

Atividades antioxidante, anticolinesterasica e citotóxica de metabolitos de fungos endofiticos**Antioxidant, anticolinesterasic and cytoxic activities of endophytic fungus metabolites**

DOI:10.34117/bjdv6n9-721

Recebimento dos originais: 30/08/2020

Aceitação para publicação: 30/09/2020

Daniela Ribeiro Alves

Doutora em Ciências Veterinárias pela Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará
Instituição: Universidade Estadual do Ceará - UECE
Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus do Itaperi – Fortaleza-CE, Brasil
E-mail: alves.danielaribeiro@gmail.com

Wildson Max Barbosa da Silva

Doutor em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará
Instituição: Centro Universitário UniChristus,
Endereço: Rua João Adolfo Gurgel 133 – Fortaleza-CE, Brasil
E-mail: maxquimica@gmail.com

Dayanne Lima dos Santos

Graduanda em Química pela Universidade Estadual do Ceará
Instituição: Universidade Estadual do Ceará - UECE
Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus do Itaperi – Fortaleza-CE, Brasil
E-mail: dayanne.lima@aluno.uece.br

Francisco das Chagas de Oliveira Freire

Doutor em Fitopatologia pelo Imperial College of Science and Technology
Pós-doutor em Fitopatologia pelo International Mycological Institute
Instituição: EMBRAPA – Agroindústria Tropical
Endereço: R. Pernambuco, 2270 - Pici, Fortaleza – Fortaleza-CE, Brasil
E-mail: francisco.o.freire@embrapa.br

Fábio Roger Vasconcelos

Doutor em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará
Instituição: Universidade Federal do Ceará
Endereço: Av, Humberto Monte, S/N, Campus do Pici, Fortaleza – Fortaleza-CE, Brasil
E-mail: fr.vasconcelos@yahoo.com.br

Selene Maia de Moraes

Doutora em Química pela University of London
Pós-Doutora em Química pela Universidade de Aveiro
Instituição: Universidade Estadual do Ceará - UECE
Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus do Itaperi – Fortaleza-CE, Brasil
E-mail: selenemaiademoraes@gmail.com

RESUMO

As propriedades terapêuticas de fungos endofíticos conduzem à pesquisa dos princípios ativos de várias espécies. O objetivo deste trabalho foi obter extratos orgânicos de fungos endofíticos obtidos da planta *J. curcas* bem como de outros fungos da coleção da EMBRAPA Agroindústria Tropical e avaliar sua bioatividade como anticâncer, antioxidante e anticolinesterásica. Para tanto, as sementes de *J. curcas* foram incubadas por três dias a 25°C em placas de Petri descartáveis contendo agar-dextrose-batata, das quais foram isoladas cepas de *Aspergillus nidulans*. Da micoteca da EMBRAPA selecionados foram duas cepas do gênero *Dichotomophthora*. A atividade citotóxica foi avaliada em células de tumores HCT-116, PC-3 e SF-295 mas somente o extrato de uma *Dichotomophthora* sp. apresentou atividade contra HCT-116 e PC-3. Quanto a atividade antioxidante os três fungos apresentaram metabólitos antioxidantes contra o radical DPPH, sendo as cepas de *A. nidulans* com extratos mais promissores. Os extratos das duas cepas de *Dichotomophthora* foram os mais promissores na de inibição da enzima AChE. Portanto os fungos estudados apresentam propriedades biológicas que indicam o seu potencial para estudos mais aprofundados de isolamento e caracterização de seus compostos bioativos.

Palavras-chave: Fungos, Endofíticos, Metabólitos.

