

**XU** Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica

**28<sup>o</sup>**

Encontro de Iniciação Científica da UENF

**20<sup>o</sup>**

Circuito de Iniciação Científica do IFFluminense

**16<sup>a</sup>**

Jornada de Iniciação Científica da UFF



**U III** Congresso Fluminense de Pós-Graduação

**23<sup>a</sup>**

Mostra de Pós-Graduação da UENF

**8<sup>a</sup>**

Mostra de Pós-Graduação do IFFluminense

**8<sup>a</sup>**

Mostra de Pós-Graduação da UFF

## Caracterização de proteínas de ligação à quitina de sementes de *Capsicum annuum* e atividade antifúngica sobre a levedura *Candida albicans*

Gabriella Rodrigues Gonçalves, Mariele Souza da Silva, Layrana de Azevedo dos Santos, Larissa Maximiano Resende, Gabriel Bonan Taveira, Thomas Zacarone Afonso Guimarães, Celso Shiniti Nagano, Renata Pinheiro Chaves, André de Oliveira Carvalho, Rosana Rodrigues, Olney Vieira da Motta, Valdirene Moreira Gomes

Nos últimos anos, houveram vários relatos da presença de proteínas vegetais tóxicas relacionadas ao mecanismo de defesa de plantas. A existência dessas proteínas levanta a possibilidade de aplicações biotecnológicas oriundas do desenvolvimento de novas técnicas que visam o controle de doenças causadas por fungos. Nesse contexto, temos as proteínas de ligação à quitina. A quitina é um polímero de N-acetil-D-glucosamina e componente essencial da parede celular fúngica. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar e avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* e *in vivo* de uma fração protéica, com propriedades de ligação à quitina, isolada de sementes de *Capsicum annuum*, sobre o crescimento da levedura *Candida albicans*. Inicialmente, as proteínas foram extraídas em tampão fosfato pH 5,4 e submetidas a uma coluna de quitina equilibrada com tampão acetato de sódio (0,08 M, pH 4,5). Posteriormente a fração retida na coluna foi eluída com HCl 0,1 M. Para a visualização dos peptídeos foi utilizado a metodologia de eletroforese de Tricina SDS-PAGE. Para avaliar o efeito da fração sobre o crescimento da levedura, foram realizados ensaios de inibição do crescimento e em seguida foi realizado um ensaio de permeabilização de membranas. A hemotoxicidade e citotoxicidade da fração foram avaliadas em células de mamíferos e larvas de *Galleria mellonella*, respectivamente. Após cromatografia, duas frações, F1 (não retida) e F2 (retida na coluna de quitina) foram obtidas. A eletroforese obtida após cromatografia de afinidade mostrou bandas protéicas majoritárias entre 3 e 14 kDa, especialmente para a fração F2. Uma banda obtida na fração F2 foi identificada por espectrometria de massas e apresentou semelhança com a albumina 2S. A fração F2 inibiu o crescimento de *C. albicans* em quatro diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) sendo que a concentração de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  inibiu 88% do crescimento da levedura. Em seguida, observou-se que a fração F2 causou a permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans*, na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Foi verificado que a fração F2 possui baixa hemotoxicidade sobre células de mamíferos, mesmo em altas concentrações, sendo o percentual de hemólise de 1,37%, 1,37% e 3,5%, respectivamente para 50, 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Além disso, o tratamento com 400  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  da fração F2 resultou na taxa de sobrevivência de 54,5% de larvas de *G. mellonella*. Conclui-se que a fração apresentou atividade antifúngica significativa e baixa hemotoxicidade e citotoxicidade *in vivo*, o que indica grande potencial para o desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas.

Instituição do Programa de IC, IT ou PG: Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal  
Eixo temático: Biotecnologia Vegetal  
Fomento da bolsa (quando aplicável): FAPERJ

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:



**XU** Congresso  
Fluminense  
de Iniciação  
Científica e Tecnológica

**28<sup>o</sup>**  
Encontro de  
Iniciação  
Científica  
da UENF

**20<sup>o</sup>**  
Circuito de  
Iniciação  
Científica do  
IFFluminense

**16<sup>a</sup>**  
Jornada de  
Iniciação  
Científica  
da UFF



**U III** Congresso  
Fluminense de  
Pós-Graduação

**23<sup>a</sup>**  
Mostra de  
Pós-Graduação  
da UENF

**8<sup>a</sup>**  
Mostra de  
Pós-Graduação  
do IFFluminense

**8<sup>a</sup>**  
Mostra de  
Pós-Graduação  
da UFF

## Characterization of chitin-binding proteins from *Capsicum annuum* seeds and antifungal activity on *Candida albicans* yeast

Gabriella Rodrigues Gonçalves, Marcele Souza da Silva, Layrana de Azevedo dos Santos, Larissa Maximiano Resende, Gabriel Bonan Taveira, Thomas Zacarone Afonso Guimarães, Celso Shiniti Nagano, Renata Pinheiro Chaves, André de Oliveira Carvalho, Rosana Rodrigues, Olney Vieira da Motta, Valdirene Moreira Gomes

In recent years, there have been several reports of the presence of toxic proteins which are implicated in plant defense mechanisms. The existence of these proteins raises the possibility of biotechnological applications originating from the development of new techniques to combat diseases caused by fungi. In this context, we have chitin-binding proteins. Chitin is a polymer of N-acetyl-D-glucosamine and an essential component of the fungal cell wall. Thus, the objective of this study was to characterize and evaluate the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial effect of fraction peptide, with chitin binding properties, isolated from *Capsicum annuum* seeds, on the growth of yeast *Candida albicans*. Initially, proteins were extracted in phosphate pH 5.4 and a chitin column was equilibrated with sodium acetate (0.08 M, pH 4.5). Subsequently, the fraction retained on the column was eluted with 0.1 M HCl. To visualize the peptides, the Tricine SDS-PAGE electrophoresis methodology was used. To evaluate the effect of the fraction on yeast growth, growth inhibition assays were performed and then a membrane permeabilization assay was performed. The hemotoxicity and cytotoxicity of the fraction were evaluated in mammalian cells and *Galleria mellonella* larvae, respectively. After chromatography, two fractions, F1 (not retained) and F2 (retained on the chitin column) were obtained. The electrophoresis obtained after affinity chromatography showed major protein bands between 3 and 14 kDa, especially for the F2 fraction. A band obtained in the F2 fraction was identified by mass spectrometry and showed similarity with 2S albumin. Fraction F2 inhibited the growth of *C. albicans* at four different concentrations (25, 50, 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) and the concentration of 200  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  inhibited 88% of yeast growth. Then, it was observed that the F2 fraction caused permeabilization of the plasma membrane of *C. albicans*, at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . It was verified that the F2 fraction has low hemotoxicity on mammalian cells, even at high concentrations, with the percentage of hemolysis being 1.37%, 1.37% and 3.5%, respectively for 50, 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Furthermore, treatment with 400  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  of the F2 fraction resulted in a 54.5% survival rate of *G. mellonella* larvae. It is concluded that the fraction showed significant antifungal activity and low *in vivo* hemotoxicity and cytotoxicity, which indicates great potential for the development of new antifungal molecules.

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:

