

ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE UM OLIGOPEPTÍDEO PRODUZIDO PELO FUNGO *NOMURAEA RILEYI* (FARLOW) SAMSON

Sideney Becker Onofre¹
Neiva Monteiro de Barros²
João Lúcio Azevedo³

ONOFRE, S.B.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Atividade mutagênica de um oligopeptídeo produzido pelo fungo *Nomuraea Rileyi* (Farlow) Samson. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama, 8(1), jan./abr.* p.7-10, 2004.

RESUMO: Um grande número de fungos são conhecidos como produtores de metabólitos secundários, ativos sobre diversos organismos vivos, provocando inibição de crescimento, doenças e posteriormente sua morte. Diversos estudos mostraram que o fungo *Nomuraea rileyi*, é um produtor de metabólitos ativos sobre insetos e microrganismos mostrando atividade inseticida sobre larvas de *Bombyx mori*. O propósito deste trabalho foi analisar a atividade mutagênica de um metabólito produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi*, sobre as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella thiphymurium*. A análise estatística dos resultados obtidos indicou claramente a ausência de mutagenicidade para o metabólito produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi*. O metabólito, não induz a mutações de substituições de pares de base e *frameshift* como demonstrado pelos testes de genotoxicidade.

PALAVRAS-CHAVE: fungos, mutagênico, carcinogênico, metabólitos

MUTAGENIC ACTIVITY OF AN OLIGOPEPTIDE PRODUCED BY THE FUNGUS *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON

ONOFRE, S.B.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Mutagenic activity of an oligopeptide produced by the fungus *Nomuraea Rileyi* (Farlow) Samson. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama, 8(1), jan./abr.* p.7-10, 2004.

ABSTRACT: A great number of fungi are known as producers of secondary metabolites active on several living organisms, causing growth inhibition, illnesses and eventually death. Many studies had shown that the fungus *Nomuraea rileyi* is a producer of active metabolites acting upon insects and microorganisms and showing insecticidal activity on larvae of *Bombyx mori*. The purpose of this work, was to analyze the mutagenic activity of a metabolite produced by the fungus *N. rileyi*, on the lineages TA98 and TA100 of *Salmonella thiphymurium*. The statistical analysis of the results clearly indicated the absence of mutagenicity for the metabolite produced by *N. rileyi*. The metabolite do not induce to base-pair replacement mutations and frameshift as demonstrated by the genotoxic tests.

KEY-WORDS: *Nomuraea rileyi*, mutagenic, carcinogenic, metabolites, *NRtox*

Introdução

Um grande número de fungos são conhecidos como produtores de metabólitos secundários, ativos sobre diversos organismos vivos, provocando inibição de crescimento, doenças e posteriormente sua morte. Dentre esses metabólitos, destacamos as aflatoxinas, produzidas por linhagens de *Aspergillus flavus* (DIENER & DAVIS, 1969), ochratoxina de *Aspergillus ochraceus* (KODAIRA, 1961; MYOKEY *et al.*, 1969); o gênero *Penicillium*, produzindo vários metabólitos tais como toxinas e antibióticos. Vários fungos entomopatogênicos também são produtores de metabólitos com ação sobre microrganismos e insetos, dentre eles o fungo, *Metarhizium anisopliae*, produzindo um ciclodipepsipeptídeo denominado destruxina, ativo sobre insetos e inibindo o crescimento de diversas linhagens de bactérias, (KODAIRA, 1969; CRISAN, 1971; KAIJIANG

& ROBERTS, 1986; DUMAS, *et al.*, 1995; CIANCIO, 1996). Os fungos *Beauveria bassiana*, *Peecilomyces fumoso-roseus*, *Fusarium moniliforme*, também produzem ciclodipepsipeptídeos beauvericina e o complexo enniatina (WEST & BUGGS, 1968; BERNARDINI *et al.*, 1975; GROVE & POPLE, 1980; RICHARD *et al.*, 1995; JEGOROV *et al.*, 1995; LOGRIECO *et al.*, 1996). Diversos estudos mostraram que o fungo *Nomuraea rileyi*, é um produtor de metabólitos ativos sobre insetos e microrganismos (MYKUMI & KAWAKAMI, 1975; IGNOFFO *et al.*, 1976; WASTI & HARTMANN, 1978; MOHAMED & NELSON, 1984; ONOFRE *et al.*, 1999), em trabalhos anteriores realizados por YE *et al.*, (1993), mostraram atividade inseticida sobre larvas de *Bombyx mori*. Nesse contexto o propósito deste trabalho, foi analisar a atividade mutagênica de um metabólito produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi*, sobre as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella thiphymurium*.