ABSTRACT

The therapeutic properties of endophytic fungi lead to research into the active ingredients of various species. The objective of this work was to obtain organic extracts of endophytic fungi obtained from the *J. curcas* plant as well as other fungi from the EMBRAPA Agroindústria Tropical collection and to evaluate their bioactivity as anticancer, antioxidant and anticholinesterase. For that, the seeds of *J. curcas* were incubated for three days at 25 ° C in disposable Petri dishes containing agar-dextrose-potato, from which strains of *Aspergillus nidulans* were isolated. From the EMBRAPA library, two strains of the genus *Dichotomophthora* were selected. Cytotoxic activity was evaluated in tumor cells HCT-116, PC-3 and SF-295 but only the extract of a *Dichotomophthora* sp. showed activity against HCT-116 and PC-3. Regarding the antioxidant activity, the three fungi presented antioxidant metabolites against the DPPH radical, being the strains of *A. nidulans* with more promising extracts. The extracts of the two strains of *Dichotomophthora* were the most promising in inhibiting the enzyme AChE. Therefore, the studied fungi have biological properties that indicate their potential for further studies of isolation and characterization of their bioactive compounds.

Keywords: Fungi, Endophytes, Metabolites.

1 INTRODUÇÃO

Fungos dos tipos endofíticos e patogênicos de plantas produzem metabólitos secundários que desempenham papéis importantes na virulência e na competição contra outros microrganismos (JAKUBCZYK; DUSSART, 2020). Os endófitos são o grupo de microrganismos que residem no interior dos tecidos vegetais sem causar nenhum sinal negativo no hospedeiro. Estudos revelaram que os fungos endófitos estão em quase todos os lugares, em muitas espécies de plantas, e a colonização endofítica difere de planta para planta. Podem fornecer proteção e condições de sobrevivência para sua planta hospedeira, produzindo uma infinidade de substâncias que anulam os efeitos de compostos tóxicos do solo, infecções fúngicas e bacterianas, da herbivoria ou aumentando as respostas das plantas (VERMA; LAL; DAS, 2017).

A biodiversidade existente na região Nordeste detém um potencial latente mediante o patrimônio genético, como o bioma Caatinga, que ocupa cerca de 11% do território nacional, sendo uma fonte promissora de metabólitos bioativos oriundo de plantas e microrganismos, dos quais os fungos apresentam um papel relevante diante de sua vasta diversidade.

A Caatinga apresenta uma grande diversidade de fungos cujo maior parcela é caracterizada pela microbiota endofítica (ALBUQUERQUE, 2006). Diversos trabalhos determinam uma ampla área de aplicação dos metabólicos secundários extraídos de fungos endofíticos, atuando com relevância nas atividades antimicrobiana, antioxidante, antileishmanial, entre outras bioatividades (ALVES *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018; SILVA; CONCEIÇÃO, 2010; TAKAHASHI *et al.*, 2009).

A *Jatropha curcas* L., uma planta perene cultivada nos trópicos e subtropicais, da família Euphorbiaceae, conhecida pelos nomes comuns de purgueira, pinhão-manso, jatropa, mandubiguaçu, pinhão-de-purga e pinha-de-purga, é conhecida popularmente por seu potencial como biocombustível. É relatado que a planta sobrevive sob condições ambientais variadas, com tolerância ao estresse e capacidade de gerenciar pragas e doenças. Alguns autores relataram a presença dos fungos endofíticos *Colletotrichum truncatum*, *Nigrospora oryzae*, *Fusarium proliferatum*, *Guignardia cammillae*, *Alternaria destruens* e *Chaetomium* sp., os quais provavelmente apresentavam proteção a planta, coletadas em Nova Delhi, Índia (Kumar e Kaushi, 2013). Contudo, não existe relatos de identificação de fungos endofíticos nas sementes de *Jatropha curcas* da região da Caatinga.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial bioativo citotóxico, antioxidante e anticolinesterásica de metabólitos produzidos por fungos endofíticos da micoteca da EMBRAPA, fungos endofíticos isolados de semente de *J. curcas*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes frescas de *Jatropha curcas* L. foram adquiridas em Beckman seeds[®], Fortaleza, no estado do Ceará. Uma porção das sementes passaram por um processo de esterilização na superfície durante 1 min com etanol 70%, lavadas com água destilada e secas usando papel filtro esterilizado. Um total de cinco sementes, com ou sem desinfestação superficial foram adicionadas a 30 (trinta) placas descartáveis de Agar de Dextrose de Batata (PDA). Permaneceram incubadas por três dias a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Após esse processo foram isoladas várias cepas, dentre elas destacamos *Aspergillus nidulans* (CMIAT 232) identificada por morfologia de esporos e submetida à coleta de microrganismos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA[®]). O fungo *Dichotomophthora* sp. 01 (CMIAT234) e *Dichotomophthora* sp. 02 (CMIAT235) foram obtidos na coleção de fungos endofíticos da EMBRAPA. Os fungos foram inoculados no meio de cultivo líquido

