

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE LIPÍDIOS OBTIDOS A PARTIR DE *Ganoderma stipitatum*

Luma Hikaru Namiki¹ (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Regina Aparecida Correia Gonçalves¹, José Eduardo Gonçalves², José Rivaldo dos Santos Filho¹ (Co-orientador), Arildo José Braz de Oliveira¹ (Orientador), email: ajboliveira@uem.b.

¹Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

²Programa de Mestrado em Tecnologias Limpas e Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. Centro Universitário de Maringá.

Farmácia - Farmacognosia

Palavras-chave: *Ganoderma stipitatum*, lipídios, *Leishmania amazonensis*

Resumo:

Ganoderma cf. stipitatum pertence ao gênero *Ganoderma*, conhecido pelas propriedades medicinais de suas espécies desde os tempos antigos. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade biológica dos lipídios obtidos a partir de corpos de frutificação de *G. stipitatum*. Os extratos foram obtidos por maceração e caracterizados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Para a avaliação da atividade biológica, foi realizada a determinação da atividade *anti-Leishmania amazonensis*. Os extratos demonstraram uma boa atividade principalmente contra as formas amastigotas da *L. amazonensis*. O extrato obtido por maceração com clorofórmio foi o que apresentou melhores resultados de IC₅₀, CC₅₀ e IS, sendo também a fração que apresentou a maior porcentagem relativa de ácido linoléico.

Introdução

G. stipitatum pertence ao gênero *Ganoderma*, conhecido pelas propriedades medicinais de suas espécies desde os tempos antigos, sendo utilizadas para diversos tipos de doenças (SANODIYA et al., 2009). O gênero apresenta distribuição cosmopolita, e pode ser encontrado em países como Brasil, Peru, Bolívia, Venezuela e Índia (BHOSLE et al., 2010). O presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade biológica dos lipídios obtidos a partir de corpos de frutificação de *G. stipitatum*.

Materiais e Métodos

Obtenção e caracterização dos lipídios de G. stipitatum para avaliação da atividade biológica.

Os corpos de frutificação de *G. stipitatum* foram coletados no município de Umuarama-PR. O material liofilizado (5 g) de *G. stipitatum* foi submetido a extração por maceração por 24h com 100 mL de isopropanol frio, seguido de re-extração por maceração com solução de clorofórmio-metanol (2:1, v/v). A seguir foi realizada uma segunda extração, mantendo a primeira etapa, na mesma proporção utilizando diclorometano-metanol (2:1, v/v). Ambas as frações foram reunidas e os solventes evaporados em rotaevaporador (MACHADO et al., 2006).

Os extratos brutos foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos por transesterificação (JACOMINI et al., 2015). Por fim, realizou-se a determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).

Determinação da atividade antiproliferativa dos extratos em formas promastigotas e amastigotas de Leishmania amazonenses e avaliação da citotoxicidade

Formas promastigotas (1×10^6 parasitos mL^{-1}) com cultivo de 72 h foram adicionadas em placa de 96 poços estéril, na presença e ausência dos extratos, diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) a 1%, em seguida incubadas por 72 h a 25 °C. Os tratamentos foram realizados nas concentrações finais de 1,5625 - 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e então realizado o ensaio de viabilidade celular através da redução do XTT (MESHULAM, 1995). Miltefosina foi utilizada como padrão. A luminescência foi quantificada em luminômetro SpectraMax L (Molecular Devices) com $\lambda_{\text{nm}} = 570$ nm e tempo de integração de 1 s. A porcentagem de inibição foi calculada com base na luminescência do controle (não tratado), e as concentrações de CI_{50} foram calculadas por regressão não linear.

A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos J774A.1, utilizando o ensaio redução do MTT (MOSSMANN, 1983). Para isso, células J774A.1 (5×10^5 células mL^{-1}) em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB foram cultivadas em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C e 5% de CO_2 por 24 h. Em seguida, os extratos foram adicionados em concentrações crescentes de 7,8125 - 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a placa incubada durante 48 h. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS (pH 7,2) e incubadas na presença de MTT (2 mg mL^{-1}) por 4 h. O sobrenadante foi removido, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorbância realizada a 570 nm em um espectrofotômetro de placas (Power Wave XS - BioTek). Os valores de CC_{50} (concentração citotóxica em 50%) foram determinados por análise de regressão não linear

Resultados e Discussão

Os resultados da atividade antileishmania dos extratos de *G. stipitatum* podem ser visualizados a seguir na tabela 1:

Tabela 1: Atividade antiproliferativa dos extratos de *G. stipitatum* frente ao protozoário *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade em macrófagos J774A.1.

