AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE UMA MOLÉCULA DE *QUORUM SENSING* RELACIONADA À BIOFILME DE ESPÉCIES DO GÊNERO *FUSARIUM*

Joana Gomes Vieira (PIBIC/FA), Vinicius Alexandre, Emilli Karine Marcomini, Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi (Orientador). E-mail: ra124094@uem.br .

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área de Ciências da Saúde e subárea de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Palavras-chave: *Fusarium* spp., *quorum sensing, Tenebrio molitor*

RESUMO

Fusarium spp. são fungos patógenos oportunistas aos seres humanos, que possuem a capacidade de formar biofilmes como mecanismo de virulência e patogenicidade. Dentro de um biofilme, a comunicação é realizada através da sinalização por moléculas de *Quorum Sensing* (QS). Contudo, estudos sobre o sistema de sinalização em biofilmes de fungos são muito recentes e escassos. Assim, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* de uma molécula de QS relacionada ao biofilme de espécies de *Fusarium*. Foi realizado uma revisão de literatura sobre metabólitos secundários e moléculas de QS de biofilmes do gênero *Fusarium*. Além disso, foi avaliado os efeitos da molécula de QS em ensaios *in vitro* e *in vivo,* como Concentração Inibitória Mínima, Concentração Fungicida Mínima e Dose Letal 50 para modelo alternativo de *Tenebrio molitor*. Assim, foi encontrado na literatura que existem muitos metabólitos secundários de *Fusarium* spp, que devem ser mais estudados a fim de avaliar seus efeitos biológicos. Além disso os ensaios experimentais demonstraram que a molécula foi capaz de inibir o crescimento de *F. oxysporum* e *F. solani*, e observou uma possível ação fungicida, além de que não foi capaz de matar larvas da espécie *Tenebrio molitor* na concentração utilizada.

INTRODUÇÃO

Os fungos são capazes de formar biofilmes sobre diferentes superfícies bióticas e abióticas, contribuindo para sua virulência e patogenicidade. Os biofilmes são comunidades de microrganismos, aderidos à um substrato, integrado em uma matriz extracelular, produzida pela própria comunidade, constituída de biomoléculas, como polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, que favorecem as interações entre os microrganismos. A formação de um biofilme permite muitas vantagens aos microrganismos, pois fornece adesão, proteção resistência, nutrição e uma alta comunicação celular. Assim, dentro de um biofilme, a comunicação celular é de importante contribuição para a sobrevivência da comunidade, por regular fatores físicos, químicos e biológicos. Essa troca de informações é dada por vários mecanismos, mas principalmente pela sinalização por moléculas de Quorum Sensing (QS), que são pequenas moléculas sinalizadoras produzidas pelos

membros de um biofilme, respondendo a fatores intrínsecos e extrínsecos do biofilme e na sincronização da expressão gênica, além de promover fatores de virulência e patogenicidade. Dessa forma, o estudo dessas moléculas de interação microbiana auxilia o entendimento da patogênese de microrganismos formados em biofilmes e o desenvolvimento de um possível entendimento para a pesquisa de novos fármacos (Solano, *et al*. 2014, p. 96).

MATERIAIS E MÉTODOS

Revisão de literatura

Foi realizado o levantamento de estudos sobre moléculas de QS relacionadas ao biofilme e metabólitos secundários de espécie de *Fusarium* spp. nas bases de dados National Library of Medicine (PubMed) e Google Scholar. Foram consultados artigos experimentais e revisões entre os anos de 2008 e 2023, e selecionados aqueles com maior grau de relevância, a fim de obter resultados visando uma maior compreensão e fundamentação para os estudos *in vitro* e *in vivo* sobre moléculas de QS.

Ensaios in vitro

Após a seleção e a obtenção comercial da molécula de QS relacionada à biofilme de *Fusarium* spp., foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) frente aos isolados *F. solani* (CRPM) e *F. oxysporum* (CRPM 2925) da Coleção Microbiológicas Paranaense Tax-online (CMRP) conforme descrito por Kischkel *et al*. 2020. Nas concentrações sub-inibitórias (½ CIM; ½ CFM; ½ CBM).

Ensaios in vivo

Foram utilizadas larvas de *Tenebrio molitor*. Preparou-se a diluição seriada da molécula de QS (concentração do CFM de ambos os fungos, 1/2, 1/4, 1/6, 1/16, 1/32), utilizou-se um total de 5 larvas por grupo com aproximadamente 100-200 mg. Foram utilizados dois grupos: 1) tratado com salina como controle negativo; 2) tratado com a molécula de QS a partir da concentração do CFM e as respectivas diluições; para cada grupo injetou-se 5 µL da solução, na hemolinfa da larva, no segundo ou terceiro anel visível da porção ventral. As larvas foram colocadas em placas de Petri estéreis contendo dieta de criação e mantidas na escuridão a 25 °C. A mortalidade foi monitorada uma vez por dia por 5 dias. Para estabelecer a morte das larvas, verificou-se visualmente a melanização e a resposta aos estímulos físicos tocando-os suavemente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Revisão de literatura

O objetivo principal dessa revisão bibliográfica foi analisar na literatura alguns metabólitos secundários de *Fusarium* spp., a fim de estabelecer uma relação com a molécula de QS estudada neste presente trabalho. Tem-se então que moléculas,

como metabólitos secundários são liberados por fungos, nos quais são moléculas que embora não possuem uma função no metabolismo fúngico central, ainda, assim possuem diversos papéis biológicos importantes para sobrevivência destes, especialmente em comunidade com outros microrganismos (Rodrigues, *et al*. 2020, p. 1).