¹Biólogo, Doutor em Processos Biotecnológicos, Prof. Titular da disciplina de Microbiologia da Universidade Paranaense, UNIPAR, Campus de Francisco Beltrão - PR. e-mail: sideney@unipar.br

²Bióloga, Doutora em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul - Caxias do Sul - RS.

³Departamento de Genética de Microrganismos, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo - Piracicaba - SP. E-mail: jazevedo@carpa.ciagri.usp.br.

Endereço para correspondência: Av. Júlio Assis Cavalheiro, 2000. Curso de Ciências Biológicas, Universidade Paranaense, Campus de Francisco Beltrão, PR.

Material e métodos

Meio de crescimento

SSY - Sabouraud sacarose acrescido de extrato de levedura, contendo: peptona (1%); sacarose (4%) extrato de levedura (0,5%). O pH foi ajustado para 6,0. O meio foi preparado em recipientes de 12 litros e autoclavado a 120°C em 1 atm. de pressão, por uma hora, ONOFRE *et al.* 2002.

Produção e isolamento do metabólito

Um quimiostato com capacidade de quatro litros e, meio foram inoculados com uma suspensão de esporos da linhagem SA-86101 do fungo *Nomuraea rileyi*, numa concentração de $5,4 \times 10^9$ conídios/mL. Este recipiente foi mantido em condições controladas de temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e oxigenação constante por 12 dias. Após este período, o meio de cultura foi filtrado, descartando-se o micélio. Os metabólitos produzidos foram separados num extrator líquido/líquido, utilizando-se meio de cultivo - diclorometano na proporção 10:1 (v:v), os quais foram concentrados em evaporador rotativo, a uma temperatura de 35°C , obtendo-se (135mg/L) de metabólito mais impurezas. O resíduo contendo metabólitos mais impurezas, foi passado através de uma coluna contendo sílica gel GF, na proporção de 100:1 (peso/peso). Benzeno e benzeno, contendo quantidades crescentes de acetato de etila (5, 10, 25, 50%), foram usados como eluentes no fluxo de 1mL/minuto.

Frações de cinco mililitros foram coletados. Cada fração foi examinada em cromatografia de camada delgada (CCD). O sistema de solventes utilizados foi clorofórmio: metanol:acetato de etila, 18:1:1 (v:v:v), e aquelas frações que continham as mesmas características, foram agrupadas após evaporação a vácuo e analisadas em espectrofotômetro de infravermelho. Para remover outras substâncias, uma pequena quantidade de éter de petróleo foi adicionada aos cristais. O solvente foi descartado após permanecer no congelador por um período de 4 horas, a uma temperatura de -4°C . Após a separação, o metabólito foi armazenado a uma temperatura de -20°C , para posterior análise da atividade biológica, ONOFRE *et al.* 2002.

Linhagem de *Salmonella typhimurium*

Para as avaliações foram utilizadas as linhagens TA100 e TA98, construídas originalmente por AMES *et al.*, (1973). Essas linhagens são auxotróficas para histidina, e o teste permite a avaliação do potencial mutagênico do produto pela indução de mutação reversa das linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium*, para o aminoácido histidina e presença de mistura de ativação metabólica.

Fração microsomal S_9

Foi preparada a partir de fígado de ratos, Sprague-Dawleys pré-tratados com Aroclor-1254 (mistura bifenil policlorinada - PCB), adquirida da Molecular Toxicology Inc. (MoltoxTM) Lote 0337.

Meios para crescimento bacteriano e controles positivos

O crescimento das células bacterianas foi feito em meio líquido completo NB, contendo 0,8% de meio nutriente para crescimento (Nutrient Broth, BBL, Maryland, EUA) e

0,5% de cloreto de sódio. Para o teste de toxidez em placa foi utilizado meio completo solidificado com 1,5% de ágar (meio NA).

