

## ANÁLISE POR CLAE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ACETILCOLINESTERASE DOS EXTRATOS DE CO-CULTIVO DE *Fusarium nygamai* COM *Candida albicans*.

Geane P. Oliveira<sup>1\*</sup>, Debora L. C. Barreto<sup>2</sup>, Jacqueline A. Takahashi<sup>3</sup>.

1. Estudante de pós-graduação em química da UFMG
2. Estudante de IC do Centro Universitário Una
3. UFMG - Departamento de Química / Orientador

### Resumo:

Neste trabalho foi realizado o estudo do metabolismo da espécie fúngica *Fusarium nygamai* visando à produção de metabólitos secundários bioativos. Para induzir a produção de metabólitos diferenciados, o fungo foi cultivado na presença da levedura *C. albicans* em meios de cultura sólidos diferentes, durante 30 dias, aliando-se a técnica de co-cultura à abordagem OSMAC (*One Strain, Many Compounds*). Os extratos obtidos nas diferentes condições foram avaliados quanto ao seu perfil cromatográfico por CLAE, bem como quanto à sua atividade biológica, mostrando um perfil metabólico diferenciado em relação às condições de cultivo utilizadas.

**Autorização legal:** CNPq nº 010661/2012-3.

**Palavras-chave:** *Fusarium nygamai*; indução metabólica; Alzheimer.

**Apoio financeiro:** Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES); Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq).

### Introdução:

A diversidade biológica oferece à ciência um amplo campo de pesquisa na busca de novos fármacos. Muitos produtos naturais têm sido utilizados com sucesso como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, visando o tratamento de diversas doenças.<sup>1</sup>

Com as inovações da biologia molecular, foi possível detectar nos fungos a existência de genes responsáveis por rotas biossintéticas que não são usualmente transcritos e permanecem em silêncio quando fungos são cultivados sem estímulos específicos.<sup>2,3</sup> Em virtude disso, estratégias tem sido desenvolvidas para ativar genes silenciados, visando despertar rotas biossintéticas capazes de produzir novas substâncias bioativas para uso farmacológico. Dentre estas, destaca-se a diversificação de

componentes nutricionais no meio de cultura,<sup>4</sup> uma abordagem denominada OSMAC (*One Strain, Many Compounds*), que consiste em realizar pequenas variações no meio de cultura onde fungos são cultivados, visando alterações no perfil metabólico dos mesmos.<sup>5</sup> O co-cultivo (cultivo do fungo na presença de outro micro-organismo) é outra metodologia que tem se destacado na busca por novos metabólitos bioativos, uma vez que muitos compostos expressados a partir dessa interação possuem estruturas com atividades biológicas promissoras.<sup>6,7</sup> Aliando-se estas abordagens tem se obtido muita inovação nesta área. O potencial dos fungos na produção de compostos bioativos, a diversidade de compostos que estas espécies podem oferecer e as possibilidades de transformações a partir dos seus metabólitos, geram grande interesse da ciência na pesquisa destes micro-organismos como fontes de novos fármacos.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo submeter a espécie fúngica *F. nygamai* a cultivo em condições capazes de induzir a expressão de genes silenciados, utilizando a técnica de co-cultivo.

### Metodologia:

**Preparo dos extratos:** Para a realização dos experimentos foram preparados dois meios de cultura com a seguinte composição: **meio 1:** Ágar bacteriológico (39 g/L), extrato de carne (10 g/L) e glicerina (10 g/L); **Meio 2:** Ágar bacteriológico (39 g/L) e extrato de carne (10 g/L). Os meios foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120 °C. Em seguida, foi preparada uma suspensão contendo a levedura *C. albicans*, padronizada na turbidez 0,5 da escala McFarland (transmitância entre 75 e 76 % a 530 nm). Após resfriamento dos meios de cultura até a temperatura de 40-45 °C, em capela de fluxo laminar, adicionou-se 1 mL da suspensão do micro-organismo e agitou-se manualmente. Em seguida, verteu-se o meio em placa de Petri esterilizada para solidificação. Após uma hora, foram adicionados dois cubos de ágar

contendo fungo crescido previamente em meio BDA, um em cada extremidade da placa. As placas foram seladas, observando-se o crescimento por 30 dias à temperatura ambiente. Ao término desse período, o meio de cultura de cada placa, contendo os microorganismos crescidos em co-cultura, foi recortado e submetido à extração com metanol durante 72 horas. Após esse tempo, foi feita filtração a vácuo, para separação do meio e do micélio da fase orgânica e, em seguida, o solvente foi rotaevaporado, obtendo-se os extratos metanólicos do fungo.

Os extratos foram submetidos à análise por CLAE utilizando água ultra pura acidificada (0,1 % ácido fórmico) e acetonitrila como fase móvel, gradiente linear, volume de injeção de 20 µL, fluxo de 0,6 mL/min e coluna analítica C18 250 x 3,0 mm, 5 µm.

