

Atividade Citotóxica de Extratos de Fungos Endofíticos Isolados de *Smallanthus sonchifolius*

Margareth B. C. Gallo¹, Mônica T. Pupo², Jairo K. Bastos³, Andrew Sá Nunes⁴, Bruno Coêlho Cavalcanti⁴, Manoel Odorico de Moraes⁴, Leticia Veras Costa-Lotufó⁴, Cláudia do Ó Pessoa⁴

Introdução

Os fungos endofíticos são microrganismos que colonizam os tecidos vivos e internos das plantas e, sob circunstâncias normais, não lhes causam doenças [1]. Por crescerem neste nicho biológico específico, onde organismo e seu biótipo estão sujeitos a constantes e singulares interações, são considerados como uma fonte original e destacada de produtos naturais bioativos.

A planta selecionada para este trabalho foi a *Smallanthus sonchifolius* (Poeppig & Endlicher) H. Robinson, primeiramente conhecida como *Polymnia sonchifolia* Poeppig & Endlicher, 1845. O Yacon, como é vulgarmente conhecida, é membro da família Asteraceae. Suas raízes são indicadas como alimento de baixo valor energético por serem constituídas por fruto-oligossacarídeos, os quais não são absorvidos pelo organismo humano. Além disso, as folhas são usadas para preparar chás antidiabéticos [2].

A presente pesquisa visa contribuir para o conhecimento, do ponto de vista químico, da relação microrganismos endofíticos e a espécie de planta selecionada, almejando a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos de fungos que possam servir de base para o desenvolvimento de fármacos ou agroquímicos.

Material e métodos

A. Isolamento, estoque e identificação dos fungos

A planta *S. sonchifolius* (cuja exsicata será depositada no Herbário da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-SP) foi coletada no jardim de plantas medicinais da UNAERP (Ribeirão Preto-SP) e submetida ao processo de esterilização superficial [3]. Logo após, pequenos pedaços (1,0 x 1,0 cm) dos órgãos vegetais foram inoculados em meio BDA contendo ou não antibiótico e incubados a 30° C por até sete dias. As colônias crescidas dos tecidos vegetais foram repicadas e recultivadas em meio BDA sob as mesmas condições anteriores para o isolamento das espécies. Os fungos isolados foram cultivados em pequena escala em meio líquido, Czapek (400 mL com agitação), e sólido, arroz parboilizado (90 g, na BOD), por 20 dias a 30° C. Do cultivo em meio Czapek, foram obtidos os extratos do micélio e aquoso, os quais foram submetidos à partição líquido-líquido em acetato de etila (PAA). Do cultivo em

arroz, foi obtido o extrato etanólico, o qual também foi submetido à partição em acetato de etila.

Todas as microestruturas das espécies isoladas, tais como hifas e esporos, foram fotografadas (Microscópio Óptico Digital Leica DM 4500B, acoplado a câmera digital Leica DFC320) e também suas culturas nos meios BDA, Czapek e arroz (YASHICA-FXD-quartz) com o objetivo de se fazer um registro visual para facilitar a identificação do fungo cultivado e ou possíveis contaminações. Os microrganismos isolados estão sendo mantidos no nosso laboratório de Microbiologia, sobre sílica gel (14-20 mesh, somente aqueles produtores de conídios) a 10° C ou por transferência em tubos de vidro contendo meio BDA a 10° C. As espécies isoladas foram enviadas ao Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para classificação taxonômica.

B. Condições experimentais para o perfil químico e ensaio citotóxico

Para obtenção do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usou-se um sistema composto por um cromatógrafo líquido Shimadzu LC-6AD acoplado a um injetor automático SIL-10AF, um detector de UV com dispositivo de diodo SPD-M10 AVP, processador de dados CLASS VP, uma pré-coluna 100CN LiChrospher 5µm e uma coluna CLC-ODS Shim-pack (4.6 x 250 mm D.I., 5µm). Foram injetados 20 µL de uma solução metanólica do extrato obtido da partição em acetato de etila, de ambos os cultivos de cada fungo, a uma concentração de 1mg/mL, sob um fluxo de 1mL/min, numa eluição em gradiente empregando metanol (B) em água (A), programada como se segue: 5 a 100% B em 30 min, mantendo-se 100% B por 5 min e retornando a 5% B aos 45 min. Os cromatogramas foram gravados em 290 nm.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H RMN) foram obtidos empregando-se um espectrômetro Bruker Avance DRX-400 e clorofórmio deuterado para dissolver os respectivos extratos provenientes da partição em acetato de etila dos dois cultivos de cada fungo.

