ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA E CITOTÓXICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ESTIRPES DE *STREPTOMYCES SPP*. ENDOFÍTICAS DA PLANTA MEDICINAL *Baccharis crispa.*

Francielle dos Santos (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Jesiane Stefania da Silva Batista (co-orientadora), Iriane Eger (orientadora)
e-mail: francielle.santos96@yahoo.com.br; iriane.eger@gmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Geral.

Área: Parasitologia, Subárea: Protozoologia.

Palavras-chave: Atividade leishmanicida, Atividade tripanocida, *Streptomyces.*

Resumo

Actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces*, tem grande importância na busca de novos compostos bioativos. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de extratos de actinobactérias provenientes da planta *Baccharis crispa* e a avaliação do seu efeito antiparasitário e citotóxico. A obtenção dos extratos ocorreu por extração de seus metabólitos secundários das actinobactérias. As amostras foram utilizadas em testes de citotoxidade contra células Vero E6 e atividade antiparasitária contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e promastigotas de *Leishmania chagasi*. Nenhum extrato apresentou citotoxidade frente as células Vero E6, e também não apresentaram inibição em relação a *T. cruzi*. Já os extratos Bc126 e Bc379 inibiram, respectivamente, 48% e 69% da proliferação de *L. chagasi* e foram considerados promissores na caracterização de novos compostos com atividade antiparasitária.

Introdução

Actinobactérias são bactérias Gram positivas, filamentosas, que sintetizam uma grande diversidade de metabólitos secundários com atividade anti-parasitária, antibacteriana, dentre outras (LIMA et al., 2006). O primeiro antibiótico desse gênero foi isolado de *Streptomyces griseus,* que possui atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, que causa a tuberculose (WAKSMAN; LECHEVALIER, 1949).

A doença de Chagas possui duas fases distintas, a fase aguda que pode ser assintomática ou apresentar quadro febril inespecífico, e a fase crônica, que pode apresentar-se como assintomática (também chamada de indeterminada), cardíaca, digestiva ou mista (também chamada de cardiodigestiva) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A leishmaniose visceral, causada pela *Leishmania infantum chagasi* apresenta comprometimento do fígado, baço e medula óssea, sendo que essa, tem como um dos principais reservatórios os canídeos (SOUZA et al., 2010).

Com isso o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade tripanocida, leishmanicida e citototóxica frente a extratos de metabólitos secundários de actinobactérias.

Materiais e Métodos

Obtenção de metabólitos secundários das actinobactérias

As quatro estirpes foram inoculadas em 20mL de meio ISP-2 líquido e mantidas sobre agitação de 120 rpm por 5 dias a 28ºC para obtenção do pré inóculo. Para o inóculo, utilizou se os pré inóculos + 200 mL de meio ISP-2, que foram mantidos sobre agitação de 120 rpm por 10 dias a 28°C; após, o caldo de fermentação foi filtrado em papel filtro e em membrana de 0,22 µm, e utilizando éter etílico na proporção 1:1. O filtrado foi reduzido em rotaevaporador a 40°C e depois liofilizado. Em seguida, foi determinado o peso seco das amostras e essas foram ressuspensas

em 1 mL de água ultra pura. Antes dos ensaios biológicos, os extratos foram pré diluídos em PBS estéril para uma concentração de 10 mg/mL.

Ensaios de citotoxicidade contra células Vero

Células Vero E6 foram semeadas em placa de 96 poços, em meio DMEM + 10% SBF por 24 horas em estufa de CO_2 a 37°C. Após, as células foram expostas aos extratos nas concentrações de 1; 0,5; 0,25; e 0,125mg/mL em triplicata. Como controle foi utilizado PBS. Após 48 horas a 37°C em estufa de CO_2, as células foram coradas pelo May-Grunwald/Giemsa e a integridade celular avaliada em microscópio óptico invertido e registro fotográfico pelo programa AxioVision.

Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida

Formas epimastigotas ($5x10^6$ parasitas/mL) de *T. cruzi* e promastigotas ($3x10^6$ parasitas/mL) de *L. chagasi* foram distribuídas em placa de 96 poços, em meio LIT ou Schneider, respectivamente. Em seguida, os parasitas foram expostos aos extratos em concentrações variando de 1mg/mL a 0,10 mg/mL, em triplicata. Como controle negativo foi utilizado PBS. Após 48 horas de incubação a 27°C a atividade antiparasitária foi avaliada pela observação em microscópio invertido, seguido da técnica colorimétrica do MTT.

