

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANA, MUTAGÊNICA E GENOTÓXICA DE UMA MOLÉCULA ISOLADA DE *Laelia marginata* (Orchidaceae).

Vinicius Alexandre (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Larissa Miwa Kikuchi Ochikubo (graduanda), Jakeline Luiz Corrêa (doutoranda), Professor Armando Mateus Pomini (coorientador), Professora Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi (orientadora)

Universidade Estadual de Maringá/ Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/ Maringá-PR

Área: 21200009 - Microbiologia

Subárea: 21201030 - Micologia

Palavras chave: fungos, antimicrobiano, produto natural

Resumo:

A procura por novos compostos que tenham ação antimicrobiana para combater agentes infecciosos são de extrema relevância, visto a necessidade de gerar menores impactos econômicos e sociais. Assim, a partir da orquídea *Laelia marginata* obteve-se o ácido crispóico, molécula na qual apresenta ações antiproliferativas em algumas linhagens celulares carcinogênicas. O objetivo do presente projeto foi avaliar as propriedades antimicrobianas e citotóxicas da molécula obtida da orquídea *L. marginata* e verificar sua ação biológica. Primeiramente, a molécula foi isolada e caracterizada para em seguida realizar a avaliação em células tumorais e não tumorais. Na sequência, realizou-se o teste de susceptibilidade *in vitro* utilizando cepas padrão de *Candida* spp. a fim de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração microbicida mínima (CMM). Foi possível observar que o ácido crispóico não teve ação citotóxica, antitumoral e também não houve atividade antifúngica sobre as espécies de *Candida* spp. nas concentrações testadas, podendo concluir que esta substância, apesar de não possuir ação para as células e leveduras estudadas, é uma molécula nova, sendo necessárias mais investigações para avaliar qual o seu potencial de ação, uma vez que o ácido crispóico é produzido em grande quantidade pela orquídea *Laelia marginata*.

Introdução

O uso inadequado de fármacos para o combate de microrganismos é um problema alarmante visto que, os mesmos estão ficando cada vez mais resistentes aos antimicrobianos. Fatores como mutações genéticas ou alterações ambientais contribuem para gerar a multirresistência dos microrganismos e o próprio medicamento utilizado no tratamento é o agente seletivo, contribuindo para selecionar os mais resistentes em relação a ação do composto (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Buscam-se novos produtos com ação antimicrobiana de amplo espectro uma vez que, os microrganismos possuem características muito particulares e isso dificulta os pesquisadores a descobrirem novos fármacos. Além disso, alguns medicamentos podem ser tóxicos ou causar efeitos colaterais. Dessa forma, substâncias naturais advindas de plantas tem grande potencial de serem agentes combatentes de microrganismos patogênicos, além de serem renováveis e diminuir os impactos econômicos e sociais (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Novos estudos conseguiram isolar um novo produto natural da orquídea *Laelia marginata* (Orchidaceae), o ácido crispóico, juntamente com outros seis compostos já conhecidos. Esse composto, recém identificado, apresenta um potencial anti-proliferativa contra algumas linhagens celulares de câncer humano modificadas por HPV e demonstrou ser eficiente para o tratamento de *Trypanosoma cruzi*. Como alguns compostos presente nesta orquídea do estudo apresentaram ações contra outros parasitas como *Leishmania amazonensis* e Zika vírus (BELLOTO *et al.*, 2017), e, por essas razões acredita-se que o ácido crispóico pode apresentar ações antimicrobianas. Sendo assim, o objetivo deste projeto foi avaliar as propriedades desta substância em linhagens celulares e sua atividade antimicrobiana.

Materiais e métodos

Para este projeto foi utilizado o ácido crispóico, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Armando Mateus Pomini, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. Esta molécula foi isolada da orquídea neotropical, *Laelia marginata* (Orchidaceae) de acordo com os procedimentos descritos por BELLOTO *et al.*, 2017.

No presente estudo foram utilizadas linhagens celulares tumorais (HeLa) e não tumorais (VERO). Após a reativação das células, estas foram crescidas em placa de 96 poços e colocadas em contato por 24h em diferentes concentrações do ácido crispóico. Após, cada poço foi lavado com PBS e adicionado 100µl de MTS (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium) diluído (1:10 em meio DMEM sem Fenol). Após 3 horas, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 492 nm e realizado o cálculo de viabilidade celular. Os testes ocorreram em triplicata e em três ensaios independentes.

