

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CITOTOXIDADE DA MACROALGA DA ANTÁRTICA *HIMANTOTHALLUS GRANDIFOLIUS*

ROSIANE MASTELARI MARTINS¹; FERNANDA NEDEL²; FLAVIO DEMARCO³,
CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA⁴; RAFAEL GUERRA LUND⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – rosimastelari@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – fernanda.nedel@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – ffdemarco@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - claudiochemistry@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – rafael.lund@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A prevalência de *Candida* como comensal na cavidade oral de indivíduos saudáveis varia entre 20 a 75%; no entanto, apesar de ser um microrganismo sapróbio, *Candida* spp. pode assumir uma forma patogênica frente a determinadas condições locais e/ou fatores predisponentes como: idade, imunossupressão, xerostomia, uso de próteses dentárias, uso de aparelhos ortodônticos, má higienização oral, tabagismo, diabetes mellitus, deficiências nutricionais, uso de antibióticos, entre outros (NAGLIK et al., 2004; MISHA et al., 2007). O principal patógeno implicado no desenvolvimento de candidíase oral é a espécie *Candida albicans*, entretanto, espécies de *Candida* não-*albicans* também podem ser detectadas (MISHA et al., 2007).

Apesar do grande número de fármacos antifúngicos disponíveis, estes ainda possuem certas limitações devido aos seus efeitos colaterais e toxicidade; além disso, o uso indiscriminado desses medicamentos tem resultado no surgimento de patógenos resistentes. Neste contexto, existe a necessidade permanente de investigação de novos fármacos antifúngicos e com baixa toxicidade permanece bastante relevante no contexto científico mundial.

Enquanto o ambiente terrestre foi o foco da indústria farmacêutica por muitos anos, o ambiente marinho, que representa aproximadamente metade da biodiversidade global, encontra-se praticamente inexplorado; mostrando-se um alvo promissor para a descoberta de novos compostos com potenciais terapêuticos. As algas são consideradas uma grande fonte de metabólitos estruturalmente e biologicamente ativos. Até o presente momento, há muitas publicações demonstrando uma variedade de atividades farmacológicas em substâncias isoladas de algas pardas (ROSALINE et al., 2012; SATHYA et al., 2013; GÓMEZ-ORDÓÑEZ et al., 2014). Além disso, considerando a sua grande diversidade taxonômica, as investigações relacionadas com a busca de novos compostos biologicamente ativos a partir de algas pode ser visto como um campo quase ilimitado.

A região Antártica é caracterizada por grandes agregações de macroalgas. O ambiente natural das algas antárticas é caracterizado por condições abióticas extremas, com uma forte sazonalidade de luz e temperaturas baixas constantes (ZACHER et al., 2009). Para sobreviver nas condições ambientais extremas, as algas da Antártica têm desenvolvido estratégias de adaptação que resultam na produção de uma enorme diversidade de compostos que, como demonstrado em inúmeros estudos envolvendo diferentes espécies de algas, podem ser biologicamente ativos e possuir potencial farmacológico e terapêutico. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o potencial antifúngico e a citotoxicidade de extratos da macroalga *Himantothallus grandifolius* originária da Antártica.

2. METODOLOGIA

Espécie de Macroalga e Preparação dos Extratos

A espécie estudada foi a macroalga *H. grandifolius*, coletada em janeiro de 2012, na região da Bahia do Almirantado na Ilha do Rei George, Antártica. A amostra foi liofilizada e submetida a extrações sucessivas em extrator soxhlet com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol. Após 6h de extração, os solventes foram evaporados em evaporador rotativo a vácuo e, por fim, em fluxo de nitrogênio, originando os extratos brutos.

Avaliação da Atividade Antifúngica

A atividade antifúngica de dez concentrações (1 a 500µg/ml) dos extratos foi avaliada sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 62342 e isolados clínicos orais de espécies de *C. albicans* (3) e *C. não-albicans*: *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lipolytica* e *C. famata*, isoladas da cavidade bucal de pacientes com Candidíase Atrófica Crônica (CAC) atendidos no Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca da Universidade Federal de Pelotas e armazenadas na Micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia UFPel.