(BD), após crescimento separou-se o caldo dos micélios por filtração e realizada partição líquido/líquido com o solvente acetato de etila no caldo de cultivo. Posteriormente o solvente foi evaporado, obtendo-se os extratos orgânicos dos três fungos.

A atividade de inibição de AChE foi medida quantitativamente usando o método de Ellman (1961), modificado por Grajeda-Iglesias *et al.* (2016). A atividade antioxidante foi aferida em placas de 96 poços de fundo chato utilizando leitor ELISA BIOTEK (modelo ELX 800 com software Gen5 V2.04.11). Para avaliação da atividade antioxidante utilizou-se o teste contra o radical DPPH. Neste teste foram utilizadas as seguintes soluções por poço: 180 µL de solução metanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), 20 µL da amostra de extrato dissolvida em metanol, nas concentrações de 200-0,78 µg.mL⁻¹.

Os extratos foram investigados quanto a sua atividade antiproliferativa nas linhagens de células tumorais através do ensaio colorimétrico do MTT. O método do MTT é quantitativo, indireto, rápido, sensível que analisa a viabilidade com base no estado metabólico da célula, através da conversão do sal amarelo 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT) em um precipitado de coloração roxa (formazan), a partir da enzima succinil desidrogenase das mitocondrias presentes somente nas células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983).

Para o ensaio da atividade citotóxica, foram utilizadas as linhagens de célula tumoral humana de adenocarcinoma de cólon (HCT-116), carcinoma de ovário (OVCAR-8) e glioblastoma (SF-295), as células aderidas foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100UI penicilina/100µg/mL estreptomicina).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram utilizados três fungos endofíticos (dois do gênero *Dichotomophthora* e o *Aspergillus nidullans*), que foram cultivados em meio batata-dextrose e, após cultivo, foram obtidos os extratos orgânicos com o solvente acetato de etila. Os extratos testados demonstraram baixa atividade citotóxica contra as três linhagens celulares de câncer humano utilizadas, com exceção da amostra do gênero *Dichotomophthora* sp. 02, cujas atividades contra a linhagem HCT-166 e PC3 foram relevantes, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da citotoxicidade das amostras em linhagens neoplásicas humanas.

Amostra	Linguagem Celular					
	HCT-116		PC-3		SF-295	
	MÉDIA(%)	EPM	MÉDIA(%)	EPM	MÉDIA(%)	EPM
<i>Dichotomophthora</i> sp. 01	4,34	1,24	22,16	1,02	37,59	0,65
<i>Dichotomophthora</i> sp. 02	100,00	7,24	96,41	8,64	11,09	4,60
<i>Aspergillus nidulans</i>	7,61	0,97	5,54	1,79	15,72	1,16

Quanto a capacidade de sequestro de radicais livres para estes extratos, os três extratos fúngicos apresentaram ótima atividade antioxidante quando comparados ao padrão quercetina (Tabela 2). Considerando que o solvente de acetato de etila consegue extrair componentes da classe fenólica, a atividade encontrada pode estar relacionada a estes compostos pois na literatura existe ampla discussão sobre a atividade antioxidante de compostos fenólicos como quinonas, taninos e flavonoides (ALVES *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2018; MORAIS *et al.*, 2017; PENIDO *et al.*, 2017; TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2018).

