado por famílias distintas como Fabaceae (duas sequências de *C. cajan*) e Malvaceae (*Theobroma cacao* e *Durio zibethinus*).

A partir da análise fenética realizada, foi possível observar que as sequências de defensinas de *C. cajan* estão representadas em diferentes grupamentos, ou seja, duas sequências no Grupo IV (verde, com defensinas de Fabaceae), no grupo II (violeta), mais basal, que incluiu seis defensinas *C. cajan*, algumas unidas por valores significativos de *bootstrap*. O fato desse grupo não incluir defensinas de outras espécies vegetais, indica a existência de candidatos especializados e exclusivos em *C. cajan*. Finalmente, duas espécies agruparam-se no ramo mais basal (vermelho escuro). Uma vez que os grupamentos refletem similaridade de sequências de aminoácidos, pode-se inferir que há três grupos funcionais/estruturais, considerando todas as defensinas de *C. cajan*.

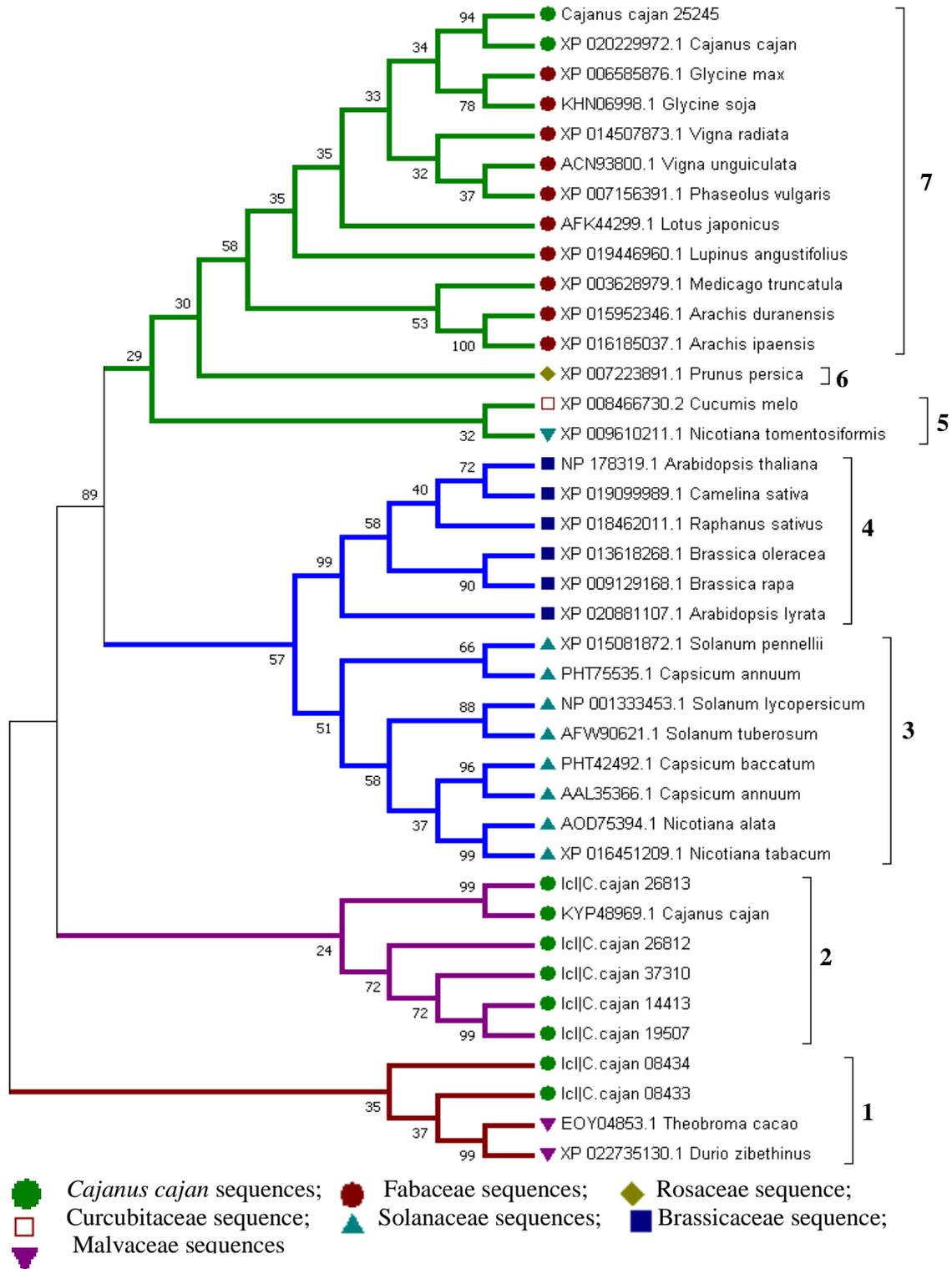


Figura 8 - Análise fenética gerada a partir de seqüências de defensinas de plantas (Apêndice D). Árvore gerada utilizando o método de Neighbor-Joining com valor de bootstrap em nível de 2000 replicações. Os números dos ramos representam os valores de bootstrap obtidos. As cores verde, azul, violeta e vermelho escuro dos ramos representam os grupos IV, III, II e I, respectivamente. Os números 7, 6, 5, 4, 3, 2 e 1, representam os subgrupos formados na análise fenética.

Vale ressaltar que os peptídeos de plantas possuem evolução rápida, visando responder de forma eficiente aos diversos estímulos do meio ambiente aos vegetais. Assim, com base na fenética construída, podemos propor que as sequências isoladas neste trabalho, compreendem defensinas de grupos distintos, provavelmente como resultado da coevolução planta-patógeno, acumulando diferenças em sua estrutura, com um possível impacto nos mecanismos de ação, semelhante ao observado por Belarmino et al. (2010) em cana-de-açúcar. O número significativo de isoformas de defensinas em feijão-guandu pode refletir uma diversidade funcional, com diferentes propriedades antimicrobianas, como proposto por Van der Weerden e Anderson (2013).

Amplificação das sequências via PCR

Em relação à funcionalidade dos oito pares de primers desenhados (Tabela 2), apenas um não amplificou em nenhuma das temperaturas testadas (Caj 8). Os fragmentos amplificados obtiveram tamanhos similares aos desenhados *in silico*. Dos sete pares de primers, todos amplificaram bandas únicas, sendo o material amplificado sequenciado, obtendo-se dois *contigs* (contig 1: Caj1; contig 2: Caj2) e um *singlet* (Caj5). As três sequências obtidas apresentaram homologia com defensinas previamente sequenciadas após um alinhamento realizado (Apêndice B).

Modelagem das sequências

A modelagem dos *contigs* Caj1, 2 e *singlet* Caj5 (agora chamados Def_Caj1, Def_Caj2 e Def_Caj5, respectivamente) foram realizadas por homologia, sendo o modelo do PDB (*Protein Data Bank*) 2lr3 (método de resolução do modelo por RMN) de defensina de *Medicago truncatula* comum para todos os modelos analisados. Todos os modelos gerados tiveram uma cobertura de 100 % e identidade de 74,5 a 83%. Na Figura 9, pode-se observar os modelos tridimensionais das Def_Caj1, Def_Caj2 e Def_Caj5. Todos os modelos foram compostos por três folhas β anti-paralelas e uma α -hélice, estabilizados por três a quatro pontes dissulfeto (Figura 3).

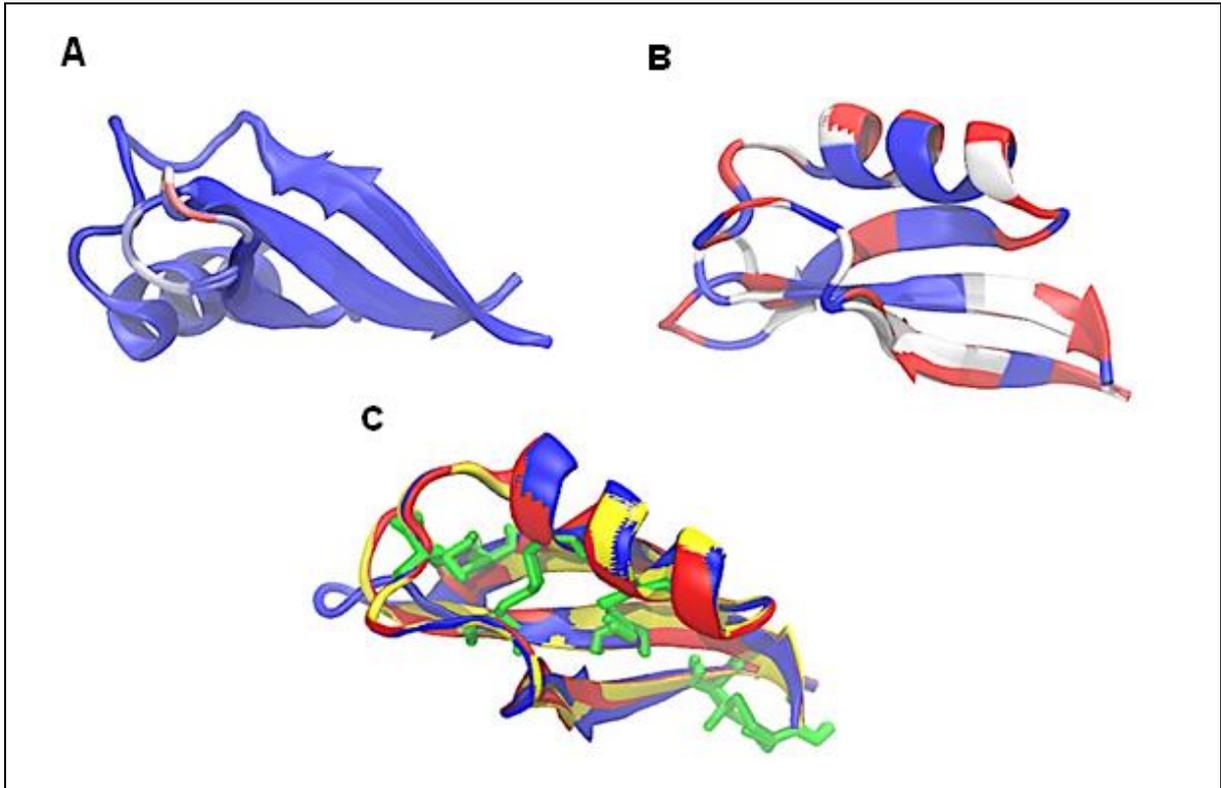


Figura 9 - Modelagem 3D das Def_Caj1, Def_Caj2 e Def_Caj5 sobrepostos. (A) Sobreposição dos modelos destacando a conservação das estruturas tridimensionais (em azul as estruturas similares entre os modelos, em vermelho as regiões diferentes entre os modelos); (B) Sobreposição dos modelos mostrando a similaridade entre as sequências de aminoácidos (em azul os aminoácidos conservados e em vermelho os aminoácidos não conservados); (C) Sobreposição dos modelos mostrando o modelo Caj1 em amarelo, Caj2 em vermelho e Caj5 em azul e as quatro pontes dissulfeto em verde.

As Def_Caj1 e Def_Caj2 apresentaram carga positiva de +8 (devido aos aminoácidos Arg + Lys) e carga negativa de -3 (devido aos resíduos Asp + Glu) enquanto a Def_Caj5 obteve uma carga positiva de +10 e negativa de -3 (Figura 10).

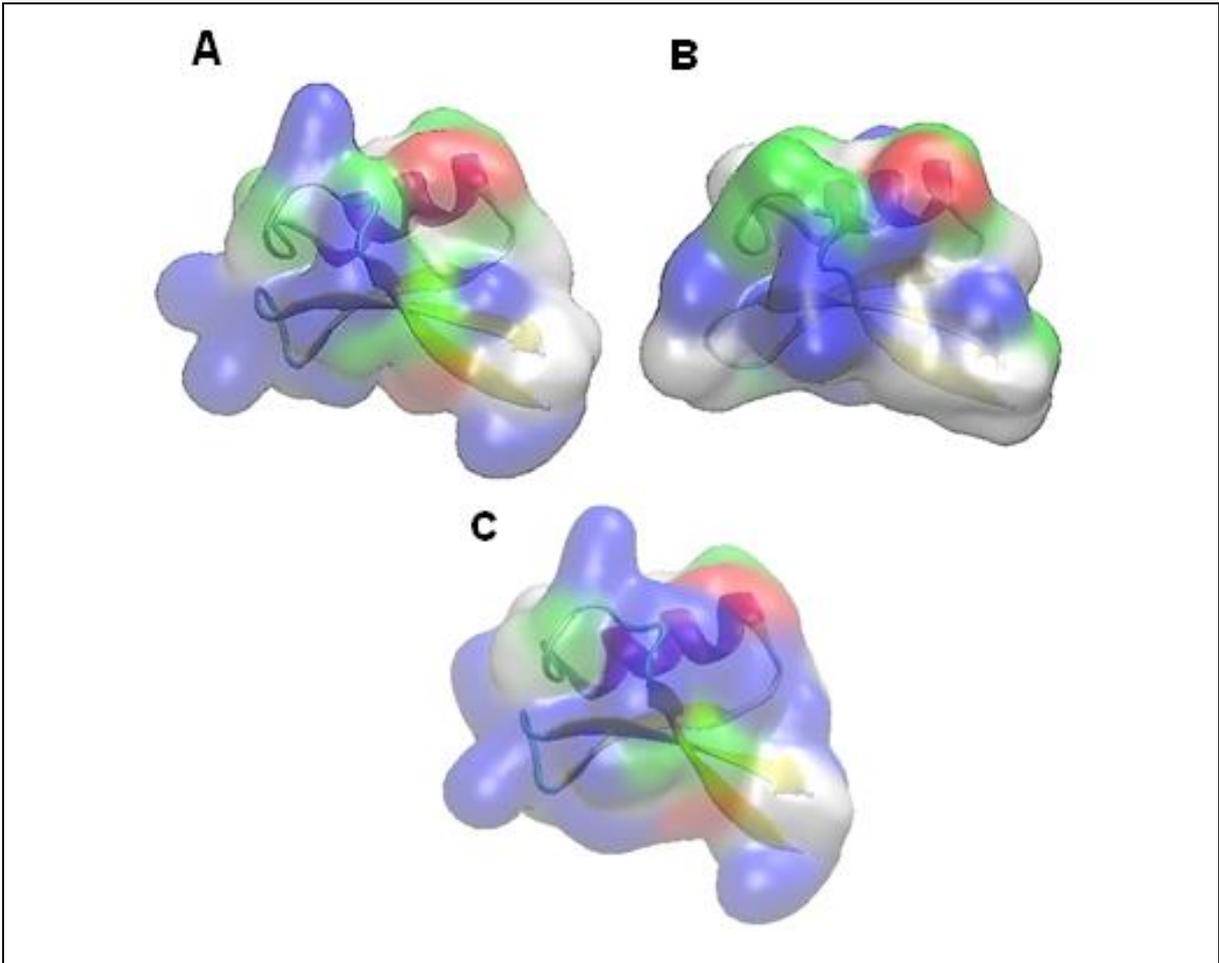


Figura 10 - Modelagem 3D das Def_Caj1 (A) e Def_Caj2 (B) e Def_Caj5 (C) evidenciando o potencial eletrostático de superfície. Em azul resíduos carregados positivamente; em vermelho resíduos carregados negativamente; em branco resíduos apolares e em verde resíduos neutros polares.

Para os três modelos gerados foram analisados os gráficos de Ramachandran. Onde os modelos apresentaram 92,3 a 97 % de resíduos de aminoácidos nas regiões mais favoráveis (Figura 11).

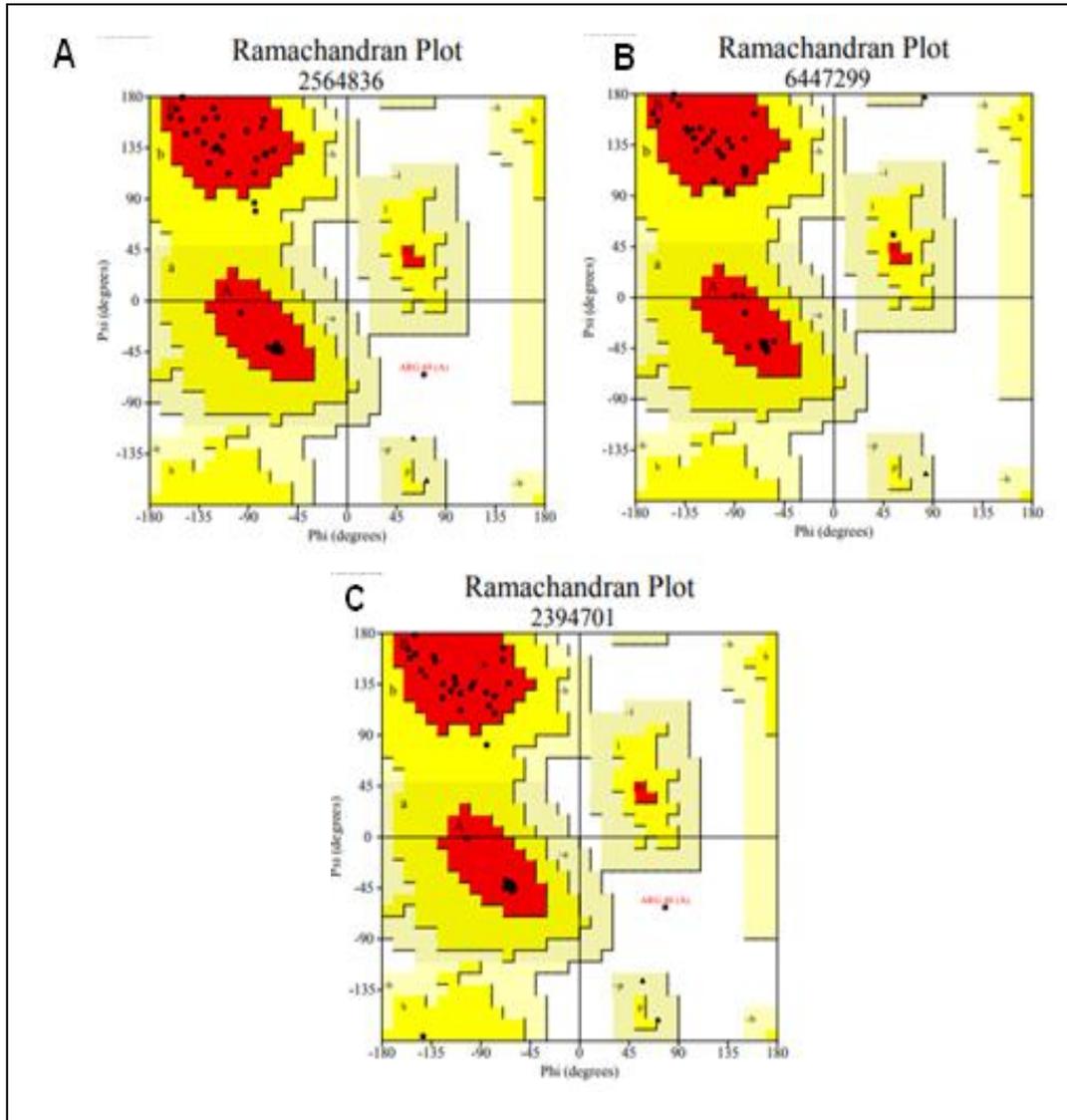


Figura 11 - Gráfico de Ramachandran das Def_Caj1, Def_Caj2 e da Def_Caj5, respectivamente. As regiões em vermelho indicam as áreas favoráveis ao dobramento do peptídeo em relação à posição dos aminoácidos.

As defensinas mostraram uma similaridade estrutural comum entre as β defensinas analisadas, com três folhas β e uma α -hélice como nos trabalhos de Almeida et al. (2002) com defensinas de *Pisum sativum* e Chattopadhyay et al. (2006) com uma defensina de clara de ovo de tartaruga. A Figura 10 mostra que as defensinas obtidas apresentam uma natureza anfipática (cargas positivas e negativas) que é uma propriedade da maioria das defensinas e acredita-se que tenha um papel importante na ligação e na bioatividade dos peptídeos com as membranas de patógenos (Chattopadhyay et al. 2006). De maneira geral, os peptídeos antimicrobianos são de natureza catiônica, podendo ser devido à interação peptídica com a membrana lipídica exposta na superfície de carga negativa de alguns patógenos (Kaas et al. 2010). Defensinas possuem regiões conservadas, como é o caso das três a quatro pontes dissulfeto (Figura 9C), que ajudam a dar estabilidade à sua estrutura, favorecendo sua atividade antimicrobiana (Kraszewska et al. 2016).

Foi analisada a qualidade da modelagem através do PROCHEK. Todos os modelos gerados apresentam mais de 90% dos aminoácidos nas regiões mais favoráveis (Figura 11). O gráfico de Ramachandran possibilita observar a conformação geométrica das ligações covalentes dos peptídeos, sendo fundamental para a compreensão energética e dobramento da estrutura proteica, também utilizada em experimentos de validação de estruturas de proteínas (Lovell et al. 2003). A ferramenta Verify3D foi também usada, sendo que Def_Caj 1 e Def_Caj5 apresentaram 100 % dos aminoácidos nas posições favoráveis em relação ao dobramento da proteína. Por sua vez, a Def_Caj 2 apresentou um valor de 72,34 %, resultado abaixo da média aceitável do servidor (80 %). Em relação à análise realizada pela ferramenta ProQ pode-se observar que todos os modelos obtiveram uma pontuação $\geq 0,4$ (Def_Caj 1: 0,54, Def_Caj 2 0,54 e Def_Caj 5 0,7) mostrando que todos os modelos apresentaram uma alta qualidade de dobramento das estruturas. Desta forma, apesar de Def_Caj2 não ter apresentado valor aceitável para o Verify3D, o peptídeo obteve valores satisfatórios para as outras ferramentas analisadas. Estes resultados indicam que as estruturas modeladas são compatíveis com o modelo (PDB 2lr3). Tal qualidade de dobramento se deve a alinhamento adequado e ao refinamento da estrutura.

Seleção de genes de referência (GRs)

Foram testados 11 genes de referência (Actin-Like, β -TUB 1, β -TUB 2, β -TUB 3 e β -TUB 4, UBQ, Elongation Factor, F-Box, UBQ E2 17, ACT 2/7, TUA 4) em três diferentes tecidos de *C. cajan*: semente, plântula e folha. Dos genes de referência testados, quatro foram eficientes (EF1, β -TUB2, UBQ e UBQ10) nos três tecidos avaliados (Figura 12). Adicionalmente, dois (Actin-Like e F-Box) GRs foram eficientes apenas para folha e plântula, enquanto os demais apresentaram eficiência fora da faixa aceitável (90 a 110 %), sendo portanto, excluídos das análises posteriores.