Os ensaios de susceptibilidade foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando o documento de referência M27-A3 (CLSI, 2008). Controles de viabilidade microbiana e esterilidade do meio e dos extratos foram incluídos. Fluconazol foi utilizado como fármaco de referência. Todos os ensaios foram realizados em triplicada.

O efeito antifúngico foi caracterizado por valores de IC₅₀, a concentração que proporciona 50% de inibição do crescimento dos microrganismos em relação ao controle de crescimento; e valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), a menor concentração que inibe totalmente o crescimento dos fungos. Os valores de IC₅₀ foram determinados por regressão não linear. Após a determinação da CIM, a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada pela subcultura em placas de ágar. A CFM foi definida como a menor concentração de cada composto que resultou na ausência de crescimento celular na superfície das placas.

Avaliação da Citotoxicidade

A citotoxicidade dos extratos foi avaliada frente à linhagem celular de fibroblastos de camundongos (NIH/3T3) proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro, através do ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio). As células foram cultivadas em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com suplemento de 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em garrafas de cultivo celular em estufa a 5% de CO₂ a 37°C.

Para o teste foram utilizadas microplacas de 96 poços. Em cada poço foram adicionadas 2 x 10⁴ células suspensas em 100 µL de DMEM e a placa incubada em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, por 24 horas. Posteriormente, as células foram incubadas com 100 µL de diferentes concentrações (62,25 a 500 µg/mL) dos extratos por 24 e 48 horas. Após este período, os produtos foram removidos e, em seguida, 180 µL de DMEM e 20 µL de MTT foram adicionados em cada poço e a placa incubada por mais 3 horas. Passado o período, o meio foi descartado e os cristais de formazan ressuspensos em 200 µl de DMSO. Subsequentemente, os resultados foram lidos em leitor de microplaca (MR-96A, Mindray Shenzhen, China) a um comprimento de onda de 492 nm. Os valores de

absorbância foram considerados como indicadores da viabilidade celular e a porcentagem de inibição do crescimento das células determinada através da fórmula: % de inibição = $(1 - \text{Abs}_{492 \text{ células tratadas}} / \text{Abs}_{492 \text{ células controles}}) \times 100$. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos em tempos diferentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etil acetanólico (AE) de *H. grandifolius* demonstrou a melhor atividade entre todos os extratos testados. Esse extrato exibiu notável atividade antifúngica/fungicida contra todas as cepas testadas, incluindo as cepas resistentes ao fluconazol (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade antifúngica *in vitro* do extrato etil acetanólico da macroalga *Himantothallus grandifolius* e do fármaco Fluconazol.

Espécie Extrato	Ensaio ($\mu\text{g/mL}$)	Microrganismos							
		C.a	C.a1	C.a2	C.a3	C.p	C.g	C.l	C.f
<i>Himantothallus grandifolius</i>	IC ₅₀	49,6	46,7	17,4	4,9	19,7	30	13,6	25,8
	CIM	500	250	62,5	31,3	250	125	62,5	125
	CFM	500	250	62,5	31,3	250	125	62,5	125
Fluconazol	IC ₅₀	5,3	21,2	<1	<1	<1	14,6	<1	<1
	CIM	>500	>500	1,9	31,3	3,9	125	3,9	3,9
	CFM	>500	>500	62,5	31,3	7,8	250	7,8	3,9

Ca: *Candida albicans* ATCC62342, Ca1: *Candida albicans* isolado clínico 1, Ca2: *Candida albicans* isolado clínico 2, Ca3: *Candida* isolado clínico 3, Cp: *Candida parapsilosis* isolado clínico, Cg: *Candida glabrata* isolado clínico, Cl: *Candida lipolytica* isolado clínico, Cf: *Candida famata* isolado clínico.