Tabela 2. Avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH*.

Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)
Quercetina (Controle Positivo)	1,05 ± 0,55
<i>Aspergillus nidulans</i>	5,40 ± 0,07
<i>Dichotomophthora</i> sp. 01	8,89 ± 0,57
<i>Dichotomophthora</i> sp. 02	16,82 ± 0,04

Quanto a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase, pode-se compreender que todos os extratos apresentaram ótima atividade inibitória, com ênfase ao *Dichotomophthora* sp. 02 que se destacou mais uma vez entre os testados (Tabela 3).

Sabe-se que compostos inibidores da AChE aumentam os níveis de acetilcolina endógena e possivelmente são úteis no tratamento sintomático de atividades anticarcinogênicas, bem como potenciais para o tratamento de outras doenças do sistema nervoso com intensa produção de espécies reativas de oxigênio (como transtornos de ansiedade e doença de Alzheimer) (LAZAREVIC-PASTI *et al.*, 2017).

As duas espécies de fungos do gênero *Dichotomophthora* apresentaram bons resultados, visto que trabalhos anteriores, utilizando substâncias isoladas, apresentaram valores equivalentes (ALVES *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2018; MORAIS *et al.*, 2017; PENIDO *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*,

2018), ressalta-se portanto a importância dos resultados aqui apresentados, na qual foram utilizados extratos.

Tabela 3. Quantificação de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase:

Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)
Fisostigmina (Controle Positivo)	1,15 ± 0,05
<i>Aspergillus nidulans</i>	27,89 ± 0,04
<i>Dichotomophthora</i> sp. 01	11,93 ± 0,02
<i>Dichotomophthora</i> sp. 02	10,81 ± 0,05

4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem a investigação mais aprofundada e a caracterização de metabolitos secundários de fungos endofíticos, sobretudo das amostras de *Dichotomophthora* sp. 02 que mostraram relevante ação antioxidante e maior potencial antiacetilcolinesterásico e citotóxico.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P. De. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. vol. 10, 2006. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-2-30>.
- ALVES, D. R.; MAIA DE MORAIS, S.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; VASCONCELOS, F. R.; SILVA, I. N. G. da; ARAUJO DE SOUSA, H.; ASSOLINI, J. P.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W. R.; FREIRE, F. das C. O. Flavonoid Composition and Biological Activities of Ethanol Extracts of *Caryocar coriaceum* Wittm., a Native Plant from Caatinga Biome. vol. 2017, p. 1–7, 7 Sep. 2017. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2017/6834218/>.
- ALVES, D. R.; MORAIS, S. M. de; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; VASCONCELOS, F. R.; FREIRE, F. das C. O.; SILVA, I. N. G. da; CATANEO, A. H. D.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; PINTO, G. A. S.; CONCHON-COSTA, I.; NORONHA, A. de A. A.; PAVANELLI, W. R. Leishmanicidal and fungicidal activity of lipases obtained from endophytic fungi extracts. **PLOS ONE**, vol. 13, no. 6, p. e0196796, 18 Jun. 2018. DOI 10.1371/journal.pone.0196796. Available at: <http://europepmc.org/abstract/med/29912872>.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; JR., V. A.; FEATHERSTONE, R. M. A NEW AND RAPID COLORIMETRIC OF ACETYLCHOLINESTERASE DETERMINATION. **Biochemical Pharmacology**, vol. 7, p. 88–95, 1961. .

GRAJEDA-IGLESIAS, C.; SALAS, E.; BAROUH, N.; BARÉA, B.; PANYA, A.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C. Antioxidant activity of protocatechuates evaluated by DPPH, ORAC, and CAT methods. **Food Chemistry**, vol. 194, p. 749–757, 2016. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.07.119. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.119>.

JAKUBCZYK, D.; DUSSART, F. Selected Fungal Natural Products with Antimicrobial Properties. **Molecules**, vol. 25, no. 4, p. 911, 18 Feb. 2020. DOI 10.3390/molecules25040911. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/4/911>.