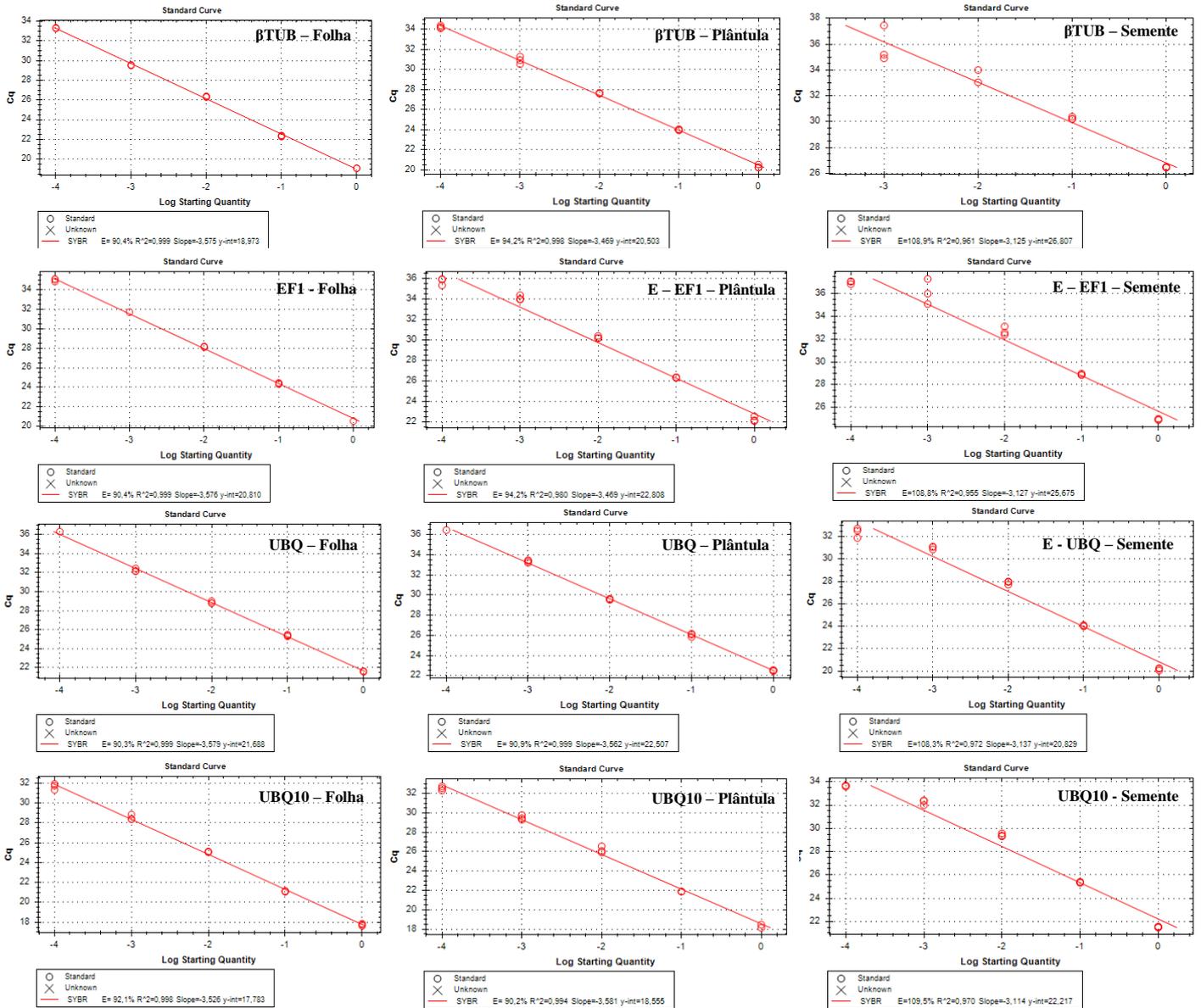


Figura 12 - Eficiência dos genes de referência nos diferentes tecidos analisados

Tabela 4 - Genes de referência e genes alvos, anotações e sequências dos primers.

Gene (Número de acesso)	Função predita	Fonte	Sequência dos primers (forward/reverse)
Genes de referência			
EF1- α	Tradução, Ligação de ácidos nucleicos, Ligação GTP, Atividade GTPase	Guerrero- González et al. (2011)	(F) GGTCATTGGTCATGTCGACTCTGG (R) GCACCCAGGCATACTTGAATGACC
UBQ	Degradação de proteínas	Este trabalho	(F) CCAAGGAACTTCAGATTGCTG (R) GTCATCACCATCATCCATTCC
UBQ10	Degradação de proteínas	Este trabalho	(F) GTCTAAGGGGAGGAATGCAGAT (R) CAAAGATCAACCTCTGCTGGTC
β TUB 2	Constituinte estrutural do citoesqueleto	Este trabalho	(F) AATGTGAAGTCCAGCGTGTG (R) CTTCCCCAGTGTACCAATGC
Genes alvos			
Caj1	Antimicrobiana	Cajanus cajan	(F) TGCAGACTGAGGGAAGATTGTGTGAG (R) TTCCTGCAAACCAGAGCACAGTTG
Caj4	Antimicrobiana	Cajanus cajan	(F) CCGTTTCAAGGGACCATGTGTG (R) ACGGAAGCCACGGCAATGTC

O percentual de eficiência para os quatro GRs selecionados (EF1, β -TUB2, UBQ e UBQ10) variou de 108,3 a 109,5 % em semente, 90,2 a 94,9 % em plântula e 90,3 a 92,1 % em folha. O coeficiente de correlação (*R*) variou entre 0,955 e 0,972 em semente, de 0,980 a 0,999 em plântula e de 0,998 a 0,999 em folha. Os declives variaram de -3,11 a -3,14 em semente, -3,47 a -3,58 em plântula e de 3,53 a 3,58 em folha (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros provenientes da análise de RT-qPCR.

Gene	Tm (°C)	Amplicon (bp)	Média Cqs Semente	E (%)	R	Slope	Y intercept	Média Cqs Plântula	E (%)	R	Slope	Y intercept	Média Cqs Folha	E (%)	R	Slope	Y intercept
EF1	82.0	146	29.10	108.8	0.955	-3.127	25.675	23.75	94.2	0.980	-3.469	22.808	24.26	90.4	0.999	-3.576	20.810
βTUB	82.0	117	31.62	108.9	0.961	-3.125	26.807	23.36	94.9	0.999	-3.562	22.507	22.38	90.4	0.999	-3.575	18.973
UBQ	79.0	150	31.73	108.3	0.972	-3.137	20.829	23.89	94.2	0.998	-3.469	20.503	23.21	90.3	0.999	-3.579	21.688
UBQ10	82.5	150	25,14	109.5	0.970	-3.114	22.217	21.88	90.2	0.994	-3.581	18.555	21.00	92.1	0.998	-3.526	17.783
Caj1	82.0	91	31.17	99.1	0.929	-3.344	27.325	28.37	98.7	0.974	-3.354	24.599	29.59	100.5	0.973	-3.310	25.603
Caj4	82.0	91	33.08	98.6	0.983	-3.355	29.929	23.76	94.0	0.994	-3.476	21.351	22.68	89.3	0.998	-3.609	29.340

Tm: temperatura de *melting* (°C); Cq: Ciclo de quantificação; E: Eficiência dos *primers*; R: Coeficiente de correlação.

Estabilidade de Expressão Gênica dos Genes de Referência

Os GRs selecionados (EF1, β -TUB, UBQ e UBQ10) para análise de estabilidade mostraram variação dos Cqs entre 29,10 e 31,73 em semente, 23,36 a 23,89 em plântula e 22,38 a 24,26 em folha (Tabela 5). Em relação aos três tecidos testados foi observado que os Cqs foram mais tardios em sementes, indicando um nível de expressão menor do que o observado para folha e plântula.

Análise no GeNorm

Considerando os valores de estabilidade de expressão (M) fornecidos para todos os GR de forma individual, UBQ ($M = 1,433$) e EF1 ($M = 1,5$) foram indicados como os genes mais estáveis, seguidos por β -TUB ($M = 1,635$) e UBQ10 ($M = 1,899$). No entanto, quando avaliados conjuntamente, os genes UBQ e β -TUB foram considerados como o melhor par da análise, com EF1 e UBQ10 indicados como terceiro e quarto genes, respectivamente (Figura 13). Apesar dos valores de M obtidos neste trabalho estarem acima do ponto de corte ($M > 1$) indicado por (Vandesompele et al. 2002), os dados podem ser considerados devido à diferença no nível de expressão entre os três tecidos utilizados, o que justificaria a variação observada para cada GR.

Adicionalmente, foi possível determinar o número ótimo de genes de referência necessários para a análise de quantificação relativa. Os dados obtidos sugerem que a adição de um terceiro ($\sqrt{2/3} = 0,594$) ou de um quarto gene ($\sqrt[3]{3/4} = 0,458$) (Figura 14) aos dois GRs mais estáveis (UBQ e β TUB) ainda não seria suficiente para atingir o ponto de corte ($< 0,15$) recomendado, ressaltando mais uma vez a variação dos níveis de expressão das amostras.

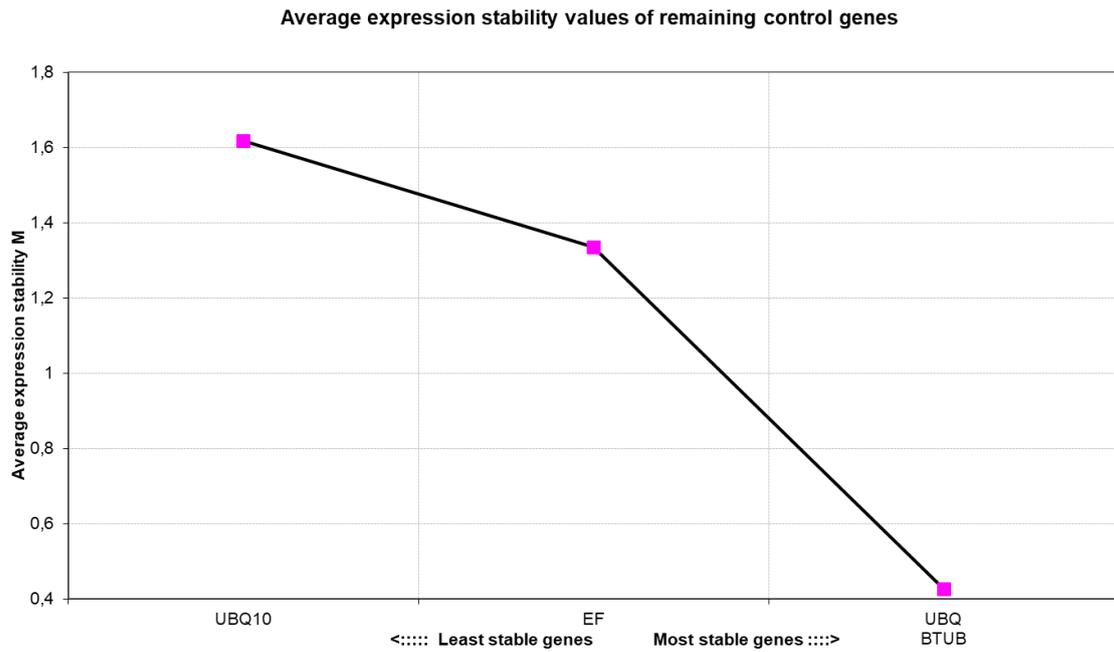


Figura 13 - Valores médios de estabilidade de expressão gerado pelo GeNorm.

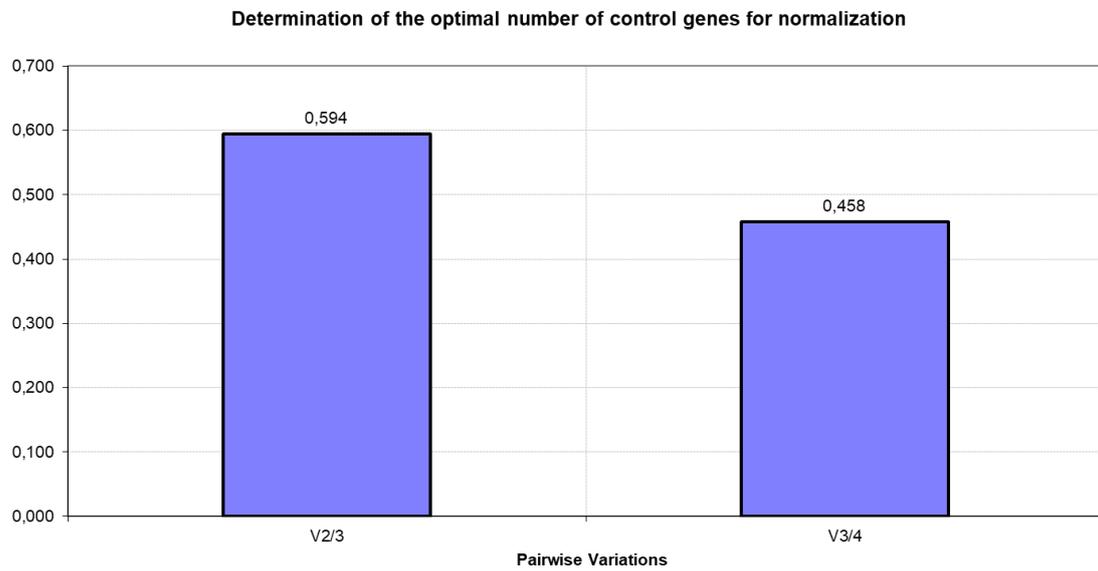


Figura 14 - Determinação do número de genes de referência ideal para normalização dos dados de expressão.

Análise no NormFinder e BestKeeper

O ranking de estabilidade fornecido pelo NormFinder indicou EF1 ($M = 0,028$) como gene mais estável, seguido por UBQ ($M = 0,029$), β TUB e UBQ10 (ambos com $M = 0,040$) (Tabela 6). No BestKeeper, levando em consideração o coeficiente de correlação de Pearson, a ordem de classificação foi UBQ, β TUB, UBQ10 e EF1 (Tabela 6), similarmente ao verificado no Genorm, com UBQ e β TUB mais uma vez sendo considerado o par mais estável.

De acordo com os resultados obtidos nos três softwares, convencionou-se escolher os genes de referência UBQ, β TUB e EF1 para a normalização dos dados RT-qPCR.

Tabela 6 - Valores obtidos pela análise dos softwares NormFinder e BestKeeper para os GRs

NormFinder			BestKeeper			
Ranking	Genes	M	Ranking	Genes	R	CV \pm SD
1	EF1- α	0.028	1	UBQ	0,999	(13,83 \pm 3.63)
2	UBQ	0.029	2	β -TUB	0,999	(15,07 \pm 3.89)
3	β -TUB 2	0.040	3	UBQ10	0,991	(1,65 \pm 7.27)
4	UBQ10	0.040	4	EF1	0,987	(8,81 \pm 2.27)

CV: coeficiente de variação e SD: desvio padrão

Análise de expressão diferencial

Foram desenhados sete pares de *primers* referentes a genes codificadores de defensinas (Caj1 ao Caj7) a fim de avaliar a expressão por RT-qPCR em diferentes tecidos (sementes, folhas e plântulas) de *C. cajan*, sob condições normais (sem estresse). Destes, dois pares de *primers* (Caj1 e Caj4) foram eficientes em todos os tecidos analisados (Tabela 5; Figura 15). As análises de expressão relativa foram normalizadas com os genes de referência β TUB, UBQ e EF1, sendo utilizada a semente como amostra controle.

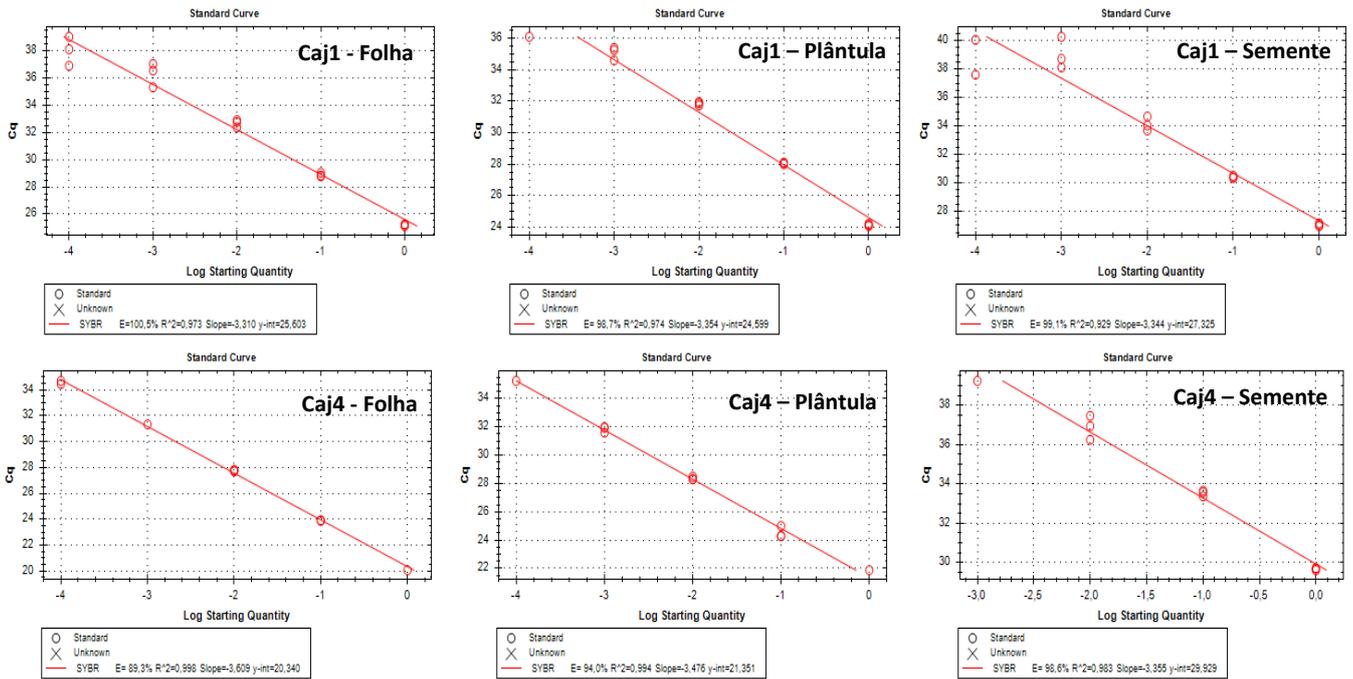


Figura 15 - Curva de eficiência dos genes alvos (Caj1 e Caj4).

Em relação à quantificação relativa, o Caj4 foi superexpresso 11,9 e 7,8 vezes para plântula e folha, respectivamente, comparado ao tecido controle (semente), como mostra a figura 16. Para o gene Caj1 não foram observados níveis de expressão significativos em nenhum dos tecidos avaliados (folha e plântula) (Figura 16).

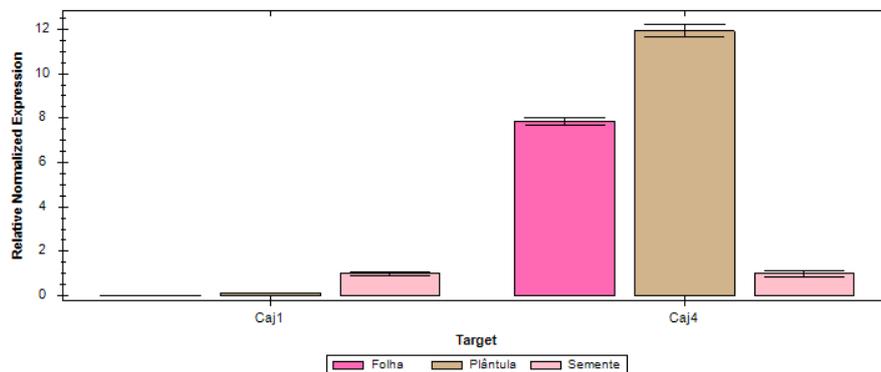


Figura 16 - Expressão relativa dos Caj1 e Caj4 nos tecidos alvo

A cultura do *C. cajan* possui relevante importância econômica e desperta interesse etnobotânico pela descoberta de seus inúmeros compostos bioativos,

incluindo peptídeos (Tekale et al. 2016). A análise de expressão diferencial de defensinas em relação aos mais diversos tecidos vegetais permanece sob intensa pesquisa, devido à importância em descobrir novos agentes antimicrobianos seja no combate de patógenos humanos resistentes ou no combate a fitopatógenos. A RT-qPCR é atualmente uma das técnicas mais utilizadas para análise da expressão gênica, devido a seus parâmetros rápidos, precisos e altamente sensíveis. Neste contexto, a seleção de genes de referência vem ganhando atenção em culturas de importância socioeconômica, como o feijão. Até o momento, poucos estudos têm sido reportados envolvendo genes de referência em *C. cajan* e em sua maioria, relatam o uso de genes de referência conhecidos na literatura, como por exemplo, EF1 α , UBQ10, GAPDH e TUB6, sob condições de estresses abióticos e bióticos (Sinha et al. 2015). No entanto, ainda é ínfimo o número de genes de referência testados e validados em *C. cajan*. No presente estudo, potenciais genes de referência foram avaliados em diferentes softwares (GeNorm, NormFinder e Bestkeeper) com o objetivo de analisar a normalização dos dados de expressão de genes codificadores de defensinas em amostras de cDNA de tecidos foliares, plântulas e sementes de *C. cajan*. Após avaliação nos três softwares, os genes de referência β TUB, UBQ e EF1 foram considerados apropriados para validação via RT-qPCR dos genes Caj1 e Caj4 nos diferentes tecidos analisados.

Em relação aos genes codificadores de defensina, o Caj4 demonstrou uma superexpressão nos tecidos analisados (plântula e folha) e uma expressão tardia em semente, enquanto que o Caj1 demonstrou uma baixa expressão nos mesmos tecidos. Isto pode ser compreendido pelas diferentes vias de ativação de um gene constitutivo que pode não ser expresso em determinadas situações (sem estímulo externo). As proteínas PR, por exemplo, se manifestam em resposta a um estímulo (van Loon et al. 2006), o que possivelmente está relacionado com a classe PR-12 de defensinas, como verificado no presente estudo para o gene Caj1, que codifica uma defensina. Resultados semelhantes foram relatados por Beer e Vivier (2011), avaliando a expressão gênica de defensinas de Brassicaceae, sendo verificado que os peptídeos Hc-AFP1 e Hc-AFP3 foram expressos em tecidos foliares, sementes, caules e flores, enquanto que Hc-AFP2 e Hc-AFP4 foram expressos apenas em sementes e vagens, demonstrando expressão tecido-específica. Em outra análise realizada por Meyer et al. (1996) com uma defensina de pimentão (J1) foi verificado uma superexpressão no fruto maduro, porém, em frutos verdes os níveis de

expressão foram baixos, bem como nos frutos em estágio de crescimento. Isto pode ajudar a compreender os baixos níveis de expressão observados para o Caj1 em nosso estudo, uma vez que, a maioria das defensinas são expressas através de estímulos (resposta hipersensível) ao longo do crescimento da planta. Por outro lado, defensinas vegetais são conhecidas como componentes importantes do sistema de defesa inato de plantas, incluindo a sua expressão em tecidos superficiais e em diferentes órgãos, o que confere também uma via de defesa constitutiva (Broekaert et al. 1995).

Conclusões

Foi possível verificar a eficiência do método proposto de mineração e caracterização para a obtenção de defensinas de *C. cajan*, sendo possível também prospectar outros tipos de AMPs.

Apesar das regiões conservadas nos peptídeos maduros das defensinas prospectadas, pode-se observar diferenças em alguns resíduos de aminoácidos, porém, isso não afetou diretamente a conformação tridimensional dessas defensinas, mostrando que as estruturas são mais conservadas que as sequências.

Através da técnica de RT-qPCR foi verificado os níveis de expressão em diferentes tecidos de *C. cajan* onde foi verificado superexpressão de defensina (Caj4) em alguns tecidos analisados (plântula e folha). Por outro lado, ocorreu baixa expressão desses peptídeos nos mesmos tecidos, podendo ser justificado pelo modo de ativação com que genes constitutivos são expressos. Foi possível também validar genes de referência até então pouco explorados em relação à espécie em estudo. As diferenças entre sequências primárias, bem como os padrões de expressão de genes aqui apresentado, fornecem interesse do presente grupo em explorar a relação estrutura-atividade desses peptídeos com mais afinco.

