



Mecanismo de toxicidade do peptídeo extraído e purificado de sementes de *Adenantha pavonina* sobre leveduras de importância médica

Rodrigo da Silva Gebara, Antônio Jesus Dorighetto Cogo, Marilúcia de Carvalho Ribeiro, Anna Lvovna Okorokova Façanha, Valdirene Moreira Gomes, André de Oliveira Carvalho

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas constituintes da primeira linha de defesa dos organismos contra competidores e patógenos. Estes possuem atividade inibitória sobre vírus, bactérias, protozoários e fungos, e geralmente tem baixa toxicidade sobre células de mamíferos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do peptídeo extraído e purificado de sementes de *Adenantha pavonina* sobre leveduras do gênero *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae*, elucidando mecanismos de toxicidade que resultam na morte celular das leveduras. Foi feita a extração dos peptídeos das sementes e a purificação total do peptídeo foi feita por cromatografia de troca iônica (DEAE- Sepharose) e cromatografia de fase reversa (C18, HPLC, gradiente linear de propanol). Foi então realizado o ensaio de inibição de crescimento de *C. albicans*, *C. buinensis*, *C. tropicalis* e *S. Cerevisiae* para determinação da concentração inibitória mínima (MIC), dose letal (DL) e viabilidade celular. Em seguida, realizamos ensaio de permeabilização de membrana (Sytox Green, 0,2µM), estresse oxidativo (H₂DFCDA, 20µM), atividade mitocondrial (Mitotracker red, 100nM), condensação de cromatina (DAPI, 1µg/mL) e ativação de caspases (FITC-VAD-FMK, 50µM), utilizando microscópio óptico (Axio Imager A2, Zeiss) acoplado a filtros fluorescentes. Os resultados apontam atividade fungicida para *C. buinensis* (DL = 50 µg/mL) e *S. cerevisiae* (DL = 12,5 µg/mL), sendo fungistática para *C. albicans* (MIC = 100 µg/mL) e *C. tropicalis* (MIC= 200 µg/mL). *S. cerevisiae*, *C. buinensis* e *C. tropicalis*, quando tratadas com o peptídeo, tiveram suas membranas permeabilizadas, aumento da expressão endógena de ROS e todas as células tiveram uma diminuição de suas atividades mitocondriais, sendo mais evidenciada em *S. cerevisiae* e *C. buinensis*. Tais resultados indicam processo de apoptose e por isso foi investigada a indução de marcadores apoptóticos. *S. cerevisiae* e *C. buinensis* apresentaram uma fluorescência nuclear concentrada e intensa, sugerindo condensação de cromatina, fenômeno típico de células apoptóticas. Tal evento foi confirmado com a detecção da atividade de caspases, induzida pelo peptídeo nas leveduras *S. cerevisiae* e *C. buinensis*. Perspectivas futuras visam a caracterização desse peptídeo por espectrometria de massas, melhor caracterização de seu mecanismo de ação como ultraestrutura das leveduras e perfil de citotoxicidade sobre células de mamíferos. Dados obtidos até o presente momento, demonstram que este peptídeo possui forte atividade contra leveduras de importância médica, sugerindo ser o peptídeo uma molécula promissora no ramo da biotecnologia para tratamento de infecções fúngicas.

Pós graduação em Biociências e Biotecnologia - UENF
CAPES