Análise dos dados

A atividade parasitária foi expressa como média ± desvio padrão do percentual de mortalidade. A média da densidade ótica (DO) dos controles negativos foram considerados como 100% de viabilidade em comparação com os parasitas tratados, segundo as fórmulas:

% sobrevivência = DO tratados x 100 ÷ DO controle negativo

% inibição = 100 - % sobrevivência

Resultados e Discussão

Obtenção de metabólitos secundários das actinobactérias

A Tabela 1 resume as principais características morfológicas das colônias e outras informações relevantes.

Tabela 1- Características dos cultivos das estirpes Bc379, Bc353, Bc184 e Bc126 e produção dos caldos de fermentação.

	Estirpe			
	Bc379	Bc353	Bc184	Bc126
Tempo de crescimento[1]	5 a 7 dias	2 a 3 dias	5 a 7 dias	2 a 3 dias
Morfologia[1]	Colônias arredondadas, com aspecto enrugado	Colônias arredondadas, com aspecto enrugado	Colônias arredondadas, cinzas e com aspecto enrugado	Colônias cinzas com aspecto enrugado
Coloração do meio após crescimento[1]	Marrom claro	Marrom escuro	Marrom claro	Marrom claro, amarelado
Volume do caldo de fermentação[2]	180mL	180mL	190mL	120mL
Volume final do caldo + solvente	450mL	459mL	500mL	256mL

[1]Caracteristicas avaliadas mediante crescimento em meio sólido ISP-2.
[2]Volume do caldo de fermentação após etapas de filtração em papel filtro e membrana filtrante.

O cultivo de cada estirpe resultou em diferentes volumes do caldo de fermentação, devido às características do micélio formado por cada estirpe. Além

disso, a capacidade de síntese e secreção de compostos pigmentados foi observado após crescimento em meio sólido e meio líquido. Foi constatado que a estirpe Bc353 foi a que gerou mais metabólitos, cerca de 0,277g, a estirpe Bc379 gerou 0,128g, a Bc184 gerou 0,048g e a estirpe Bc126 produziu 0,085g.

Quando Lima (2013) realizou a extração dos metabólitos secundários de uma actinobactéria do gênero *Streptomyces*, foi obtido um total de 440 mL do líquido metabólico que concentrado passou a 0,32g. Comparando com os resultados obtidos neste trabalho, o valor em gramas dos metabólitos concentrados se comparam ao trabalho de Lima. Reichert (2017) caracterizou a variabilidade genética das estirpes Bc126, Bc184, Bc353, e Bc379, descrevendo uma maior correlação entre as estirpes Bc126 e Bc379. Esse autor conseguiu classificar todas as estirpes como pertencentes ao gênero *Streptomyces*, porém de espécies diferentes.

Ensaios de citotoxicidade contra células Vero E6

Os extratos avaliados não causaram danos às células, mesmo na maior concentração utilizada. A figura 1A e B mostra a integridade das células Vero E6 incubadas com os extratos onde a morfologia, densidade e aderência são semelhantes ao controle negativo (Figura 1C). Devido à ausência de citotoxidade, o teste colorimétrico do MTT não foi realizado.

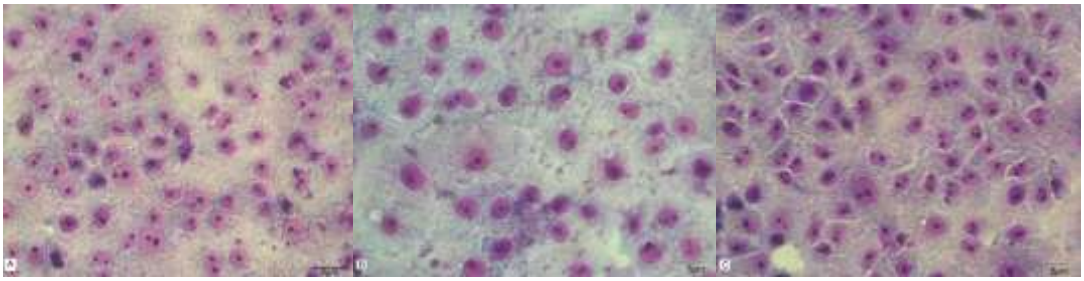


Figura 1- Integridade de células da linhagem Vero após 48 h de incubação com (A) 0,5 mg/mL do extrato Bc353; (B) 1mg/mL do extrato Bc379 ou (C) controle sem extrato. Barra = 5µm.