Referências

- Almeida, Marcius S, Katia M.S Cabral, Eleonora Kurtenbach, Fabio C.L Almeida, e Ana Paula Valente. 2002. "Solution Structure of Pisum Sativum Defensin 1 by High Resolution NMR: Plant Defensins, Identical Backbone with Different Mechanisms of Action 1 Edited by M. F. Summers". *Journal of Molecular Biology* 315 (4): 749–57. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5252>.
- Altschul, S. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Andersen, Claus Lindbjerg, Jens Ledet Jensen, e Torben Falck Ørntoft. 2004. "Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets". *Cancer Research* 64 (15): 5245–50. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.
- Arnold, Isabel, Mechthild Wagner-Ecker, Wilhelm Ansorge, e Thomas Langer. 2006. "Evidence for a Novel Mitochondria-to-Nucleus Signalling Pathway in Respiring Cells Lacking i-AAA Protease and the ABC-Transporter Mdl1". *Gene* 367 (fevereiro): 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.09.044>.
- Bahar, Ali, e Dacheng Ren. 2013. "Antimicrobial Peptides". *Pharmaceuticals* 6 (12): 1543–75. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>.
- Beer, Abré de, e Melané A Vivier. 2011. "Four Plant Defensins from an Indigenous South African Brassicaceae Species Display Divergent Activities against Two Test Pathogens despite High Sequence Similarity in the Encoding Genes". *BMC Research Notes* 4 (1): 459. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-459>.
- Belarmino, L.C., P.V.S.Z. Capriles, S. Crovella, L.E. Dardenne, e A.M. Benko-Iseppon. 2010. "EST-Database Search of Plant Defensins – An Example Using Sugarcane, a Large and Complex Genome". *Current Protein & Peptide Science* 11 (3): 248–54. <https://doi.org/10.2174/138920310791112048>.
- Benko-Iseppon, A.-M., P. Winter, B. Huettel, C. Staginnus, F. J. Muehlbauer, e G. Kahl. 2003. "Molecular Markers Closely Linked to Fusarium Resistance Genes in Chickpea Show Significant Alignments to Pathogenesis-Related Genes Located on Arabidopsis Chromosomes 1 and 5". *Theoretical and Applied Genetics* 107 (2): 379–86. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1260-x>.
- Benko-Iseppon, Ana Maria, e Sergio Crovella. 2010. "Ethnobotanical Bioprospection of Candidates for Potential Antimicrobial Drugs from Brazilian Plants: State of Art and Perspectives". *Current Protein & Peptide Science* 11 (3): 189–94.

- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, e D. L. Wheeler. 2007. "GenBank". *Nucleic Acids Research* 36 (Database): D25–30. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm929>.
- Bordoli, Lorenza, Florian Kiefer, Konstantin Arnold, Pascal Benkert, James Battey, e Torsten Schwede. 2009. "Protein Structure Homology Modeling Using SWISS-MODEL Workspace". *Nature Protocols* 4 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.197>.
- Broekaert, W. F., F. R. Terras, B. P. Cammue, e R. W. Osborn. 1995. "Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System". *Plant Physiology* 108 (4): 1353–58. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1353>.
- Brogden, Kim A. 2005. "Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?" *Nature Reviews Microbiology* 3 (3): 238–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments". *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Carvalho, André de Oliveira, e Valdirene Moreira Gomes. 2009. "Plant Defensins—Prospects for the Biological Functions and Biotechnological Properties". *Peptides* 30 (5): 1007–20. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.01.018>.
- Ceroni, A., A. Passerini, A. Vullo, e P. Frasconi. 2006. "DISULFIND: A Disulfide Bonding State and Cysteine Connectivity Prediction Server". *Nucleic Acids Research* 34 (Web Server): W177–81. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl266>.
- Chattopadhyay, Suranjana, Nirmal Kumar Sinha, Shuvojit Banerjee, Debjani Roy, Dhruvajyoti Chattopadhyay, e Siddhartha Roy. 2006. "Small Cationic Protein from a Marine Turtle Has β -Defensin-like Fold and Antibacterial and Antiviral Activity". *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 64 (2): 524–31. <https://doi.org/10.1002/prot.20963>.
- Ding, Shifei, Hui Li, Chunyang Su, Junzhao Yu, e Fengxiang Jin. 2013. "Evolutionary Artificial Neural Networks: A Review". *Artificial Intelligence Review* 39 (3): 251–60. <https://doi.org/10.1007/s10462-011-9270-6>.
- Duranti, Marcello. 2006. "Grain Legume Proteins and Nutraceutical Properties". *Fitoterapia* 77 (2): 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.11.008>.
- Ferre, F., e P. Clote. 2005. "DiANNA: A Web Server for Disulfide Connectivity Prediction". *Nucleic Acids Research* 33 (Web Server): W230–32. <https://doi.org/10.1093/nar/gki412>.

- Hall, Tom A. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". In *Nucleic acids symposium series*, 41:95–98. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Hammami, R., J. Ben Hamida, G. Vergoten, e I. Fliss. 2009. "PhytAMP: A Database Dedicated to Antimicrobial Plant Peptides". *Nucleic Acids Research* 37 (Database): D963–68. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn655>.
- Holly, Mayumi K., Karina Diaz, e Jason G. Smith. 2017. "Defensins in Viral Infection and Pathogenesis". *Annual Review of Virology* 4 (1): 369–91. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041734>.
- Kaas, Quentin, Jan-Christoph Westermann, Sónia Troeira Henriques, e David J. Craik. 2010. "Antimicrobial peptides in plants". *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design, and Novel Therapeutic Strategies*, 40–71.
- Karasuyama, Masayuki, e Ichiro Takeuchi. 2010. "Multiple Incremental Decremental Learning of Support Vector Machines". *IEEE Transactions on Neural Networks* 21 (7): 1048–59. <https://doi.org/10.1109/TNN.2010.2048039>.
- Kraszewska, Joanna, Michael C. Beckett, Tharappel C. James, e Ursula Bond. 2016. "Comparative Analysis of the Antimicrobial Activities of Plant Defensin-Like and Ultrashort Peptides against Food-Spoiling Bacteria". Organizado por J. Björkroth. *Applied and Environmental Microbiology* 82 (14): 4288–98. <https://doi.org/10.1128/AEM.00558-16>.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, et al. 2007. "Clustal W and Clustal X Version 2.0". *Bioinformatics* 23 (21): 2947–48. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, D. S. Moss, e J. M. Thornton. 1993. "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures". *Journal of Applied Crystallography* 26 (2): 283–91. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>.
- Lay, Fung T., Filippa Brugliera, e Marilyn A. Anderson. 2003. "Isolation and Properties of Floral Defensins from Ornamental Tobacco and Petunia". *Plant Physiology* 131 (3): 1283–93. <https://doi.org/10.1104/pp.102.016626>.
- Lin, Yi, e Yongho Jeon. 2006. "Random Forests and Adaptive Nearest Neighbors". *Journal of the American Statistical Association* 101 (474): 578–90. <https://doi.org/10.1198/016214505000001230>.
- Loon, L.C. van, M. Rep, e C.M.J. Pieterse. 2006. "Significance of Inducible Defense-Related Proteins in Infected Plants". *Annual Review of Phytopathology* 44 (1): 135–62. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>.
- Lovell, Simon C., Ian W. Davis, W. Bryan Arendall, Paul I. W. de Bakker, J. Michael Word, Michael G. Prisant, Jane S. Richardson, e David C. Richardson. 2003.

- “Structure Validation by C α Geometry: ϕ , ψ and C β Deviation”. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 50 (3): 437–50.
<https://doi.org/10.1002/prot.10286>.
- Macho, Alberto P., e Cyril Zipfel. 2014. “Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling”. *Molecular Cell* 54 (2): 263–72.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.028>.
- Marchler-Bauer, A., e S. H. Bryant. 2004. “CD-Search: Protein Domain Annotations on the Fly”. *Nucleic Acids Research* 32 (Web Server): W327–31.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh454>.
- Meyer, B., G. Houlne, J. Pozueta-Romero, M. L. Schantz, e R. Schantz. 1996. “Fruit-Specific Expression of a Defensin-Type Gene Family in Bell Pepper (Upregulation during Ripening and upon Wounding)”. *Plant Physiology* 112 (2): 615–22. <https://doi.org/10.1104/pp.112.2.615>.
- Parisi, Kathy, Thomas M.A. Shafee, Pedro Quimbar, Nicole L. van der Weerden, Mark R. Bleackley, e Marilyn A. Anderson. 2019. “The Evolution, Function and Mechanisms of Action for Plant Defensins”. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 88 (abril): 107–18. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.004>.
- Pelegri, Patrícia B., e Octávio L. Franco. 2005. “Plant γ -Thionins: Novel Insights on the Mechanism of Action of a Multi-Functional Class of Defense Proteins”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (11): 2239–53.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.06.011>.
- Petersen, Thomas Nordahl, Søren Brunak, Gunnar von Heijne, e Henrik Nielsen. 2011. “SignalP 4.0: Discriminating Signal Peptides from Transmembrane Regions”. *Nature Methods* 8 (10): 785–86.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>.
- Pfaffl, Michael W., Ales Tichopad, Christian Prgomet, e Tanja P. Neuvians. 2004. “Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: BestKeeper--Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations”. *Biotechnology Letters* 26 (6): 509–15.
- Rombel, Irene T., Kathryn F. Sykes, Simon Rayner, e Stephen Albert Johnston. 2002. “ORF-FINDER: A Vector for High-Throughput Gene Identification”. *Gene* 282 (1–2): 33–41. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00819-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00819-8).
- Shafee, Thomas M. A., Fung T. Lay, Mark D. Hulett, e Marilyn A. Anderson. 2016. “The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies”. *Molecular Biology and Evolution* 33 (9): 2345–56.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw106>.
- Shafee, Thomas M. A., Fung T. Lay, Thanh Kha Phan, Marilyn A. Anderson, e Mark D. Hulett. 2017. “Convergent Evolution of Defensin Sequence, Structure and Function”. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (4): 663–82.
<https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5>.

- Sinha, Pallavi, Vikas K. Singh, V. Suryanarayana, L. Krishnamurthy, Rachit K. Saxena, e Rajeev K. Varshney. 2015. "Evaluation and Validation of Housekeeping Genes as Reference for Gene Expression Studies in Pigeonpea (*Cajanus Cajan*) Under Drought Stress Conditions". Organizado por Girdhar K. Pandey. *PLOS ONE* 10 (4): e0122847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122847>.
- Tekale, Satishkumar S., Bhimrao V. Jaiwal, e Manohar V. Padul. 2016. "Identification of Metabolites from an Active Fraction of *Cajanus Cajan* Seeds by High Resolution Mass Spectrometry". *Food Chemistry* 211 (novembro): 763–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.128>.
- Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, e J. A.M. Leunissen. 2007. "Primer3Plus, an Enhanced Web Interface to Primer3". *Nucleic Acids Research* 35 (Web Server): W71–74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>.
- Vandesompele, Jo, Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe, e Frank Speleman. 2002. "[No title found]". *Genome Biology* 3 (7): research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
- Waghu, Faiza Hanif, Ram Shankar Barai, Pratima Gurung, e Susan Idicula-Thomas. 2016. "CAMP_{R3}: A Database on Sequences, Structures and Signatures of Antimicrobial Peptides: Table 1." *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D1094–97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1051>.
- Wanderley-Nogueira, Ana, Joao Bezerra-Neto, Ederson Kido, Flavia Araujo, Lidiane Amorim, Sergio Crovella, e Ana Benko-Iseppon. 2017. "Plant Elite Squad: First Defense Line and Resistance Genes – Identification, Diversity and Functional Roles". *Current Protein & Peptide Science* 18 (4): 294–310. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160724193045>.
- Weerden, Nicole L. van der, e Marilyn A. Anderson. 2013. "Plant Defensins: Common Fold, Multiple Functions". *Fungal Biology Reviews* 26 (4): 121–31. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.08.004>.
- Weising, Kurt, Hilde Nybom, Markus Pfenninger, Kirsten Wolff, e Günter Kahl. 2005. *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. CRC press.
- Xu, Dong, e Yang Zhang. 2011. "Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-Step Atomic-Level Energy Minimization". *Biophysical Journal* 101 (10): 2525–34. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.10.024>.
- Zhao, Lu, Qi Ding, Jun Zeng, Fu-Rong Wang, Jun Zhang, Shou-Jin Fan, e Xin-Qiang He. 2012. "An Improved CTAB-Ammonium Acetate Method for Total RNA Isolation from Cotton: CTAB-Ammonium Acetate Method for RNA Isolation from Cotton". *Phytochemical Analysis* 23 (6): 647–50. <https://doi.org/10.1002/pca.2368>.

CAPÍTULO II

Novel antimicrobial peptide modified from defensin *Cajanus cajan* with antimicrobial activity

Lívia Maria Batista Vilela¹; Carlos André dos Santos Silva¹; Isis Caroline da Silva Cirino¹; Carlos Henrique Bezerra Cruz³; Marx Oliveira de Lima¹; Teresa Christina Leal-Balbino²; Roberto Dias Lins Neto³; Alessandro Tossi⁴; Sérgio Crovella¹; Ana Maria Benko-Iseppon^{1*}

¹Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 50.670-423, Recife - PE, Brazil.

²Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Prof. Moraes Rego, s/n., Cidade Universitária, CEP 50670420, Recife - PE, Brazil.

³Departamento de Virologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Professor Moraes Rego, s/n., Cidade Universitária, CEP 50740-465, Recife - PE, Brazil.

⁴Department of Life Sciences, University of Trieste, Via Licio Giorgieri 1, 34127 Trieste, Italy.

*Corresponding Author's e-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) present an outstanding role in defense against microbial pathogens (mainly bacteria and fungi) in multicellular eukaryotes. Such molecules are considered less susceptible to bacterial resistance processes than traditional antibiotics. Defensins comprise a class of AMP with crucial roles in the innate immune system and lasting defense against pathogenic infections in both plants and animals. Few defensins have been engineered up to date. In the present work, a new defensin was identified in the legume *Cajanus cajan* and was modified (PDef-Caj1) using in silico approaches to predict its antimicrobial activity and structural stability. The best model of the newly synthesized PDef-Caj1 exhibits four cysteine residues, forming two disulfide bridges. *In vitro* assays of PDef-Caj1 revealed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (at concentrations of 16 µg.ml⁻¹) and *Acinetobacter baumannii* (at 256 µg.ml⁻¹). The peptide was also tested against yeasts, having better activity against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* at the concentration of 64 µg.ml⁻¹. The hemolysis and

cytotoxicity assays of PDef-Caj1 showed low cytotoxicity in human erythrocyte cells and cytotoxicity of $\pm 256 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ against rat macrophages cells. In view of the results, PDef-Caj1 regards a promising candidate with potential for the development of a new antimicrobial compound.

Keywords Plant defensins. Molecular modeling. Molecular dynamics. Peptide synthesis. Bacterial resistance.

INTRODUCTION

Since the first antibiotic was discovered by Alexander Fleming in 1929 (Fleming 1929), inadequate and constant use of antibiotics has become a critical factor in triggering increasing bacterial resistance and this has become a worldwide public health problem recognized by world organizations such as the United Nations (UN) and World Health Organization (WHO) (Tacconelli et al. 2017). However, innovative molecules have emerged as partners in the fight against severe infections caused by bacteria resistant to numerous drugs already established in the market, such as antimicrobial peptides (AMPs) (Arias e Murray 2009). AMPs are found in all groups of organisms, from bacteria, fungi, to plants and animals and are notable for having significant antimicrobial activity against bacteria, viruses, fungi, protozoa, cancer cells, and cardiovascular diseases, besides antioxidant action, among other functions (Zasloff 2002; Brogden 2005; Nascimento et al. 2015). These compounds are considered less susceptible to bacterial resistance than traditional antibiotics, presenting the potential for the development of a new class of therapeutic agents (Cândido et al. 2014).

Plants are important producers of bioactive molecules acting against systemically invading organisms, whereas AMPs are key components in innate immunity (Reddy et al. 2004; Benko-Iseppon et al. 2010). In view of their potential, plant-derived peptides have attracted the interest of the scientific community and of the pharmaceutical industry, with defensins figuring among the most important groups, because they have proven action against pathogens, for the knowledge of their mechanisms of action, their capacity of rupturing membranes and ability to transfer to a target receptor (Morgera et al. 2008). One of the reasons for the stability of defensins is their structural formation, which generally has three to four disulfide

bonds, which confer greater stability in the interaction with the microbial target (Kraszewska et al. 2016). These cysteines are mainly located in the conserved domain that can be predicted from computational tools (Li et al. 2012). Sequences of peptides with antimicrobial potential can be identified from protein databases and can be synthesized or expressed in heterologous systems (Lata et al. 2007; Torrent et al. 2011; Porto, 2012). However, the number of studies performed to obtain isolated and purified proteins and peptides is relatively limited in comparison to the number of peptides available. This limitation is justified by way of obtaining these proteins, which requires time and efforts (Keller 2018), alongside the difficulty of expressing them in microbial systems (Gazzaneo et al. 2017).

Among angiosperms, the Fabaceae family is one of the most promising sources of AMPs, due to its traditional ethnomedicinal uses, its adaptations to different environmental conditions (Benko-Iseppon et al. 2010) and its known arsenal of bioactive molecules (Duranti 2006). A legume of medicinal, nutritional, economic and ecological importance is *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (pigeon pea), known for its antioxidant and chelating properties, besides the production of bioactive molecules (Tekale et al. 2016). This species also has a sequenced genome available in GenBank (Varshney et al. 2012) for structural and functional studies, as well as for applications in biotechnology.

In the present work, a new defensin was identified in the genome of *C. cajan*, being reduced and structurally evaluated *in silico*. Additionally, its antimicrobial capacity was tested against a range of human pathogens, with promising results.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining Modeling and Reducing Sequences

Defensin sequences of *C. cajan* were amplified by conventional PCR and sequencing using the genetic material of *C. cajan*, according to Vilela et al. (in prep.). The sequences were characterized and one of them (PDef-Caj1) was reduced from 45 to 20 amino acids taking into account their molecular weight, difficulty in synthesizing, folding (by modeling the candidates), cost and prediction of antimicrobial activity available in CAMP_{R3} (Waghu et al. 2016).

PDef-Caj1 candidate models were generated using the ROSETTA algorithm (Leaver-Fay et al. 2011). The models had their structures minimized and mutations were induced to form different combinations of disulfide bridges between the four cysteines present in the sequence. Finally, PROCHECK (Laskowski et al. 1996) was used for the stereochemical analysis of the model, using the Ramachandran graph, observing the position of the amino acids in the most favorable regions.

Molecular Dynamics (MD)

Molecular dynamics (MD) is a computational simulation technique that predicts the changes in the positions and velocities of the constituent atoms of a system under a given time and condition. This calculation is done through a classical approximation of empirical parameters, called “force field” (Robustelli et al. 2018). If, on the one hand, this approximation makes the dynamics of a system containing thousands of atoms numerically accessible, it obviously limits the nature of the processes that can be observed during the simulations. No quantum effect is visualized in a molecular dynamics simulation, just as no chemical bond is broken, no interactions occur between orbitals, resonance, polarization or charge transfer effects (Freddolino et al. 2010). However, the molecules go beyond a static system. Thus, MD is a computational technique that can be used for predicting or refining structures, dynamics of molecular complexes, drug development and action of molecular biological systems (Karplus e McCammon 2002). MD simulation is widely used for protein research, aiming to extract information about the physical properties of individual proteins. The results of such simulations are then compared with experimental results. Since these experiments are generally carried out in solvents, it is necessary to simulate molecular systems of protein in water. These simulations have a variety of applications, such as determining the folding of a structure to a native structure and analyzing the dynamic stability of this structure (Mitsutake e Takano 2018).

The use of MD to simulate protein folding processes is one of the most challenging applications and should be relatively long (in the order of microseconds to milliseconds) to allow observing a single fold event. In addition, the force field used must correctly describe the relative energies of a wide variety of shapes, including unfolding and poorly folded shapes that may occur during the simulation (Freddolino

et al. 2010). The considerable application potential led to the implementation of MD simulation in many software packages, including GROMACS (Hess et al. 2008; Abraham et al. 2015), AMBER (Case et al. 2005), NAMD (Phillips et al. 2005), CHARMM (Brooks et al. 1983), LAMMPS (Plimpton 1995) and Desmond (Bowers et al. 2006). In addition to the above mentioned, there are other types of simulation available, such as the Monte Carlo Method, Stochastic Dynamics and Brownian Dynamics (Abraham et al. 2015).

In the last decades, molecular dynamics simulation has become a standard tool in theoretical studies of large biomolecular systems, including DNA or proteins, in environments with near realistic solvents. Historically the computational complexity of this type of computation has been extremely high, and much research has focused on algorithms to achieve unique simulations that are as long or as large as possible (Hess et al. 2008).

Peptide synthesis

The peptide was purchased from *NovoPro Bioscience Inc.* (Shanghai, China). The purity of the peptides (95 %) was assessed by reverse-phase high-performance liquid chromatography, and the peptides were further subjected to electrospray mass spectrometry to confirm their molecular weight. The peptides were amidated at the C terminus.

Circular dichroism (CD)

CD spectroscopy was performed on a J-715 spectropolarimeter (Jasco) using 2-mm path length quartz cells and 20 μ M peptides in water in the wavelength region from 190 to 240 nm, 10 mM SPB (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) and at increasing concentrations of trifluoroethanol (TFE) in sodium phosphate buffer (SPB). The helical content (percentage helix) was estimated from the molar ellipticity at 222 nm (Chen et al. 1974). CD spectra were the result of the accumulation of at least three scans.

Antimicrobial activity

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against PDef-Caj1 were determined by broth microdilution method following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) with modifications. For this, the PDef-Caj1 in Cation-adjusted Müller-Hinton broth (CA-MHB) (Sigma) was added to the plate under serial dilution (50 μ L). Briefly, bacterial cells were cultured in Müller Hinton (Himedia) with 1 ml of CA-MHB overnight at 37 ° C and was determined by the dissolved oxygen density (OD_{625nm} of 0.08-0.13 AU) corresponding to 0.5 of the scale of McFarland ($1-5 \times 10^8$ CFU.mL⁻¹). The solution was diluted (1:1000) in CA-MHB and inoculated into the wells of the microdilution plate (50 μ L) so that the final concentration of bacterial cell density was approximately $1-5 \times 10^5$ CFU.mL⁻¹. The MIC were determined as the lowest concentration of peptide that inhibited bacterial growth after incubation at 37 °C for 18 to 20 h, the uninoculated CA-MHB medium being used as the negative control, and cultures without peptide addition served as positive control. For MBC, the plating of 10 μ L of each well that showed no visible growth in MH plate and incubated for 24 h at 37 °C was performed, and MBC was considered the concentration in which it did not present bacterial growth. The bacterial strains used in the experiment were provided by the microbiology laboratory of the Aggeu Magalhães Institute (Fiocruz / PE). PDef-Caj1 was tested against Gram-positive strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and resistant *S. aureus* MRSA04673 and gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* resistant Pa_39, and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 and *K. pneumoniae* resistant to Carbapenemase, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *A. baumannii* resistant Acb 45, respectively. The experiments were performed in duplicates at different time intervals.

The antifungal MIC was performed following the (CLSI, 2009) guidelines M27-A3. The PDef-Caj1 was diluted in distilled water. The commercial antifungal Fluconazol® and the *Candida parapsilosis* strain ATCC 22019 as control standard yeast were used as reference. Yeasts were grown on Sabouraud Agar Dextrose (SDA; Difco) and incubated for 48 h at 37 °C. For the yeasts, two serial dilutions from 1: 100 and 1:20 were performed to obtain the final inoculum containing 1.0 to 5.0×10^6 CFU.mL⁻¹. This solution was inoculated throughout the 96 well plate containing

standard culture medium RPMI 1640, buffered at pH 7.0 with 0.1M morpholinopropanesulfonic acid (MOPS), to obtain the final concentration of 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for each yeast tested. The yeasts were incubated at 37 °C and visualized 24 and 48h later. The fungi used in the experiment came from the microclinic located in the Medical Micology Department of the Federal University of Pernambuco, being *Candida albicans* 4986, *Candida parapsilosis* 4970 and *Cryptococcus neoformans* 5980 resistant to multiple drugs, including strains of clinical origin. The MICs corresponded to the lower drug concentrations that showed growth inhibition compared to untreated fungi.