No teste mutagênico foi usado meio mínimo constituído por uma mistura de glicose a 40% e meio E de Vogel-Booner, o qual contém sulfato de magnésio a 1%, ácido cítrico monohidratado a 10%, fosfato de potássio dibásico a 50%, e fosfato de sódio e amônio a 17,5%, solidificado com ágar a 1,5%. Para o plaqueamento em meio mínimo foi empregado o ágar de superfície ou gelose, constituído por 0,6% de ágar e 0,5% de NaCl, ao qual se adicionou um solução de histidina 7,0 g/mL. Nos testes para confirmação do genótipo da linhagem testadora, foram utilizadas placas de meio mínimo, contendo ampicilina 25 (g/mL) e histidina (0,1 mL de uma solução 0,1M).

Nos testes sem ativação metabólica, foram utilizados a azida sódica (E Merck, Alemanha) e 4NQO (4 nitroquinoleína 1-óxido, Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) para as linhagens TA100 e TA98, respectivamente. Nos testes com ativação metabólica utilizou-se a Aflatoxina B1 (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA).

Teste de genotoxicidade

A metodologia foi desenvolvida pelo procedimento de incorporação em placa, segundo MARON & AMES (1983). No teste para determinar a atividade mutagênica, amostras em diferentes concentrações do oligopeptídeo *NRtox* (ONOFRE *et al.* 2002) (10, 25, 100, 500, 1000 μL), foram adicionadas a 100 μL de uma cultura das linhagens testadoras (crescimento de $1,2 \times 10^9$ células/mL em meio NB), em presença ou ausência de S_9 mix (20 μL da fração S_9 contendo 16,3 mg/mL de proteína por 500 μL de S_9 mix), incubadas ao abrigo da luz e à temperatura de 37°C . Após esta etapa, adicionou-se ao tubo teste 2 mL do ágar superfície, previamente incubado a 45°C e suplementado com solução de histidina e biotina. Após agitação breve, procedeu-se à semeadura em placas contendo meio E-geloso. A contagem das colônias revertentes foi realizada após 48 horas de incubação em estufa a 37°C (incubadora BOD - Ética).

Em cada teste foram acrescentados os controles, negativos - solução de Tween-80 0,1% e positivos - 5,0 μL /placa de azida sódica (AZS); 0,5 μg /placa de 4-óxido-1-nitroquinoleína (4NQO), em ensaios sem fração S_9 para TA 100 e TA 98, respectivamente. Em teste com fração metabolizante, foram adicionados 10 g/placa de aflatoxina B1 (AFB1, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) para TA 100 e TA 98.

Resultados e discussão

Produção e isolamento do metabólito

Utilizando-se a metodologia descrita, obteve-se 7,4 $\mu\text{g/mL}$ de *NRtox*. As análises de espectrofotometria em infravermelho e ultravioleta indicam a presença de um oligopeptídeo, Figura 1 e 2, (ONOFRE *et al.* 1999, ONOFRE *et al.* 2002).

Teste de genotoxicidade

Os resultados obtidos referente a atividade mutagênica do metabólito, em ausência e presença de ativação metabólica, estão sumarizados na tabela 1.

Podem ser verificados nesta tabela que o número de revertentes *his*⁺ induzidos pelo metabólito não aumentou significativamente em relação à concentração zero do metabólito, tanto nos testes realizados em presença, como em ausência de ativação metabólica. Portanto, para todas as doses utilizadas, a frequência de revertentes permaneceu praticamente igual à espontânea.

A análise estatística dos resultados obtidos indicou claramente a ausência de mutagenicidade para o metabólito (*NRtox*) produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi*.

O metabólito não induz a mutações de substituições de pares de base e frameshift como demonstrado pelos testes

de genotoxicidade.

Verificou-se nessas tabelas que o número de revertentes *his*⁺ induzidos pelo peptídeo, produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi* (*NRtox*), não aumentaram significativamente em relação a concentração zero, tanto nos testes realizados em presença, como em ausência de ativação metabólica. Portanto, para todas as concentrações utilizadas, a frequência de revertentes permaneceu praticamente igual à espontânea. A análise estatística dos resultados obtidos, indicou claramente, a ausência de mutagenicidade para o peptídeo *Nrtox*, produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi*.

