

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

IPPN WALTER MORS UFRJ. WALTER MORS

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

(<u>leticiamendes.of@hotmail.com</u>)

Ciências Biológicas – UFRJ polo Xerém
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 microorganismos e por eliciação 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 eliciação 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 acetronitrila em água durante 20 minutos, 100% de acetonitrila por 10 minutos, e recondicionamento: 100%-10% de acetronitrila em 2 minutos e 10% de acetonitrila aquosa por 5 min.

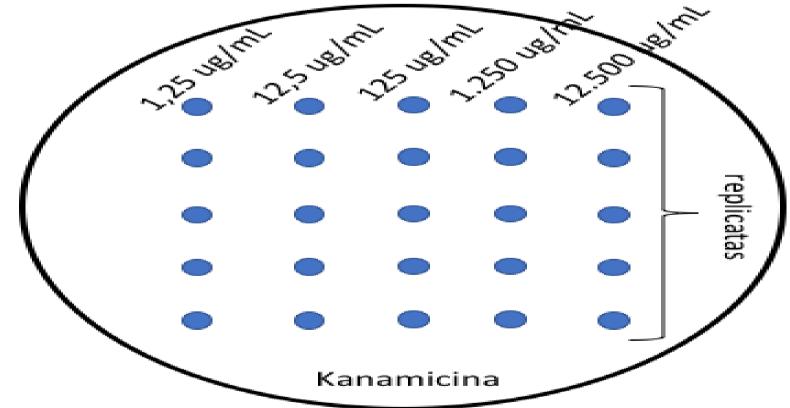


Figura 2. Representação esquemática do experimento de MIC em placa de Petri com kanamicina (as concentrações para apramicina foram 10 vezes menores).

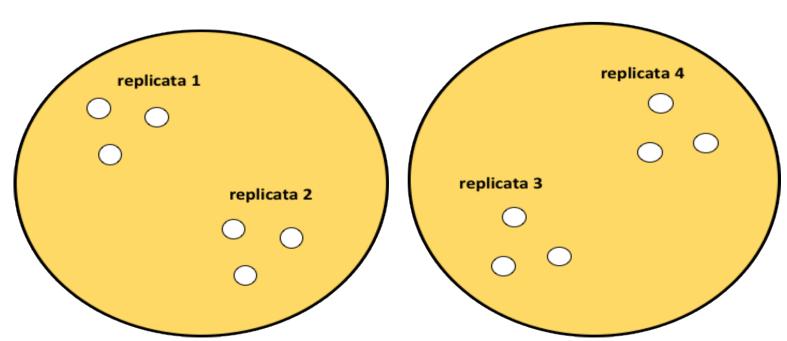


Figura 3. Representação dos fragmentos extraídos do cultivo para a realização de quadruplicata de cada extrato.

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.

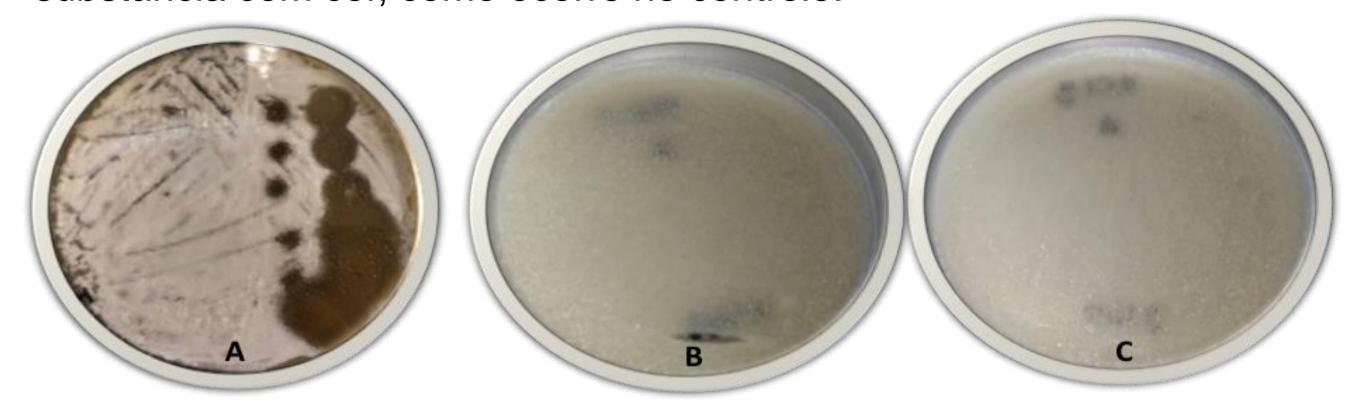


Figura 4. Experimento de MIC em placa de Petri (**A**); experimento com as actinobactérias RTd5 (**B**) e RTd8 (**C**) crescendo em meio com apramicina.

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.



Figura 5. cromatogramas das actinobactérias RTd5 e RTd8, respectivamente.

DISCUSSÃO

Presume-se que o antibiótico, utilizado como eliciador químico, tardou o processo de produção de hifas e esporos pelas actinobactérias. Os cromatogramas das linhagens RTd5 e RTd8 cultivadas com apramicina apresentaram picos antes ausentes e mais intensos em comparação com os cromatogramas das mesmas linhagens sem tratamento. Considerando que as substâncias induzidas com apramicina em RTd5 e RTd8 possuem os mesmos tempos de retenção, supõe-se que, como ambas foram isoladas da mesma planta hospedeira e no mesmo processo de isolamento, é possível que elas sejam da mesma espécie ou até da mesma linhagem. Vale ressaltar que elas apresentam as mesmas características morfológicas macroscópicas.

CONCLUSÃO

As actinobactérias RTd5 e RTd8 se mostraram promissoras no experimento de eliciação química, portanto, seu perfil metabólico será investigado mais profundamente com o intuito de identificar as substâncias sendo produzidas. Além disso, experimentos de co-cultura serão realizados com essas linhagens que foram responsivas.

REFERÊNCIAS

- 1. Ganesan, A. (2008). "The impact of natural products upon modern drug discovery." Current Opinion in Chemical Biology 12(3): 306-317
- 2. Chagas, F. O., Pessoti, R. C., Caraballo-Rodríguez, A. M., Pupo, M. T. (2018). "Chemical signaling involved in plant–microbe interactions". Chemical Society Reviews 47: 1652-1704.

3. Aigle, B. and C. Corre (2012). "Waking up Streptomyces Secondary Metabolism by Constitutive Expression of Activators or Genetic Disruption of Repressors." Methods in Enzymology 517: 343