De acordo com Sufian et al. (2013), extratos de plantas com valores de CIM abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$ são considerados notáveis, e compostos isolados com CIMs $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ são considerados ativos. Portanto, com base neste critério, AE foi claramente o extrato mais ativo, demonstrando valores iguais ou melhores do que o fluconazol, o fármaco de referência. Além disso, enquanto os valores CIM / CFM $> 69 \mu\text{g/mL}$ são considerados tóxicos para o fluconazol (CLSI 2008), a avaliação citotóxica demonstrou uma baixa citotoxicidade do AE de *H. grandifolius* sobre as células de fibroblastos de camundongos em concentrações de até 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1), demonstrando uma possível seletividade desse extrato contra células fúngicas, com baixos danos sobre células normais. Após 48h de exposição, o AE da macroalga em estudo foi capaz de estimular o crescimento das células, podendo ser útil em estudos de cicatrização, por exemplo. Além disso, a maioria dos extratos testados demonstraram baixa citotoxicidade sobre as células NIH/3T3, abrindo possibilidade de se investigar outras importantes atividades biológicas desses extratos.

A caracterização química dos extratos e a identificação do(s) composto(s) bioativo(s) são necessárias para se compreender a atividade de cada componente individual e a contribuição de cada um na atividade do extrato como um todo. Estudos de identificação das moléculas serão efetuados mediante a separação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e emprego de padrões cromatográficos. As estruturas serão confirmadas posteriormente por Espectrometria de Massas.

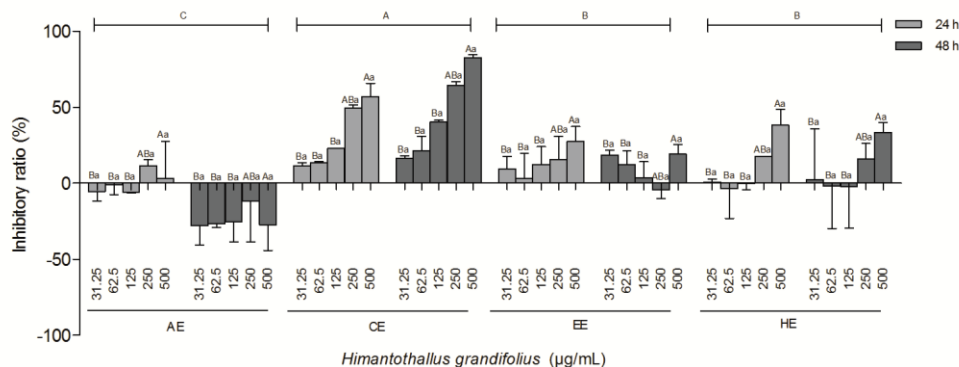


Figura 1- Efeito de diferentes tipos e concentrações de extratos da macroalga *H. grandifolius* na inibição da linhagem celular NIH/3T3 após 24 e 48h de exposição aos extratos. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. (—) indica diferença significativa entre os tipos de extratos. p-value < 0,05 foi considerado significativo (teste de Tukey). HE: Extrato hexânico; CE: Extrato clorofórmico; AE: Extrato etil acetanólico; EE: Extrato etanólico.

4. CONCLUSÃO

Os dados obtidos demonstram o potencial antifúngico e a baixa citotoxicidade da macroalga da Antártica *H. grandifolius*, indicando que a alga em estudo pode ser promissora para o isolamento de substâncias com importante potencial biológico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MISHRA, N.N.; PRASAD, T.; SHARMA, N.; PAYASI, A.; PRASAD, R.; GUPTA, D.K.; SINGH, R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, Budapeste, v. 54, n.3, p. 201–235, 2007.
- NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, Malden, v. 6, n.10, p. 915–926, 2004.
- GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Bioactivity of sulfated polysaccharides from the edible red seaweed *Mastocarpus stellatus*. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, Filadélfia, no Prelo.
- ROSALINE, X.D.; SAKTHIVELKUMAR, S.; RAJENDRAN, K.; JANARTHANAN, S. Screening of selected marine algae from the coastal Tamil Nadu, South India for antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Filadélfia, v. 2, n.1, p. S140-S146, 2012.
- SATHYA, R.; KANAGA, N.; SANKAR, P.; JEEVA, S. Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh. **Arabian Journal of Chemistry**, Filadélfia, no Prelo.
- ZACHER, K., RAUTENBERGER, R., HANELT, D., WULFF, A., WIENCKE, C. The abiotic environment of polar marine benthic algae. **Botanica Marina**, Berlim, v. 52, n. 6, p. 9-22, 2009.