**Ensaio biológico:** Os extratos foram submetidos ao ensaio de atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE), enzima alvo de fármacos anti-Alzheimer, utilizando a metodologia descrita por Ellman e colaboradores.<sup>8</sup> Este teste foi realizado em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 50 µL de tampão Tris-HCl (pH 8,0), 125 µL de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) – DTNB (3 mM), 25 µL dos extratos fúngicos (10 mg/mL em DMSO) e 25 µL de iodeto de acetilcolina – ATCI (15 mM). DMSO foi utilizado como controle negativo e eserina (10 mg/mL em DMSO) como inibidor padrão. A absorbância foi medida a 405 nm utilizando leitor de microplacas, com intervalos de 1 minuto por oito vezes. Após essas leituras foram adicionados nos poços 25 µL de solução da enzima acetilcolinesterase (0,22 U/mL em tampão). As absorbâncias foram medidas novamente com intervalos de 1 minuto por dez vezes a 405 nm. Calculou-se a porcentagem de inibição através da comparação das absorbâncias das amostras com as absorbâncias do branco. Os ensaios foram realizados em quintuplicata e o percentual de inibição da AChE foi calculado utilizando o programa Microsoft® Excel.

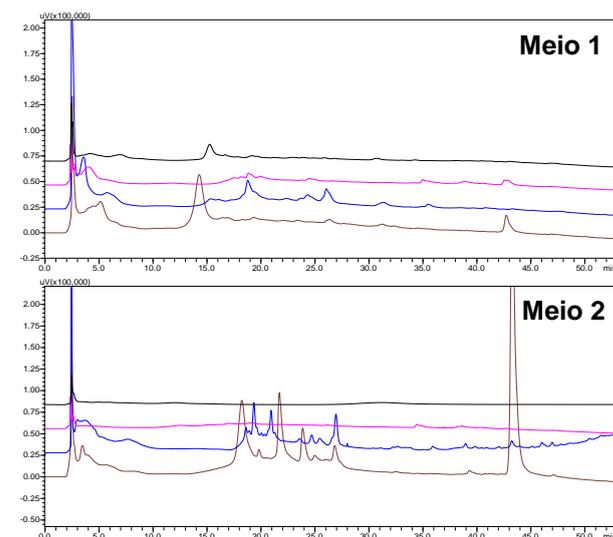
### Resultados e Discussão:

A análise dos extratos por CLAE (Figura 1) mostrou variação no perfil metabólico da espécie ao ser submetida a co-cultivo. Como pode ser observado, o co-cultivo de *F. nygamai* com a levedura *C. albicans*, em diferentes meios de cultura, levou à produção de compostos que não foram observados quando o fungo e a levedura foram cultivados isolados.

Na presença de um ambiente competitivo, em condições de estresse

causado pela presença da levedura no meio de cultura, os genes silenciosos de fungos passam a ser expressos em resposta à competição interespecífica, levando assim, à produção de compostos que até então não eram produzidos, visando uma forma de defesa e/ou adaptação ao meio.

**Figura 1.** Cromatogramas (270 nm) dos extratos do meio de cultura 1 e 2 (preto); *F. nygamai* (rosa); *C. albicans* (azul) e do co-cultivo (marrom).



Quanto à atividade inibitória da acetilcolinesterase (Tabela 1), o extrato do co-cultivo de *F. nygamai* com *C. albicans* no meio 1 mostrou uma porcentagem de inibição da acetilcolinesterase de  $52,6380 \pm 0,6544$  %, enquanto que quando o fungo foi cultivado no meio 2 esse percentual aumentou para  $58,6589 \pm 0,6765$  %.

Os resultados mostraram que a variação dos componentes no meio de cultura, promoveu modificação no perfil metabólico fúngico.

**Tabela 1.** Porcentagem de inibição da acetilcolinesterase.

Extrato	% de inibição de AChE
<i>F. nygamai</i> / <i>C. albicans</i> , meio 1	52,6380 ± 0,6544
<i>F. nygamai</i> / <i>C. albicans</i> , meio 2	58,6589 ± 0,6765
Eserina	99,8304 ± 0,0548

### Conclusões:

A espécie fúngica *F. nygamai* responde ao estresse causado pelo co-cultivo

com *C. albicans*, modificando a produção de metabólitos secundários ativos na inibição da acetilcolinesterase, sendo esta abordagem eficiente e promissora para a produção de substâncias para o tratamento do Mal de Alzheimer.

### Referências bibliográficas

- 1 - Clardy, J.; Walsh, C. *Nature*. **2004**, *432*, 829.
- 2 - Cichewicz, R.H. *J. Nat. Prod.* **2010**, *27*, 11.
- 3 - Bode, H. B.; Bethe, B.; Höfs, R.; Zeeck, A. *Chem. Bio. Chem.* **2002**, *3*, 619.
- 4 - Takahashi, J. A.; Teles, A. P. C.; Bracarense, A. A. P.; Gomes, D. C. *Phytochem Rev.* **2013**, *12*, 773.
- 5 - Bills, G. F.; Platas G.; Fillola, A.; Jimenez, M. R.; Collado, J.; Vicente, F.; Martin, J.; Gonzalez, A.; Bur-Zimmermann, J.; Tormo, J.R.; Pelaez, F. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104*, 1644.
- 6 - Wang, J.P.; Lin, W.; Wray, V.; Lai, D. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2492.
- 7- Teles, A. P.; Ataliba, G. S.; Takahashi, J. A. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *17*, 1598.
- 8 - Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andress Jr., V.; Featherstone, R. M. A. *Biochemical Pharmacology*, **1961**, *7*, 88-90.