

ATIVIDADE ANTITUMORAL E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE FUNGO ENDOFÍTICO DE *Mikania* sp.

**KENNIA DE CÁSSIA ARAÚJO GALDINO¹; NATHALIA STARK PEDRA²; CARLUS
AUGUSTO TAVARES DO COUTO²; HELENE SANTOS DE ABREU³; ROSÉLIA
MARIA SPANEVELLO²; ELIZANDRA BRAGANHOL⁴**

^{1,2} Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas

³ Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas

⁴ Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

¹kenniagaldino@gmail.com

⁴elizbraganhol@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (INCA, 2014) e ocorre em igual proporção entre homens e mulheres, tendo predominância em adultos brancos (Junqueira Júnior, 2005). Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrados no país, este tumor representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, apesar de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de formar metástases (INCA, 2014). Sua forma metastática é, na maioria das vezes, incurável, com taxas de sobrevida de 05 anos, sendo o pulmão o órgão frequentemente acometido pela disseminação metastática do melanoma cutâneo (Junqueira Júnior, 2005). O arsenal terapêutico disponível para o tratamento da doença ainda apresenta resultados insatisfatórios, sendo necessária a busca de novas modalidades para o tratamento desta doença.

O gênero *Mikania* comprehende as espécies vegetais popularmente conhecidas como guaco. Segundo Ritter & Miotto (2005), o gênero conta com 430 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, sendo 171 de ocorrência natural no Brasil. *M. glomerata* and *M. laevigata* são utilizadas como plantas medicinais pela população devido às suas propriedades bronco dilatadora, expectorante, anti-inflamatória e antialérgica (Czelusniak et al, 2012; Santana et al, 2013). *M. laevigata* também tem sido investigada por sua atividade anti-ulcerogenica (Bighetti et al, 2005), bem como um agente antitumoral (Rufatto et al, 2013).

Micro-organismos associados às plantas podem oferecer materiais com efeitos terapêuticos mais do que a própria planta (Strobel & Long, 1998). Estudos tem demonstrado que estes micro-organismos apresentam uma vasta gama de compostos biologicamente ativos como, por exemplo, compostos fenólicos (Yadav et al, 2014). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico de extratos obtidos do fungo endofítico isolado de *Mikania* sp. sobre a linhagem celular de melanoma B16F10.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção de microrganismos endofíticos

Foram utilizadas folhas de *Mikania* sp. coletadas no horto do campus universitário Capão do Leão. Para o isolamento dos fungos endofíticos, as folhas foram mergulhadas em etanol a 70%, lavadas com água destilada e deixadas em hipoclorito a 2%. Após, as folhas foram seccionadas e inoculadas em placas de petri com meio ágar-água, a 25°C e em regime de luminosidade controlada (claro-

escuro) por sete dias. Ao final deste período, os micélios que surgiram foram repicados em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), mantidas a temperatura de 25°C e em regime de luminosidade controlada.

2.2. Obtenção dos extratos

A biomassa foi obtida através de inoculação de discos de ágar de 0,8 cm de diâmetro contendo micélios do fungo isolado em 100 mL meio de cultivo líquido BD (Batata-Dextrose), mantidos sob agitação constante, e cultivados à temperatura de 25°C, durante 21-25 dias. O micélio foi separado do meio de cultivo por filtração. O micélio, após seco, foi triturado e foi adicionado MeOH (metanol) na proporção de 1:10. Os compostos presentes no meio líquido BD foram extraídos com AcoEt (acetato de etila), na proporção de 1:1. As fases orgânicas de extração de cada solvente, contendo os compostos do micélio ou metabolismo secundário, foram rota-evaporadas a pressão reduzida.

2.3. Cultura da linhagem celular

Linhagem de melanoma (B16F10), obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera umidificada/5% de CO₂.

2.4. Avaliação dos extratos

As células de melanoma B16F10 foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 5 x 10³ células por poço. As células foram tratadas por 48 h com extratos de MeOH e AcoET nas concentrações de 100, 90, 80, 70, 60 e 50 µg/mL. Os extratos foram diluídos em água filtrada e as células cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), foram usadas como controle.

2.5. Determinação de compostos fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais presente nos extratos foi quantificado através do método Folin-Ciocalteau, utilizando ácido gálico como padrão. Os extratos foram dissolvidos em metanol (1mg/mL) e 50 µL de cada extrato foi adicionado a 25 µL do reagente de Folin-Ciocalteau, 75 µL de Na₂CO₃ e 100 µL de água destilada. Seguindo-se de incubação, à temperatura ambiente, por 35 minutos e absorbância determinada a 725 nm. O conteúdo de fenóis totais foi expresso como mg/g de Equivalente de Ácido Gálico (GAE, da sigla em inglês).

2.6. Teste de viabilidade celular

A viabilidade das células B16F10 após o tratamento com os extratos foi avaliada por determinação da redução de MTT solúvel [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-Diphe-nyltetrazolium brometo] a cristais de formazan. Após o tratamento, as células foram lavadas com CMF e uma concentração final de 0.5 mg/mL de MTT foi adicionado por poço. Por fim, as células foram incubadas durante 1 h e 40 min a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. O precipitado formado foi eluído com 50 µL de DMSO e os valores da absorbância foram determinados a 492 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o presente momento foi possível o isolamento do fungo descrito sob o código F3B3 que ainda está em processo de identificação, devido à ausência de estruturas reprodutivas. Com relação ao conteúdo fenólico total observou-se que

o extrato de MeOH micélio do fungo F3B3 apresentou um valor de conteúdo de fenóis totais de $0,32 \pm 0,04$ mg GAE/g de extrato, enquanto o extrato obtido do meio de cultivo, com AcoEt como solvente, a quantidade encontrada foi de $2,3 \pm 0,16$ mg GAE/g de extrato.