Com isso, os fungos, como *Fusarium,* vêm sendo estudados por sua diversidade fonte de novos metabólitos secundários, com ativos biológicos com relevância farmacológica. Assim, neste trabalho, metabólitos secundários de *Fusarium* spp. foram pesquisados e analisados quanto às suas atividades biológicas frente a outros microrganismos, a fim de comparar com a molécula de QS estudada nessa pesquisa. Assim, espécies de *Fusarium* demonstraram produzir uma gama dessas moléculas, estruturalmente diversas, de potencial relevância farmacológica, tais como: (1) Fusaripeptide A, a qual exibiu potente atividade antifúngica contra espécies de *Candida e Aspergillus fumigatus;* (2) Oxisporidinona*,* apresentou atividade fungistática contra *A. fumigatus*; (3) Enniatinas, observou-se amplo espectro de bioatividades, principalmente antimicrobiana; (4) Neofusapirona, demonstrou efeito inibitório potente para *Aspergillus clavatus*; (5) Fusaritioamida A e B, apresentou ação antifúngica e antibacteriana; (6) Diidronaftalenonas que apresentou efeito anti-micobacteriano moderado (Li, *et al.* 2019).

Ensaios in vivo e in vitro

Nos ensaios *in vitro* foram determinados a CIM e a CFM. Desse modo a molécula de QS testada demonstrou inibir o crescimento de *F. solani* e *F. oxysporum* na menor concentração titulada, de 0,126g/mol. Além disso, na CFM, a molécula demonstrou-se capaz de matar *F. solani* na concentração 0,254g/mol e *F. oxysporum* na concentração 1,01g/mol, ou seja, uma e duas concentrações acima da CIM, demonstrando uma possível atividade fungicida. Já nos ensaios *in vivo* utilizando larvas de *Tenebrio molitor*, não houve morte considerável das larvas, atestando que o produto não foi tóxico a partir da concentração da CFM e até cinco titulações realizadas.

Desse modo, sabe-se que as moléculas de QS são de suma importância para a sobrevivência da comunidade dentro de um biofilme. Além disso estas moléculas são metabólitos secundários com a principal função de comunicação célula-célula, assim esta pesquisa baseou-se da procura, na literatura, por metabolitos secundários de *Fusarium* e suas possíveis ações biológicas. Encontrou-se, então, que muitas moléculas evidenciaram-se como potenciais agentes antimicrobianos. Além disso, estudos como de Semighini e colaboradores, 2008 demonstraram que a molécula de QS de *C. albicans,* o Farnesol apresentou uma bioatividade além da comunicação, pois foi possível inibir o crescimento e desenvolvimento de *Fusarium graminearum* ao induzir apoptose. Igualmente aos metabólitos secundários encontrados e ao Farnesol, a presente pesquisa utilizou uma molécula de QS frente a espécies de *Fusarium*, na qual também demostrou inibir o crescimento e desenvolvimento desses fungos. Desse modo, pode-se dizer que os metabólitos

secundários e moléculas de QS de fungos, devem ser mais estudadas para fins terapêuticos, como potenciais antifúngicos, pois de acordo com esta pesquisa e outros estudos, estas demonstraram uma função além da sinalização, mas sim de inibição do crescimento fúngico.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir, através desta pesquisa que fungos do gênero *Fusarium* produzem uma gama de metabólitos secundários, nos quais muitos deles demonstraram potenciais antifúngicos, assim como a molécula de QS estudada, que apresentou inibição do crescimento de *F. solani* e *F. oxysporum*, bem como foi um possível agente fungicida para estes fungos. Além disso, foi demonstrado que a molécula não apresentou toxicidade para as larvas de *Tenebrio molitor* nas concentrações utilizada. Dessa forma, pode-se averiguar que a molécula estudada vai além de sua função de sinalização. Assim, deve-se expandir as pesquisas na área de QS fúngico, a fim de desvendar novas moléculas como potenciais antifúngicos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária pelo financiamento desta pesquisa, à Universidade Estadual de Maringá, por toda estrutura concedida e a minha orientadora, Prof(a). Dr.(a) Melyssa Fernanda Norman Negri, por todo apoio e disposição.

REFERÊNCIAS

KISCHKEL, B. *et al*. The ability of farnesol to prevent adhesion and disrupt *Fusarium keratoplasticum* biofilm**. Applied Microbiology and Biotechnology**, Maringá, v. 104, n. 1, p. 377-389, Jan 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00253-019-10233-2. Acesso em 10 ago. 2023.

LI, M., *et al***.** Fusarium: a treasure trove of bioactive secondary metabolites. **Natural Product Reports**, Hangzhou, v. 37, n. 12, p. 1568-1588, Dec. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1039/d0np00038h. Acesso em: 10 ago. 2023.

RODRIGUES, C. F.; ČERNÁKOVÁ, L. Farnesol and Tyrosol: Secondary Metabolites with a Crucial quorum-sensing Role in *Candida* Biofilm Development. **Genes (Basel)**, Porto, 11, n. 4, Apr 18 2020. Disponível em: https://doi.org./10.3390/genes11040444. Acesso em 10 ago. 2023.

SEMIGHIN, C. P.; MURRAY, N. & HARRIS, S. D. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. **Fems Microbiology Letters**, Lincoln, v. 279, n. 2, p. 259-264, Feb 2008. Disponível em https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01042.x. Acesso em 10 ago. 2023.

SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology,** Navarra, 18, p. 96-104, Apr 2014. Disponível em https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008. Acesso em 10 ago 2023.