

Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA

Influence of culture media on the bioactive metabolites production by endophytic *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA

Ivana Gláucia B. Cunha¹, Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho², Rosa Elvira Areias da Silva³,
Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim⁴ & Janete Magali de Araujo⁴

RESUMO – *Streptomyces* endofíticos de plantas medicinais vem contribuindo de maneira significativa como uma fonte promissora para descoberta de novos metabólitos bioativos. Este trabalho teve como objetivo selecionar o melhor meio de cultura e tempo de produção de metabólitos secundários bioativos, visando seu isolamento. Foram utilizados na fermentação cinco diferentes meios de cultura, que através do teste de difusão em disco para *Bacillus subtilis* ATCC 6633 mostraram boa atividade antimicrobiana. A massa celular foi extraída com solventes polares, sendo o extrato etanólico o que apresentou maior halo de inibição, quando comparado aos extratos dos líquidos metabólicos. O extrato etanólico foi submetido à coluna cromatográfica de sílica gel, seguida da purificação da fração ativa por cromatografia em placas preparativas, originando quatro novas frações, das quais apenas a fração A₄ apresentou halo de inibição para bactérias Gram-positivas. Desta fração foi determinada a CMI e o melhor resultado obtido foi para *Micrococcus luteus* ATCC 2225 <12,5µg/mL. O espectro infravermelho desta fração mostrou a presença de grupos característicos de anímina primária alifática, grupos: alquila e cetona.

PALAVRAS-CHAVE – *Streptomyces* sp., endofítico, metabólito secundário.

SUMMARY – Endophytic *Streptomyces* strains of medicinal plants has been contributing in a meaningful way as a promising source for discovery of new bioactive metabolites. This study has as objective to select the best culture media and time of production of secondary metabolites then your isolation. Five different fermentation media were used in through the disk diffusion assay against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 showed better antimicrobial activity. The mass of cell was extracted with polar solvents, being the ethanolic extract what showed the great inhibition zone, when compared to the culture liquids extracts. The ethanolic extract was subjected the column chromatography of silica gel, followed by the purification of the active fraction by thin-layer chromatography preparative originated four new fractions, where just the A₄ fraction presented halo of inhibition for Gram-positive bacteria. This fraction was determined the MIC and the best results were obtained to *Micrococcus luteus* ATCC 2225 <12.5µg/mL. Infrared spectroscopy this fraction shows the presence of groups' characteristic of primary amine aliphatic, alkyl and acetone groups.

KEYWORDS – *Streptomyces* sp., endophytic, secondary metabolites.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais assumem um papel de destaque como fonte promissora de novos compostos e como precursores para a síntese de novos fármacos¹. Cerca de 80% dos antibacterianos tiveram suas origens em derivados de produtos naturais².

Neste contexto os microrganismos endofíticos, isolados de tecido vegetal, constituem uma fonte valiosa para obtenção de novas moléculas com alta atividade antimicrobiana³. Estes endófitos habitam o interior do tecido vegetal numa associação mutualística sem causar sinto-

mas de doenças ou produzir estruturas externas visíveis além de proteger a planta do ataque de microrganismos patogênicos^{4,6}.

Entre os microrganismos produtores de metabólitos bioativos merece destaque o gênero *Streptomyces* pertencente a classe Actinobacteria que é responsável pela produção de 75% dos antibióticos com inúmeras aplicações nas áreas da saúde e na agropecuária⁷. Pesquisas recentes mostram que *Streptomyces laceyi* MS53 isolado da planta medicinal *Ricinus communis* produz dois compostos: Salicina A e B derivados do ácido 6- alquilsalicílico⁸, enquanto o endófito *Streptomyces* sp SUC1 isolado da raiz

Aceite em 02/4/2009

¹ Farmacêutica, mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPE;

² Biólogo, doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPE

³ Bióloga, mestre em Biotecnologia/ UFPE

⁴ Docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPE

da planta *Ficus benjamina* produz o composto denominado Lansai A-D que apresenta atividade antitumoral e antifúngica⁹.

