

UTILIZAÇÃO DE CULTURA MISTA E ELICIAÇÃO QUÍMICA PARA INDUZIR A BIOSSÍNTESE DE PRODUTOS NATURAIS POR ACTINOBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Letícia da Costa Pena Mendes¹, Marco Antônio Silva Cabral², Fernanda Oliveira das Chagas³

1. Faculdade de Farmácia e Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais (IPPN) – UFRJ

(leticiamendes.of@hotmail.com)

2. Ciências Biológicas – UFRJ polo Xerém

3. IPPN - UFRJ

INTRODUÇÃO

Uma nova biota com potencial biossintético que vem sendo pesquisada são os micro-organismos endofíticos. Apesar de haver estudos realizados há mais de 35 anos, existem diversos produtos naturais de bactérias e fungos ainda não descobertos, indicando que o número de genes biossintéticos é superior a quantidade de metabólitos conhecidos oriundos desses micro-organismos. Alguns desses genes podem não ser expressos nas condições padrões laboratoriais de cultivos, havendo necessidade de estímulos específicos para serem ativados, como a manipulação de fatores nutricionais e ambientais.

As linhagens escolhidas para a pesquisa foram isoladas de uma planta medicinal (**figura 1**) e se mostraram responsivas e biologicamente ativas contra bactérias e fungos em estudos prévios. Visto isso, estudos mais aprofundados desses genes silenciosos aliados com a indução de metabolitos secundários através da interação com outros micro-organismos e por elicitação química, são de extrema importância.



Figura 1. *Tithonia diversifolia*. Planta medicinal de onde foram isoladas as actinobactérias endofíticas *Streptomyces* sp. RTd5 e *Streptomyces* sp. RTd8.

OBJETIVOS

- Induzir a expressão de metabólitos secundários bioativos por *Streptomyces* sp. RTd8 e *Streptomyces* sp. RTd5 através de elicitação química com os antibióticos kanamicina e apramicina.

METODOLOGIA

Foram realizados experimentos de Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC) para os eliciadores químicos kanamicina e apramicina (**figura 2**) seguido da inoculação das linhagens em meio sólido de DS (dextrose e soja) contendo uma concentração sub-inibitória dos eliciadores. Também foram inoculadas as bactérias em cultivo sem os eliciadores químicos. As culturas cresceram por 7 dias e, após esse período, realizou-se o corte dos fragmentos (**figura 3**) e microextração com metanol. O extratos secos foram analisados por cromatógrafo líquido de alta eficiência - HPLC (Shimadzu® Shim-Pak), com coluna analítica C18 100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm (Ascentis Express) e gradiente de 10%-100% de acetonitrila em água durante 20 minutos, 100% de acetonitrila por 10 minutos, e recondição: 100%-10% de acetonitrila em 2 minutos e 10% de acetonitrila aquosa por 5 min.