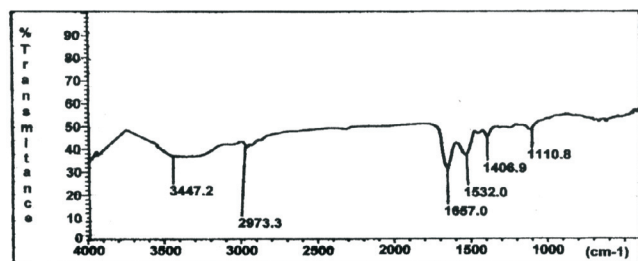


Figura 1 - Espectrometria de infravermelho referente ao metabólito produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi*.

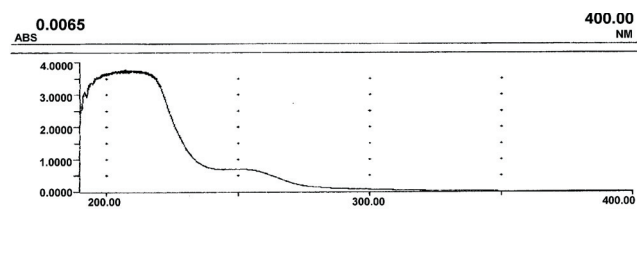


Figura 2 - Espectrometria de ultravioleta referente ao metabólito produzido pelo fungo *Nomuraea rileyi*.

TABELA 1 – Resposta das linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, ao tratamento com diferentes concentrações de *Nrtox*, no teste de *Salmonella*/microsossoma, sem ativação metabólica.

Dose	TA98		TA100		
	Concentração $\mu\text{L/mL}$	R/placa ^a	IM ^b	R/Placa	IM
0,00		19,67 \pm 4,04	1,00	95,67 \pm 4,04	1,00
10		16,67 \pm 2,08	0,84	97,00 \pm 12,17	1,01
25		17,00 \pm 6,93	0,86	83,00 \pm 6,00	0,86
100		21,00 \pm 6,56	1,06	85,67 \pm 8,08	0,89
500		22,00 \pm 3,21	1,13	101,33 \pm 17,21	1,05
1000		21,33 \pm 8,08	1,08	102,33 \pm 29,69	1,06

Análise estatística:

P anal. Variância 72,4%

Mod. Aceitável (p) linear 80,1%

P dose resposta 14,6%

Resultado **Negativo**

P anal. Variância 72,4%

Mod. Aceitável (p) linear 80,1%

P dose resposta 14,6%

Resultado **Negativo**

^aNúmero de revertentes *his*⁺/placa; média de, no mínimo 3 placas + desvio padrão.

^bÍndice de mutagênese: R/placa induzidos na amostra/revertentes na concentração zero.

Controles positivos: TA98, 4NQO 0,5 μg /placa, 155,33 revertentes; TA100, azida sódica 10 μg /placa, 469 revertentes.

TABELA 2 – Resposta das linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, ao tratamento com diferentes concentrações de *NRtox* no teste de *Salmonella*/microsossoma, com ativação metabólica.

Dose	TA98		TA100		
	Concentração $\mu\text{L/mL}$	R/placa ^a	IM ^b	R/Placa	IM
0,00		22,67 \pm 3,51	1,00	131,33 \pm 8,58	1,00
10		26,33 \pm 3,06	1,16	128,00 \pm 22,72	0,97
25		20,67 \pm 4,93	0,91	141,00 \pm 11,27	1,07
100		23,33 \pm 2,08	1,03	125,67 \pm 15,63	0,96
500		22,67 \pm 4,93	1,00	155,67 \pm 28,57	1,18
1000		26,00 \pm 6,56	1,14	113,00 \pm 15,39	0,86

Análise estatística:

P anal. Variância 62,5%

Mod. Aceitável (p) linear 52,1%

P dose resposta 34,5%

Resultado **Negativo**

P anal. Variância 16,9%

Mod. Aceitável (p) linear 12,5%

P dose resposta 75,1%

Resultado **Negativo**

Controles positivos: Aflatoxina B1, 10 μg /placa, 441 revertentes.