Por não se ter relatos de trabalhos anteriores sobre o potencial antimicrobiano dos endófitos da planta *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, esta pesquisa tem como objetivos: selecionar o melhor tempo e meio de cultura para a fermentação do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A, realizar a extração e isolamento de frações bioativas, além de determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Microrganismo

Ao falar do isolamento do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A, este foi isolado das raízes da planta *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist coletadas no município de Igarassu - PE, Brasil.¹⁰

2.2 – Fermentação

A linhagem *Streptomyces* sp. EBR49-A, crescida em tubo inclinado contendo meio de cultura ISP2, foi inoculada em Erlenmeyers de 250mL, cada um contendo 50 mL de cada meio de cultura: ISP2¹¹, ISP2M¹¹, MPE¹², MPEM¹³, MA¹⁴. Estes meios de cultura foram cultivados sob agitação - 180rpm a 28°/30°C por 48h. Em seguida 10% (v/v) deste pré-inóculo foi utilizado para inocular Erlenmeyers de 500mL, contendo cada um 100mL de um dos cinco meios de cultura testados que foram cultivados nas mesmas condições de rotação e temperatura por 96 horas. Para determinar o melhor meio de cultura e tempo de fermentação, a cada 24h durante o período de 96h da fermentação, foi realizado o teste de difusão em disco utilizando *B. subtilis* ATCC 6633 como microrganismo teste¹⁵.

2.3 – Extração e obtenção do composto bioativo

Após 72h, o líquido metabólico foi centrifugado e a biomassa (pellet) tratada com solventes polares etanol, metanol e acetona, em pH 2, 7 e 9^{16,17}, enquanto o fermentado (sobrenadante) nos mesmos valores de pH foi tratado com clorofórmio e acetato de etila.

2.4 – Isolamentos da fração bioativa A₄

O extrato etanólico bruto em pH7 apresentou melhor atividade antimicrobiana, quando comparado aos demais extrato da biomassa: etanol em pH2 e 9, cetona e metanol em pH2, 7 e 9. Desta forma, este extrato bruto etanólico em pH 7 foi submetido a sucessivas colunas cromatográficas de sílica gel 60 (70-230 Mesh) com sistema eluente ciclohexano: acetato de etila (98:2 e 97:3). As frações obtidas foram evaporadas em rota-evaporador e submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) seguida da revelação química e bioautográfica, sendo selecionada a fração bioativa. Com a fração bioativa foi realizada cromatografia em camada delgada preparativa de sílica gel PF-254, usando como fase móvel diclorometano: metanol (98:2). Desta forma, foi obtida a fração A₄, para a qual foi determinada a Concentração Mínima Inibitória e foi realizada análise espectroscópica na região do infravermelho.

2.5 – Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A Concentração Mínima Inibitória foi realizada em meio sólido¹⁸.

3. RESULTADOS

A fermentação nos diferentes meios de cultura durante 96 horas mostrou que o meio ISP2 com (4%) de fonte de carbono glicose foi o que apresentou maior halo de inibição (24,5mm) com 72h de cultivo, enquanto o meio MA com glicerol (15%) exibiu o menor halo de inibição (16.5mm) como pode ser observado nas figuras 1 e 2. Uma vez que não existiu diferença estatisticamente significativa entre os meios de cultura ISP2 e ISP2M, conforme a análise do Teste T $p < 0,05$, foi selecionado o meio ISP2, por sua composição ser mais simples em comparação ao meio ISP2M que contem amido. Desta forma o meio de cultura ISP2 é menos onerosa para a produção do composto bioativo.

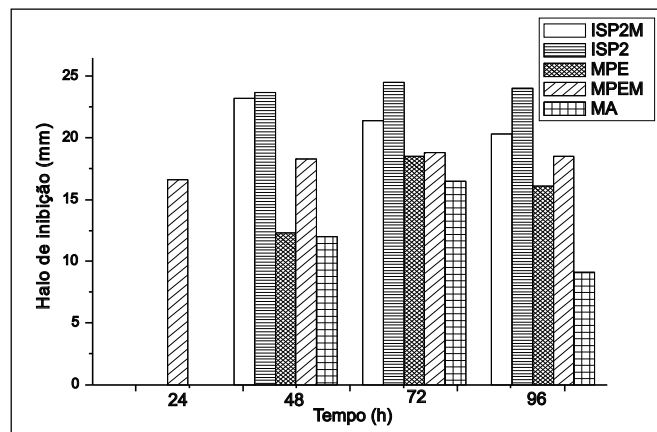


FIG. 1 - Diâmetros dos halos de inibição para *B. subtilis* ATCC 6633 da fermentação de *Streptomyces* sp. EBR49-A nos diferentes meios de fermentação durante 96h.