Para o teste de susceptibilidade *in vitro*, foram utilizadas cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida glabrata* (ATCC 2001). Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), seguiu-se o método de microdiluição em caldo, de acordo com CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, M27-S4) e KISCHKEL *et al.*, 2020. A CIM foi considerada a menor concentração a qual não houve nenhum crescimento evidente de microrganismos em leitura visual da microplaca, tendo como referências o controle positivo dos respectivos

microrganismos. A CMM foi considerada a menor concentração a qual não houve nenhum crescimento evidente de micro-organismos em meio de cultura.

Resultado e Discussão

Neste projeto foram avaliadas propriedades do ácido crispóico, produto isolado da orquídea *Laelia Marginata* em linhagens celulares tumorais e não tumorais e, também, atividade antifúngica em cepas padrão de *Candida* spp. Tendo em vista que com o passar do tempo os microrganismos têm ficado mais resistentes aos fármacos tradicionais é de suma importância a realização de estudos que busquem inovar os antimicrobianos. Além disso, deve-se destacar que a molécula em estudo é um produto de origem natural e renovável, sendo este um ponto requisitado no mercado por ter menor impacto econômico e social.

Para realização das atividades do projeto, foi preparada a solução de estoque, diluindo o ácido crispóico em carboximetilcelulose. Na literatura, encontramos que a maioria dos trabalhos utiliza como diluente o dimetilsulfóxido (DMSO) como em (MORAIS *et al.*, 2020), no entanto, a substância não se dissolveu completamente neste meio, por isso, a utilização do carboximetilcelulose.

A avaliação de citotoxicidade é importante para estudar o potencial de um material produzir efeitos tóxicos *in vitro* (DE LIMA FILHO *et al.*, 2020). Foram avaliadas as linhagens celulares tumorais (HeLa) e não tumorais (VERO) e notou-se que as células se mantiveram íntegras, sendo assim, o ácido crispóico não teve uma ação citotóxica e nem antitumoral.

A atividade antimicrobiana do ácido crispóico foi avaliada sobre as espécies do gênero *Candida* spp., as quais são responsáveis por desencadear desde infecções superficiais à sistêmicas de difícil tratamento e muitas vezes resistentes aos fármacos usuais. Quando investigado a CIM e CMM não houve ação antifúngica para as concentrações testadas em diluições a partir de 2,0 mg/ml até 0,390 µg/ml. Uma alternativa para tal resultado, no entanto, seria a adição de outro composto para que assim, exista um efeito sinérgico entre eles como no estudo feito por BARROSO *et al.*, 2021.

Percebemos que o ácido crispóico não apresentou ação para as linhagens celulares tumorais e não tumorais testadas e nem para as espécies de *Candida* spp.. Podemos afirmar que pode existir potencial biológico para o ácido crispóico, mas que ainda necessita da realização de outros estudos mais específicos para descobrir a atividade desse novo produto.

Conclusão

Podemos concluir que o ácido crispóico, composto isolado da *Laelia marginata* (Orchidaceae) não apresenta propriedades antimicrobianas para as leveduras e nem ação contra as linhagens celulares testadas.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq-FA-UEM, ao laboratório de micologia médica, à orientadora prof. Melyssa Negri, ao coorientador prof. Amando Pomini, à doutoranda Jakeline Corrêa e à graduanda Larissa Ochikubo.

Referências

BARROSO, F. D. D. Avaliação in vitro da atividade antifúngica da Dobutamina contra cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol e determinação de sua possível atividade espécie-específica contra cepas de *Candida glabrata*, 2021. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2021.

BELLOTO, A. C. *et al.* Crispoic acid, a new compound from *Laelia marginata* (Orchidaceae), and biological evaluations against parasites, human cancer cell lines and Zika virus. **Natural product research**, v. 32, n. 24, p. 2916-2921, 2018.

DE LIMA FILHO, O. C. *et al.* Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *eremanthus erythropappus* sobre células de câncer mamário MCF-7. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 4699-4727, 2020.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

MORAIS, M. G. *et al.* AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS FRUTOS VERDES E MADUROS DE *Solanum lycocarpum* FRENTE À *Candida albicans* e *Candida krusei*. **Biodiversidade**, v. 19, n. 3, p. 180-187, 2020.