

Estudo da atividade hipoglicemiante e antibacteriana de polissacarídeos obtidos a partir da levedura *Candida zeylanoides*

Gláucia Lais Pereira Lima Neco¹; Sandra Aparecida de Assis²; Anny Carolinny Tigre Chaves³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: glaucialaisneco@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: sandrinhaassis@yahoo.com.br
3. Participante do projeto, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: annytigre@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Polissacarídeo; Leveduras; Semi-árido.

INTRODUÇÃO

O isolamento de micro-organismos de ambientes onde se conhece pouco da biodiversidade microbiana, como o semi-árido nordestino, tem incentivado, nas últimas décadas, um aumento nos estudos de bioprospecção microbiana. Desta forma, pesquisas envolvendo o potencial biotecnológico desses organismos vem proporcionando a descoberta de novos produtores de compostos bioativos de alto valor agregado (LIU *et al.*, 2012; SMRITHI *et al.*, 2013; MONCIARDINI *et al.*, 2014).

Atualmente, a pesquisa de compostos bioativos naturais com aplicação no tratamento e prevenção de doenças humanas tem vindo a ganhar cada vez mais importância (DONADIO *et al.*, 2010).

Os fungos são conhecidos por seu papel ambiental, por sua versatilidade na obtenção de metabólitos secundários e pela facilidade na reprodutibilidade de resultados, porém, apesar dos fungos serem reconhecidos como uma importante fonte de produtos bioativos naturais é estimada que, uma grande quantidade destes compostos, se encontre ainda por identificar (SANTOS, 2012; HIGGINBOTHAM, 2013).

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

O micro-organismo do estudo foi a levedura *Candida zeylanoides*, código CCMB 244 pertencente a coleção de cultura de micro-organismos da Bahia (CCMB, Feira de Santana, Brasil).

Produção e Extração de Polissacarídeos

O micro-organismo foi inoculado em placa de Petri contendo meio YM sólido (extrato de levedura 3,0 g/L; extrato de malte 3,0 g/L; peptona de carne 5,0 g/L; glicose 10,0 g/L e ágar 15,0 g/L) e cultivados em estufa de crescimento a 28°C. Após esse período de crescimento, alçadas do micro-organismo foram inoculadas em solução salina 0,45% até alcançar a absorbância de aproximadamente 1nm, 10 ml deste inóculo foram acrescentados em 100 ml de meio YM líquido (extrato de levedura 3,0 g.L⁻¹, extrato de malte 3 g.L⁻¹, peptona 5 g.L⁻¹, glicose 10 g.L⁻¹). A fermentação ocorreu em shaker rotatório sob condições de 28°C a 100 rpm, por cinco dias. Após o período fermentativo, o material foi centrifugado a 10.000rpm por 10 minutos para a extração da biomassa. O exopolissacarídeo (EXO) foi obtido partir do sobrenadante com etanol absoluto na proporção de 3:1 (etanol/sobrenadante), a 4°C por 24 horas.

Otimização da Amostra obtida

A metodologia avaliou o comportamento da biomassa e o exopolissacarídeo em relação ao tempo e temperatura em solução de NaOH a 1M, onde 0,300g do material seco a ser purificado (exopolissacarídeo e biomassa) e 3mL de solução de NaOH (proporção 1:10), foram incubados em banho-maria em temperaturas de 50°C, 70°C, 90°C no intervalo de tempo que variavam de 60 a 180 minutos.

Determinação da atividade hipoglicemiante *in vitro*

A metodologia da atividade inibitória da enzima α -amilase foi adaptada do método de Caraway. Assim, a solução enzimática foi homogeneizada com a amostra e solução tampão e colocada em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado o substrato que estava no banho-maria a 37°C por 2 minutos e, por fim, foi adicionado o reagente de cor e a água, sendo que esta solução foi colocada em banho-maria por 7 minutos e 30 segundos. Tal procedimento foi realizado com os controles negativo e positivo e padrão, diferenciando apenas na ausência da enzima no padrão. A leitura foi feita no espectrofotômetro em 660 nm.