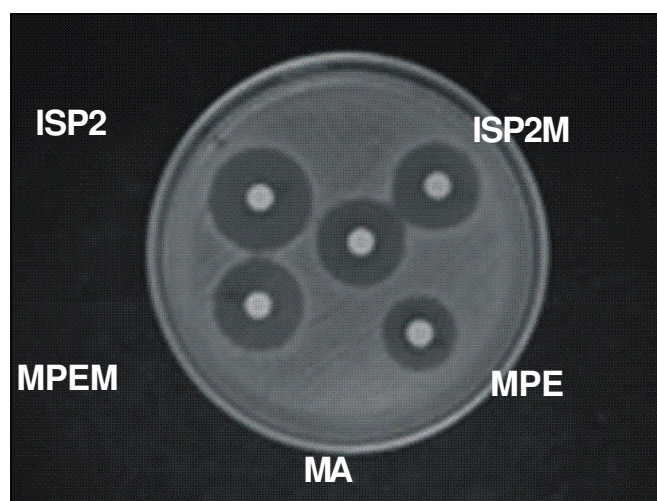


FIG. 2 - Halos de inibição para *B. subtilis* ATCC 6633 da fermentação de *Streptomyces* sp. EBR49-A com 72h nos meios de cultura testados.

Após a fermentação, o extrato do líquido metabólico Ph7 foi obtido por partição com clorofórmio e acetato de etila. Estes extratos brutos apresentaram halo de inibição de 24 mm para *B. subtilis* ATCC 6633, enquanto o extrato da massa micelial tratado com o etanol a pH7 apresentou halo de inibição de 35,6mm. Os extratos dos solventes etanol, acetona e metanol em pH9 não apresentaram halo de inibição. Os solventes acetona e etanol não apresentaram diferença estatisticamente significativa conforme a análise do Teste T $p < 0,05$ durante a extração da biomassa. Desta forma, o solvente etanol foi selecionado para extração da biomassa devido a sua facilidade de obtenção e ser menos oneroso para a pesquisa. Por tanto o extrato etanólico foi

selecionado para posterior purificação do composto bioativo. Apesar do halo de inibição dos extratos etanólico, clorofórmico e acetato de etila serem grandes, não podemos classificá-los como sensíveis ou resistentes, pois estes testes foram qualitativos (Figura 3).

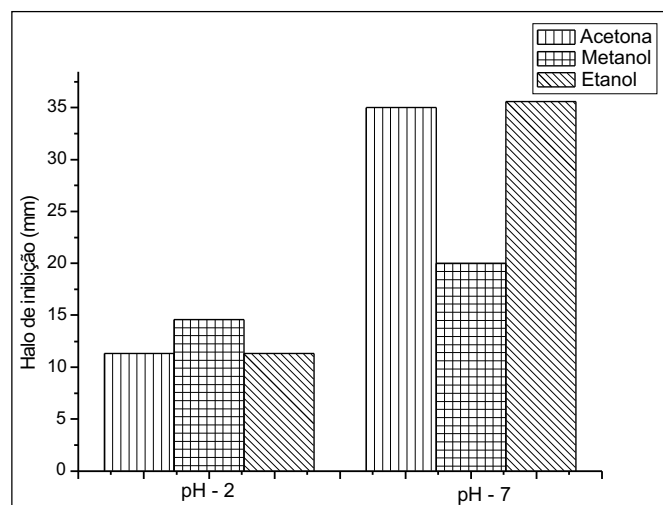


FIG. 3 - Diâmetros dos halos de inibição para *B. subtilis* ATCC 6633 dos extratos acetona, etanol e metanol em diferentes valores de pH, obtidos da extração da biomassa do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A.