LAZAREVIC-PASTI, T.; LESKOVAC, A.; MOMIC, T.; PETROVIC, S.; VASIC, V. Modulators of Acetylcholinesterase Activity: From Alzheimer's Disease to Anti-Cancer Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 24, no. 30, p. 3283–3309, 2017. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170705123509>.

MARTINS, G. V.; ALVES, D. R.; MARCELO VIERA-ARAÚJO, F. M.; RONDON, F.; BRAZ-FILHO, R.; MORAIS, S. M.; VIERA-ARAÚJO, F. M.; RONDON, F.; BRAZ-FILHO, R.; MORAIS, S. M. Chemical Study and Evaluation of Antioxidant, Anti-acetylcholinesterase and Antileishmanial Activities of Extracts from *Jatropha gossypifolia* L. (Pião Roxo). **Revista Virtual de Química**, vol. 10, no. 1, p. 21–36, 2018. DOI 10.21577/1984-6835.20180004. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-85044168844&partnerID=MN8TOARS>.

MORAIS, S.; SILVA, K.; ARAUJO, H.; VIEIRA, I.; ALVES, D.; FONTENELLE, R.; SILVA, A. Anacardic Acid Constituents from Cashew Nut Shell Liquid: NMR Characterization and the Effect of Unsaturation on Its Biological Activities. **Pharmaceuticals**, vol. 10, no. 4, p. 31, 16 Mar. 2017. DOI 10.3390/ph10010031. Available at: <http://www.mdpi.com/1424-8247/10/1/31>.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, vol. 65, no. 1–2, p. 55–63, Dec. 1983. DOI 10.1016/0022-1759(83)90303-4. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>.

PENIDO, A. B.; M, D. M. S.; RIBEIRO, A. B.; ALVES, D. R.; RODRIGUES, A. L.; H, D. S. L.; E, de M. J. Medicinal Plants from Northeastern Brazil against Alzheimer's Disease. 2017. DOI

<https://doi.org/10.1155/2017/1753673>. Available at: <http://europepmc.org/abstract/med/28316633>.

PEREIRA, E. J. P.; DOS REIS LIMA, J.; ALVES, D. R.; DE MENEZES, J. E. S. A.; DE MORAIS, S. M.; BANDEIRA, P. N.; FONTENELLE, R. O. S.; SANTOS, H. S.; DO VALE, J. P. C.; DA SILVA, P. T.; RODRIGUES, T. H. S.; COSTA, P. S. Circadian rhythm, and antimicrobial and anticholinesterase activities of essential oils from vitex gardneriana. **Natural Product Communications**, vol. 13, no. 5, p. 635–638, 2018. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300528>.

SILVA, N. L. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado , da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum , Caxias , Maranhão. vol. 6, p. 1–17, 2010. .

TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; SUZUKI, E.; TAGLIARI, L.; STRAUS, A. H. Current relevance of fungal and trypanosomatid glycolipids and sphingolipids: studies defining structures conspicuously absent in mammals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 81, no. 3, p. 477–88, Sep. 2009. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722017>.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; ALVES, D. R.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; DE MORAIS, S. M.; ASSOLINI, J. P.; DA SILVA BORTOLETI, B. T.; GONÇALVES, M. D.; CATANEO, A. H. D.; KIAN, D.; MADEIRA, T. B.; YAMAUCHI, L. M.; NIXDORF, S. L.; COSTA, I. N.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W. R. Caryocar coriaceum extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 98, no. September 2017, p. 662–672, Feb. 2018. DOI 10.1016/j.biopha.2017.12.083. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332217349764>.

VERMA, S. K.; LAL, M.; DAS, M. D. STRUCTURAL ELUCIDATION OF BIOACTIVE SECONDARY METABOLITES FROM ENDOPHYTIC FUNGUS. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, vol. 10, no. 7, p. 395, 1 Jul. 2017. DOI 10.22159/ajpcr.2017.v10i7.18909. Available at: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/18909>.