Hemolytic activity

The hemolytic activity of PDef-Caj1 was measured by the amount of hemoglobin released by lysis of human erythrocytes. Human cells were suspended in 2% saline (NaCl 0.85% + CaCl₂) and incubated in 96 well plates with different concentrations of PDef-Caj1 (512 to 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Plates were incubated for a period of 3 hours at 37 °C under constant stirring and centrifuged at 3500 rpm for 4 min at 4 °C and the absorbance of the supernatant measured at 540nm to establish the percentage of hemolysis. As a positive control of cell lysis, 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) and saline (0.85% NaCl + 10mM CaCl₂) were used as the negative control. The experiments were performed in quadruplicate, with repetition at different time intervals. The results were expressed as percentage of hemolysis determined by the equation:

$$\text{Hemolytic activity (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{negative control}}) \times 100}{(\text{OD}_{\text{positive control}} - \text{OD}_{\text{negative control}})}$$

Cytotoxic activity (MTT)

The cytotoxic activity of PDef-Caj1 was evaluated from the cells of the peritoneal exudate of mice, provided by the microbiology laboratory of the Aggeu Magalhães Institute (Fiocruz-PE). For this, the cells were seeded in 96 well plates containing Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium, without phenol red, supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and incubated for 24h at 37 °C in

a 5% atmosphere of CO₂. Five serial dilutions of PDef-Caj1 were carried out starting from 1024 µg.mL⁻¹. The cultured cells were also used in the absence of the compounds, but maintained under the same conditions, as 100% cell viability control. After 24h the medium was removed and the cells were treated in the presence of the different concentrations of PDef-Caj1 and incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 24h. After the incubation period, the effect of PDef-Caj1 was determined by measuring the mitochondrial dehydrogenase activity, adding 10µl per well of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and incubating at 37 °C for 3 hours. Then, the formazan crystals were solubilized in DMSO and the absorbance was determined in a spectrophotometer at 540nm. The concentration capable of killing 50% of the cells (CC50) was calculated by linear regression. Wells containing medium and MTT were used as reaction control. Each concentration of PDef-Caj1, as well as the control without the compound, was evaluated in quadruplicate in two independent experiments.

RESULTS

Sequence shortening

The *C. cajani* defensin sequence available from GenBank (ID 25245) was modified from 46 to 20 amino acids (RFTGGHCRGFRRRCFCTKHC), with four cysteine residues being maintained with the intention of preserving two disulfide bonds. The in silico prediction of antimicrobial activity was critical for the choice of the reduced sequence. Prediction values of antimicrobial activity before and after shortening can be seen in Table 7.

Tabela 7 - Predição de atividade antimicrobiana utilizando os quatro algoritmos do software CAMPR₃

Sequences	Domain Gamma-thionin			
	SVM	RFC	ANN	DAC
ID 25245	0.924	0.996	AMP	1.000
PDef-Caj1	0.968	0.797	AMP	1.000

Support Vector Machine (SVM), Random Forest Classifier (RFC), Artificial Neural Network (ANN), Discriminant Analysis Classifier (DAC)

Molecular modeling

After peptide synthesis, it was observed by mass spectrometry (data not shown) that the peptide has two disulfide bonds between the four cysteine residues present in PDef-Caj1. In this way, three possible ab initio models, based on the formation of two disulfide bridges (Table 8), were generated using the ROSETTA algorithm for three-dimensional protein folding.

Tabela 8 - Number of generated models and their respective disulfide bonds
Peptide synthesis

Model	Disulfide Bridges
1	Cys1-Cys2 e Cys3-Cys4
2	Cys1-Cys3 e Cys2-Cys4
3	Cys1-Cys4 e Cys2-Cys3

Molecular Dynamics

After the simulation in MD it was observed that the RMSD (Figure 17A) of the three models generated left the original conformation, been the model 1 and model 3 the best results with the peaks closer to 0.4 nm mainly after half the time analyzed (400 ns). According to the RMSF of the 3 generated models Figure 17C it is possible to observe that again the model 3 presented smaller fluctuations of the amino acid residues, having a small peak of fluctuation among residues of 8 to 12 that are located in the region of return between the beta structures. It is common for this type of region to have greater flexibility of movement in relation to the structures in beta sheets.

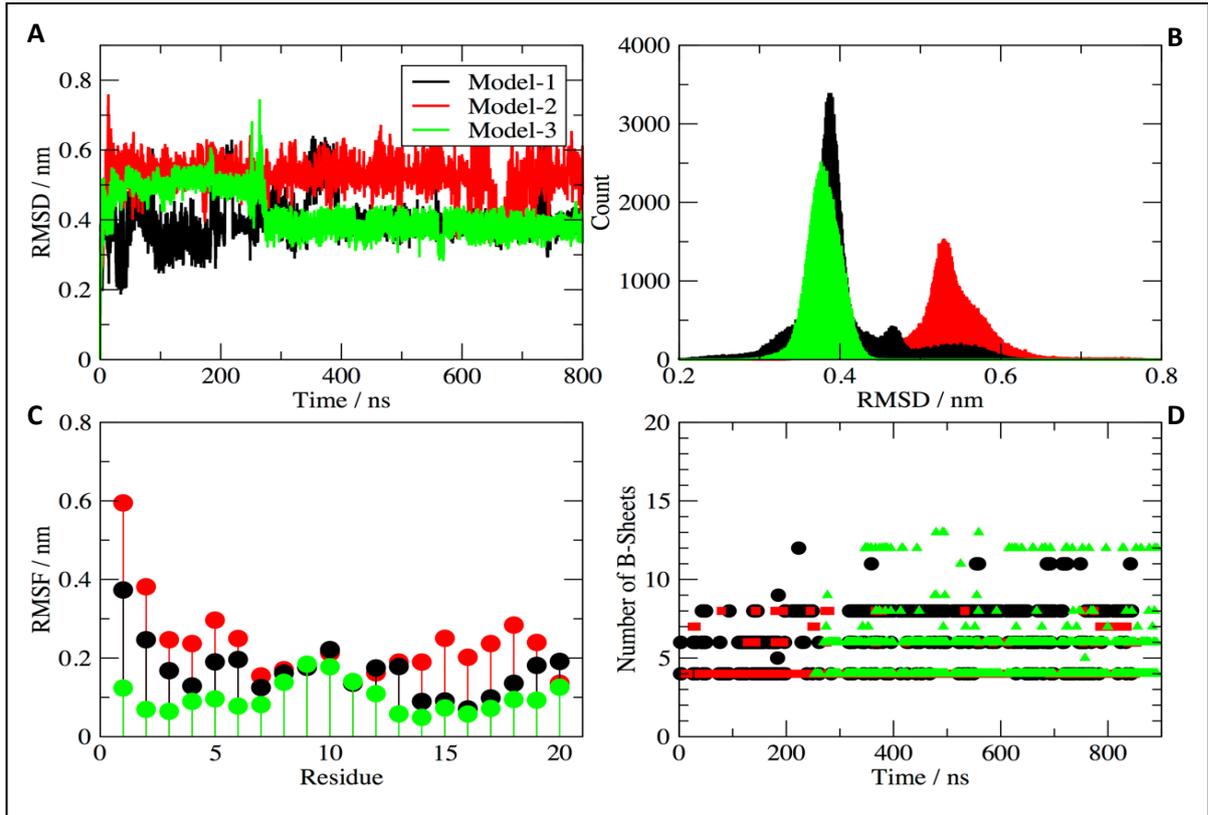


Figure 17 - Graphics of DM analyzes of the three models generated. A and B show the Root Mean Square Deviation (RMSD) in overlap. In C the Root Mean Square Fluctuation (RMSF) of the amino acid residues of each model. In D, number of beta-sheets.

In Figure 18, it was observed that all the models had a positive charge with predominance along the structure (color in blue), this positive charge facilitates the electrostatic bonding of the cationic peptide with the membrane of the pathogens with a predominance of negative charge.

In Figure 18 it was possible to observe through the leaves betas verified in the MD that the models 1 and 3 showed to preserve more amount of leaves beta in relation to the model 2. It was possible to observe through the leaves betas verified in the MD that the models 1 and 3 showed to preserve more amount of leaves beta in relation to the model 2 (Figure 18).

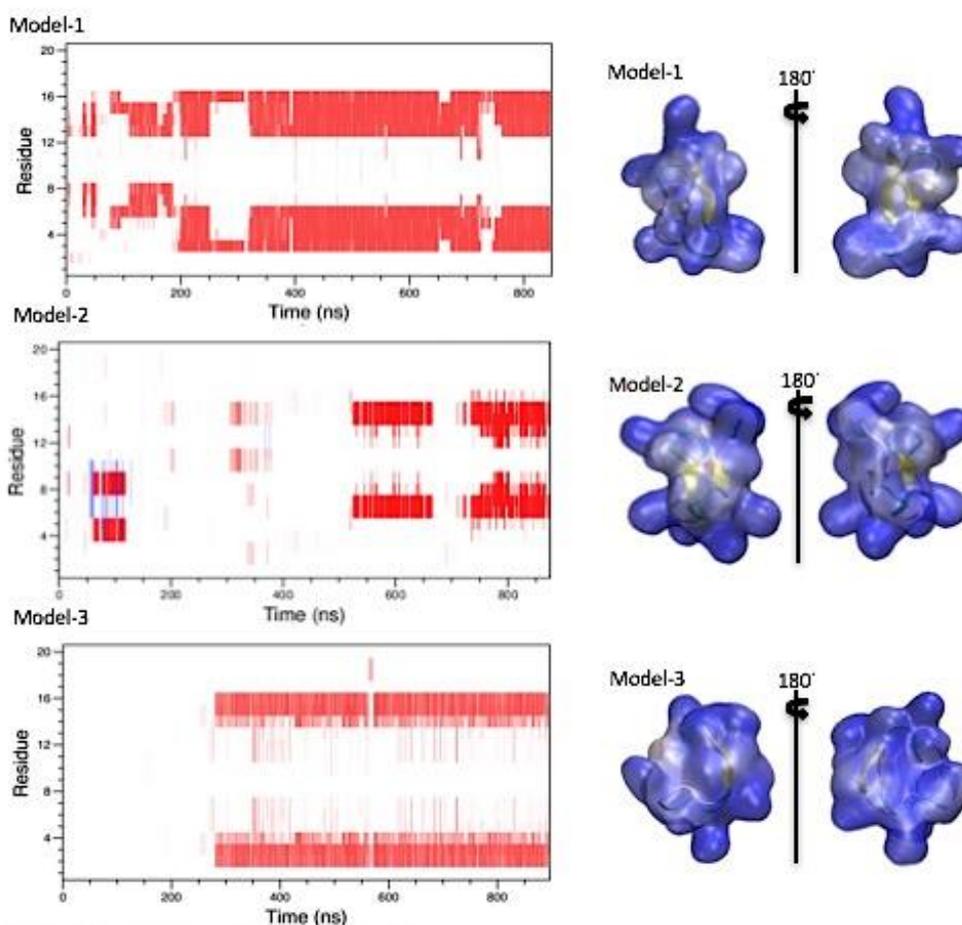


Figura 18 - Graphics of the Dictionary of Protein Secondary Structure (DSSP) showing in red the beta sheets of the three models tested. To the right the 3D structure of the three models showing in blue the cationic surface of the models generated.

Potential energy analysis was essential to suggest the most probable structure between model 1 and 3 (Table 9).

Tabela 9 - Energy values of the three models tested in MD

Model	Energy		
	Potential	Coulomb	vdW
1	-602 ± 5	-835.8 ± 5	-416.0 ± 2
2	-688	-957.6	-406.3
3	-749 ± 11	-968.1 ± 10	-456.3 ± 2

In Table 9 it is possible to observe that the model 3 obtained lower energy. Significantly, the decrease in the potential energy of the molecular mechanics along the MD correlates well with the maintenance of the 3D structure of the model

generated. The combination Cys1-Cys4 and Cys2-Cys3 was considered more stable with the potential energy -749 ± 11 , conserving its two antiparallel beta leaves, being this one chosen to represent PDef-Caj1.

In Figure 19, a comparison was made between the 1GPT and PDef-Caj1 model showing the similarity of the cationic surface energy of both and the structural similarity (RMSD of 0.59 nm), showing how close Pdef-Caj1 is to its predecessor.

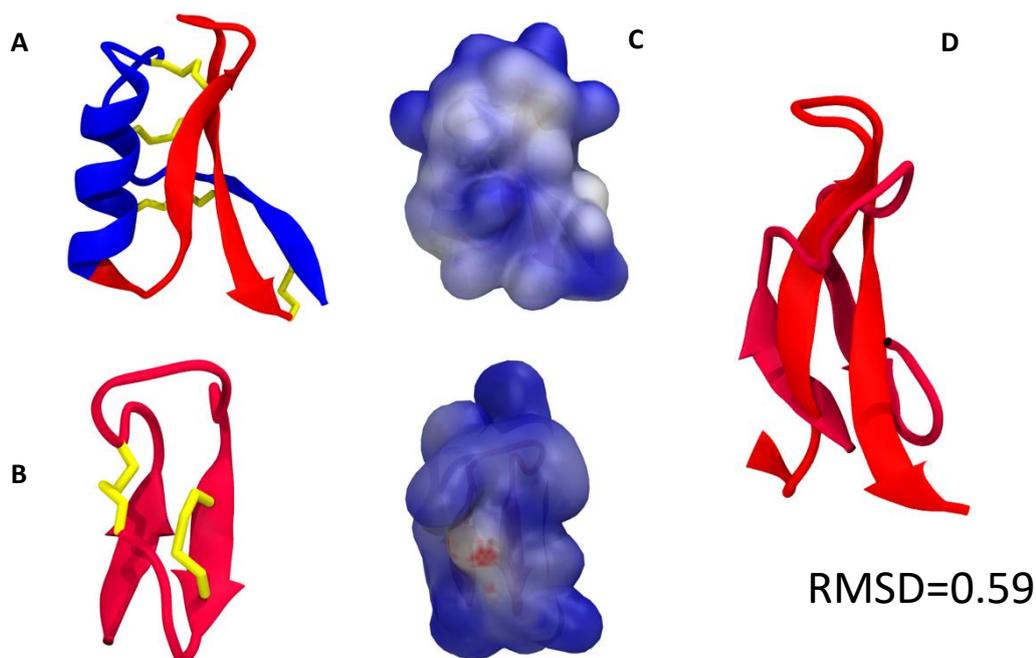


Figure 19 - 3D model of 1GPT and PDef-Caj1. In A the model of the PDB (1GPT), in B the model PDef-Caj1. In C the predominant cationic surface charge (in blue) of the PDef-Caj1, in red the anionic wastes. In D the antiparallel beta-sheets overlap of 1GPT and PDef-Caj1 with a RMSD of 0.59 nm.

Peptide synthesis

The synthesized PDef-Caj1 had a molecular weight of 2.74 kDa and a purity level greater than 95%. Through mass spectrometry, it was possible to observe that the peptide formed two disulfide bonds. Chromatography showed the presence of a single peak.

Circular Dichroism

According to the CD spectra, the peptide presented a typical form of a random spiral in water, but in the presence of TFE, a solvent that enhances the formation of hydrogen bonds, or SDS micelles (a simple model for lipid membranes) showed a partial transition to another conformation (Figure 20).

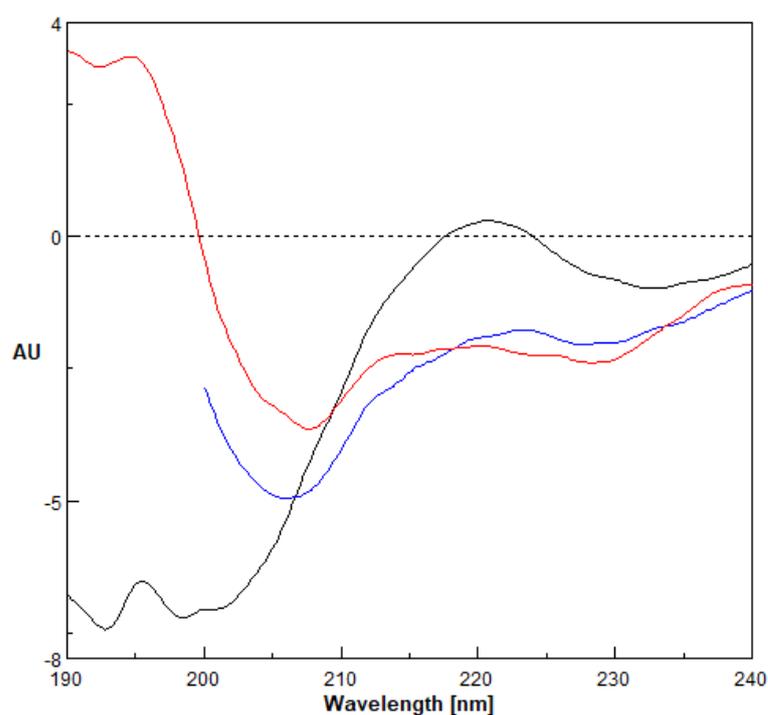


Figure 20 - CD spectra of PDef-Caj1. The spectra were taken for a 20 μM solution in the following conditions: (—) black: water; (—) blue: 10 mM SDS (micelles); (—) red: 50% TFE in water. Spectra are the mean of three scans and subject to smoothing.

Antimicrobial activity

Results of antimicrobial tests of PDef-Caj1 against bacterial strains are presented in Table 10. In general, PDef-Caj1 showed activity against *S. aureus* (the only Gram-positive tested) with 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for strain ATCC (25923) and 256 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA04673). Considering Gram-negative strains, PDef-Caj1 showed better results against *P. aeruginosa* (Pa_39) with MIC 256 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and *A. baumannii* (ATCC 19606 and Acb 45) with a MIC of 256 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for both strains. PDef-Caj1 showed no activity for *K. pneumoniae* at the concentrations tested (1 - 1024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Regarding the minimum bactericidal concentration (MBC) PDef-

Caj1 presented 128 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *S. aureus* ATCC 25923, whereas for strain MRSA04673 it presented MBC of 1024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. In the assay with *P. aeruginosa* ATCC 27853, the result for MBC was 512 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ while for the strain Pa_39 no bactericidal effect was observed. MBC for *K. pneumoniae* also could not be obtained.

In regard to antifungal activity, PDef-Caj1 presented best results against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* at the concentration of 64 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for both yeasts, while for *Candida parapsilosis* a MIC of 128 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ was observed (Table 10).

Tabela 10 - Antimicrobial activity of PDef-Caj1 against different pathogens tested, considering Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) for each tested strain.

Strains	Microorganism	Result ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
		MIC	MBC
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	16	128
Resistant MRSA04673	<i>S. aureus</i>	256	1024
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	512	512
Resistant Pa_39	<i>P. aeruginosa</i>	256	>1024
ATCC 13883	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1024	>1024
Carbapenemase L016	<i>K. pneumoniae</i>	>1024	>1024
ATCC 19606	<i>Acinetobacter. baumannii</i>	256	1024
Resistant Acb 45	<i>A. baumannii</i>	256	512
4986	<i>Candida albicans</i>	64	-
4970	<i>Candida parapsilosis</i>	128	-
5980	<i>Cryptococcus neoformans</i>	64	-

Cell Viability Assay (MTT)

By analyzing the cell viability of PDef-Caj1 using mouse macrophage cells, it was observed that the cytotoxic concentration of the peptide was 244.33 presenting similar results to the negative control. Thus, the cytotoxic activity of PDef-Caj1 against these cells starts above 244.33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, presenting cell viability below 50%, which decreases as the concentration is increased (Figure 21).

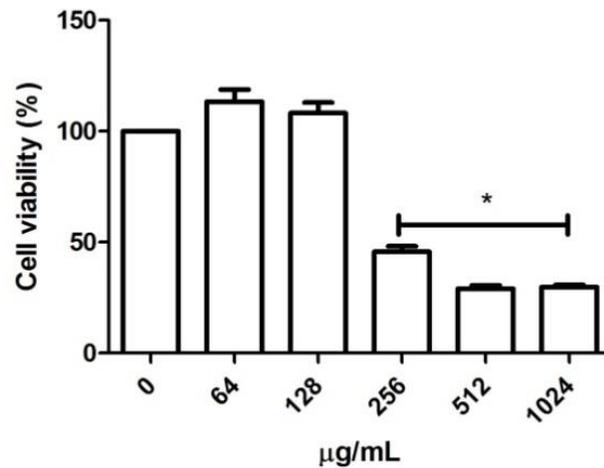


Figura 21 - Cellular viability (in %), considering different concentrations of PDef-Caj1 against rat macrophage cells.

Hemolytic activity

No hemolytic activity was observed for PDef-Caj1 against human erythrocyte cells (Figure 22).

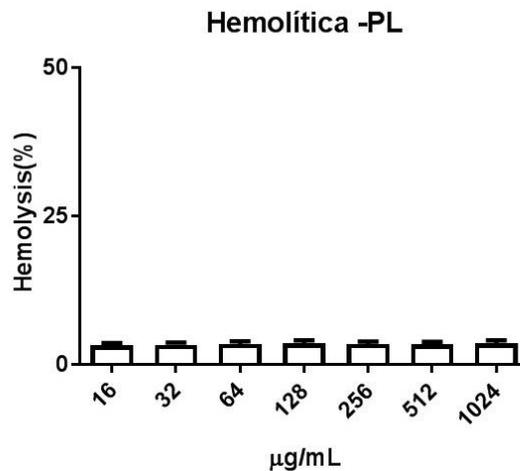


Figura 22 - Hemolytic activity test of Pdef-Caj1 in different concentrations

Discussion

In this study, a newly modified peptide – derived from a *Cajanus cajan* defensin was synthesized with the basis of bioinformatics tools aiming at developing a new molecule with therapeutic.

In relation to the three-dimensional structures generated by the ab initio method, it was possible to verify in the three models generated the formation of two disulfide bridges as well as the molecular dynamics simulation analyzes favored the choice of the best model (model 3) for the reduction of the defensin sequence and later synthesis of PDef-Caj1. This was only possible through the use of algorithms such as ROSETTA, which has shown considerable success in predicting three-dimensional structures of ab initio proteins (Kuhlman et al. 2003), and is also suitable for folding peptides with cysteines, since the disulfide bonds of these peptides significantly reduce the number of conformations that need to be investigated. The four cysteines present in PDef-Caj1 probably play a crucial role in maintaining the tertiary structure of this peptide, by forming disulfide bonds increasing molecular stability and resistance to proteolysis (Porto et al. 2014).

The PDef-Caj1 peptide obtained by solid phase chemical synthesis showed the formation of two disulfide bonds identified by the molecular weight according to the mass spectrometry (2.74 kDa), while the modeling demonstrated the formation of a single bridge. However, the peptide adopted the formation of two bridges due to four conserved cysteine residues in the modified sequence. The disulfide bonds conserved in defensins play important roles in the conservation of their structure and modulate their functions. However, given its conformational complexity, it is difficult to draw a simple conclusion about the effects of disulfide bonds on defensins, thus requiring further investigation to better understand how the defensin peptide structures affect their functions (Zhao et al. 2016).

The CD spectra analysis demonstrated that the peptide has a typical spiral form in water. Based on the position of the minimal CD (approx. 230 nm), this would correspond to a beta-sheet structure, suggesting that the peptide folds to a coil- β . Our CD results resembled those of the PD-L1 / 2 peptides derived from a type 1 ribosome inactivating protein (RIP) from *Pithecolobium dioica* L. PD-L1 / 2 assumed stable helical conformations in the presence of membrane-simulating agents (SDS and TFE) and formed beta structures when incubated with extracellular bacterial wall components (Pizzo et al. 2018).

After in vitro assays, PDef-Caj1 presented variable antimicrobial activities. All strains tested are bacteria considered to be of high priority in the list of antibiotic development by the World Health Organization (WHO, 2017). The results revealed antimicrobial action against Gram-positive strains such as *S. aureus* ATCC 25923

and MRSA04673, with similar activity as in the work of Wang et al. (2009) using Ib-AMP1 (modified 20-residue AMP with a disulfide bridge from *Impatiens balsamina* seeds) in similar concentrations relative to the ATCC strain (16 μM). Inhibition may have been favored by the conformation of the bacterium since an ionic attraction probably occurs in the first interaction formed between the AMP and the bacterial membrane. Such interaction is favored by the electrostatic bonding between the cationic peptide and the negatively charged components of the bacterial outer membrane. It has been proposed that these interactions probably occur specifically in the phosphate groups present in the teichoic acids that compose the external envelope of bacteria (Chandra et al. 2017). Four other peptides similar to PDef-Caj1 were isolated from seeds of *Impatiens balsamina* (Ib-AMP1, Ib-AMP2, Ib-AMP3 and Ib-AMP4), presenting 20 amino acids with four cysteine residues that form two intramolecular disulfide bonds (Tailor et al. 1997) shown to be growth inhibitors of a variety of fungi and bacterias, and are not cytotoxic to cultured human cells. An other synthetic peptide (Solyc07g007760) from tomato defensin (17 aa) had similar results to our PDef-Caj1 when tested against Gram-positive bacteria (such as *Staphylococcus aureus* A170) exhibiting a MIC of 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Rigano et al. 2012).