O extrato etanólico bruto foi fracionado em coluna de sílica gel fornecendo três frações e apenas uma fração S₃ apresentou halo de inibição de 23mm. A cromatografia em camada delgada analítica da fração S₃, revelada com luz UV (254 nm e 366 nm) mostrou a presença de dois compostos com R_f 0,84 e R_f 0,61, cuja bioautografia revelou que o composto com maior R_f apresentava maior halo de inibição (20mm). A fração S₃ foi então submetida à cromatografia em placa preparativa o que possibilitou a separação de quatro novas frações, onde A₄ apresentou halo de inibição de 21mm.

O espectro de infravermelho da fração bioativa A₄ mostrou bandas de absorção características que sugerem a presença de um grupo funcional amina alifática primária e um grupamento cetona provavelmente ligado a um ciclo de seis membros (Figura 4).

Desta forma, foi observada uma banda de absorção a 3.446cm⁻¹ que pode corresponder à deformação axial de N-H. A indicação da presença de um N-H na estrutura é reforçada pela existência de uma banda, de média intensidade, a 1.629cm⁻¹, que corresponde à deformação angular simétrica no plano de N-H de uma amina alifática primária. A banda a 1.182cm⁻¹ poderia ser originada pela deformação axial de uma ligação C-N não conjugado, normalmente presente em aminas alifáticas. Uma banda de absorção a 1.718

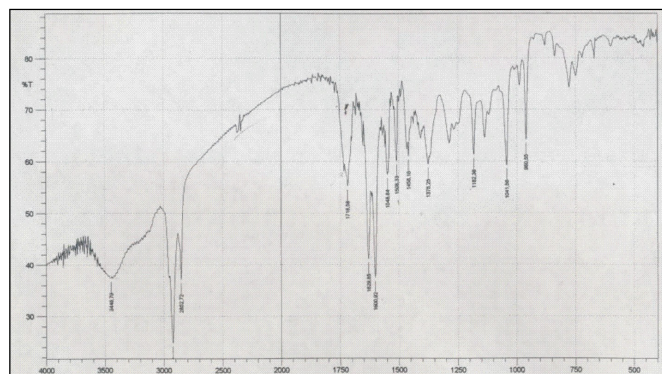


FIG. 4 - Espectro de absorção do infravermelho da fração A₄ produzida pelo endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A.

sugere a presença de grupo cetona ligada em um ciclo de seis membros. A presença de grupos alquila CH₃ e CH₂ foi sugerida em decorrência das bandas de absorção 2.852cm⁻¹, 1.458cm⁻¹ e 1.375cm⁻¹.

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI), foi preparada uma solução em dimetilsulfóxido da fração bioativa A₄ (1000µg/mL), sendo dez vezes mais concentrada que a soluções teste inicial 100µg/mL (Tabela I).

TABELA I
Concentração Mínima Inibitória (CMI) (mg/mL) da fração A₄ produzida pelo endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A

Microrganismo	CMI (µg/mL)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	50 - 100
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	50 - 100
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 2225	< 12.5
<i>S. aureus</i> UFPEDA 609 MR ^a	50 - 100
<i>S. aureus</i> UFPEDA 612 MR ^b	25 - 50
<i>S. aureus</i> UFPEDA 615 MR ^c	50 - 100

^aIsolada de granuloma; ^bIsolada de secreção nasal; ^cIsolada de hemocultura.

Entre as linhagens, de isolado clínico testadas, a que apresentou menor concentração mínima Inibitória foi *S. aureus* UFPEDA 612 MR^b (25-50µg/mL). Talvez por ser uma amostra de colonização, esta seja mais sensível que as demais linhagens *S. aureus* UFPEDA 609 MR^a e *S. aureus* UFPEDA 615 MR^c que possivelmente sejam amostras de infecção.

Entre as Concentrações Mínimas Inibitórias obtidas o melhor valor foi para *Micrococcus luteus* ATCC 2225 <12.5, podendo este valor ser considerado viável para a utilização em vivo.

Os valores das CMI determinadas neste teste foram considerados resistentes para as concentrações entre 25-50µg/mL e 50-100µg/mL. Intermediária para *Micrococcus luteus* ATCC 2225 na concentração de <12.5.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na seleção dos meios de cultura mostram que dos 5 meios de cultura utilizados, o ISP2 se destacou como o melhor meio de produção do composto bioativo. Neste caso, a concentração de 4% de glicose no meio ISP2 pode não ter interferido na produção do metabólito bioativo. Os demais meios de cultura (MPE, MPEM e MA), que apresentavam fonte de carbono de 20% e 15% foram menos eficientes na produção de compostos bioativos.