A citotoxicidade dos extratos foi determinada através do ensaio colorimétrico do MTT [4] utilizando três linhagens celulares tumorais humanas: MDA-MB435 (mama), HCT-8 (cólon) e SF295 (sistema nervoso),

1. Pós-doutoranda no Departamento de Farmacognosia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP, CEP 14040-903. E-mail: mbcgallo@fcrfp.usp.br

2. Professora Adjunta do Departamento de Química Farmacêutica, FCFRP-USP.

3. Professor Titular do Departamento de Farmacognosia, FCFRP-USP.

4. Pesquisadores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, Fortaleza, CE, CEP 60430-270.

cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37° C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Os extratos foram incubados durante 72 horas na concentração de 100 µg/mL.

Resultados

A. Isolamento dos fungos e atividade citotóxica

Foram isoladas 32 espécies de fungos, sendo que quatro delas já foram classificadas: *Papulospora immersa* (SS13), *Preussia minima* Auerswald, *Aspergillus niger* van Tieghen (SS82) e *Curvularia lunata* var. *aeria* Bat., Lima & Vasconc. e as outras estão em fase de identificação. Estes fungos cresceram dos tecidos de folhas, caule, raízes delgadas e tuberosas e rizóforo de *S. sonchifolius*. Após o cultivo dos mesmos em meios líquido e sólido, obtiveram-se 200 extratos, os quais foram testados *in vitro* sobre as linhagens de células humanas, sendo que 17 deles apresentaram elevada citotoxicidade inibindo a proliferação celular em mais de 75% (Tabela 1) e 20 mostraram atividades moderadas com percentual de inibição proliferativo variando entre 50-75% sobre pelo menos uma das linhagens utilizadas.

B. Perfil químico

O perfil químico dos extratos das dezessete amostras fúngicas que se mostraram muito ativas na inibição do crescimento celular exibiram uma grande diversidade química marcada por substâncias de polaridade variada. Um exemplo dessa diversidade química pode ser observado no resultado da análise CLAE/¹H RMN do extrato AtFSS13, no qual pode-se detectar a presença de derivados terpenoídicos hidroxilados e insaturados, devido aos sinais característicos entre δ 1-6 ppm no seu espectro de ¹H RMN. Outro exemplo é o extrato AtFSS22, que mostrou sinais entre δ 1-8 ppm, sugerindo a presença de derivados terpenoídicos e aromáticos (Figura 1). A análise por CG-EM do extrato AtMiFSS13 detectou a presença de ácidos graxos e esteróis, corroborada pelos sinais revelados no seu espectro de ¹H RMN.

Discussão

O percentual de extratos com atividade expressiva foi de 18,5% e, com base nas análises químicas realizadas, estes extratos podem ser considerados fontes promissoras de metabólitos secundários anticancerígenos. Este estudo preliminar mostrou-se útil na escolha dos fungos que serão cultivados em escala ampliada para a obtenção dos respectivos extratos mais promissores, seguindo-se o isolamento de suas substâncias ativas.

É oportuno ressaltar a seletividade sobre as células do cólon humano (Tabela 1) dos extratos AtFSS76, AtFSS62, AtFSS82 e AtMiFSS13. Neste último extrato, foram detectados ácido palmítico, estigmast-4-en-3-ona, β-saccharostenona, ergost-25-en-3β,5α,6β,12β-tetrol e brassicasterona. Como já foi observada atividade anticancerígena variada para esteróides [5], é possível que a(s) substância(s) ativa(s) desse extrato pertença a essa classe micromolecular.

Agradecimentos

À FAPESP, FINEP e CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] STROBEL, G.A. 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22: 315-333.
- [2] AYBAR, M.J.; RIERA, A.N.S.; GRAU, A. & SANCHÉZ, S.S. 2001. Hypoglycemic effect on the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (Yacon) leaves in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacology*, 74: 125-132.
- [3] PETRINI, O.; SIEBER, T.N.; TOTI, L. & VIRET, O. 1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1: 185-196.
- [4] MOSMAN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 65: 55-63.
- [5] <http://www.tlahui.com/medic/medic11/cuachal1.htm>, acessado em setembro de 2006.

Tabela 1. Percentuais de inibição do crescimento celular causados por extratos de fungos endofíticos isolados de *S. sonchifolius*.

Extratos Fúngicos	Linhagens Celulares Testadas		
	HCT-8	MDA	SF295
AtFSS22	100	100	100
AtFSS33	86,7	71,2	84,5
AtFSS46	85,6	83,2	85,8
AtFSS62	99,8	51,4	67,5
AtFSS82	87,6	45,7	68,2
AtMiFSS13	70,9	16,3	49,9
AtFSS13	100	95,2	98,1
AASS13	54,5	81,3	34,2
HMiFSS13	75,9	16,7	35,9
AtFSS77	94,7	81,9	78,3
AASS67	86,2	41,9	82,2
AtFSS67	79,2	48,2	73,0
MiFSS67	86,8	50,2	67,6
AASS74	83,8	81,0	71,3
AqFSS75	81,6	76,6	41,9
AtFSS76	100	42,6	52,7
AtFSS84	100	92,4	95,6

Os números dados aos extratos são correspondentes aos seus fungos de origem, os quais ainda não se encontram totalmente identificados. AtF: PAA do cultivo em meio líquido; SS: planta de origem; A: extrato etanólico proveniente do cultivo em arroz; AA: PAA do extrato etanólico proveniente do cultivo em arroz.