Concerning Gram-negative bacteria, the results were quite promising, except for *K. pneumoniae*. This may have occurred because the membrane conformation of these bacteria is more resistant, including an extra layer located in the periplasmic space between the outer and inner membrane. Gram-negative bacteria bear structures that are external to the cell envelope, including, for example, polysaccharides and exopolysaccharides involved in the formation of biofilms, in addition to the so-called O-polysaccharide, which together constitute membrane lipopolysaccharides, playing a fundamental role in the mechanism of resistance against AMPs (Van der Weide et al. 2017).

Interestingly, PDef-Caj1 showed activity against two strains (ATCC 19606 and Acb 45) of the Gram-negative bacteria *A. baumannii*, described as critical in the global priority list of antibiotic-resistant bacteria (Tacconelli et al. 2017). This may occur according to the mode of action of small modified peptides, which may not cause disruption in the cytoplasmic membranes of bacteria, but rather form small ion channels with intracellular components such as proteins, DNA or RNA as targets (Wang et al. 2009).

Different fungal isolates were tested, but the ones with the highest inhibition at a lower concentration were *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans* (concentrations of 64, 128 and 64 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively), a very promising result for the PDef-Caj1 in combating fungi that cause opportunistic diseases. Other defensins were recognized by their action against the *Candida* species, being inferred that they are able to cross the fungal membrane and internalize in *C. albicans* cells by endocytosis (Brigitte Hayes et al. 2018). AMPs are described as having primarily antifungal activity, known for the ease of binding to the polysaccharide chitin present on fungal cell walls, as described by Odintsova et al. (2009). These authors obtained a modified hevein peptide (substitution of serine for glycine) from seeds of *Triticum kiharae* with 45 amino acids, showing a greater antifungal action than the native peptide, as well as similar activity against several pathogens, including chitin-free. This shows that our modified peptide had peptide-like activity specialized in combating pathogens with chitin-rich membranes.

The biological properties of given a peptide are intrinsically linked to its number of amino acids and their properties relative to the polarity and type of side chain that it has. In view of our results on the antimicrobial activity of PDef-Caj1, it can be remarked that the distribution of the amino acids in the peptide chain may have directly influenced the conformation, secondary structure and interaction of the peptide with the pathogen.

Concluding remarks and perspectives

A reduced antimicrobial peptide was synthesized from a defensin sequence identified in the legume *Cajanus cajan*, which showed significant activity against *S. aureus* (ATCC 25923 and MRSA04673), and also against other Gram-negative bacteria and selected pathogenic fungi. For this purpose, an in silico based tooling strategy was used to reduce and modify the native peptide, considering anti-microbial and in silico modeling, especially considering the possible conformations that this peptide could acquire based on the formation of a disulfide bridge.

AMP reduction and engineering by computational tools was successful and may be applied to other candidate-peptides in order to filter out potential candidates. The mechanism of action of PDef-Caj1 is still unknown, although it is a consensus

that such peptide acts on the membrane causing perturbations in the surface of the pathogens.

PDef-Caj1 is a potential candidate for the development of an antimicrobial drug, alone or in combination with traditional antibiotics in the treatment of multiresistant bacteria. Next steps include in vivo analyzes about PDef-Caj1 and as adjuvant in conjunction with traditional antibiotics.

References

- Abraham, Mark James, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, e Erik Lindahl. 2015. "GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers". *SoftwareX* 1–2 (setembro): 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- Arias, Cesar A., e Barbara E. Murray. 2009. "Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge". *New England Journal of Medicine* 360 (5): 439–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMp0804651>.
- Benko-Iseppon, Ana Maria, Suely Lins Galdino, Tercilio Calsa, Ederson Akio Kido, Alessandro Tossi, Luis Carlos Belarmino, e Sergio Crovella. 2010. "Overview on Plant Antimicrobial Peptides". *Current Protein & Peptide Science* 11 (3): 181–88.
- Bowers, Kevin J., David E. Chow, Huafeng Xu, Ron O. Dror, Michael P. Eastwood, Brent A. Gregersen, John L. Klepeis, et al. 2006. "Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters". In *ACM/IEEE SC 2006 Conference (SC'06)*, 43–43. Tampa, FL: IEEE. <https://doi.org/10.1109/SC.2006.54>.
- Brigitte Hayes, Mark Bleackley, Marilyn Anderson, e Nicole van der Weerden. 2018. "The Plant Defensin NaD1 Enters the Cytoplasm of *Candida Albicans* via Endocytosis". *Journal of Fungi* 4 (1): 20. <https://doi.org/10.3390/jof4010020>.
- Brogden, Kim A. 2005. "Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?" *Nature Reviews Microbiology* 3 (3): 238–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.
- Brooks, Bernard R., Robert E. Bruccoleri, Barry D. Olafson, David J. States, S. Swaminathan, e Martin Karplus. 1983. "CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations". *Journal of Computational Chemistry* 4 (2): 187–217. <https://doi.org/10.1002/jcc.540040211>.

- Case, David A., Thomas E. Cheatham, Tom Darden, Holger Gohlke, Ray Luo, Kenneth M. Merz, Alexey Onufriev, Carlos Simmerling, Bing Wang, e Robert J. Woods. 2005. "The Amber Biomolecular Simulation Programs". *Journal of Computational Chemistry* 26 (16): 1668–88. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>.
- Chandra, Harish, Parul Bishnoi, Archana Yadav, Babita Patni, Abhay Mishra, e Anant Nautiyal. 2017. "Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review". *Plants* 6 (4): 16. <https://doi.org/10.3390/plants6020016>.
- Chen, Yee-Hsiung, Jen Tsi Yang, e Kue Hung Chau. 1974. "Determination of the Helix and β Form of Proteins in Aqueous Solution by Circular Dichroism". *Biochemistry* 13 (16): 3350–59. <https://doi.org/10.1021/bi00713a027>.
- Duranti, Marcello. 2006. "Grain Legume Proteins and Nutraceutical Properties". *Fitoterapia* 77 (2): 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.11.008>.
- Fleming, Alexander. 1929. "On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*". *British journal of experimental pathology* 10 (3): 226.
- Freddolino, Peter L., Christopher B. Harrison, Yanxin Liu, e Klaus Schulten. 2010. "Challenges in Protein-Folding Simulations". *Nature Physics* 6 (10): 751–58. <https://doi.org/10.1038/nphys1713>.
- Gazzaneo, Luiz, Valesca Pandolfi, Andre Jesus, Sergio Crovella, Ana Benko-Iseppon, e Antonio Freitas. 2017. "Heterologous Expression Systems for Plant Defensin Expression: Examples of Success and Pitfalls". *Current Protein & Peptide Science* 18 (4): 391–99. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160625070414>.
- Hess, Berk, Carsten Kutzner, David van der Spoel, e Erik Lindahl. 2008. "GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation". *Journal of Chemical Theory and Computation* 4 (3): 435–47. <https://doi.org/10.1021/ct700301q>.
- Institute, Clinical and Laboratory Standards. 2009. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: informational supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- Karplus, Martin, e J. Andrew McCammon. 2002. "Molecular dynamics simulations of biomolecules". *Nature Structural Biology* 9 (9): 646–52. <https://doi.org/10.1038/nsb0902-646>.
- Keller, Rob C.A. 2018. "Identification of Potential Lipid Binding Regions in Cereal Proteins and Peptides with the Use of Bioinformatics". *Journal of Cereal Science* 80 (março): 128–34. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.02.006>.
- Kraszewska, Joanna, Michael C. Beckett, Tharappel C. James, e Ursula Bond. 2016. "Comparative Analysis of the Antimicrobial Activities of Plant Defensin-Like

- and Ultrashort Peptides against Food-Spoiling Bacteria”. Organizado por J. Björkroth. *Applied and Environmental Microbiology* 82 (14): 4288–98. <https://doi.org/10.1128/AEM.00558-16>.
- Kuhlman, Brian, Gautam Dantas, Gregory C. Ireton, Gabriele Varani, Barry L. Stoddard, e David Baker. 2003. “Design of a Novel Globular Protein Fold with Atomic-Level Accuracy”. *Science* 302 (5649): 1364–68. <https://doi.org/10.1126/science.1089427>.
- Laskowski, RomanA., J. Antoon C. Rullmann, MalcolmW. MacArthur, Robert Kaptein, e JanetM. Thornton. 1996. “AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for Checking the Quality of Protein Structures Solved by NMR”. *Journal of Biomolecular NMR* 8 (4). <https://doi.org/10.1007/BF00228148>.
- Lata, Sneh, Bk Sharma, e Gps Raghava. 2007. “Analysis and prediction of antibacterial peptides”. *BMC Bioinformatics* 8 (1): 263. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-263>.
- Leaver-Fay, Andrew, Michael Tyka, Steven M. Lewis, Oliver F. Lange, James Thompson, Ron Jacak, Kristian W. Kaufman, et al. 2011. “Rosetta3”. In *Methods in Enzymology*, 487:545–74. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381270-4.00019-6>.
- Li, Meng, Ling Zhu, Chun-ya Zhou, Shan Sun, Yan-jun Fan, e Zhi-meng Zhuang. 2012. “Molecular Characterization and Expression of a Novel Big Defensin (Sb-BDef1) from Ark Shell, *Scapharca Broughtonii*”. *Fish & Shellfish Immunology* 33 (5): 1167–73. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.008>.
- Mitsutake, Ayori, e Hiroshi Takano. 2018a. “Relaxation Mode Analysis for Molecular Dynamics Simulations of Proteins”. *Biophysical Reviews* 10 (2): 375–89. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0406-7>.
- . 2018b. “Relaxation Mode Analysis for Molecular Dynamics Simulations of Proteins”. *Biophysical Reviews* 10 (2): 375–89. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0406-7>.
- Morgera, Francesca, Nikolinka Antcheva, Sabrina Pacor, Luca Quaroni, Federico Berti, Lisa Vaccari, e Alessandro Tossi. 2008. “Structuring and Interactions of Human β -Defensins 2 and 3 with Model Membranes”. *Journal of Peptide Science* 14 (4): 518–23. <https://doi.org/10.1002/psc.981>.
- Nascimento, V. V. do, E. d. O. Mello, L. P. Carvalho, E. J. T. de Melo, A. d. O. Carvalho, K. V. S. Fernandes, e V. M. Gomes. 2015. “PvD1 Defensin, a Plant Antimicrobial Peptide with Inhibitory Activity against *Leishmania Amazonensis*”. *Bioscience Reports* 35 (5): e00248–e00248. <https://doi.org/10.1042/BSR20150060>.
- Odintsova, Tatyana I., Alexander A. Vassilevski, Anna A. Slavokhotova, Alexander K. Musolyamov, Ekaterina I. Finkina, Natalia V. Khadeeva, Eugene A. Rogozhin, et al. 2009. “A Novel Antifungal Hevein-Type Peptide from *Triticum Kiharae*

- Seeds with a Unique 10-Cysteine Motif". *FEBS Journal* 276 (15): 4266–75.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07135.x>.
- Patel, Jean B, e Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*.
- Phillips, James C., Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D. Skeel, Laxmikant Kalé, e Klaus Schulten. 2005. "Scalable Molecular Dynamics with NAMD". *Journal of Computational Chemistry* 26 (16): 1781–1802.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
- Pizzo, Elio, Katia Pane, Andrea Bosso, Nicola Landi, Sara Ragucci, Rosita Russo, Rosa Gaglione, et al. 2018. "Novel Bioactive Peptides from PD-L1/2, a Type 1 Ribosome Inactivating Protein from *Phytolacca Dioica* L. Evaluation of Their Antimicrobial Properties and Anti-Biofilm Activities". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860 (7): 1425–35.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.04.010>.
- Plimpton, Steve. 1995. "Fast Parallel Algorithms for Short-Range Molecular Dynamics". *Journal of Computational Physics* 117 (1): 1–19.
<https://doi.org/10.1006/jcph.1995.1039>.
- Porto, William F., Guilherme M. Fensterseifer, e Octavio L. Franco. 2014. "In Silico Identification, Structural Characterization, and Phylogenetic Analysis of MdesDEF-2: A Novel Defensin from the Hessian Fly, *Mayetiola Destructor*". *Journal of Molecular Modeling* 20 (7): 2339. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2339-9>.
- Porto, William F., Állan S. Pires, e Octavio L. Franco. 2012. "CS-AMPPred: An Updated SVM Model for Antimicrobial Activity Prediction in Cysteine-Stabilized Peptides". Organizado por Vladimir N. Uversky. *PLoS ONE* 7 (12): e51444.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051444>.
- Reddy, K.V.R., R.D. Yedery, e C. Aranha. 2004. "Antimicrobial Peptides: Premises and Promises". *International Journal of Antimicrobial Agents* 24 (6): 536–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>.
- Rigano, M. M., A. Romanelli, A. Fulgione, N. Nocerino, N. D'Agostino, C. Avitabile, L. Frusciante, A. Barone, F. Capuano, e R. Capparelli. 2012. "A Novel Synthetic Peptide from a Tomato Defensin Exhibits Antibacterial Activities against *Helicobacter Pylori*: A NOVEL ANTIMICROBIAL SYNTHETIC PEPTIDE FROM A TOMATO DEFENSIN". *Journal of Peptide Science* 18 (12): 755–62.
<https://doi.org/10.1002/psc.2462>.
- Robustelli, Paul, Stefano Piana, e David E. Shaw. 2018. "Developing a Molecular Dynamics Force Field for Both Folded and Disordered Protein States". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (21): E4758–66.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1800690115>.

- Souza Cândido, Elizabete de, Marlon Henrique e Silva Cardoso, Daniel Amaro Sousa, Juliane Cançado Viana, Nelson Gomes de Oliveira-Júnior, Vívian Miranda, e Octávio Luiz Franco. 2014. "The Use of Versatile Plant Antimicrobial Peptides in Agribusiness and Human Health". *Peptides* 55 (maio): 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.02.003>.
- Tacconelli, E., N. Magrini, G. Kahlmeter, e N. Singh. 2017. "Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics". *World Health Organization* 27.
- Taylor, Ravi H., David P. Acland, Sheila Attenborough, Bruno P. A. Cammue, Ian J. Evans, Rupert W. Osborn, John A. Ray, Sarah B. Rees, e Willem F. Broekaert. 1997. "A Novel Family of Small Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides from Seed of *Impatiens Balsamina* Is Derived from a Single Precursor Protein". *Journal of Biological Chemistry* 272 (39): 24480–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24480>.
- Tekale, Satishkumar S., Bhimrao V. Jaiwal, e Manohar V. Padul. 2016. "Identification of Metabolites from an Active Fraction of *Cajanus Cajan* Seeds by High Resolution Mass Spectrometry". *Food Chemistry* 211 (novembro): 763–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.128>.
- Torrent, Marc, David Andreu, Victòria M. Nogués, e Ester Boix. 2011. "Connecting Peptide Physicochemical and Antimicrobial Properties by a Rational Prediction Model". Organizado por Markus Heimesaat. *PLoS ONE* 6 (2): e16968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016968>.
- Varshney, Rajeev K, Wenbin Chen, Yupeng Li, Arvind K Bharti, Rachit K Saxena, Jessica A Schlueter, Mark T A Donoghue, et al. 2012. "Draft Genome Sequence of Pigeonpea (*Cajanus Cajan*), an Orphan Legume Crop of Resource-Poor Farmers". *Nature Biotechnology* 30 (1): 83–89. <https://doi.org/10.1038/nbt.2022>.
- Waghu, Faiza Hanif, Ram Shankar Barai, Pratima Gurung, e Susan Idicula-Thomas. 2016. "CAMP_{R3}: A Database on Sequences, Structures and Signatures of Antimicrobial Peptides: Table 1." *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D1094–97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1051>.
- Wang, Peng, Jeong-Kyu Bang, Hak Jun Kim, Jin-Kyoung Kim, Yangmee Kim, e Song Yub Shin. 2009. "Antimicrobial Specificity and Mechanism of Action of Disulfide-Removed Linear Analogs of the Plant-Derived Cys-Rich Antimicrobial Peptide Ib-AMP1". *Peptides* 30 (12): 2144–49. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.020>.
- Weide, Hessel van der, Jlenia Brunetti, Alessandro Pini, Luisa Bracci, Chiara Ambrosini, Pietro Lupetti, Eugenio Paccagnini, et al. 2017. "Investigations into the Killing Activity of an Antimicrobial Peptide Active against Extensively Antibiotic-Resistant *K. Pneumoniae* and *P. Aeruginosa*". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859 (10): 1796–1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.001>.

Zasloff, Michael. 2002. "Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms". *Nature* 415 (6870): 389–95. <https://doi.org/10.1038/415389a>.

Zhao, Bing-Chuan, Hua-Can Lin, Dan Yang, Xiyang Ye, e Zi-Gang Li. 2016. "Disulfide bridges in defensins". *Current topics in medicinal chemistry* 16 (2): 206–19.

CAPÍTULO III

Prospecting of bioactive molecules with antimicrobial potential from plants of the Fabaceae family

Livia Maria Batista Vilela¹; Carlos André dos Santos Silva¹; Lucas Matos de Lima¹; Edson Renan Barros de Santana²; Marcus Vinicius da Silva Alves³; Cláudia Sampaio de Andrade Lima³; Sérgio Crovella¹; Alessandro Tossi⁴; Ana Maria Benko-Iseppon^{1*}

¹ Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 50.670-423, Recife, PE, Brazil.

² Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

³ Departamento de Botânica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

⁴ Department of Life Sciences, University of Trieste, Via Licio Giorgieri 1, 34127 Trieste, Italy.

*Corresponding Author's e-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

ABSTRACT

The search for new drugs based on extracts of medicinal plants has been extensive in order to obtain routes for the treatment of the most diverse diseases including those caused by microorganisms. The compounds with medicinal activity of these plants are due to the presence of bioactive molecules being among these a group called secondary metabolites. The objective of this study was to investigate the bioactive properties of ethanolic and acid extracts of six species of the Fabaceae family. Phytochemical and antimicrobial tests with both ethanolic and acid crude extracts (10 mg.mL⁻¹) were carried out and fractions were isolated from the plants using high performance reverse phase liquid chromatography (RP-HPLC). In the present work we obtained promising results with the presence of secondary metabolites such as terpenes and steroids, saponins, tannins, alkaloids and flavonoids. The ethanolic extracts of the species *Mimosa candollei* and *Cajanus cajan* showed greater antibacterial activity against *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus*, whereas the acid extracts had greater activity against *Escherichia coli* and *S. aureus*. Fraction 1 of the *Desmodium adscendens* acid

extract showed 93% inhibitory activity against *S. aureus*. In view of the above, it can be verified that some species presented more antibacterial activity in relation to the others, this may be due to the action of bioactive molecules that act in synergism enhancing the antimicrobial effect and the extraction method. Therefore, other tests need to be performed in order to verify the cytotoxic activity present in the extracts and to investigate and isolate the molecules that hold a large part of the antimicrobial activities.

Keywords: Secondary metabolites, antibacterial activity, medicinal plants.

Introduction

Throughout their evolution, plants have developed ways of combating invading agents and biotic or abiotic stresses, through which they have played a variety of defense mechanisms. In this sense, bioactive molecules are present in plants in many different types and are known to participate in defense mechanisms that trigger a complex network of biochemical reactions throughout the life cycle of the plant, as is the case of secondary metabolites (Wink 2013) as well as antimicrobial peptides. The development and storage of these molecules differ and depend on the stage of development of the plant and the organs where they are produced and stored (Wink 2016).

The number of studies performed to identify these compounds has not been proportional to their amount available in nature. It is estimated that only about 20% of the plants were studied phytochemically and that the amount of secondary metabolite structures probably exceeds 200,000 (Wink 2016).

Among the plant groups of main relevance, the Fabaceae family is recognized in the literature as a major carrier of bioactive phytochemical molecules (Güçlü-Ustündağ and Mazza 2007; Ahuja et al. 2012), as well as the ability of its roots to keep nitrogen, nutrient replenishment and soil maintenance, as well as benefiting sustainable agriculture (Wink 2013). Fabaceae species are also known for the ethnobotanical potential and popular medicinal use, such as activities associated with the treatment of gastrointestinal disorders in the case of the *Cajanus cajan* species, with curative properties of the respiratory tract such as bronchitis and cough of the antidiabetic properties, hepatic protection, antimicrobial, antioxidant among others (Rahmatullah et al. 2009; Kong et al. 2010). *Amburana cearensis* has also been

widely used in the treatment of respiratory diseases as well as muscle relaxant, neuroprotection, antimicrobial activity and other functions (Pereira et al. 2017; Peixoto et al. 2016; Leal et al. 2003). Another Fabaceae used in popular medicine is *Desmodium adscendens* that stands out for its respiratory properties acting against chronic bronchitis and asthma, besides presenting antimicrobial activity.

Among the medicinal properties of Fabaceae, some have in common antimicrobial activity that can be used as new therapeutic agents in the pharmaceutical industry, replacing the drugs already consolidated in the market. For this, the purification of the bioactive compounds need to be performed in order to analyze the activity of each compound separately. However, the purification of these compounds is still quite complex and laborious, making it difficult to find specific analytical methods capable of characterizing the different types of plant compounds, whether qualitative or quantitative methods. Some more elaborate methods of extraction and purification have been used for the study of pharmacological properties, such as high performance liquid chromatography associated with mass spectrometry (Baiocchi et al. 2013).

In this context, the objective of this study was to prospect bioactive molecules in plants of the Fabaceae family, in order to analyze the potential of antimicrobial activity in the species studied.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Fresh leaves of species of the Fabaceae family were collected in the municipality of Paudalho in the state of Pernambuco, Brazil (49°NE 7°57'35" S 35°6'18"O) identified by Dr. Marcus Alves of the Department of Botany of the Federal University of Pernambuco. The exsicates of the species studied were deposited in the herbarium UFP – UFPE (Apêndice C).

Preparation of plant extracts

Ethanolic extracts

The leaves were dried at 45 °C and crushed to a fine powder in a Wiley TE-650/1 Thecnal knife mill. Ethanolic extracts were obtained using the powder material submerged in ethyl alcohol (92%) in a percolator. Four exchanges were performed every two days totaling 8 days being the liquid so obtained. The solution was subsequently filtered using filter paper. The filtrate was evaporated to dryness using a rotary evaporator (Model MV 10, IKA). The list of species extracted and extract sample numbering are shown in Table 11. Approximately 5 mg from each solid ethanolic extract was transferred to 1.5 mL, pre-weighed Eppendorf tubes, and the weight accurately measured with an analytical balance. Final weights between 5.0 – 5.2 mg were recorded. The extracts were then resuspended in absolute ethanol to a final concentration of 5 mg.mL⁻¹, subjected to vortexing, sonication in a bath heated to 50 °C and then centrifuged.

Acid extracts

The acid extraction was based on the methodology of Dellavalle et al. (2011) with some modifications. The plants materials were ground to a fine powder in liquid nitrogen, using a mortar and pestle, except for the seeds that were ground in a Wiley TE-650/1 Thecnal knife mill.