Determinação da atividade antibacteriana

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos polissacarídeos fúngicos frente às bactérias *S. aureus* ATCC 29213, *K. pneumoniae* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 e *P. mirabilis* ATCC 17407 foram determinados pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2006). Após expansão das bactérias em caldo nutriente por 24 h a 37 °C, estas foram diluídas em caldo nutriente para 10^5 UFC/mL e incubadas com as amostras (10, 6, 3, 1 mg/mL) por 24 h a 37 °C. Após esse período, resazurina (0,01%) foi adicionada à suspensão e o CIM foi determinado como sendo a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano após 1 h, indicado pela coloração azul.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

A levedura CCMB 244 apresentou uma produção média de $11,971 \pm 0,5$ g/L de exopolissacarídeo, e $8,446 \pm 0,4$ g/L, de Biomassa. Após a etapa de produção foi otimizado os produtos e definidos as condições ideais e o ponto ótimo de produtividade. Os resultados gráficos do experimento foram avaliados através do Statistic, onde mostraram o comportamento da fração solúvel da biomassa e do exopolissacarídeo purificado em relação às variáveis do estudo.

O gráfico de superfície de resposta e curva de níveis mostrou em relação ao ponto ótimo do experimento para Biomassa solúvel, temperatura de 62,3°C no tempo de 153 minutos. Os modelos propostos foram validados pela análise de variância ANOVA, com regressão correspondente $F=60,49$ e em relação ao ajuste o F calculado=5,3, os dados referentes o coeficiente de correlação $R^2 = 0,99$ mostraram que 99% dos dados podem ser explicados pelo modelo proposto.

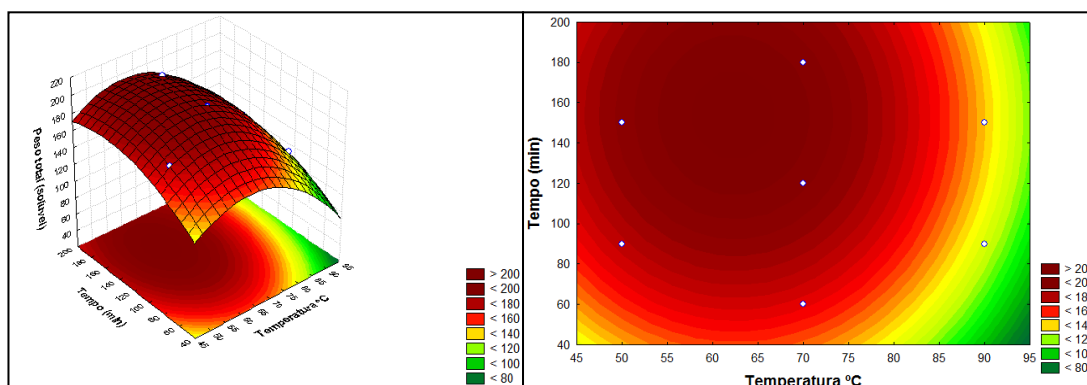


Figura 01: Gráfico superfície de resposta e curva de níveis - Influência do tempo e da temperatura na otimização da fração solúvel da Biomassa do micro-organismo CCMB 244

Para o EXO o ponto ótimo foi cálculo em 66°C em 121 minutos para a fração solúvel do EXO 244 de acordo como o programa Statistic. De acordo com a análise de variância ANOVA, o coeficiente de correlação $R^2 = 0,95$, ou seja, 95% dos dados podem ser explicados pelo modelo proposto. A regressão $F=13,67$ e o ajuste $F=10,28$.