A interferência da concentração de carboidrato foi observada na produção de pirroindomicina por *S. rugosporus*, que em alta concentração de glicose (10%) diminuiu a produção desse antibiótico¹⁹.

A fonte de carbono interfere na produção de antibiótico através da repressão de enzimas biossintéticas²⁰. Portanto a seleção de meios de cultura é fundamental durante o processo de produção de antibióticos por microrganismos.

Neste trabalho, o composto bioativo foi extraído da massa celular utilizando solvente etanol em pH7. O extrato etanólico bruto apresentou melhor halo de inibição (35mm) para *B. subtilis* ATCC 6633 em comparação aos halos e

inibição (24mm) dos extratos dos solventes clorofórmio e acetato de etila em pH7.

Como exemplo pode ser citado alguns antibióticos obtidos a partir da extração de massa celular: o antimicrobiano e antitumoral produzido por *Streptovercillium* sp. (DAUFPE 13.729) que é extraído com etanol pH 7²¹. Igualmente Levorin, antifúngico heptaênico aromático, produzido por *Streptomyces levoris* 99/23²² foi extraído da biomassa e recentemente obtiveram um mutante de *Streptomyces levoris* 99/23, onde 80% de Levorin foi extraído da biomassa e 20% do líquido metabólico²³. Isto mostra a importância de localizar o antibiótico produzido pelo microrganismo, durante o processo de extração.

A fração bioativa A₄, obtida de fracionamento do extrato bruto etanólico, possui atividade antimicrobiana para algumas espécies de bactérias Gram-positivas e para diferentes isolados de *S. aureus* resistentes à Ampicilina, Cefalotina, Eritromicina, Oxacilina e Penicilina, sendo o melhor resultado observado para *M. luteus*. Vários antibióticos isolados de *Streptomyces* endofíticos apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas: Munumbicinas E-4 e E-5 de *Streptomyces* NRRL 3052²⁴ e Celastramina A de *Streptomyces* MaB-QuH-8¹⁶.

No espectro na região do infravermelho, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência. A presença dessas bandas características de grupos funcionais específicos permite a obtenção de informações estruturais úteis. Através da análise na região do infravermelho da fração bioativa A₄, verificou-se semelhança estrutural com o composto produzido por *Nonomuraea* sp. NM94²⁵.

5. CONCLUSÃO

A partir deste trabalho pode ser sugerido que o endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A isolado da planta medicinal *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, quando fermentado por 72h no meio de cultura ISP2, produz metabólito bioativo com atividade contra algumas espécies de bactérias Gram-positivas. Foi verificado que o extrato etanólico bruto da massa celular em pH7, apresentou maior halo de inibição para *B. subtilis* ATCC 6633, em comparação com o extrato bruto do líquido metabólico. Através de sucessivas purificações do extrato etanólico em cromatografias: coluna de sílica gel e em placa preparativa foi obtida a fração bioativa A₄, para a qual se determinou a Concentração Mínima Inibitória para *M. luteus*. CMI < 12,5µg/mL. Para esta mesma fração, a análise na região do infravermelho, sugere a presença de grupos característicos de amina primária alifática, cetona ligada a um anel de seis membros e grupos alquilas.