The powdered material (5 g) was extracted with 50 mL of water buffer containing 10% acetic acid for 1 h at 50 °C, under stirring. The homogenate was removed by filtration and the supernatant clarified by centrifugation at 7000 x g for 30 min at 4 °C. All the supernatant was then injected (in aliquots of 1 or 2 mL at a time) into disposable SepPak C18 reversed phase cartridges, and separate fractions were collected. To allow for a more efficient monitoring and separation of fractions (about 6 ml each), the elutions were not carried out isocratically by syringe injection of the eluent, but rather the cartridges were modified for mounting onto an GE Aktä HPLC system, monitoring at 214, and applying a gradient of 0-100% acetonitrile (0.05% TFA) in 17.5 min.

Phytochemical studies

Qualitative Analysis

Tanins

The tannins were identified using three drops of FeCl_3 alcohol solution (2%), were added and stirred for a few moments. A blank test was also prepared with distilled water and ferric chloride for comparisons. The presence of tannins it was determined according to the appearance of the indicated color for each substance when the control test was negative. The dark precipitate with blue tint indicates the presence of hydrolyzable tannins, while the green color indicates condensed tannins. The control test was performed using water and ferric chloride.

Saponins

The saponins were identified using 10 mg of extract dissolved in 10 mL of distilled water. The solution was stirred vigorously (manual shaking) for three minutes. The presence of persistent foam after 30 min in the solution is indicative of the presence of the saponin substance in the extract.

Terpenoids

0.5 g extract was dissolved in 2 mL of chloroform then 3 mL concentrated sulfuric acid was added, a reddish brown colour in interphase indicates the presence of terpenoids.

Cumarins

The detection of cumarins was performed using thin layer chromatography, according Wagner and Bladt (1996), with modifications.

Quantitative Analysis

Flavonoids

The determination of flavonoids was adapted from the methodology proposed by (Woisky and Salatino 1998). The experiment consisted in pipetting 1 ml of extracts (1 mg.ml^{-1}) to test tubes and add 1 ml of 5% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (in methanol) and 2 ml of methanol. The blank was prepared using 3 mL of methanol and 1 mL of the aluminum chloride. Thus, 30 minutes were taken in the dark and then it was read in spectrophotometer at 425nm. The quercetin was used as the standard at the concentrations of 1000, 500, 250 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ for the construction of the calibration curve. Therefore, the flavonoid content in the samples was expressed as the quercetin equivalent (mg of QUE.g⁻¹ of extract).

Phenols

The determination of the total phenol content (TPC) was performed by spectroscopy in the visible region using the method of Folin-Ciocalteu (Velioglu et al. 1998). Thus, the ethanolic extract (100 mg) was initially dissolved in 100 mL of methanol. An aliquot of 7.5 ml of this solution was transferred to a 50 ml volumetric flask and completed with the same solvent. Then, an aliquot of 100 μL of this latter solution was shaken with 500 μL of the Folin-Ciocalteu reagent and 6 mL of distilled water for 1 min. After this time, 2 mL of 15% Na_2CO_3 was added to the mixture and stirred for 30 sec. Finally, the solution had its volume adjusted to 10 mL with distilled water. After 2 h, the absorbance of the samples was measured at 750 nm. The blank corresponded to methanol and all other reagents applied. The TPC was determined by interpolating the absorbance of the samples against a calibration curve constructed with gallic acid standards (10 to 350 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and expressed as mg GAE (gallic acid equivalent) per g of extract.

Liquid cromatography

All the supernatant was then injected (in aliquots of 1 or 2 mL at a time) into disposable SepPak C18 reversed phase cartridges, and separate fractions were

collected. To allow for a more efficient monitoring and separation of fractions, the elutions were not carried out isocratically by syringe injection of the eluent, but rather the cartridges were modified for mounting onto an GE Aktä HPLC system, monitoring at 214, and applying a gradient of 0-100% acetonitrile (0.05% TFA) in 17.5 min. A flow rate of 0.4 mL.min⁻¹ was used. Higher flow rates damage the cartridge.

Mass spectrometry

Mass spectrometry was carried out for some complete extracts or fractions, to see if any preponderant species was present. These analyses were performed on an Esquire4000 (MS/MS) instrument with an electrospray ionization source and ion-trap separation, operated in the standard positive ionization mode. The capillary voltage used was 183.8 V. Solid samples were diluted in 50% acetonitrile/0.1% Formic acid solution in Milli-Q water and injected directly into the spectrometer using a syringe diffusion pump with a flow of 50 µL.min⁻¹ and the results were analysed using the esquire Control program.

Antimicrobial assays

Kinetic antimicrobial

The effect of peptides on *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923 was assessed by a growth kinetics assay, as described (Ilić et al. 2013). Briefly, the bacterial growth curves were obtained using mid log phase bacteria at 1 × 10⁶ CFU.mL⁻¹ per 200 µL per well in MHB, in the presence of increasing peptide concentrations, monitoring the optical density (OD) at 620 nm every 10 min at 37 °C for 4 h in a microplate reader with intermittent shaking (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland). Experiments were carried out twice, in triplicate, and results are expressed as the mean ± SEM. IC₅₀ values were determined by plotting % inhibition at 210 min vs peptide concentration.

An alternative method was used to evaluate the effect of ethanolic extracts on the growth kinetics of reference strains (*E. coli* and *S. aureus*). These assays were carried out in Mueller Hinton broth on 96 well plates, using a Tecan plate reader. The initial bacterial load was about 10⁶ bacteria per well. As bacteria replicate over a

relatively short time period, the opacity of the medium increases observably over 4 hours. The assay is not extended beyond this period as the plates have to be incubated at 37°C and evaporation eventually leads to medium concentration and increase in opacity unrelated to bacterial growth.

RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemical Analysis

The plants have been extensively studied as medicinal products with the intention of curing the most diverse diseases. Among the plant groups of great relevance, the Fabaceae family is recognized in the literature as a major carrier of bioactive phytochemical molecules (Güçlü-Ustündağ and Mazza 2007; Ahuja et al. 2012). These plants contain bioactive molecules that are produced primarily in the chemical defense mechanisms of the plant and are known as secondary metabolites (Ramawat and Mathur 2007). These organic compounds can provide a defined physiological action in the human body, these substances being tannins, alkaloids, carbohydrates, terpenes, steroids, flavonoids and others (Edeoga et al. 2005). A large number of phytochemicals belonging to various chemical classes have shown inhibitory effects on all types of microorganisms in vitro (Parekh and Chanda 2007; Palit 2018; Sukanya et al. 2009).

In the present study, secondary metabolites were tested from the ethanolic extract of the leaf tissue of the species under study (Table 11), except for *A. cearensis* that had its extract from seeds. Saponins, tannins, phenols, alkaloids, flavonoids, steroids and terpenes were present in the ethanolic extracts of species such as *C. cajan*, *M. pudica* and *S. reticulata*. Saponin have been absented in *A. cearensis*, *D. adscendens* and *B. cheilanta*. Coumarin was detected only in the species *A. cearensis* (seeds). In the *A. cearensis* species, coumarin, steroids and terpenes were detected and the phenols quantified (23,78 mg of GAE.g⁻¹), but flavonoids have not been quantified. To the species *A. cearensis* (seeds), *D. adscendens* and *B. cheilanta* the alkaloids have not been tested until the moment. Of all six plants, *Desmodium adscendens* had a higher TPC than the other species.

We obtained promising results with the presence of secondary metabolites such as terpenes, present in all plants studied here. This metabolite can act by

performing various functions in plants, as a stimulant in germination, its emission in the plant signals the production of defense in surrounding tissues, as well as, volatile terpenes may alert other plants nearby when it is affected by the presence of herbivores (Gershenzon and Dudareva 2007). This metabolite may also act on cell membranes through its toxic nature causing loss of chemosmotic control and this is possibly caused by its highly lipophilic nature (Inoue et al. 2004). One possible explanation for this effect is that the terpenes synergize the effects of other toxins acting as solvents to facilitate their passage through membranes (Gershenzon and Dudareva 2007).

The presence of phenols and total flavonoids of the species studied here corroborates with works in the literature where it evidences the formation of these compounds in the family Fabaceae (Chanda et al. 2010). Phenols and flavonoids are common natural products found in medicinal plants known for their antioxidant activity. The phenolic compounds have strong antioxidant activity and act in stresses such as the wear and tear caused by solar radiation in already tested plants (Zheng and Wang 2001) by using redox properties that allow them to act as reducing agents, hydrogen donors and oxygen inhibitors, these being the most relevant properties for pharmacological and therapeutic use (Chanda et al. 2010).

Tabela 11 - Phytochemical constituents of Fabaceae extracts

Plant species	Saponins	Tanins	Phenols*	Alkaloids	Flavonoids**	Coumarin	Steroids/ Terpenes
<i>Amburana cearensis</i>	-	-	23,78	N.T.	0	+	+
<i>Cajanus cajan</i>	+	+	101,82	+	115,23	-	+
<i>Desmodium adscendens</i>	-	+	132,66	N.T.	77,26	-	+
<i>Mimosa pudica</i>	+	+	75,54	+	98,27	-	+
<i>Senna alata</i>	+	+	80,48	+	128,32	-	+
<i>Bauhinia cheilanta</i>	-	+	78,55	N.T.	106,93	-	+

N.T – not tested

* mg of GAE.g⁻¹

** mg of QUE.g⁻¹

Liquid Chromatography

In the present study, the results of liquid chromatography showed the diversity of bioactive molecules present in the acid extracts and their respective fractions (see Figure 23) as can be seen in the species *M. candollei*, *C. cajan*, *A.*

cearensis, seed and leaf. In the species *D. adscendens* and *B. cheilanta* the chromatogram had a more specific formation in relation to the diversity of molecules found in the other species, suggesting a better specificity in relation to molecules of antimicrobial peptides that were extracted by the acid extraction method. The use of the reverse phase C18 column together with acid extraction in HPLC was able to separate molecules with antibacterial function in species such as *M. candollei*, *C. cajan*, *D. adscendens* and *A. cearensis*.

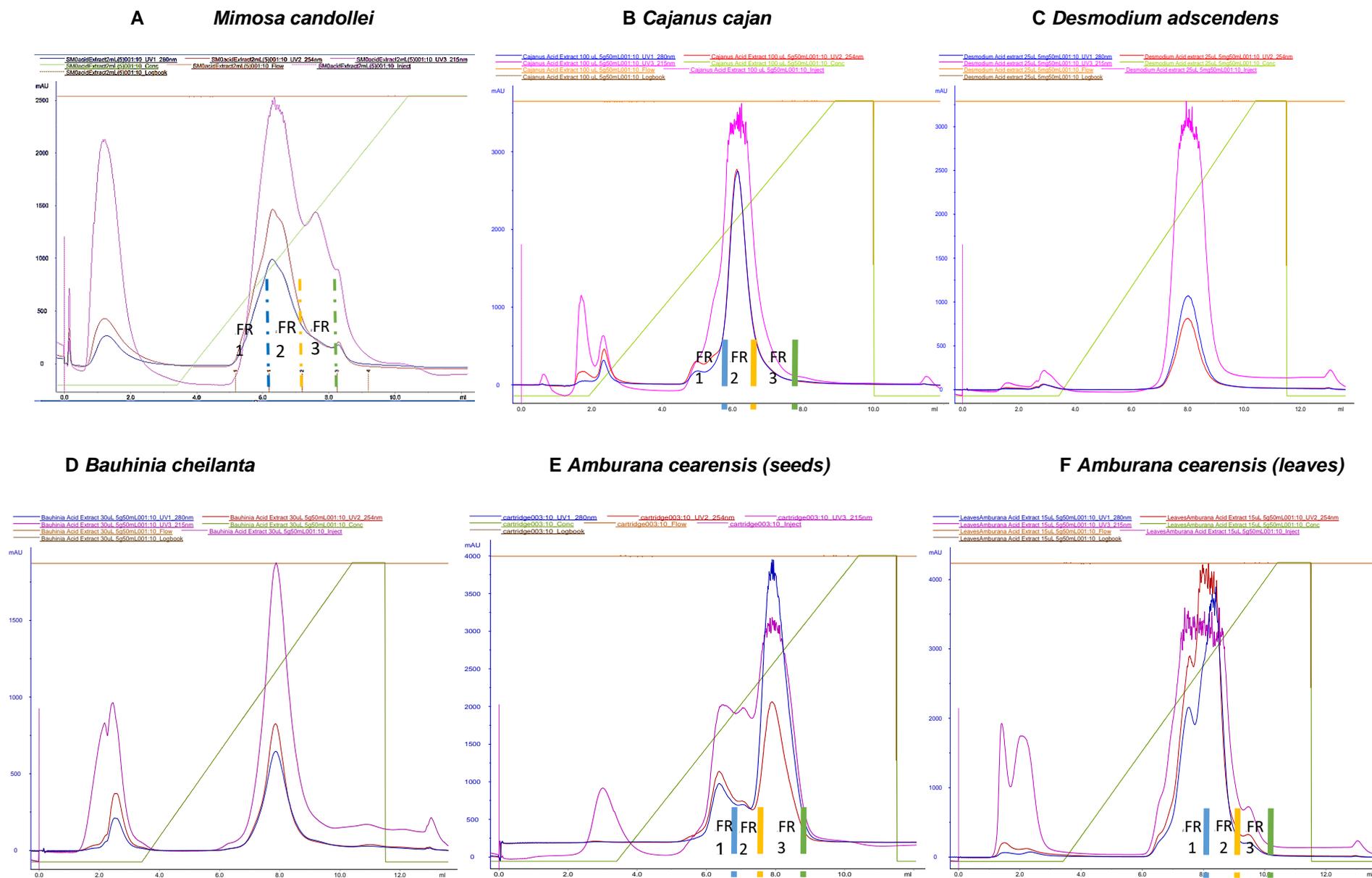
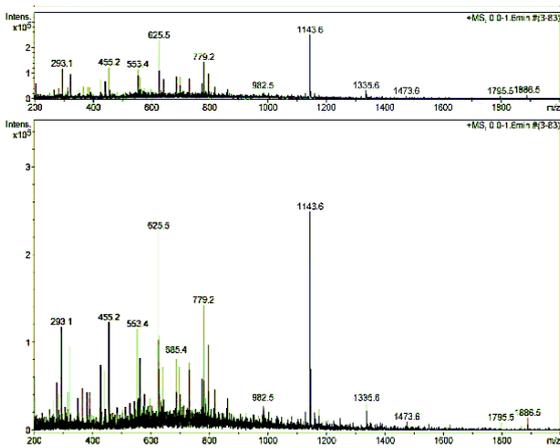


Figura 23 - RP-HPLC chromatograms. Acids extracts and Fractions monitoring at 214 (violet), 250 (red) and 280 (blue) nm.

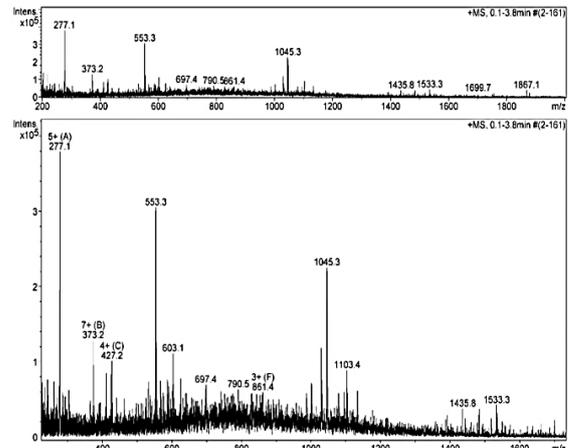
Mass spectrometry

For none of the samples a clear pattern of peaks appeared, as is typical for cationic AMP, furthermore, masses tend to be low (Figure 24). There is therefore no evidence yet that the active species are peptides. It is possible that the fractions are still not yet sufficiently pure to provide good mass spectra.

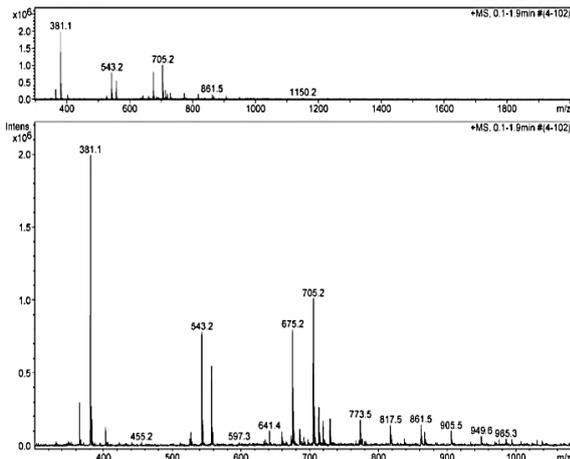
A- Acid extract of *Mimosa candollei*



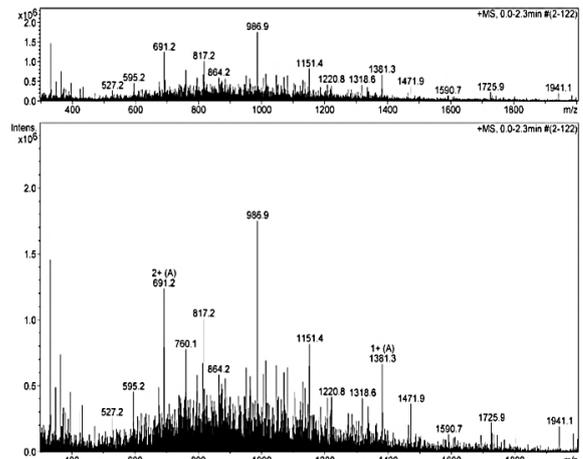
B- FR1-2 of *Mimosa candollei*



C- Acid Extract of *Amburana cearensis*



D- FR1 of *Amburana*



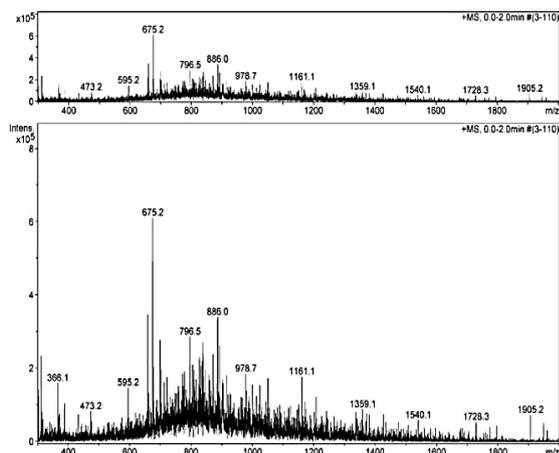
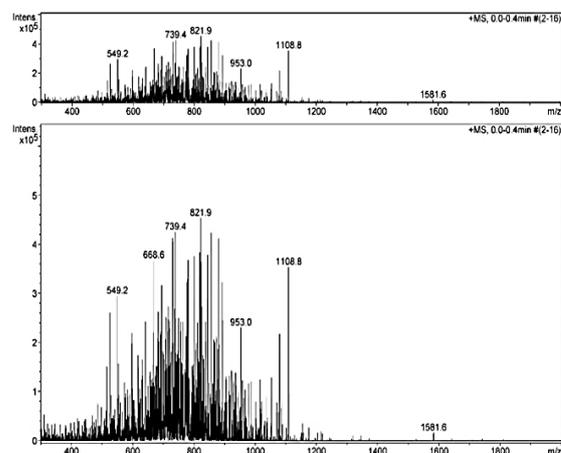
E- FR2 of *Amburana cearensis*F- FR3 of *Amburana cearensis*

Figura 24 - Mass spectrometry of the acids extracts or RP-HPLC fractions of the *Mimosa candollei* and *Amburana cearensis*.

Antimicrobial assays

Ethanolic antimicrobial kinetic

From Table 12, it can be seen that the inhibition assay reveals some activity over a 4 hour period in the concentration of 10 mg.mL^{-1} , for six plant extracts. This would seem to indicate that the activity may be bacteriostatic to tests such as antimicrobial kinetic, however, it would be necessary to perform other types of tests such as the minimum inhibitory concentration (MIC). It is interesting to note that the extracts have been actived against *S. aureus* while others to *S. pyogenes*.

Tabela 12 - Percentage inhibition (%) of the bacteria by plant ethanol extract

Extracts	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Mimosa candollei</i>	-	-	50%	80%	>10%
<i>Cajanus cajan</i>	-	-	80%	40%	>10%
<i>Desmodium adscendens</i>	-	-	55%	0%	10%
<i>Senna reticulata</i>	-	-	50%	0%	<10%
<i>Bauhinia cheilanta</i>	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t
<i>Amburana cearenses</i>	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t

n.t=Untested sample. (-) no have activity

The ethanolic extract of the species *Mimosa candollei* presented an antimicrobial activity of 80 and 50% for *S. pyogenes* and *S. aureus*, respectively. The genus *Mimosa* is known in the literature for its antimicrobial activity (Saraiva et al. 2015; Sukanya et al. 2009). The species *Mimosa pudica* presented an action against *S. aureus* at the concentration of 19.53 mg.mL⁻¹ using the ethanolic extract (Kaur et al. 2011) with a different methodology (Minimum Inhibitory Concentration - MIC). This corroborates with the results found in the present study with ethanolic extract at a concentration of 10 mg.mL⁻¹.

The ethanolic extract of *C. cajan* inhibited *S. aureus* and *S. pyogenes* in 80 and 90%, respectively. Nwachukwu and Uzoeto (2010) performed a MIC test with ethanolic extract and obtained inhibition at the concentration of 50 mg.mL⁻¹, a concentration higher than found in this study. Different results can occur according to the seasonality and types of stresses that the plants undergo during development, since the production and accumulation of secondary metabolites depends on several elicitor and signaling molecules in response to defense reactions (Zhao et al. 2005). Other studies report the antimicrobial activity of the *C. cajan* species using the ethanolic extract with a methodology different from the one used here (antimicrobial test in disks) (Ezeifeke et al. 2004).

The species *D. adscendens* presented an antimicrobial activity for *S. aureus* and *P. aeruginosa* of 55 and 20%, respectively in the concentration of 10 mg.mL⁻¹. In addition, to acting against respiratory problems, wounds, venereal diseases, muscular pains, joint pains, renal disorders, constipation, impotence, central nervous system disorders, among others, *Desmodium adscendens* leaves have known in vitro antimicrobial activity, one of the studies performed with the methanolic extract of the plant showed to have activity against *S. aureus* with a MIC of 2 mg.mL⁻¹ (Fomogne-Fodjo et al. 2014).

The species *S. reticulata* presented antimicrobial activity of 50% and 10% for *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively. Other studies have reported the antimicrobial activity of the *Senna* genus through the ethanolic extract at the concentration of 20 mg.mL⁻¹ (Tshikalange et al. 2005), as well as other extracts (methanol, acetate, acetone, dichloromethane) from roots and (12 and 15 mg.mL⁻¹), *S. pyogenes* (6 and 12 mg.mL⁻¹), *E. coli* (12 and 15 mg.mL⁻¹) and *S. aureus* among other bacteria and yeasts such as *C. albicans* and *Cryptococcus neoformans* (Doughari and Okafor 2007; Doughari and Okafor 2008).

Acid antimicrobial kinetic

Antimicrobial kinetics tests were carried out with the Fabaceae family plants studied in this study to verify the action of acid extracts and their respective fractions (Table 13).

Tabela 13 - Antimicrobial activity of acid extract of plants of the family Fabaceae (10 mg.mL⁻¹)

Species	Acid extract			Fraction 1			Fraction 2			Fraction 3		
	S. a	E. c	S. p	S. a	E. c	S. p	S. a	E. c	S. p	S. a	E. c	S. p
<i>Mimosa candollei</i>	23	95	7	35	-	-	18	10	27	-	20	20
<i>Cajanus cajan</i>	-	-	-	11	-	-	15	6	38	NT	NT	NT
<i>Desmodium adscendens</i>	NT	NT	NT	93	-	68	X	X	X	X	X	X
<i>Bauhinia cheilanta</i>	NT	NT	NT	35	7	44	X	X	X	X	X	X
<i>Amburana cearensis</i> (seeds)	-	-	-	-	5	-	29	29	-	-	28	27
<i>Amburana cearensis</i> (leaves)	21	5	-	6	-	-	32	14	6	34	16	36

X Fractions not collected - 0%
 NT Not tested

S. a *Staphylococcus aureus*
 E. c *Escherichia coli*
 S. p *Streptococcus pyogenes*

In *M. candollei*, the antimicrobial activity of the acid extract showed to be stronger than the fractions collected with activity ranging from 7 to 95% for *S. pyogenes* and *E. coli*, respectively. In fractions 1 and 2 the antimicrobial activity decreased in relation to the acid extract. This can occur through synergism between bioactive molecules (Eid et al. 2012). Synergism has been studied as a fundamental principle of phytotherapy since in vitro and in vivo results with hundreds of bioactive molecules have shown that progress in synergy research not only legitimates phytotherapy but increases the chances of developing new phytodrugs that can be used as a single treatment or cooperative with chemotherapeutics (Wagner 2011; Eid et al. 2012).