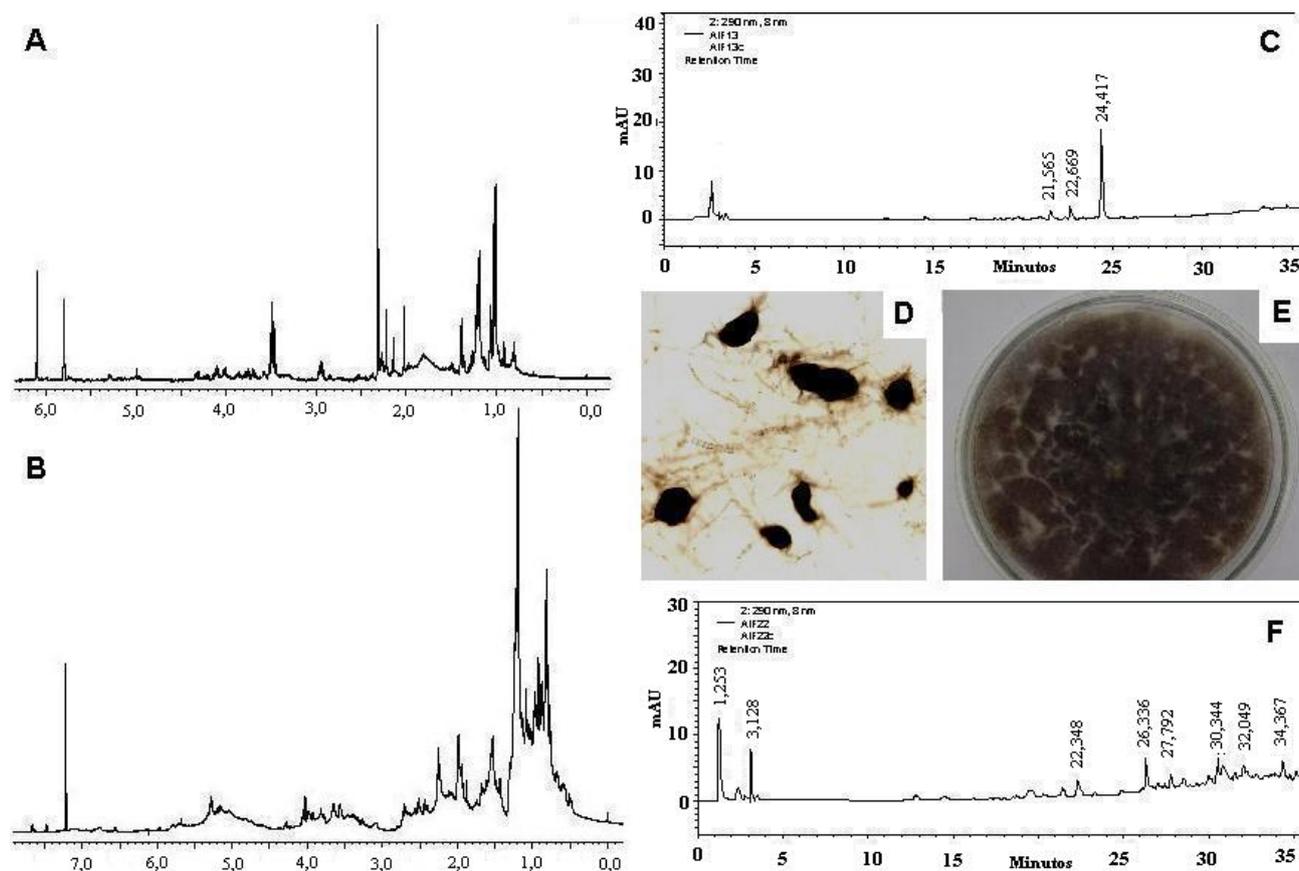


Figura 1. A: espectro de ^1H RMN da partição em acetato de etila do fungo *Papulospora immersa* (AtFSS13) do extrato aquoso proveniente do cultivo em meio Czapek; B: espectro de ^1H RMN da partição em acetato de etila do fungo SS22 (AtFSS22); C: cromatograma do extrato AtFSS13; D: corpo reprodutivo peculiar de *Papulospora immersa* denominado de bulbo (10x); E: anverso da cultura em meio BDA de *Papulospora immersa* (Θ da placa 10,0 cm); F: cromatograma do extrato AtFSS22.