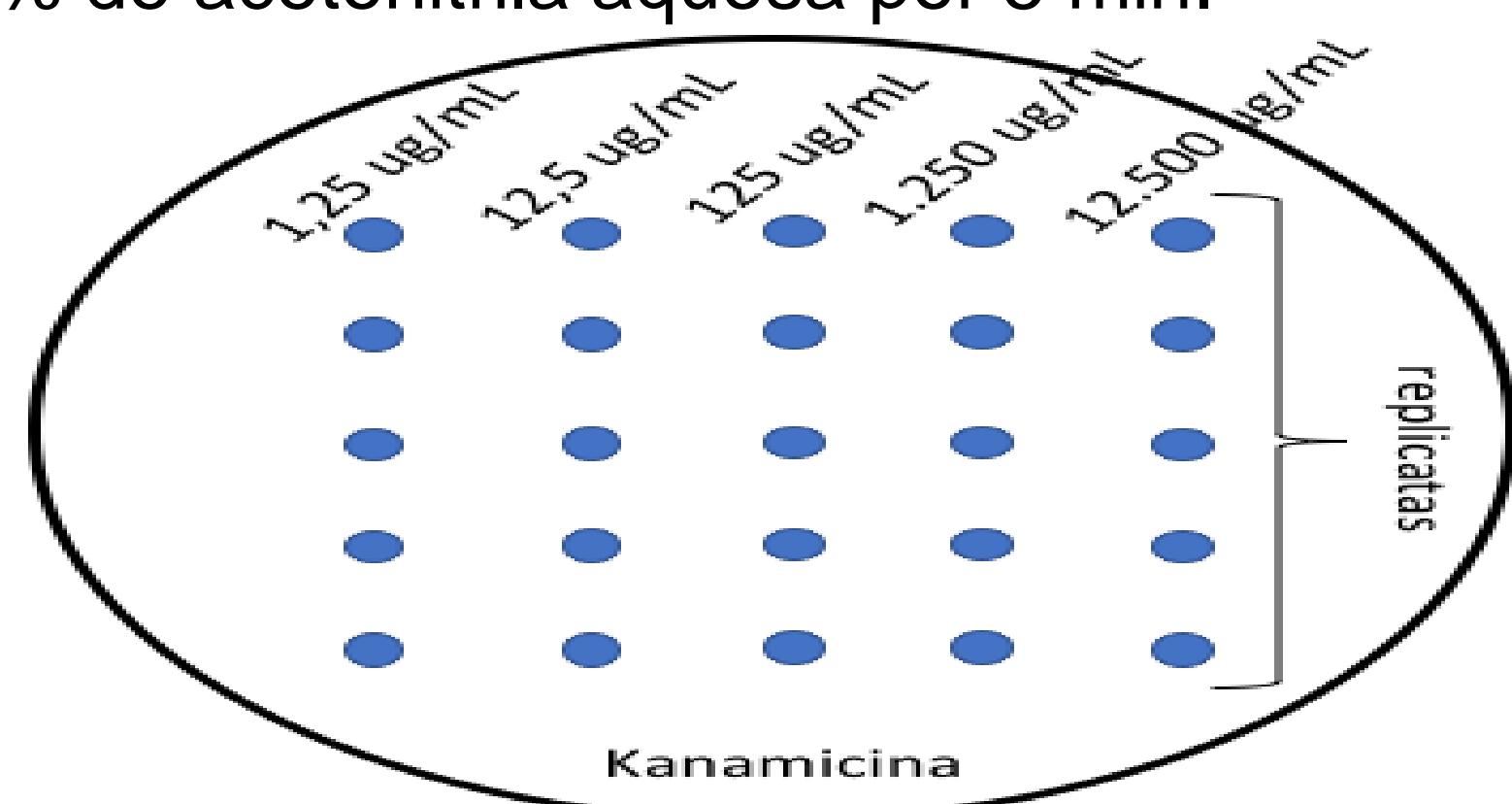


Figura 2. Representação esquemática do experimento de MIC em placa de Petri com kanamicina (as concentrações para apramicina foram 10 vezes menores).