The *C. cajan* species have not been presented antimicrobial activity against any of the microorganisms tested in the acid extract. However, it showed inhibition of activity against *S. pyogenes*, *S. aureus* and *E. coli* of 38,15 and 6%, respectively. The *C. cajan* is a widely used species against respiratory diseases, epidermal

diseases among others, and is also used against some human pathogens (Kong et al. 2010). The study of Zu et al. (2010) tested the activity of the *C. cajan* alcohol extract against *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* and *Proteus vulgaris* and had a MIC of 2.5 mg.mL⁻¹, the extract was also tested (under conditions of supercritical fluid extraction in CO₂) in vivo models using *S. aureus* and showed significant antimicrobial activity also in vivo, being able to be a candidate for the treatment of *S. aureus* infections.

The acid extract of *D. adscendens* was not tested, however, Fraction 1 had activity against *S. aureus* and *S. pyogenes* with a percentage of inhibition of 93 and 68%, respectively. The other fractions of the species were not collected and tested. The *D. adscendens* is well known for its medicinal use popular for the treatment of various diseases such as asthma, bronchitis having been scientifically proven the activity described with aqueous extract and ethanolic (Rastogi et al. 2011; Ampofo 1977). Besides that, *D. adscendens* has been tested against human pathogenic microorganisms and some extracts has presented promising results as described by (Adeniyi et al. 2013) in their work using methanolic extract of *D. adscendens* against several microorganisms, between them *S. aureus* ATCC 29213, SA 1199 and ASXY 212 which had the MIC of 0.25 mg.mL⁻¹ for the strains tested in addition to other bacteria (*P. aeruginosa*, *Escherichia cloacae*, *faecalis* and *coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*) e leveduras (*C. parapsilosis*, *albicans* e *krusei*). Until the moment no studies with antimicrobial activity using *D. adscendens* acid extract have been described.

B. cheilanta had activity against *S. pyogenes* and *S. aureus* with 44 and 35% inhibition, respectively. Fraction 2 of *A. cearensis* (seed) had 29% inhibition for both *S. aureus* and *S. pyogenes*. The crude acid extract showed no inhibition for any tested microorganism; Fraction 3 of the species showed activity less than 29% for both *E. coli* and *S. pyogenes* microorganisms (28 and 27%, respectively).

The extract of *A. cearensis* leaf as well as the fractions showed activity against most of the microorganisms tested, with the exception of the acid extract for *S. pyogenes* and Fraction 1 for *E. coli* and *S. aureus*. Although the acid extract had activity for the microorganisms tested, some fractions had low antimicrobial activity.

CONCLUSIONS

From the results obtained in the present study, it was possible to observe that extracts of some plants of the family Fabaceae exhibited antibacterial effects against gram positive and gram negative microorganisms when tested with acid extract. The ethanolic extract of the plants also showed inhibition against gram positive. However, these antibacterial activities need to be investigated more extensively through the purification and isolation of the molecules that in synergism may have exerted antimicrobial activity.

It was verified by mass spectrometry that the purifications were not enough to isolate each bioactive molecule, requiring more purification processes until the identification of which molecules exert activity or if only the synergism between them provoked the antibacterial activity.

REFERÊNCIAS

- Adeniyi, Bolanle A., Kingsley C. Izuka, Bamidele Odumosu, and O. O. Aiyelaagbe. 2013. "Antibacterial and Antifungal Activities of Methanol Extracts of *Desmodium Adscendens* Root and *Bombax Buonopozense* Leaves." *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 7 (1): 185–94.
- Ahuja, Ishita, Ralph Kissen, and Atle M. Bones. 2012. "Phytoalexins in Defense against Pathogens." *Trends in Plant Science* 17 (2): 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>.
- Ampofo, Oku. 1977. "Plants That Heal." *World Health* 26: 28–33.
- Baiocchi, Claudio, Claudio Medana, Valeria Giancotti, Riccardo Aigotti, Frederica Dal Bello, Cristina Massolino, Daniela Gastaldi, and Maurizio Grandi. 2013. "Qualitative Characterization of *Desmodium Adscendens* Constituents by High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Ultraviolet-Electrospray Ionization Multistage Mass Spectrometry." *European Journal of Mass Spectrometry* 19 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1255/ejms.1214>.
- Chanda, Sumitra, Sandeep Dudhatra, and Mital Kaneria. 2010. "Antioxidative and Antibacterial Effects of Seeds and Fruit Rind of Nutraceutical Plants Belonging to the Fabaceae Family." *Food & Function* 1 (3): 308. <https://doi.org/10.1039/c0fo00028k>.
- Dellavalle, Paola Díaz, Andrea Cabrera, Diego Alem, Patricia Larrañaga, Fernando Ferreira, and Marco Dalla Rizza. 2011. "Antifungal Activity of Medicinal Plant

- Extracts against Phytopathogenic Fungus *Alternaria* Spp.” *Chilean Journal of Agricultural Research* 71 (2): 231.
- Doughari, J. H., and B. Okafor. 2007. “Antimicrobial Activity of *Senna Alata* Linn.” *East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences* 10 (1): 17–21.
- Doughari, J. H., and N. B. Okafor. 2008. “Antibacterial Activity of *Senna Siamae* Leaf Extracts on *Salmonella Typhi*.” *African Journal of Microbiology Research* 2 (2): 42–46.
- Edeoga, H. Okwu, D. E. Okwu, and B. O. Mbaebie. 2005. “Phytochemical Constituents of Some Nigerian Medicinal Plants.” *African Journal of Biotechnology* 4 (7): 685–88.
- Eid, Safaa Yehia, Mahmoud Zaki El-Readi, and Michael Wink. 2012. “Synergism of Three-Drug Combinations of Sanguinarine and Other Plant Secondary Metabolites with Digitonin and Doxorubicin in Multi-Drug Resistant Cancer Cells.” *Phytomedicine* 19 (14): 1288–97.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.08.010>.
- Ezeifeka, G. O., M. U. Orji, T. I. Mbata, and A. O. Patrick. 2004. “Antimicrobial Activities of *Cajanus Cajan*, *Garcinia Kola* and *Xylopia Aethiopica* on Pathogenic Microorganisms.” *Biotechnology* 3 (1): 41–43.
- Fomogne-Fodjo, M.C.Y., S. Van Vuuren, D.T. Ndinteh, R.W.M. Krause, and D.K. Olivier. 2014. “Antibacterial Activities of Plants from Central Africa Used Traditionally by the Bakola Pygmies for Treating Respiratory and Tuberculosis-Related Symptoms.” *Journal of Ethnopharmacology* 155 (1): 123–31. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.032>.
- Gershenzon, Jonathan, and Natalia Dudareva. 2007. “The Function of Terpene Natural Products in the Natural World.” *Nature Chemical Biology* 3 (7): 408–14. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>.
- Güçlü-Ustündağ, Ozlem, and Giuseppe Mazza. 2007. “Saponins: Properties, Applications and Processing.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47 (3): 231–58. <https://doi.org/10.1080/10408390600698197>.
- Ilić, Nada, Mario Novković, Filomena Guida, Daniela Xhindoli, Monica Benincasa, Alessandro Tossi, and Davor Juretić. 2013. “Selective Antimicrobial Activity and Mode of Action of Adepantins, Glycine-Rich Peptide Antibiotics Based on Anuran Antimicrobial Peptide Sequences.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828 (3): 1004–12.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.017>.
- Inoue, Y, A Shiraishi, T Hada, K Hirose, H Hamashima, and J Shimada. 2004. “The Antibacterial Effects of Terpene Alcohols on and Their Mode of Action.” *FEMS Microbiology Letters* 237 (2): 325–31.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.049>.

- Kaur, Palwinder, Nilesh Kumar, and T. N. Shivan. 2011. "Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of the Plant Extracts of *Mimosa Pudica* L. against Selected Microbes." *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (22): 5356–59.
- Kong, Yu, Yu-Jie Fu, Yuan-Gang Zu, Fang-Rong Chang, Yung-Husan Chen, Xiao-Lei Liu, Johannes Stelten, and Hans-Martin Schiebel. 2010. "Cajanuslactone, a New Coumarin with Anti-Bacterial Activity from Pigeon Pea [*Cajanus Cajan* (L.) Millsp.] Leaves." *Food Chemistry* 121 (4): 1150–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.062>.
- Leal, L. K. A. M., M. Nechio, E. R. Silveira, K. M. Canuto, J. B. Fontenele, R. A. Ribeiro, and G. S. B. Viana. 2003. "Anti-Inflammatory and Smooth Muscle Relaxant Activities of the Hydroalcoholic Extract and Chemical Constituents from *Amburana Cearensis* A. C. Smith." *Phytotherapy Research* 17 (4): 335–40. <https://doi.org/10.1002/ptr.1139>.
- Pereira, Érica Patrícia, Cleide Santos Souza, Jessika Amparo, Rafael Short Ferreira, Yanier Nuñez-Figueroa, Luzimar Gonzaga Fernandez, Paulo Roberto Ribeiro, Suzana Braga-de-Souza, Victor Diogenes Amaral da Silva, and Silvia Lima Costa. 2017. "*Amburana Cearensis* Seed Extract Protects Brain Mitochondria from Oxidative Stress and Cerebellar Cells from Excitotoxicity Induced by Glutamate." *Journal of Ethnopharmacology* 209 (September): 157–66. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.07.017>.
- Nwachukwu, Ejikeme, and H. Uzoeto. 2010. "Antimicrobial Activities of Leaf of *Vitex Doniana* and *Cajanus Cajan* on Some Bacteria." *Researcher* 2 (3): 37–47.
- Palit, Partha. 2018. "Bioactivity-Guided Phytofractions." In *Natural Products and Drug Discovery*, 57–71. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102081-4.00003-4>.
- Parekh, Jigna, and Sumitra Chanda. 2007. "Antibacterial and Phytochemical Studies on Twelve Species of Indian Medicinal Plants." *African Journal of Biomedical Research* 10 (2).
- Peixoto, Rodolfo De Moraes, Wellington Erasmo Lima E Silva, Jackson Roberto Guedes Silva Almeida, Alexsandro Branco, and Mateus Matiuzzi Da Costa. 2016. "ANTIBACTERIAL POTENTIAL OF NATIVE PLANTS FROM THE CAATINGA BIOME AGAINST *Staphylococcus Spp.* ISOLATES FROM SMALL RUMINANTS WITH MASTITIS." *Revista Caatinga* 29 (3): 758–63. <https://doi.org/10.1590/1983-21252016v29n328rc>.
- Rahmatullah, Mohammed, Abu Noman, Md Shahadat Hossan, M. H. Rashid, Taufiq Rahman, Majeedul H. Chowdhury, and Rownak Jahan. 2009. "A Survey of Medicinal Plants in Two Areas of Dinajpur District, Bangladesh Including Plants Which Can Be Used as Functional Foods." *American Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 3 (4): 862–76.

- Ramawat, K. G., and Meeta Mathur. 2007. "Factors Affecting the Production of Secondary Metabolites." *Biotechnology: Secondary Metabolites. Plants and Microbes*, 59–102.
- Rastogi, Subha, Madan Mohan Pandey, and Ajay Kumar Singh Rawat. 2011. "An Ethnomedicinal, Phytochemical and Pharmacological Profile of *Desmodium Gangeticum* (L.) DC. and *Desmodium Adscendens* (Sw.) DC." *Journal of Ethnopharmacology* 136 (2): 283–96.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.031>.
- Saraiva, Manuele Eufrazio, Ana Vartan Ribeiro de Alencar Ulisses, Daiany Alves Ribeiro, Liana Geraldo Souza de Oliveira, Delmácia Gonçalves de Macêdo, Francisca de Fátima Silva de Sousa, Irwin Rose Alencar de Menezes, Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio, and Marta Maria de Almeida Souza. 2015. "Plant Species as a Therapeutic Resource in Areas of the Savanna in the State of Pernambuco, Northeast Brazil." *Journal of Ethnopharmacology* 171 (August): 141–53.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.034>.
- Sukanya, S. L., J. Sudisha, P. Hariprasad, S. R. Niranjana, H. S. Prakash, and S. K. Fathima. 2009. "Antimicrobial Activity of Leaf Extracts of Indian Medicinal Plants against Clinical and Phytopathogenic Bacteria." *African Journal of Biotechnology* 8 (23).
- Tshikalange, T.E., J.J.M. Meyer, and A.A. Hussein. 2005. "Antimicrobial Activity, Toxicity and the Isolation of a Bioactive Compound from Plants Used to Treat Sexually Transmitted Diseases." *Journal of Ethnopharmacology* 96 (3): 515–19. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.057>.
- Velioglu, Y. S., G. Mazza, L. Gao, and B. D. Oomah. 1998. "Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (10): 4113–17.
<https://doi.org/10.1021/jf9801973>.
- Wagner, Hildebert. 2011. "Synergy Research: Approaching a New Generation of Phytopharmaceuticals." *Fitoterapia* 82 (1): 34–37.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.016>.
- Wagner, Hildebert, and Sabine Bladt. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer Science & Business Media.
- Wink, M. 2013. "Evolution of Secondary Metabolites in Legumes (Fabaceae)." *South African Journal of Botany* 89: 164–75.
- Wink, M. 2016. "Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification Of." In *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, 1–9. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00263-8>.
- Woisky, Ricardo G, and Antonio Salatino. 1998. "Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control." *Journal of*

Apicultural Research 37 (2): 99–105.
<https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>.

Zhao, Jian, Lawrence C. Davis, and Robert Verpoorte. 2005. "Elicitor Signal Transduction Leading to Production of Plant Secondary Metabolites." *Biotechnology Advances* 23 (4): 283–333.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>.

Zheng, Wei, and Shioh Y. Wang. 2001. "Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (11): 5165–70. <https://doi.org/10.1021/jf010697n>.

Zu, Yuan-gang, Xiao-lei Liu, Yu-jie Fu, Nan Wu, Yu Kong, and Michael Wink. 2010. "Chemical Composition of the SFE-CO₂ Extracts from *Cajanus Cajan* (L.) Huth and Their Antimicrobial Activity in Vitro and in Vivo." *Phytomedicine* 17 (14): 1095–1101. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.04.005>.

CONCLUSÕES

- Foi possível desenvolver um método de prospecção de sequências peptídicas em bancos de dados disponíveis, a fim de identificar AMPs, bem como prever sua atividade antimicrobiana *in silico* favorecendo a busca por sequências candidatas.
- Ferramentas *in silico* foram essenciais na obtenção de uma nova e modificada defensina de *C. cajan*, considerando as possíveis conformações geradas e simulações de interação.
- O PDef-Caj1 apresentou-se como um potencial candidato no desenvolvimento de um novo agente antimicrobiano através de sua baixa citotoxicidade em relação as células testadas, bem como sua ação contra cepas de bactérias resistentes e fungos oportunistas.
- Análises via RT-qPCR demonstraram a expressão de novas defensinas em diferentes tecidos de *C. cajan* assim como genes de referência foram relevantemente validados, visto que, na literatura há poucos estudos envolvendo a validação desses genes na espécie estudada.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Testar a citotoxicidade do PDef-Caj1 contra outros tipos de linhagens celulares.
- Realizar ensaios de expressão heteróloga de PDef-Caj1 em *Eschericia coli* ou em leveduras, visando à sua produção.
- Investigar a interação de PDef-Caj1 em simulação de Dinâmica molecular em membrana de patógenos.
- Realizar ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão a fim de verificar possíveis mecanismos de ação do PDef-Caj1.
- Testar a atividade de PDef-Caj1 em linhagens virais.
- Realizar estudo de expressão por RT-qPCR do peptídeo sob desafio de inoculação por um patógeno (estresse biótico).
- Realizar cristalografia de raios-X ou RMN do peptídeo sintetizado a fim de verificar a conformação de sua estrutura secundária.
- Engenheirar o peptídeo a fim melhorar a atividade antimicrobiana e diminuir potencial citotoxicidade.
- Extrair, purificar e testar AMPs de algumas plantas da família Fabaceae.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, v. 17, n. 2, p. 73–90, fev. 2012.
- ALI, M. Pigeonpea: cropping systems. *Pigeonpea: cropping systems.*, p. 279–301, 1990.
- ALIAHMADI, A. et al. A simple method for primary screening of antibacterial peptides in plant seeds. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 3, n. 2, p. 104–108, jun. 2011.
- ANDREWS, M.; ANDREWS, M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 4, p. 705, 26 mar. 2017.
- ANDREWS, S. J.; ROTHNAGEL, J. A. Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames. *Nature Reviews Genetics*, v. 15, n. 3, p. 193–204, mar. 2014.
- ANTOSOVA, Z. et al. Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever? *Trends in Biotechnology*, v. 27, n. 11, p. 628–635, nov. 2009.
- ASAI, T.; MATSUKAWA, T.; KAJIYAMA, S. Metabolomic analysis of primary metabolites in citrus leaf during defense responses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 123, n. 3, p. 376–381, mar. 2017.
- AUSUBEL, F. M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*, v. 6, n. 10, p. 973–979, out. 2005.
- AZANI, N. et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny – The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon*, v. 66, n. 1, p. 44–77, 22 fev. 2017.
- BEKTAS, Y.; EULGEM, T. Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, 26 jan. 2015.
- BENKO-ISEPPON, A. M. et al. Overview on plant antimicrobial peptides. *Current Protein & Peptide Science*, v. 11, n. 3, p. 181–188, maio 2010.
- BENKO-ISEPPON, A. M.; CROVELLA, S. Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from Brazilian plants: state of art and perspectives. *Current Protein & Peptide Science*, v. 11, n. 3, p. 189–194, maio 2010.
- BENSCHOP, J. J. et al. Quantitative Phosphoproteomics of Early Elicitor Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 6, n. 7, p. 1198–1214, jul. 2007.

- BERTELSEN, K. et al. Mechanisms of Peptide-Induced Pore Formation in Lipid Bilayers Investigated by Oriented ³¹P Solid-State NMR Spectroscopy. *PLoS ONE*, v. 7, n. 10, p. e47745, 18 out. 2012.
- BROEKAERT, W. F. et al. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, v. 108, n. 4, p. 1353–1358, ago. 1995.
- BROEKAERT, W. F. et al. Antimicrobial Peptides from Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 16, n. 3, p. 297–323, jan. 1997.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 238–250, mar. 2005.
- BRUIX, M. et al. ¹H-nmr studies on the structure of a new thionin from barley endosperm: Structure of a New Thionin. *Biopolymers*, v. 36, n. 6, p. 751–763, dez. 1995.
- CAPRILES, P. et al. Modelos tridimensionais. *Bioinformática da biologia à flexibilidade molecular* (Verli H, ed.). SBBq, São Paulo, p. 147–171, 2014.
- CARBONARO, M. et al. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 3, p. 742–749, mar. 2000.
- CARVALHO, A. DE O.; GOMES, V. M. Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, v. 30, n. 5, p. 1007–1020, maio 2009.
- CHANDRA, H. et al. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review. *Plants*, v. 6, n. 4, p. 16, 10 abr. 2017.
- CHEN, Y. C. et al. Molecular defense responses in roots and the rhizosphere against *Fusarium oxysporum*. *Plant Signaling & Behavior*, v. 9, n. 12, p. e977710, 2 dez. 2014.
- CHISHOLM, S. T. et al. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 803–814, fev. 2006.
- CHRISTENSEN, A. B. et al. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, v. 3, n. 3, p. 135–144, maio 2002.
- CILLI, E. M. et al. Reações de clivagem ácida de aminoácidos e peptídeos ligados a polímeros: relevância para a metodologia de síntese de peptídeo. In: RESENDE, R. R. (Ed.). *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4*. 1. ed. [s.l.] Editora Blucher, 2017. p. 175–196.

- COBO, E.; CHADEE, K. Antimicrobial Human β -Defensins in the Colon and Their Role in Infectious and Non-Infectious Diseases. *Pathogens*, v. 2, n. 1, p. 177–192, 19 mar. 2013.
- CONRATH, U. Systemic Acquired Resistance. *Plant Signaling & Behavior*, v. 1, n. 4, p. 179–184, jul. 2006.
- CURIEL, J. A. et al. Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: The potential of sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 196, p. 51–61, mar. 2015.
- CÂNDIDO, E. et al. The use of versatile plant antimicrobial peptides in agribusiness and human health. *Peptides*, v. 55, p. 65–78, maio 2014.
- DELLAVALLE, P. D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean journal of agricultural research*, v. 71, n. 2, p. 231, 2011.
- DEWEN, Q. et al. Plant Immunity Inducer Development and Application. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 30, n. 5, p. 355–360, maio 2017.
- DI, L. Strategic Approaches to Optimizing Peptide ADME Properties. *The AAPS Journal*, v. 17, n. 1, p. 134–143, jan. 2015.
- NASCIMENTO, V. V. et al. PvD1 defensin, a plant antimicrobial peptide with inhibitory activity against *Leishmania amazonensis*. *Bioscience Reports*, v. 35, n. 5, p. e00248–e00248, 10 set. 2015.
- DOMON, B. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, v. 312, n. 5771, p. 212–217, 14 abr. 2006.
- SANTOS, I. S. et al. Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect α -amylase inhibitory activity. *Protein Expression and Purification*, v. 71, n. 1, p. 8–15, maio 2010.
- DU VIGNEAUD, V.; RESSLER, C.; TRIPPETT, S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 205, n. 2, p. 949–957, dez. 1953.
- DURRANT, W. E.; DONG, X. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology*, v. 42, n. 1, p. 185–209, set. 2004.
- FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, v. 6, p. PMC.S14459, jan. 2014.
- FINDLAY, B.; ZHANEL, G. G.; SCHWEIZER, F. Cationic Amphiphiles, a New Generation of Antimicrobials Inspired by the Natural Antimicrobial Peptide

- Scaffold. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 10, p. 4049–4058, 1 out. 2010.
- FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, v. 20, n. 1, p. 122–128, jan. 2015.
- GEPTS, P. et al. Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology*, v. 137, n. 4, p. 1228–1235, abr. 2005.
- GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, v. 131, n. 3, p. 872–877, 1 mar. 2003.
- GÜÇLÜ-USTÜNDAĞ, O.; MAZZA, G. Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 47, n. 3, p. 231–258, 2007.
- GUERRA-GUIMARÃES, L. et al. Protein Dynamics in the Plant Extracellular Space. *Proteomes*, v. 4, n. 3, p. 22, 13 jul. 2016.
- GULEWICZ, P. et al. Non-Nutritive Compounds in Fabaceae Family Seeds and the Improvement of Their Nutritional Quality by Traditional Processing – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, v. 64, n. 2, p. 75–89, 30 jun. 2014.
- HANCOCK, R. E. W. Alterations in Outer Membrane Permeability. *Annual Review of Microbiology*, v. 38, n. 1, p. 237–264, out. 1984.
- HANEY, E. F.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. Antimicrobial peptides: An introduction. In: *Antimicrobial Peptides*. [s.l.] Springer, 2017. p. 3–22.
- HANSEN, P. R. (ED.). *Antimicrobial peptides: methods and protocols*. New York , NY, U.S.A: Humana Press, 2017.
- HEESE, A. et al. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 29, p. 12217–12222, 17 jul. 2007.
- HERBEL, V.; SCHÄFER, H.; WINK, M. Recombinant Production of Snakin-2 (an Antimicrobial Peptide from Tomato) in *E. coli* and Analysis of Its Bioactivity. *Molecules*, v. 20, n. 8, p. 14889–14901, 14 ago. 2015.
- HERENDEEN, P. et al. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. 2013.
- HOWL, J. *Peptide synthesis and applications*. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2005. v. 298

- HRUBY, V. J. Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, n. 11, p. 847–858, nov. 2002.
- HUMMEL, G.; REINEKE, U.; REIMER, U. Translating peptides into small molecules. *Molecular BioSystems*, v. 2, n. 10, p. 499, 2006.
- JACOB, J. T.; GAYNES, R. P. Emerging trends in antibiotic use in US hospitals: quality, quantification and stewardship. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 8, n. 8, p. 893–902, ago. 2010.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 16 nov. 2006.
- JOTHI, A. Principles, Challenges and Advances in ab initio Protein Structure Prediction. *Protein & Peptide Letters*, v. 19, n. 11, p. 1194–1204, 1 set. 2012.
- KAAS, Q. et al. Antimicrobial peptides in plants. *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design, and Novel Therapeutic Strategies*, p. 40–71, 2010.
- KÄLLBERG, M. et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*, v. 7, n. 8, p. 1511–1522, 19 jul. 2012.
- KARRI, V.; PULUGURTHA BHARADWAJA, K. Tandem combination of *Trigonella foenum-graecum* defensin (Tfgd2) and *Raphanus sativus* antifungal protein (RsAFP2) generates a more potent antifungal protein. *Functional & Integrative Genomics*, v. 13, n. 4, p. 435–443, nov. 2013.
- KASPAR, A. A.; REICHERT, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 17–18, p. 807–817, set. 2013.
- KAUFMANN, K. W. et al. Practically Useful: What the ROSETTA Protein Modeling Suite Can Do for You. *Biochemistry*, v. 49, n. 14, p. 2987–2998, 13 abr. 2010.
- KOMORI, T.; YAMADA, S.; IMASEKI, H. A cDNA clone for γ -thionin from *Nicotiana paniculata* (accession no. AB005250; PGR97–132). *Plant Physiol*, v. 115, p. 314, 1997.
- KULIKOVA, O. G. et al. [Biologically Active Peptides Isolated from Dill *Anethum graveolens* L]. *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiya*, v. 51, n. 3, p. 348–353, jun. 2015.
- KUMAR, P. et al. Sodium Orthovanadate and *Trigonella foenum-graecum* Prevents Neuronal Parameters Decline and Impaired Glucose Homeostasis in Alloxan Diabetic Rats. *Prague Medical Report*, v. 116, n. 2, p. 122–138, 2015.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 26, n. C, p. 283–291, 1993.