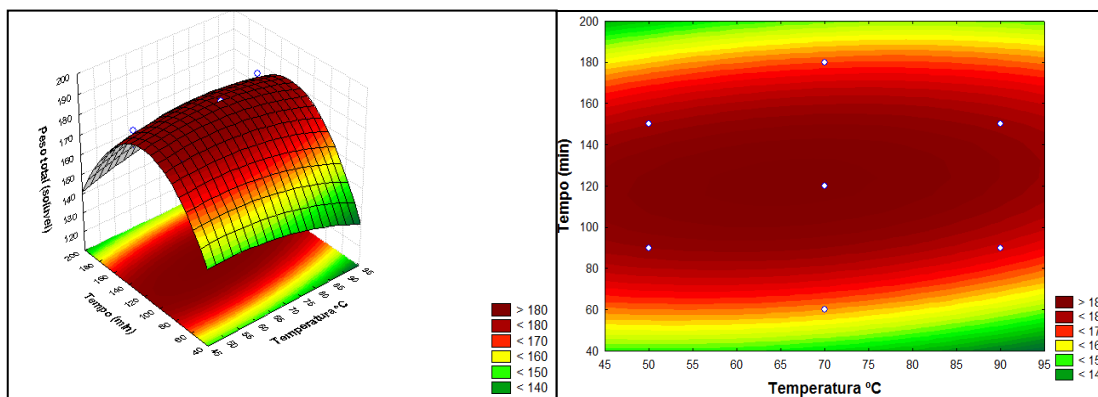


Figura 02: Gráfico superfície de resposta e curva de níveis - Influência do tempo e da temperatura na otimização da fração solúvel do exopolissacarídeo CCMB 244

Análise da atividade biológica justifica-se, pela prevalência da diabetes que tem vindo aumentando nos últimos tempos, ocupando um maior espaço no perfil de morbidade e mortalidade da população mundial (Sargis, 2014). E pelo uso da arcabose como hipoglicemiante oral conhecido, sendo este um pseudotetrassacarídeo.

A atividade frente à enzima α -amilase testada com o polissacarídeo CCMB 244 em solução de concentração 10 mg/mL, apresentou inibição de 67,3%. Devido a atividade inibitória enzimática apresentada, foi possível calcular o IC50, dentro das concentrações de 5, 3 e 1 mg/mL.

Tabela 09: Inibição da enzima amilase por polissacarídeo do micro-organismo CCMB 244

Amostra	Inibição enzimática (%)	IC50 (mg/mL)
CCMB 244	67,3%	3,615 ± 0,07*
Acarbose	-	0,019 ± 0,00

Além da atividade hipoglicemiante, o polissacarídeo da levedura *Candida zeylanoide*, teve seu potencial antibacteriano avaliado. No entanto, não apresentou qualquer atividade frente às bactérias testadas na concentração de até 10 mg/mL.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

O estudo com o micro-organismo CCMB 244, *Candida zeylanoides*, mostrou ser promissor, o método de produção, extração e otimização mostraram satisfatórios de acordo com as metodologias propostas. Os polímeros extraídos apresentaram características para serem explorados em atividade biológicas tanto em *in vitro* como *in vivo*. Ademais, esse estudo evidenciou a atividade inibitória enzimática frente à α -amilase sendo uma peça útil para o tratamento da diabetes.

REFERÊNCIAS

- CLSI. 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; **Approved Standard**—Ninth Edition. CLSI document M07-A7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- DONADIO, S. et al. 2010. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. **The Journal of antibiotics**, v.63, n.8, p.423-430.
- HIGGINBOTHAM, S. J. et al. 2013. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophytes taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. **PloS One**, v.8, n.9, p. 73192.
- LIU, X. et al. 2012. Systematics-guided bioprospecting for bioactive microbial natural products. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 1, p. 55-66.
- MONCIARDINI, P. et al. 2014. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 209-220.
- SANTOS, S. N. 2012. **Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Cobretum leprosum* do bioma Caatinga**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Tese.
- SMRITHI, S. et al. 2013. Bioprospecting of Microbes Producing Commercially Useful Products. **PHARMANEST - An International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 6, p. 1419-1426.