

EFEITO DOS EXTRATOS OBTIDOS DO FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO DE *Mikania* sp. SOBRE LINHAGEM CELULAR DE MELANOMA B16F10

NATHALIA STARK PEDRA¹; KENNIA C. A. GALDINO²; CARLUS A. T. DO COUTO²; VINICIUS DE C. GUIGUER²; CAMILA F. P. NUNES²; ELIZANDRA BRAGANHOL³

^{1,2,3} Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, BR

¹nathaliastark@hotmail.com

³elizbraganhol@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 terapêuticas capazes de inibir o desenvolvimento do melanoma e, com isso, evitar a formação de metástases, aumentando a sobrevida dos pacientes.

O gênero *Mikania* compreende 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. Na medicina tradicional existem diversas atribuições às plantas deste gênero. Espécies deste gênero são utilizadas pela população devido as suas propriedades analgésicas (SILVA, 2011) broncodilatadoras, expectorante, anti-inflamatória e antialérgica (CZELUSNIAK *et al*, 2012; SANTANA *et al*, 2013), tendo algumas, atividade antinociceptiva comprovadas (SILVA, 2011). GREGÓRIO (2008) demonstrou que extratos de *M. parodii* e *M. pilosa*, possuem atividade citotóxica para as linhagens celulares de carcinoma de colón (HCT-8), carcinoma de mama (MDA-MB435) e glioblastoma multiforme humano (SF925).

Micro-organismos associados às plantas podem oferecer materiais com efeitos terapêuticos mais do que a própria planta (STROBEL & LONG, 1998), gerando novos compostos farmacologicamente ativos (PINTO, 2003). Plantas medicinais apresentando ação antimicrobiana poderiam ser hospedeiras de endófitos, que por sua vez poderiam apresentar tais propriedades. Isso sugere que o princípio ativo antimicrobiano pode ser produzido pelo micro-organismo e não propriamente pelo vegetal, ou então seus efeitos terapêuticos somente são constatados devido à associação existente entre a planta e o seu hospedeiro (STROBEL, 2003; PILEGGI, 2006). 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 x10³ células por poço. As células foram tratadas por 48 h com extratos de MeOH e AcoET nas concentrações de 50, 100, 300 e 500 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. 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-Diphenyltetrazolium 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. O rendimento da extração de compostos do metabolismo secundário presentes em 100 mL de meio extraídos com acetato de etila, foi de 0,0157g; o rendimento obtido para a extração com uso de MeOH dos compostos presentes no micélio (3,39g), foi de 1,35g. Com relação aos dados do cultivo celular, foi observado que o extrato de AcoET reduziu de forma significativa a viabilidade celular em 48 h de tratamento em todas as concentrações avaliadas quando comparados com o controle (Tabela 1). Entretanto, não foram observados resultados satisfatórios quando foi utilizado o extrato de MeOH obtido a partir do micélio do fungo.

Tabela 1: Análise do efeito dos extratos de fungo endofítico isolado de guaco sobre a viabilidade celular de cultura de linhagem de melanoma B16F10.

	Controle	50 µg/mL	100 µg/mL	300 µg/mL	500 µg/mL
Extrato de AcoEt	0,25 ±0,015	0,23 ± 0,022**	0,14 ±0,005*\$	0,11 ±0,006*&	0,078 ± 0,007*@
Abs %	100	92	56	44	31,2
Extrato de MeOH	0,25 ±0,015	0,27 ± 0,039	0,26 ±0,006	0,25 ±0,008	0,025 ± 0,017
Abs %	100	108	104	100	100

Os dados foram expressos como médias±desvio padrão de 4 experimentos independentes, analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Duncan. *diferença significativa quando comparado ao controle; #, \$, &, @diferença significativa entre os tratamentos. Extrato do meio com AcoEt P < 0,01; Extrato do micélio com MeOH, P = 0,42.

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 dose dependente quando testado na linhagem de melanoma B16F10. Nenhum resultado satisfatório foi obtido para o extrato metanólico do micélio do fungo. 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

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguaríuna: EMBRAPA-CNPMA, 1998, v. 1, p. 117-137.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F. FREITAS, G. B. L. **Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulz Bip. ex Baker**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 400-409, 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/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.

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. 2006. 141f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná.

PINTO, L. D. **Atividade antimicrobiana e caracterização molecular de microrganismos endofíticos isolados de folhas de *Lonchocarpus guillemianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco)**. 2003. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

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.

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 Mediciniais**, Campinas, v.15, n.4, p.742-750, 2013.

SILVA, A. S. B. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Mikania lindleyana* DC.: validação do uso na medicina popular**. 2011. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará.

STROBEL, G. A.; D. M. LONG. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American society of microbiology news**, v. 64, p. 263-268, 1998.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, vol., p. 5 535–544, 2003.