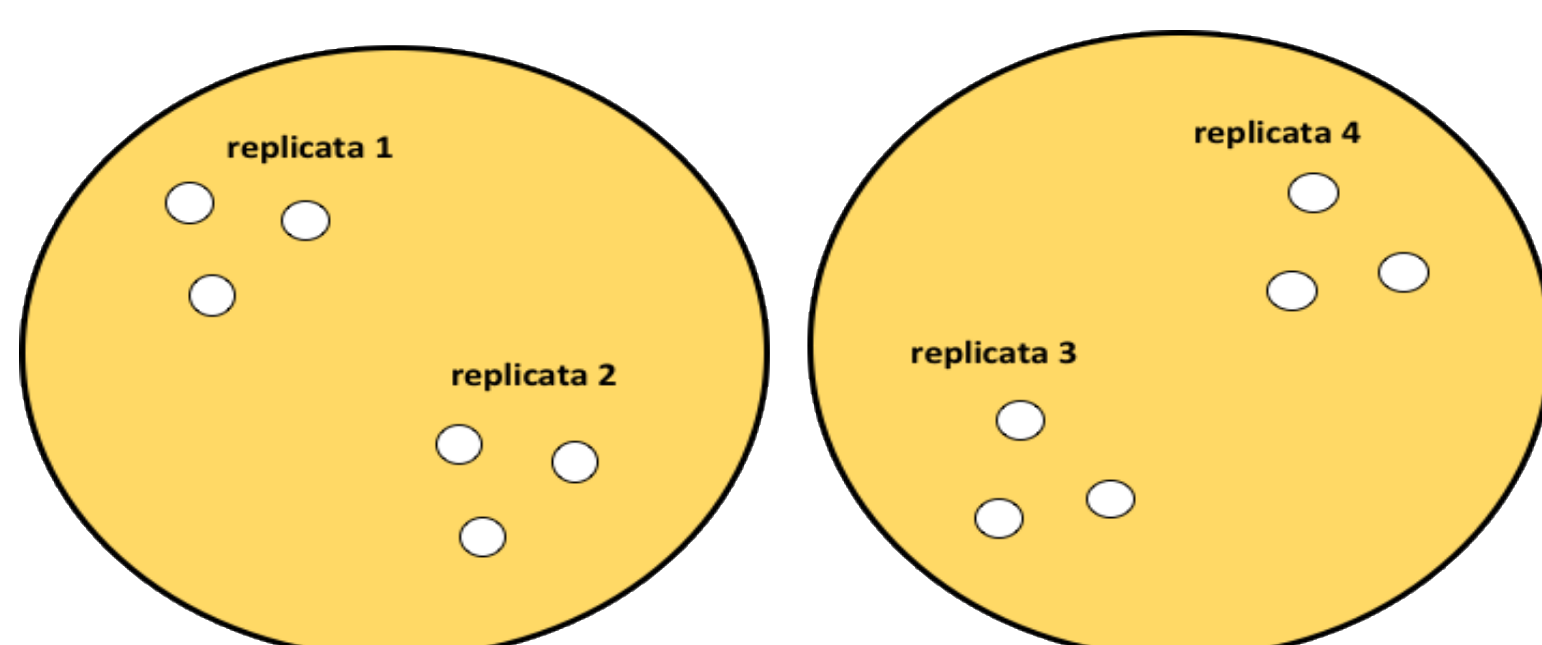


Figura 3. Representação dos fragmentos extraídos do cultivo para a realização de quadruplicata de cada extrato.

AGRADECIMENTOS

RESULTADOS

Os experimentos de MIC (**figura 4A**) revelaram que as concentrações sub-inibitórias de kanamicina e apramicina no meio de cultura foram de 2,5 µg.mL⁻¹ e 0,25 µg.mL⁻¹, respectivamente. As colônias tratadas de RTd5 e RTd8 demoraram mais para crescer (**figura 4B e 4C**) em relação ao padrão e adquiriram cor pastel. Não houve escurecimento do meio de cultura devido ao aparecimento de substância com cor, como ocorre no controle.

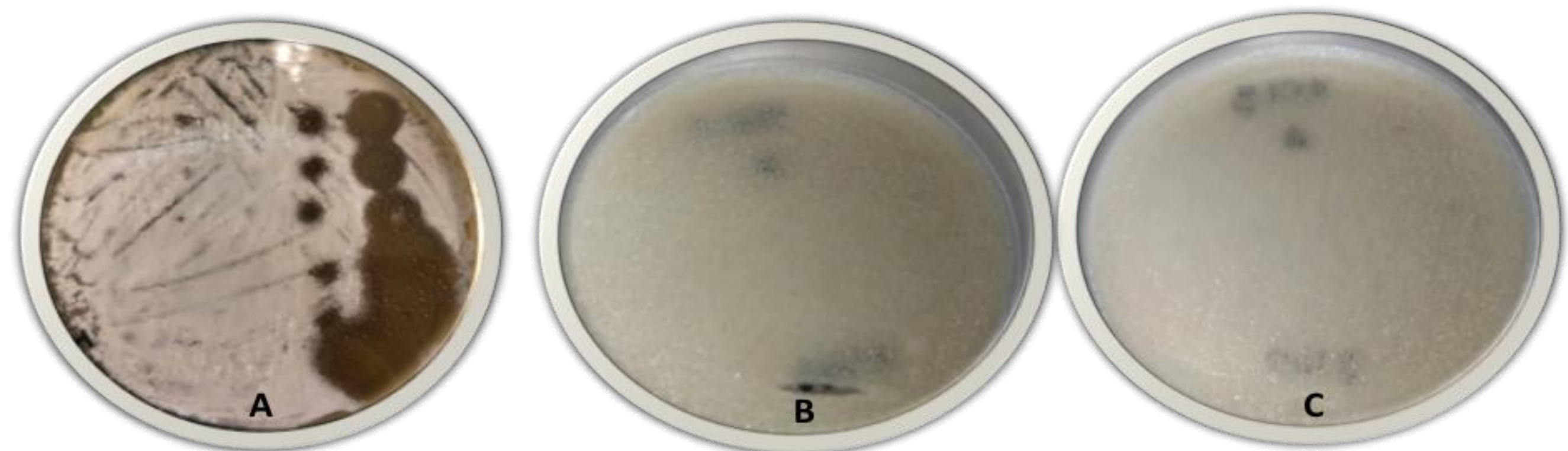


Figura 4. Experimento de MIC em placa de Petri (**A**); experimento com as actinobactérias RTd5 (**B**) e RTd8 (**C**) crescendo em meio com apramicina.

Comparando os cromatogramas das actinobactérias RTd5 e RTd8, foi possível identificar alterações nos perfis metabólicos de ambas (**figura 5**). A apramicina foi capaz de induzir a biossíntese de substâncias que não eram identificadas no cultivo controle das actinobactérias RTd5 e RTd8. Já com kanamicina, nenhum resultado relevante foi observado. Ao que tudo indica, os tempos de retenção das substâncias que foram induzidas com a apramicina em RTd5 e RTd8 são equivalentes.