Foi observado que o extrato de AcoET reduziu de forma significativa a viabilidade celular em 48 h de tratamento nas concentrações avaliadas quando comparados com o controle, exceto a concentração de 0,005 mg/mL (Figura 1). Entretanto, não foram observados resultados significativos quando foi utilizado o extrato de MeOH obtido a partir do micélio do fungo.

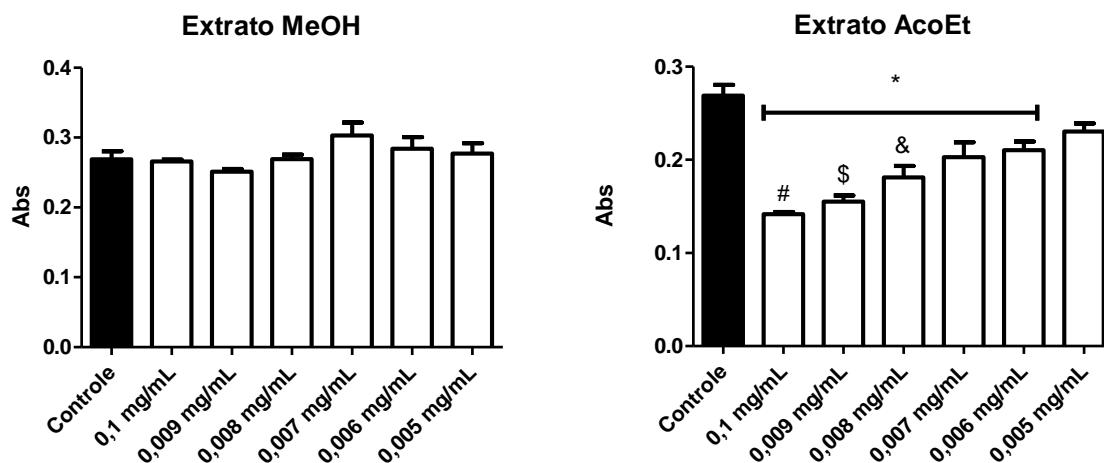


Figura 1. Os dados foram expressos como médias \pm desvio padrão de 4 experimentos independentes, analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. *diferença significativa quando comparado ao controle; #, \$, &, diferença significativa entre os tratamentos. Extrato do meio com AcoEt $P < 0,0001$; Extrato do micélio com MeOH, $P = 0,1382$.

A atividade antitumoral observada no extrato do meio pode estar associada aos compostos fenólicos que foram quantificados. A extração de compostos do metabolismo, utilizando acetato de etila como solvente orgânico, é o método mais eficiente de isolar compostos do metabolismo secundário de fungos (García *et al* 2012). Yadav *et al* (2014) determinou a presença de compostos fenólicos totais, com atividade antioxidante, de diversos fungos endofíticos isolados de *Eugenia jambolana*. Corroborando então com a possibilidade destes micro-organismos serem empregados para a busca de novos compostos com propriedades farmacológicas de interesse.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que o extrato do meio de cultura do fungo endofítico obtido utilizando como solvente acetato de etila apresenta efeito antitumoral quando testado na linhagem de melanoma B16F10. Nenhum resultado satisfatório foi obtido para o extrato metanólico do micélio do fungo. Podendo a atividade observada dever-se a presença de composto fenólicos que no extrato AcoEt. Neste sentido, estes resultados indicam que os micro-organismos endofíticos representam uma fonte promissora para a busca por novos compostos com potencial farmacêutico antitumoral.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIGHETTIA, A.E.; ANTÔNIOA, M.A.; KOHN, L.K.; REHDER, V.L.G.; FOGLIO, M.A.; POSSENTI, A.; VILELA, L.; CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine** n. 12, p. 72-77, 2005.
- CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F. FREITAS, G. B. L. **Farmacobotânica, fitoquímica e farmacoloia do guaco: revisão considerando Mikania glomerata Sprengel e Mikania laevigata Schulz Bip. ex Baker.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.
- GARCIA, A.; RHODEN, S. A.; BERNARDI-WENZEL, J.; ORLANDELLI R. C.; AZEVEDO J. L.; PAMPHILE J. A. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. **Journal Appl Pharm Sci**, v. 10, n. 2, p.35-40, 2012.
- GREGÓRIO, L. E. **Fitoquímica e atividades biológicas de plantas do gênero Mikania (Asteraceae)**. 2008. 250f. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós-graduação em Química, Universidade de São Paulo.
- INCA. **Câncer**. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. 19 jul. 2014. Acessado em 19 jul. 2014. Online. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/a/definicao
- JUNQUEIRA JÚNIOR, G. **Modelo experimental de metástases pulmonares de melanoma murino B16-F10 em camundongos C57BL/6N com células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico**. 2005. 56f. Tese (Doutorado em Medicina) – Programa de Pós-graduação em Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- RITTER, R. M.; MIOTTO, S. T. S. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Jornal Hoehnea**, São Paulo, v.32, n.3, p. 309-359, 2005.
- Rufatto, L. C.; Finimundy, T.C.; Roesch-Ely, M.; Moura, S. *Mikania laevigata*: Chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. **Phytomedicine**, v. 20 p. 883– 889, 2013.
- SANTANA, L. C. L. R.; BRITO, M. R. M.; SOUSA, G. F.; FREITAS, R. M. Propriedades físicoquímicas e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico padronizado a 70% das folhas de *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.15, n.4, p.742-750, 2013.
- STROBEL, G. A.; D. M. LONG. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American society of microbiology news**, v. 64, p. 263-268, 1998.
- YADAV, M.; YADAV, A.; YADAV, J. P. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. 256-261, 2014.