Melo (2013) em seu estudo sobre actinobactérias endofíticas, constatou que dois de seus extratos de actinobactéria do gênero *Streptomyces* ocasionaram 80% de citotoxidade a linhagens celulares de carcinoma. Em nosso estudo, utilizando células epiteliais não tumorais (Vero) não foi observado nenhum efeito citotóxico.

Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida

As formas epimastigotas de *T. cruzi* (Y) foram resistentes aos quatro extratos avaliados. Os extratos Bc126 e Bc379 foram ativos contra *L. chagasi* reduzindo, respectivamente, 48% e 69% a proliferação dos parasitos. A Figura 2 mostra a curva concentração-resposta dos dois extratos, sendo que o extrato Bc126 manteve atividade inibitória até 0,1 mg/mL.

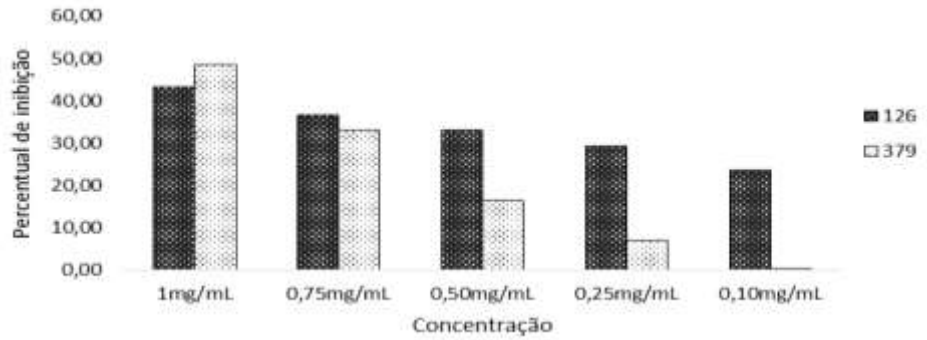


Figura 2- Curva concentração-resposta dos extratos Bc126 e Bc379 frente a formas promastigotas de *L. chagasi*. Os resultados representam a média do experimento, em triplicata.

A atividade leishmanicida observada sugere que pode haver relação com os dados genéticos de correlação dessas duas estirpes, obtidos por Reichert (2017). De acordo com Castilho et al. (2006), *Streptomyces* NRRL 30562, isolado da planta *Kennedia nigriscans*, produz substâncias que são eficazes contra o parasita *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária.

Os extratos das estirpes Bc 126 e Bc 379 que tem correlação genética, apresentaram atividade contra *L. chagasi*, sem causar citotoxidade contra as células Vero E6. Esses resultados estimulam a continuidade de estudos nesse sentido.

Conclusões

-Cada actinobactéria apresentou morfologia de micélio e pigmentação em meio líquido, que influenciou na produção e eficácia dos extratos;

-Os quatro extratos estudados não apresentaram atividade tripanocida nem citotoxicidade contra células Vero;

-Os extratos Bc126 e Bc379 (que possuem correlação genética) causaram taxas de 48 e 69%, de inibição, respectivamente, em formas promastigotas de *L. chagasi*;

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq e a Fundação Araucária pela concessão desta bolsa, ao C-LABMU pela disponibilização do uso do liofilizador. A Cleyson M. M. Delvoss e Henrique B. de Assis pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos, e a todos aqueles que ajudaram de alguma maneira para o desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

CASTILLO, U. F. et al. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from Streptomyces NRRL 3052. **FEMS Microbiol Lett**, v. 255, p. 296–300, 2006.

LIMA, D.V. et al. **Produção de antibióticos e avaliação da citotoxidade de actinomicetos isolados de solo frente a *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (mrsa).** In: III CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG, 2006, Goiás.

LIMA, S. M. de A. **Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria actms-9h isolada da rizosfera de *Paullinia cupana* kunth.** 2013. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) –Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MELO, J. C. DA S. **Caracterização química e avaliação de atividade biológica dos metabólitos de actinobactéria endofítica isolada de *Momordica charantia* L.** 2013. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) -Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Doença de chagas. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, n. 10, p. 1–18, 2014.

REICHERT, P. R. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos por actinobactérias endofíticas isoladas da planta medicinal *Baccharis crispa* Spreng.** 2017. 23f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) -Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

SOUZA, N. P. et al. Leishmania (Leishmania) infantum chagasi em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 333–335, 2010.

WAKSMAN, S. A.; LECHEVALIER, H. A. Neomycin, a New Antibiotic Active against Streptomycin-Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms. **Science**, v. 109, n. 2830, p. 305–307, 1949.