Extratos	Promastigotas IC ₅₀ (µg/mL)	Amastigotas IC ₅₀ (µg/mL)	J774A.1 CC ₅₀ (µg/mL)	IS _p	IS _a
MC	176,73 ± 3,16	40,81 ± 4,93	117,52±13,69	0,66	2,88
MD	187,85 ± 7,64	49,78 ± 3,55	129,40±14,15	0,69	2,60
Miltefosina	9.63 ± 0,22	0.78 ± 0,04	26.06 ± 4.43	2,71	33,41

MC = Extrato obtido por maceração com clorofórmio. MD = Extrato obtido por maceração com diclorometano. Cada valor representa a média ± desvio padrão para três experimentos realizados em duplicata. IC₅₀: concentração inibitória para 50% das células; CC₅₀: concentração citotóxica para 50% das células IS: índice de seletividade (CC₅₀ macrófagos/IC₅₀ promastigotas^p/amastigotas^a)

A partir dos resultados, foi possível observar que tanto o extrato obtido por maceração com clorofórmio (MC), quanto o extrato obtido por maceração com diclorometano (MD) foram capazes de inibir o crescimento de promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Em relação aos valores obtidos, contra a forma promastigota obteve-se valores de IC₅₀ de 176,73 e 187,85 µg/mL respectivamente para MC e MD. Contra a forma amastigota os valores de IC₅₀ foram 40,81 e 49,78 µg/mL para MC e MD, respectivamente. Ou seja, os extratos apresentaram maior atividade contra a forma amastigota quando comparada à promastigota, sendo o extrato MC o que apresentou maior inibição frente às duas formas do parasito *L. amazonensis*.

Em relação a citotoxicidade, os resultados obtidos para os extratos MC e MD foram de 117,52 e 129,06 µg/mL, respectivamente, demonstrando que os extratos apresentam uma citotoxicidade menor do que a miltefosina.

Foi calculado o índice de seletividade (IS), que é a razão entre CC₅₀ e IC₅₀. Segundo Moreira et al. (2019), índices de seletividade superiores a 1 indicam maior seletividade contra parasitos, e valores abaixo de 1 demonstram uma seletividade maior para atividade citotóxica. No presente estudo, para a forma promastigota, o extrato MC apresentou IS de 0,66 e o MD 0,69. Esses valores indicam uma seletividade maior para a atividade contra as células do hospedeiro. Já para a forma amastigota, obteve-se IS de 2,88 e 2,60 para os extratos MC e MD, respectivamente. Ou seja, esses valores demonstram uma maior seletividade contra o parasita, sobretudo contra a forma amastigota.

A atividade contra a leishmania apresentada pelos extratos pode ter relação com a presença do ácido linoleico (AL) em sua composição. A análise por CG-EM, demonstrou que o AL é o ácido graxo predominante nos extratos MC e MD, com 49,09% e 47,93%, respectivamente. Estudos recentes demonstraram o importante papel desse ácido graxo na modulação da resposta imune, no controle da carga parasitária em macrófagos infectados por *Leishmania donovani* e também na inibição da liberação de formas promastigotas derivadas de microvesículas presentes no parasito.

No presente estudo, os extratos demonstraram uma boa atividade principalmente contra as formas amastigotas da *L. amazonensis*. O extrato MC foi o que

apresentou melhores resultados de IC₅₀, CC₅₀ e IS, bem como foi o extrato que apresentou maior porcentagem relativa de AL.

Apesar dos estudos anteriores demonstrarem a atividade contra a leishmania do AL diminuindo a carga parasitária de macrófagos infectados com *L. donovani* (SAINI, et al. 2020; SAINI e RAI, 2020), não foi observada uma atividade direta do AL contra as formas promastigotas. Entretanto, no presente estudo, as amostras se demonstraram mais ativas contra a forma amastigota, além disso, foi utilizada para avaliar atividade antiproliferativa dos extratos, a espécie *L. amazonensis*, e também, os ácidos graxos não foram testados na sua forma livre, diferentemente dos estudos anteriores. Portanto, este trabalho fornece uma base significativa para futuras investigações sobre a ação dessas frações lipídicas no tratamento da leishmaniose.

Conclusões

Os resultados obtidos permitiram concluir que a determinação da atividade biológica dos lipídios obtidos a partir do corpo de frutificação de *G. stipitatum* foi realizada com êxito, possibilitando avaliar a atividade antileishmania dos extratos.

Agradecimentos

Ao CNPq, Capes e Fundação Araucária pelo apoio financeiro. Ao meu orientador, Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira, e ao meu co-orientador, Me. José Rivaldo dos Santos Filho, pelo suporte e auxílio para o desenvolvimento deste projeto. A Prof. Dr. Regina Aparecida Correia Gonçalves e todo grupo LABIPROS, ao Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos e por fim, ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Referências

- BHOSLE, S. et al. Taxonomy and diversity of Ganoderma from the Western parts of Maharashtra (India). *Mycosphere*, v. 1, n. 3, p. 249-262, 2010.
- JACOMINI, D. et al. Lipid profile and antiproliferative activity of callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. *Industrial Crops and Products* v. 69, p. 408-414, 2015.
- MACHADO, F.A.P.S.A. et al. Fatty Acids Production from Plants and Callus Cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *Journal of plants sciences*, v. 1, n.4, p. 368-373, 2006
- MESHULAN, T. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT). *Journal Infectious Disease*, v. 172, p. 1153-1156, 1995.
- MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, p. 65, 55-63, 1983.
- SANODIYA, B. S. et al. Ganoderma lucidum: a potent pharmacological macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 10, n. 8, 2009.
- SAINI, S.; RAI, A. K. Linoleic acid inhibits the release of *Leishmania donovani* derived microvesicles and decreases its survival in macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 406, 2020.

31º Encontro Anual de Iniciação Científica
11º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



10 e 11 de novembro de
2022

SAINI, S.et al. Preventive as well as therapeutic significances of linoleic acid in the containment of *Leishmania donovani* infection. *Biochimie*, v. 175, p. 13-22, 2020.