- LAY, F.; ANDERSON, M. Defensins - Components of the Innate Immune System in Plants. *Current Protein & Peptide Science*, v. 6, n. 1, p. 85–101, 1 fev. 2005.
- LAY, F. T. et al. The C-terminal propeptide of a plant defensin confers cytoprotective and subcellular targeting functions. *BMC Plant Biology*, v. 14, n. 1, p. 41, 2014.
- LAY, F. T.; BRUGLIERA, F.; ANDERSON, M. A. Isolation and Properties of Floral Defensins from Ornamental Tobacco and Petunia. *Plant Physiology*, v. 131, n. 3, p. 1283–1293, 1 mar. 2003.
- LEONTIADOU, H.; MARK, A. E.; MARRINK, S. J. Antimicrobial Peptides in Action. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 37, p. 12156–12161, set. 2006.
- LEWIS, G. P. *Legumes of the World*. [s.l.] Royal Botanic Gardens Kew, 2005.
- LI, J. et al. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Frontiers in Neuroscience*, v. 11, 14 fev. 2017.
- LIEN, S.; LOWMAN, H. B. Therapeutic peptides. *Trends in Biotechnology*, v. 21, n. 12, p. 556–562, dez. 2003.
- LO, H.-Y. et al. Identification of the bioactive and consensus peptide motif from *Momordica charantia* insulin receptor-binding protein. *Food Chemistry*, v. 204, p. 298–305, ago. 2016.
- LOFFET, A. Peptides as Drugs: Is There a Market? *Journal of Peptide Science*, v. 8, n. 1, p. 1–7, jan. 2002.
- LYON, B. R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiological Reviews*, v. 51, n. 1, p. 88–134, mar. 1987.
- MACHO, A. P.; ZIPFEL, C. Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell*, v. 54, n. 2, p. 263–272, abr. 2014.
- MALAGUTI, M. et al. Bioactive Peptides in Cereals and Legumes: Agronomical, Biochemical and Clinical Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 11, p. 21120–21135, 14 nov. 2014.
- MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1858, n. 5, p. 936–946, maio 2016.
- MANDAL, S. M. et al. Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. *Peptides*, v. 30, n. 4, p. 633–637, abr. 2009.

- MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-Search: Protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. WEB SERVER ISS., p. 327–331, 2004.
- MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochemical Journal*, v. 35, n. 12, p. 1358–1368, dez. 1941.
- MATSUBAYASHI, Y. Post-Translational Modifications in Secreted Peptide Hormones in Plants. *Plant and Cell Physiology*, v. 52, n. 1, p. 5–13, 1 jan. 2011.
- MATSUBAYASHI, Y. Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. *Annual review of plant biology*, v. 65, p. 385–413, 2014.
- MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 15, p. 7623–7627, 23 jul. 1996.
- MATSUZAKI, K.; MURASE, O.; MIYAJIMA, K. Kinetics of Pore Formation by an Antimicrobial Peptide, Magainin 2, in Phospholipid Bilayers. *Biochemistry*, v. 34, n. 39, p. 12553–12559, out. 1995.
- MELO, M. N.; FERRE, R.; CASTANHO, M. A. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 3, p. 245, 2009.
- MENDEZ, E. et al. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *European Journal of Biochemistry*, v. 194, n. 2, p. 533–539, dez. 1990.
- MENG, P. et al. The First Salamander Defensin Antimicrobial Peptide. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. e83044, 30 dez. 2013.
- MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, jul. 1963.
- MILLIGAN, S. B.; GASSER, C. S. Nature and regulation of pistil-expressed genes in tomato. *Plant molecular biology*, v. 28, n. 4, p. 691–711, 1995.
- MOFFETT, P. Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. *Advances in Virus Research*, v. 75, p. 1–33, 2009.
- MOJICA, L.; BERHOW, M.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. *Food Chemistry*, v. 229, p. 628–639, ago. 2017.

- NAWROCKI, K.; CRISPELL, E.; MCBRIDE, S. Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics*, v. 3, n. 4, p. 461–492, 13 out. 2014.
- NEEDHAM, B. D.; TRENT, M. S. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 7, p. 467–481, jul. 2013.
- NICE, E. C. et al. Use of multidimensional separation protocols for the purification of trace components in complex biological samples for proteomics analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1168, n. 1–2, p. 190–210, out. 2007.
- NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 4, p. 593–656, 1 dez. 2003.
- NOGUCHI, M.; SASADA, T.; ITOH, K. Personalized peptide vaccination: a new approach for advanced cancer as therapeutic cancer vaccine. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 62, n. 5, p. 919–929, maio 2013.
- OCDE/FAO. *Perspectivas agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira 2015-2024*. 2015.
- ODDEPALLY, R.; GURUPRASAD, L. Isolation, purification, and characterization of a stable defensin-like antifungal peptide from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds. *Biochemistry (Moscow)*, v. 80, n. 3, p. 332–342, mar. 2015.
- ONG, Z. Y.; WIRADHARMA, N.; YANG, Y. Y. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 78, p. 28–45, nov. 2014.
- PANDIN, C.; CAROFF, M.; CONDEMINE, G. Antimicrobial Peptide Resistance Genes in the Plant Pathogen *Dickeya dadantii*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, n. 21, p. 6423–6430, 1 nov. 2016.
- PANSTRUGA, R.; PARKER, J. E.; SCHULZE-LEFERT, P. SnapShot: Plant Immune Response Pathways. *Cell*, v. 136, n. 5, p. 978.e1-978.e3, mar. 2009.
- PEARCE, G. et al. A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science*, v. 253, n. 5022, p. 895–897, 23 ago. 1991.
- PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O. L. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 37, n. 11, p. 2239–2253, nov. 2005.

- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, v. 8, n. 10, p. 785–6, jan. 2011.
- PICHEREAU, C.; ALLARY, C. Therapeutic peptides under the spotlight. *Eur. Biopharm. Rev*, v. 5, p. 88–91, 2005.
- PREVENTION (US), C. FOR D. C. AND. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. [s.l.] Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and ..., 2013.
- RAETZ, C. R. H. et al. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, v. 76, n. 1, p. 295–329, 7 jun. 2007.
- RIBEIRO SOARES, J. et al. Antimicrobial Peptides from *Adenantha pavonina* L. Seeds: Characterization and Antifungal Activity. *Protein & Peptide Letters*, v. 19, n. 5, p. 520–529, 1 abr. 2012.
- RICHARDSON, D. M. et al. Human-mediated introductions of Australian acacias - a global experiment in biogeography: Wattles: a model group for invasion science. *Diversity and Distributions*, v. 17, n. 5, p. 771–787, set. 2011.
- RIEMER, A. B. et al. Generation of Peptide Mimics of the Epitope Recognized by Trastuzumab on the Oncogenic Protein Her-2/neu. *The Journal of Immunology*, v. 173, n. 1, p. 394–401, 1 jul. 2004.
- RIZZELLO, C. G. et al. Hydrolysate from a mixture of legume flours with antifungal activity as an ingredient for prolonging the shelf-life of wheat bread. *Food Microbiology*, v. 64, p. 72–82, jun. 2017.
- RUANE, J.; SONNINO, A. Agricultural biotechnologies in developing countries and their possible contribution to food security. *Journal of Biotechnology*, v. 156, n. 4, p. 356–363, dez. 2011.
- RYALS, J. A. et al. Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, p. 1809–1819, 1 out. 1996.
- SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 10, p. 605–619, out. 2015.
- SELS, J. et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, n. 11, p. 941–950, nov. 2008.
- SENGUPTA, D. et al. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1778, n. 10, p. 2308–2317, out. 2008.

- SHAFEE, T. M. A. et al. The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 9, p. 2345–2356, set. 2016.
- SHAFEE, T. M. A. et al. Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 74, n. 4, p. 663–682, fev. 2017.
- SINGH, A.; RANI, R.; SHARMA, M. Medicinal Herbs of Punjab (India). *International Journal*, v. 10, n. 2, p. 10–27, 2018.
- SOUZA, G. S. et al. Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, v. 135, n. 1, p. 116–125, set. 2013.
- SUAREZ-CARMONA, M. et al. Defensins: “Simple” antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 26, n. 3, p. 361–370, jun. 2015.
- SUN, L. Peptide-Based Drug Development. *Modern Chemistry & Applications*, v. 01, n. 01, 2013.
- TAM, J. et al. Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals*, v. 8, n. 4, p. 711–757, 16 nov. 2015.
- TAVORMINA, P. et al. The Plant Peptidome: An Expanding Repertoire of Structural Features and Biological Functions. *The Plant Cell*, v. 27, n. 8, p. 2095–2118, ago. 2015a.
- TEKALE, S. S.; JAIWAL, B. V.; PADUL, M. V. Identification of metabolites from an active fraction of *Cajanus cajan* seeds by high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 211, p. 763–769, nov. 2016.
- TERRAS, F. R. et al. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 22, p. 15301–15309, 1992.
- TERRAS, F. R. et al. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell*, v. 7, n. 5, p. 573–588, maio 1995.
- THIBEAULT, J. et al. Analyzing bean extracts using time-dependent SDS trapping to quantify the kinetic stability of phaseolin proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 491, n. 4, p. 994–999, set. 2017.
- UHLIG, T. et al. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics*, v. 4, p. 58–69, set. 2014.

- VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 44, n. 1, p. 135–162, set. 2006.
- VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 55, n. 2, p. 85–97, ago. 1999.
- VRIENS, K.; CAMMUE, B.; THEVISSSEN, K. Antifungal Plant Defensins: Mechanisms of Action and Production. *Molecules*, v. 19, n. 8, p. 12280–12303, 14 ago. 2014.
- WANDERLEY-NOGUEIRA, A. et al. Plant Elite Squad: First Defense Line and Resistance Genes – Identification, Diversity and Functional Roles. *Current Protein & Peptide Science*, v. 18, n. 4, p. 294–310, 6 fev. 2017.
- WANDERLEY-NOGUEIRA, A. C. et al. Insight on pathogen defense mechanisms in the sugarcane transcriptome. *Funct Plant Sci Biotechnol*, v. 6, p. 134–148, 2012.
- WANG, G. Post-translational modifications of natural antimicrobial peptides and strategies for peptide engineering. *Current biotechnology*, v. 1, n. 1, p. 72–79, 2012.
- WANG, G. Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies. [s.l.] Cabi, 2017.
- WANG, S. et al. Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 5, p. 603, 3 maio 2016.
- WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER: Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. In: BATEMAN, A. et al. (Eds.). *Current Protocols in Bioinformatics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. p. 5.6.1-5.6.37.
- WERNER, G. D. A. et al. A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N₂-fixation in angiosperms. *Nature Communications*, v. 5, n. 1, p. 4087, set. 2014.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. Web Server, p. W407–W410, 8 maio 2007.
- WINK, M. The role of quinolizidine alkaloids in plant-insect interactions. *Insect-plant interactions*, v. 4, p. 131–166, 1992.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, v. 89, p. 164–175, 2013.

- WINK, M. Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification of. In: Encyclopedia of Evolutionary Biology. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 1–9.
- WU, S.; SKOLNICK, J.; ZHANG, Y. Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. BMC Biology, v. 5, n. 1, p. 17, 2007.
- WU, S.; ZHANG, Y. MUSTER: Improving protein sequence profile-profile alignments by using multiple sources of structure information. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, v. 72, n. 2, p. 547–556, 4 fev. 2008.
- XIN, F. et al. Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. 2011.
- YAGAMI, A. et al. Occupational food allergy due to parvalbumin and phaseolin induced by epicutaneous sensitization. Allergology International, v. 64, n. 3, p. 287–288, jul. 2015.
- YANG, Y. et al. Improving protein fold recognition and template-based modeling by employing probabilistic-based matching between predicted one-dimensional structural properties of query and corresponding native properties of templates. Bioinformatics, v. 27, n. 15, p. 2076–2082, 1 ago. 2011.
- YIN, C.; WONG, J. H.; NG, T. B. Isolation of a Hemagglutinin with Potent Antiproliferative Activity and a Large Antifungal Defensin from *Phaseolus vulgaris* cv. Hokkaido Large Pinto Beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 63, n. 22, p. 5439–5448, 10 jun. 2015.
- YOKOYAMA, S. et al. Purification, characterization, and sequencing of antimicrobial peptides, Cy-AMP1, Cy-AMP2, and Cy-AMP3, from the Cycad (*Cycas revoluta*) seeds. Peptides, v. 29, n. 12, p. 2110–2117, dez. 2008.
- ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics, v. 9, n. 1, p. 40, 2008.
- ZHANG, Y. et al. Expression analysis and functional characterization of a pathogen-induced thaumatin-like gene in wheat conferring enhanced resistance to *Puccinia triticina*. Journal of Plant Interactions, v. 12, n. 1, p. 332–339, jan. 2017.
- ZHANG, Y.; KOLINSKI, A.; SKOLNICK, J. TOUCHSTONE II: A New Approach to Ab Initio Protein Structure Prediction. Biophysical Journal, v. 85, n. 2, p. 1145–1164, ago. 2003.

Apêndice A - Sequências sonda com atividade antimicrobiana predita no PhytAMP

Query ID	Família	Organismo	Atividade	UNIPROT
PHYT00001	Defensin family	<i>Aesculus hippocastanum</i> (Horse chestnut)	Antibacterial, Antifungal	Q7M1F3
PHYT00002	Defensin family	<i>Beta vulgaris</i> (Sugar beet)	Antibacterial, Antifungal	P81493
PHYT00003	Defensin family	<i>Beta vulgaris</i> (Sugar beet)	Antibacterial, Antifungal	P82010, P81510
PHYT00004	Defensin family	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	Antifungal	P30224, Q42179
PHYT00006	Defensin family	<i>Vigna unguiculata</i> (Cowpea)	Antibacterial	P84920
PHYT00009	Defensin family	<i>Pisum sativum</i> (Garden pea)	Antifungal	P81929
PHYT00010	Defensin family	<i>Pisum sativum</i> (Garden pea)	Antifungal	P81930
PHYT00011	Defensin family	<i>Capsicum annuum</i> (Bell pepper)	Antifungal	Q43413
PHYT00012	Defensin family	<i>Capsicum annuum</i> (Bell pepper)	Antifungal	O65740
PHYT00022	Defensin family	<i>Vicia faba</i> (Broad bean)	Antibacterial	P81456
PHYT00023	Defensin family	<i>Vicia faba</i> (Broad bean)	Antibacterial	P81457
PHYT00024	Defensin family	<i>Petunia hybrida</i> (Petunia)	Antifungal	Q8H6Q1
PHYT00025	Defensin family	<i>Petunia hybrida</i> (Petunia)	Antifungal	Q8H6Q0
PHYT00027	Defensin family	<i>Nicotiana tabacum</i> (Common tobacco)	Antifungal	P32026, Q8GTM0
PHYT00052	Defensin family	<i>Raphanus sativus</i> (Radish)	Antifungal	P69241, P30225, etc.
PHYT00053	Defensin family	<i>Raphanus sativus</i> (Radish)	Antifungal	P30230
PHYT00054	Defensin family	<i>Sinapis alba</i>	Antifungal	P30232
PHYT00055	Defensin family	<i>Vigna radiata</i>	Antibacterial, Antifungal, Insecticidal	Q6T418
PHYT00073	Thionin family	<i>Phyllostachys pubescens</i> (moso bamboo)	Antibacterial, Antifungal	Não depositado
PHYT00074	Thionin family	<i>Phyllostachys pubescens</i>	Antibacterial, Antifungal	Não depositado
PHYT00090	Thionin family	<i>Tulipa gesneriana</i>	Antibacterial, Antifungal	Não depositado
PHYT00091	Thionin family	<i>Tulipa gesneriana</i>	Antibacterial, Antifungal	Não depositado
PHYT00096	Thionin family	<i>Viscum album</i> (European mistletoe)	Antifungal	P01538
PHYT00097	Thionin family	<i>Viscum album</i>	Antifungal	P08943, P01536, P84186

Apêndice B - Contig e singlet de defensinas de Fabaceae

Query		%	%	Q./S.				q.	q.	s.	s.			
ID	Subject IDs	Identity	Positives	Frames	Length	Mismatches	Gap	start	end	start	end	e-value	Score	Description
Contig1	KYP48968.1	100.000	100.00	2/0	56	0	0	764	931	19	74	1,60E-27	113	Defensin-like protein 4*
Contig2	KYP71794.1	100.000	100.00	1/0	67	0	0	130	330	21	87	4,42E-61	145	Wound-induced protein WIN1*
Singlet5	KYP52760.1	100.000	100.00	-1/0	37	0	0	280	170	22	58	2,92E-15	79.0	Defensin-like protein*

Apêndice C – Descrição das espécies da família Fabaceae utilizadas no presente trabalho

Plant species	Voucher	Coordinates	Popular uses	Organ use	Local name	References
<i>Amburana cearensis</i>	purchased	Purchased	Neuroprotection	Seed	Cumaru/Amburana de cheiro	Pereira et al. 2017
<i>Amburana cearensis</i>	LMBV-5	S 7°57'35'/ W 35°6'18'	Respiratory diseases, anti-inflammatory muscle relaxant	Leaves	Cumaru/Amburana de cheiro	Leal et al. 2003
<i>Cajanus cajan</i>	78,924	S 7°57'35'/ W 35°6'18'	Throat affections, snakebite, stimulant, antiedema, diarrhea, skin diseases	Leaves	Feijão guandu	Rahmatullah et al. 2003
<i>Desmodium adscendens</i>	78,923	S 7°57'39'/ W 35°6'15'	Respiratory diseases, antidote, analgesic, antipyretic and antiepileptic	Leaves	Carrapicho	Rastogi et al. 2011; Adeniyi et al. 2013
<i>Mimosa candollei</i> R. Grether	78,921	S 7°57'34°/ W 35°6'19'	Anti diabetic, antitoxin, antihepatotoxin, antioxidant and wound healing activities	Aerial part	Dormideira/Mimosa	Joseph et al. 2013
<i>Senna reticulata</i>	LMBV-4	S 7°57'32°/ W 35°6'25'	Anti-herpetic, febrifuge, antianemic, antimycotic, diuretic, parasiticide and against skin diseases	Leaves	Fedegoso gigante	Hennebelle et al. 2009
<i>Bauhinia cheilantha</i> (Bong.) Steud	78,919	S 8°34'23°/ W 36°49'34'	Antidiabetic, antinfection, anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial and healing	Leaves	Pata de vaca	Silva et al. 2002; Cartaxo et al. 2010

Apêndice D - Sequências de Defensinas vegetais utilizadas na construção da árvore fenética.

Acess ID	Organism	Description	Lenght
XP_020881107.1	<i>Arabidopsis lyrata</i>	defensin-like protein 4	77 aa
NP_178319.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	low-molecular-weight cysteine-rich 69	77 aa
XP_015952346.1	<i>Arachis duranensis</i>	defensin Ec-AMP-D2	79 aa
XP_016185037.1	<i>Arachis ipaensis</i>	defensin Ec-AMP-D2	79 aa
XP_013618268.1	<i>Brassica oleracea</i>	PREDICTED: defensin-like protein 1	77 aa
XP_009129168.1	<i>Brassica rapa</i>	PREDICTED: defensin-like protein 1	77 aa
C.cajan_25245	<i>Cajanus cajan</i>	Defensin Cajanus cajan AMP 1	47 aa
C.cajan_26813	<i>Cajanus cajan</i>	Defensin Cajanus cajan AMP 2	54 aa
KYP48969.1	<i>Cajanus cajan</i>	Defensin-like protein	55 aa
XP_020229972.1	<i>Cajanus cajan</i>	defensin Ec-AMP-D2-like	78 aa
XP_019099989.1	<i>Camelina sativa</i>	PREDICTED: defensin-like protein 2	77 aa
AAL35366.1	<i>Capsicum annuum</i>	defensin protein precursor	78 aa
PHT75535.1	<i>Capsicum annuum</i>	Defensin SD2	106 aa
PHT42492.1	<i>Capsicum baccatum</i>	Defensin-like protein	78 aa
XP_022735130.1	<i>Durio zibethinus</i>	defensin-like protein 1	74 aa
XP_006585876.1	<i>Glycine max</i>	PREDICTED: defensin-like protein	127 aa
KHN06998.1	<i>Glycine soja</i>	Defensin-like protein	84 aa
AFK44299.1	<i>Lotus japonicus</i>	unknown	78 aa
XP_019446960.1	<i>Lupinus angustifolius</i>	PREDICTED: defensin Ec-AMP-D2-like	78 aa
XP_003628979.1	<i>Medicago truncatula</i>	Defensin MtDef4.4	78 aa
AOD75394.1	<i>Nicotiana alata</i>	class I defensin	78 aa
XP_016451209.1	<i>Nicotiana tabacum</i>	PREDICTED: defensin-like protein P322	78 aa
XP_007156391.1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	hypothetical protein PHAVU_003G282500g	78 aa
XP_018462011.1	<i>Raphanus sativus</i>	PREDICTED: defensin-like protein 2	77 aa
NP_001333453.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	defensin-like protein precursor	78 aa
XP_015081872.1	<i>Solanum pennellii</i>	PREDICTED: defensin-like protein	78 aa
AFW90621.1	<i>Solanum tuberosum</i>	protease inhibitor-related protein	78 aa
EOY04853.1	<i>Theobroma cacao</i>	Scorpion toxin-like knottin superfamily protein	141 aa
XP_014507873.1	<i>Vigna radiata</i>	defensin Ec-AMP-D2	78 aa
ACN93800.1	<i>Vigna unguiculata</i>	defensin precursor	78 aa