

Desenvolvimento e Validação de Ensaio Biológico para a Triagem de Compostos Bioativos Candidatos a Agroquímicos para Culturas de Cana-de-Açúcar

Gustavo M. A. de Lima (PG), Renata V. Bueno (PG), Rafael V. C. Guido (PQ)*

*rvcguido@ifsc.usp.br

Laboratório de Química Medicinal e Computacional – LQMC, Centro de Inovação em Biodiversidade e Fármacos – CIBFar-CEPID, Instituto de Física de São Carlos – IFSC, Universidade de São Paulo – USP

Palavras Chave: cana-de-açúcar, escaldadura das folhas, ensaio biológico, agroquímicos

Introdução

A proeminente utilização de fontes renováveis de energia fez do Brasil a primeira economia sustentável em biocombustíveis.^{1,2} O avanço do setor agroindustrial brasileiro é chave para o enorme sucesso da utilização da cana-de-açúcar na produção do etanol combustível. O aumento da produção sustentável de bioenergia derivada da cana-de-açúcar gera benefícios ambientais e econômicos significativos,³ contudo, a ocorrência e a severidade de fitopatologias representam um dos principais limitantes para a expansão do setor. A escaldadura-das-folhas é uma fitopatologia causada pela bactéria gram-negativa *Xanthomonas albilineans*, sendo encontrada em praticamente todas as regiões do mundo onde a planta é cultivada. A necessidade de reforma precoce no canavial e perda de produtividade pela diminuição da qualidade do caldo extraído da planta estão entre os principais danos causados pela fitopatologia. Atualmente, não existem alternativas químicas ou biológicas para o controle dessa doença. Portanto, quando a fitopatologia é identificada no campo há necessidade urgente de reforma de toda a plantação para contenção da bactéria. Nesse contexto, é extremamente necessário a descoberta e desenvolvimento de moléculas bioativas como candidatos a novos agroquímicos para a cultura de cana-de-açúcar. Para tanto, foi desenvolvido e validado um novo bioensaio para a triagem e identificação de moléculas bioativas frente a cultura de *X. albilineans*. O método permite a determinação de propriedades biológicas de moléculas como a Concentração Inibitória Mínima (MIC, do inglês, *minimum inhibitory concentration*) e a Concentração Não-Inibitória (NIC, do inglês, *non-inhibitory concentration*). A padronização e validação do bioensaio é uma etapa fundamental para a triagem de compostos naturais e sintéticos frente a cultura de *X. albilineans*.

Resultados e Discussão

A cultura de *X. albilineans* foi adquirida da coleção de fitopatógenos do Instituto Biológico (IBSBF 724) e validada por PCR. Os ensaios foram conduzidos utilizando-se a incubadora Bioscreen Microbiological Analyser (Labsystem, Helsinki, Finland) em placas de 100 poços (10x10). A *X. albilineans* foi cultivada utilizando-se o meio seletivo XAS na temperatura de 28 °C e 150 rpm. O crescimento bacteriano no meio de cultura foi monitorado a cada 10 min durante 72 h ($\lambda = 600$ nm). As curvas de crescimento (Figura 1A) foram tratadas com a ferramenta GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., Califórnia). Os dados foram ajustados ao modelo matemático descrito pela equação de Gompertz.⁴ Os valores de MIC e NIC foram determinados calculando-se a área sob a curva (i.e., definida como a fração entre a área sob a curva do controle negativo e a área sob a curva do controle positivo) em função do logaritmo das concentrações dos controles positivos (Figura 1B). Para validação do ensaio e identificação de controles positivos foram empregados os antibióticos tobramicina, gentamicina, amicacina, tetraciclina e ampicilina. As concentrações dos antibióticos variaram entre 5 mg.mL⁻¹ e 5 μ g.mL⁻¹. Todas as medidas foram realizadas em

triplicata e as médias de densidade óptica para cada concentração foram utilizadas para os cálculos dos valores de MIC e NIC.

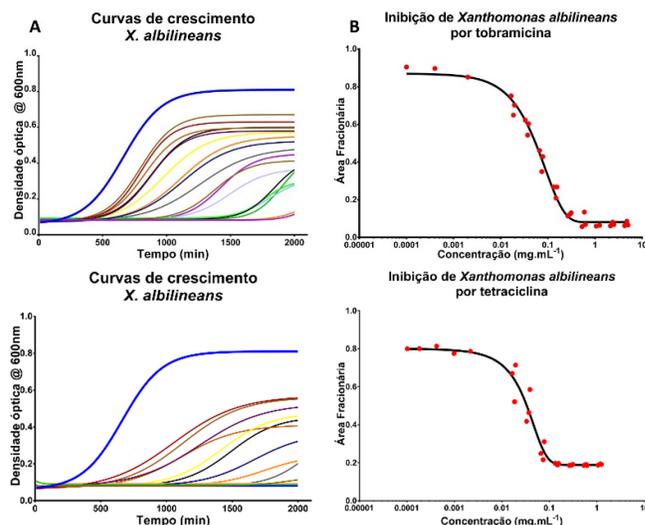


Figura 1. (A) Curvas de crescimento da *X. albilineans* na presença dos antibióticos tobramicina e tetraciclina. (B) Gráfico da inibição do crescimento bacteriano construído com os valores das áreas calculadas a partir das curvas da Figura 1A.

A tobramicina apresentou valores de MIC = 22±4 μ g.mL⁻¹ e NIC = 1,3±0,2 μ g.mL⁻¹ enquanto a tetraciclina apresentou valores de MIC = 9±1 μ g.mL⁻¹ e NIC = 1,2±0,2 μ g.mL⁻¹. Os antibióticos gentamicina, amicacina e ampicilina não apresentaram atividade inibitória frente a cultura de *X. albilineans*. Para avaliação da reprodutibilidade e estabilidade do método, o mesmo ensaio padronizado foi reproduzido cinco vezes em dias não consecutivos com diferentes lotes de culturas de *X. albilineans*. Os valores de MIC e NIC determinados para a tobramicina e tetraciclina, em todos os ensaios realizados, apresentaram valores médios dentro do intervalo indicado pelo desvio médio padrão.

Conclusões

O emprego de tecnologias e métodos modernos em Química Medicinal é uma estratégia extremamente interessante para o desenvolvimento de novos agroquímicos potentes, seletivos e seguros para o meio ambiente. Nesse trabalho, um novo método foi desenvolvido e validado para a triagem e determinação de propriedade biológica de moléculas candidatas a agroquímicos. Os resultados deste trabalho possibilitarão a descoberta de novos agentes antimicrobianos úteis para o controle da escaldadura-das-folhas em culturas de cana-de-açúcar.

Agradecimentos

CAPES, FAPESP (BIOEN - Jovem Pesquisador #2011/08042-9)

¹ Lichts, F.O. "Industry Statistics: 2010 World Fuel Ethanol Production". Renewable Fuels Association, 2011.

² Budny, D.; Sotero, P. "Brazil Institute Special Report: The Global Dynamics of Biofuels". Brazil Institute of the Woodrow Wilson Center, 2008.

³ Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil; Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE: Brasília, 2009.

⁴ Lambert, R. J. W.; Pearson, J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. Journal of Applied Microbiology, 88(5), 784–790, 2000.