

Estratégias de Eliciação Química para a Descoberta de Metabólitos Microbianos.

Gabriella C. M. da Cruz¹ (PG), Ricardo M. Borges (PQ)¹, Fernanda O. das Chagas^{1*} (PQ)

1. Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais – Universidade Federal do Rio de Janeiro

373 Av. Carlos Chagas Filho 21941-903, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*ferchagas.usp@gmail.com

Palavras Chave: ecologia química, *Streptomyces*, redes moleculares, espectrometria de massas, eliciação química.

Introdução

Os produtos naturais de microrganismos têm um papel crucial na descoberta moderna de medicamentos. O sequenciamento genômico de várias linhagens de microrganismos revela que o número de genes biossintéticos em bactérias e fungos supera claramente os metabólitos secundários já identificados desses organismos, indicando que ainda existem muitos novos produtos naturais a serem descobertos a partir dessas fontes¹. Uma possível razão para essa observação é que apenas alguns genes da via biossintética são expressos em condições padrão de cultura de laboratório e que outros genes são silenciados ou mal expressos sem um estímulo específico, como nutrientes específicos, fatores ambientais e compostos de sinalização². Portanto, para acessar um reservatório mais amplo de metabólitos potencialmente bioativos, a biossíntese dessas substâncias precisa ser induzida através da manipulação de fatores nutricionais ou ambientais. Um método para desencadear a biossíntese de metabólitos secundários em bactérias é através da influência das condições de estresse por eliciação química, adicionando metabólitos de defesa de microrganismos (antibióticos em concentrações subinibitórias) às culturas microbianas³.

Resultados e Discussão

Para este experimento, linhagens endófitas das actinobactérias *Streptomyces* sp. foram isolados da planta *Tithonia diversifolia*. As linhagens isoladas foram cultivadas em uma cultura sólida incorporada aos antibióticos kanamicina A ou apramicina abaixo da concentração inibitória mínima. Após 10 dias de inoculação, foi realizada microextração com metanol e o perfil metabólico das culturas incorporadas aos antibióticos foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e comparado aos perfis das culturas bacterianas sem eliciação química. O cromatograma por HPLC das linhagens Rtd5 e Rtd8 incorporadas com apramicina e Rtd2 incorporada com kanamicina apresentaram picos novos e mais intensos em comparação com os cromatogramas das mesmas linhagens sem tratamento com

antibióticos. Essas linhagens foram selecionadas para análise posterior por espectrometria de massas (MS). Os dados de MS foram organizados em uma rede molecular, usando a plataforma online The Global Natural Product Social Molecular Networking, e as bibliotecas de espectros de MS/MS foram usadas para identificar substâncias conhecidas nas amostras. A análise estatística dos replicados e os resultados da rede molecular (Figura 1) mostraram uma clara separação dos aglomerados de metabólitos presentes nas culturas de bactérias com tratamento com antibiótico daquelas sem.

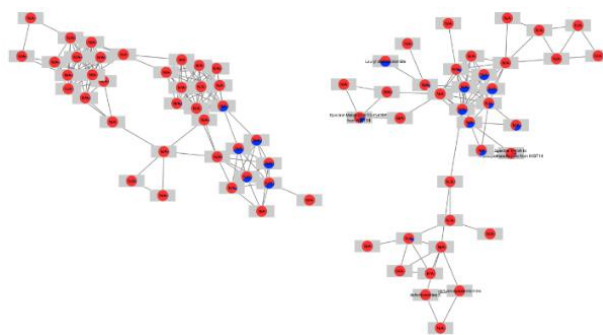


Figura 1. Rede molecular da linhagem Rtd8 tratada com apramicina (em vermelho) e sem tratamento (em azul).

Conclusões

Este estudo demonstra que a eliciação química usando antibióticos pode estimular a biossíntese de microrganismos, levando à produção de substâncias não observadas ou produzidas em quantidades muito menores quando a eliciação não é introduzida. Além disso, a rede molecular baseada em MS é uma ferramenta poderosa para identificar moléculas conhecidas e auxiliar na descoberta de novos produtos naturais.

Agradecimentos

CAPES e FAPERJ.

Professora Monica T. Pupo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

¹ Walsh, C. T.; Fischbach, M. A. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (8), 2469-2493.

² Challis, G. L. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7* (9), 1753-1760.

³ Pettit, R. K. *Microbial Biotechnology* **2011**, *4* (4), 471-478.