Referências

- AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of muagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 70, p. 782-786, 1973.
- BERNARDINI, M. A.; CARILLI, G.; PACIONI, B. SANTURBANO. Isolation of beauvericin from paecilomyces fumosoroseus. *Phytochemistry*. v. 14, p. 1865, 1975.
- CIANCIO, A. Observations on the nematicidal properties of some mycotoxins. *Fundamental and Applied Nematology*, v. 18, p. 451-454, 1996.
- CRISAN, E. V. Mechanism responsible for release of toxin by *Metarrhizium anisopliae* spores in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.17, p. 260-264, 1971.
- DIENER, L. U.; DAVIS, N. D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In: L. A. GOLDBLATT. *Aflatoxin*. Academic Press: New York, 1969. 472 p.
- DUMAS, C. Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 108, p. 195-203, 1995.
- GROVE, J. F.; POPLE, M. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia*, v. 70, p. 103-105, 1980.
- IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C.; HOSTETTER, D. L. Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Environmental Entomology*, College Park, v. 5, p. 935-936, 1976.
- JEGOROV, A.; SEDMERA, P.; MATHA, V. Biosynthesis of destruxins. *Phytochemistry*, v. 33, p. 1403-1405, 1995.
- KAIJIANG, L.; ROBERTS, D. W. The production of destruxins by the entomogenous fungus, *Metarrhizium anisopliae* var. major. *Journal Invertebrate Pathology*, v. 47, v. 3, p. 120-22, 1986.
- KODAIRA, Y. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of the Faculty of Textil Science and Technology, Shinshu-University, Agriculture and Sericulture*, v. 5, n. 29, p.1-68, 1961.
- KODAIRA, Y. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, v. 25, p. 261-262, 1969.
- LOGRIECO, A. et al. Occurrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from *Peruvia maize*. *Mycopathologia*, v. 122, p.185-190, 1996.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutagens research*. v. 113, p. 173-215, 1983.
- MOHAMED, A. K.A.; NELSON, F. R. S. Toxic effects of *Nomuraea rileyi* extract on *Heliothis spp.* *Journal of Agricultural Entomology*, v. 1, p. 349-353, 1984.
- MYKUMI, T.; KAWAKAMI, K. Toxinas produzidas por *Nomuraea rileyi*. In: BURGESS, H. D. *Microbial control of pests and plant diseases*. New York: Academic Press, 1975. p. 450-451.
- MYOKEY, R. et al. Aspochracin, a new insecticidal metabolite of *Aspergillus ochraceus*. Isolation, structure and biological activities. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, v. 33, p. 1491-1494, 1969.
- ONOFRE, S. B. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Arquivos de ciências da saúde da Unipar*, v. 3, n. 1, p. 29-33, 1999.
- _____. LC₅₀ of the Peptide Produced by the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson active against third instar larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Lep.: Noctuidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 45, n. 3, p. 269-275, 2002.
- RICHARD, J. L.; BENNETT, G. A.; MARACOS, C. M. Detection, identification, and surveillance of mycotoxins in cereals and other foods. *Fedrip database*, v. 3, p. 45-49, 1995.
- WASTI, S. S.; HARTMANN, G. C. Host-parasite, Interactions between larvae of gypsy moth, *Lymantria dispar*, (L.) (Lepdoptera: Lymantridae) and the entomogenous fungus, *Nomuraea relewi* (farlow) SAMSON (Moniliales: moniliaceae). *Applied and Entomological Zoology*, v. 13, n. 1, p. 23-28, 1978.
- WEST, E. J.; BUGGS, J. D. In vitro toxin product by the fungus *Beauveria bassiana* and bioassay in eater wax larval. *Journal of Economic Entomology*, v. 61, p. 684-687, 1968.
- YE, M. Z. et al. Insecticidal toxin produced by the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. *Acta Agriculturae Universitatis Zheijiangensis*, v. 19, p. 76-79, 1993.

Recebido para publicação em: 22/07/03

Received for publication on: 22/07/03

Aceito para publicação em: 04/03/04

Accepted for publication on: 04/03/04