AGRADECIMENTOS

Os autores deste trabalho agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov. Today*. 5: 294-300, 2000.
- BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot.* 58(1): 1-26, 2005.
- R.X. TAN & W.X. ZOU. Endophytes : a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18: 448-459. 2001.
- PETRINI, O. *Fungal endophyte of tree leaves*. In: Andrews, J. & Hirano, S.S. (Eds.) *Microbial Ecology of Leaves*. New York: String-Verlag, 179-197, 1991
- AZEVEDO, J.L.; MacCHERONI, Jr.W.; PEREIRA, J.O. & ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Elect. J. of Biotechnol.* 3 (1): 40-65, 2000
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI Jr, W.; van ELSAS, J.D.; van VUURDE, J.W. L. & AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Env. Microbiol.* 68 (10): 4906-4914, 2002.
- DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 455-463, 1999.
- NAHYUN, K.; JIN, C.S.; WONCHEOL, K.; BANG, Y.H.; BEOM, S.K.; YOUNG-SOO, H. & DONGHO, L. Cytotoxic 6-Alkylsalicylic Acids from the Endophytic *Streptomyces laceyi*. *J. Antibiot.* 59 (12): 797-800, 2006.
- TUNTIWACHWUTTİKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITI, S. & TAYLOR, W.C. Lansai A-D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1. *Tetrahed.* 64: 7583-7586, 2008
- SILVA, R.E.A. *Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos e actinobactérias endofíticas isolados de Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. (Rabo de Raposa). 2006, 78 p. Tese de Mestrado em Biotecnologia – Universidade Federal de Pernambuco, PE.
- PRIDHAM, T.G.; GOTTILIEB, D. The utilization of carbon compounds by some Actinomycetes as na AID for species determination. *J. Bacteriol.* 56: 107-114, 1948.
- KAWAMURA, T.; TAGO, K.; BEPEU, T.; ARIMA, C. Taxonomy of the producing strain and study conditions for production of the antibiotic. *J. Antibiot.* 3(29): 242-247, 1976.
- BOMFIM, S.M. *Isolamento de metabólitos antifúngicos de Streptomyces sp. UFPEDA 3347, endófito de Momordica charantia L. (Cucurbitaceae)*. 2008, 75 p. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco, PE.
- TRIPATHI, C.K.M.; PRAVEEN, V.; SINGH, V. & BIHARI, V. Production of antibacterial and antifungal metabolites by *Streptomyces violaceusniger* and media optimization studies for the maximum metabolite production. *Med. Chem. Res.* 13(8/9): 790-799, 2004.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Path.* 45: 493-496, 1966.
- PULLEN, C.; SCHMITZ, P.; MEURER, K.; BANBERG, D.D.V.; LOHMANN, S.; FRANÇA, S. de C.; GROTH, I.; SCHLEGEL, B.; MOLLMANN, U.; GOLLMICK, F.; GRAFE, U. & LEISTNER, E. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of *Celastraceae*. *Plant.* 216: 162-167, 2002.
- LANCINI, G.; LORENZETTI, C. *Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites*. Ed. Illustrated, 1993, 236 p.
- KONEMAN, W.E.; ALLEN, D. S.; JANDAN, W.M.; SCHRECKENBERG, P.C. & Jr, W.C.W. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido*. 5a. ed. MEDSI, 2001, 1465p.
- ABBANAT, D.W.; MAIESE & M. GREENSTEIN. Biosynthesis of the pyrrolidomycins by *Streptomyces rugosporus* LL – 42D005; Characterization of nutrient requirements. *J. Antibiotics* 1999, 52:117-126.
- SANCHEZ, S. & DEMAIN, A.L. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzym. Technol.* 31: 895-906, 2002.
- LIMA, C.S.A.; SILVA, R.F.; ABREU, S.M.B.; SENA, K.X.F.R.; NASCIMENTO, S.C. & AMORIM, E.L.C. Atividade antimicrobiana e antitumoral de *Streptomyces* sp. (DAUFPE 13. 729). *Rev. Lect.* 20 (2): 161-165, 2002.
- KULJBKAKH, V.O.; SOKOLOV, L.B.; SVESHNJKOV, J.F.; KUZNESTSOVA, A.O.; KUZNESTSOVA, L.; MALINOVSKAJA, N.; PENZA and RAIGORODSKAJA, V.J. & KHOLODOVA, G.V. *Method for extracting the antibiotic Levorin from a culture medium*. United States Patent Office. 15, 1969
- KOZHUHAROVA, L. & KOLEVA, V.G.L. Isolation, purification and characterization of Levorin produced by *Streptomyces levoris* 99/23. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1-5, 2008.
- CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M.A.M.; TEPLow, D.B.; STEVENS, D. & YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kentia nigriscans*. *FEMS Microbiol, Lett.* 255: 296-300, 2006.
- BADJI, B.; MOSTEFAOUI, A.; SEBAOU, N.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; SEGUIN, E. & TILLEQUIN, F. Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 403-412, 2007.

Endereço eletrônico
Ivana Glauca Cunha
e-mail: glau_iv@hotmail.com