

Substâncias ativas no metabolismo oxidativo de neutrófilos produzidas pelos fungos endofíticos *Camarops* sp. e *Phomopsis* sp.

Maria Luiza Zeraik^{1*} (PQ), Juliana R. Gubiani¹ (PG), Vanessa M. Chapla¹ (PG), Angela R. Araujo¹ (PQ), Luiz M. Fonseca² (PQ), Valdecir F. Ximenes³ (PQ), Vanderlan S. Bolzani¹ (PQ).
*marialuizaze@iq.unesp.br

¹NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, CP 355, 14800-900, Araraquara-SP, Brasil.

²Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, CP 502, 14801-902, Araraquara-SP, Brasil. ³Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, CP 473, 17033-360, Bauru-SP, Brasil.

Palavras Chave: Quimiluminescência, neutrófilos, fungos endofíticos.

Introdução

Os neutrófilos atuam na defesa do organismo contra microrganismos invasores através de fagocitose, degranulação e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).¹ As EROs são essenciais no combate aos microrganismos fagocitados, mas quando liberadas em excesso para o meio extracelular podem causar destruição de tecidos saudáveis, processo este diretamente envolvido na gênese e progressão de doenças inflamatórias crônicas, cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer.²

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos dos sesquiterpenos eremofilanos (Xylarenonas D, F, G, C), isolados da cultura do fungo endofítico *Camarops* sp., isolado da espécie hospedeira *Alibertia macrophylla*³ e o alternariol, citocalasina H e a citocalasina J isolados do fungo endofítico *Phomopsis* sp., associado a espécie vegetal *Senna spectabilis* sobre a inibição das EROs produzidas por neutrófilos ativadas por zimosan opsonizado. Para esta avaliação foram utilizados os ensaios de quimiluminescência dependente de lucigenina (QLLuc) e luminol (QLlum), além de testes de viabilidade celular.

Resultados e Discussão

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi avaliado por meio da produção de O₂⁻ detectado por QLuc, e da produção total de EROs medido por QLlum. Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços: 50,0 µL da suspensão de neutrófilos (10⁶ neutrófilos/poço) adicionados em 160,0 µL de PBS suplementado foram incubados com 5,0 µL das substâncias analisadas em diferentes concentrações por 15 minutos, a 37°C. Após a incubação, foram adicionados 10,0 µL da sonda lucigenina (10,0 µM) ou luminol (8,0 µM) e 25,0 µL de zimosan opsonizado (1,0 mg mL⁻¹), obtendo-se um volume final de 250 µL em cada poço. A resposta de QL dos neutrófilos foi monitorada por 30 minutos (Luminômetro, Biotek- Synergy 2), e

expressa como valores de IC₅₀ (concentração de droga capaz de inibir em 50% a produção QL) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de IC₅₀ das substâncias estudadas.

Substâncias	IC ₅₀ ± d.p. (QLuc-µM)	IC ₅₀ ± d.p. (QLum-µM)
Xylarenona C	1,44 ± 0,59	4,17 ± 0,81
Xylarenona D	4,14 ± 0,08	5,90 ± 0,70
Xylarenona F	4,04 ± 0,92	5,73 ± 0,42
Xylarenona G	1,50 ± 0,23	6,13 ± 0,41
Alternariol	1,90 ± 0,44	2,06 ± 0,55
Citocalasina H	1,19 ± 0,16	0,91 ± 0,26
Citocalasina J	1,77 ± 0,36	1,67 ± 0,20
Apocinina	4,22 ± 0,62	3,90 ± 0,30
Quercetina	4,68 ± 0,39	4,86 ± 0,36

d.p.= desvio padrão (n=6).

As substâncias avaliadas inibiram a produção de EROs (liberadas por neutrófilos) de maneira dependente da concentração, sendo as citocalasinas as mais potentes.

Também avaliou-se a viabilidade celular destas substâncias em diferentes concentrações, por meio do método do Azul de Trypan.⁴ Os ensaios demonstraram que as substâncias não apresentaram ação tóxica para os neutrófilos em concentrações menores que 100 µM.

Conclusões

Conclui-se que as substâncias isoladas de diferentes culturas de fungos endofíticos inibiram as duas etapas da produção de EROs, ou seja, apresentaram alta inibição sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, principalmente as citocalasinas e o alternariol, apresentando maior atividade que os padrões apocinina e quercetina.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq.

¹ Mayer-Schol, A., et al. *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 62.

² Dallegrì, F.; Ottonello, L. *Inflammation Res.* **1997**, *46*, 382.

³ Oliveira, C. M., et al. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1353.

⁴ Rodrigues, A. P., et al. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 1755.