

Otimização das condições de crescimento e produção de metabólitos secundários por *Penicillium oxalicum* e *P. citrinum* de origem marinha

Eli F. Pimenta¹ (PG), Mirna H. R. Seleglim² (PQ), Aristeu G. Tinini³ (PQ), Roberto G. S. Berlinck¹ (PQ)*. email: rgsberlinck@iqsc.usp.br

¹Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil,

²Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP,

³Departamento de Química Orgânica, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP.

Palavras Chave: Microrganismos, quimiometria, metabolismo secundário, extração em fase sólida.

Introdução

O metabolismo secundário de microrganismos é extremamente diversificado, proporcionando a descoberta de novos compostos químicos bem como novas classes de compostos. Todavia, a produção de metabólitos secundários por parte de fungos depende intrinsecamente das condições utilizadas para seu crescimento e desenvolvimento (tempo de incubação, composição do meio de cultura, temperatura, pH).

Neste trabalho propomos uma nova metodologia para a produção e extração de metabólitos secundários de duas linhagens de fungos isolados de ambiente marinho. O método desenvolvido faz uso de quimiometria como ferramenta para encontrarmos condições de crescimento ótimas para diferentes linhagens de fungos.

Resultados e Discussão

As linhagens de fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium oxalicum* foram cultivadas em meio de cultura líquido. Os componentes do meio de cultura (original) foram os seguintes: glicose 2%, amido 1%, soytone 2%, peptona 0,5%, extrato de carne 0,03%, extrato de levedura 0,5%, em água do mar artificial, pH 8,0, 25°C e tempo de incubação de 7 dias.

Cada componente do meio de cultura foi variado de maneira a que as duas linhagens fossem submetidas a crescimento e produção de metabólitos sob diferentes condições. Desta maneira, utilizamos metodologia multivariada para variar as condições de crescimento e verificar como estas variações influenciavam na produção de metabólitos secundários por parte das duas linhagens de fungos. Após realizar todos os experimentos multivariados para as duas linhagens de fungos, os meios de cultura de cada experimento foram filtrados para separar o micélio do meio líquido. O meio líquido de cada experimento de crescimento foi submetido à extração em fase sólida (SPE) em coluna C₁₈ (eluente: gradiente de MeOH em H₂O). O micélio de cada experimento foi misturado com MeOH, sonificado por 1 min e filtrado. Todas as frações (SPE) e extratos metanólicos dos micélios foram evaporados

e analisados por HPLC-PDA. As análises foram feitas em uma coluna de fase reversa C₁₈ com um gradiente MeOH-H₂O. Cada cromatograma foi analisado pela integral da área dos picos no intervalo de tempo que corresponde de 10 a 25 minutos. Os resultados das análises por HPLC-PDA foram tabulados em função das condições de crescimento utilizadas em cada experimento. Os dados obtidos foram analisados por métodos quimiométricos de primeira (uma variável) e segunda ordem (duas variáveis). Para a linhagem *P. oxalicum*, a salinidade do meio de crescimento mostrou ser um parâmetro pouco significativo na indução do metabolismo secundário; já a composição de nutrientes do meio de crescimento demonstrou ser um parâmetro significativo, sendo necessário se utilizar 60% de sua composição original; o tempo de crescimento também demonstrou ser um parâmetro significativo para a produção de metabólitos secundários, com um período ideal de incubação de 14 dias; o pH 6,0 do meio de crescimento também mostrou influenciar a produção de metabólitos; finalmente, a temperatura de 30 °C mostrou ser ótima para a produção de metabólitos secundários. Análises similares foram realizadas para a linhagem *P. citrinum*, demonstrando que um ajuste fino dos fatores que influenciam o crescimento e produção de metabólitos pode ser realizado utilizando-se análise quimiométrica.

Conclusões

A otimização das condições de crescimento e produção de metabólitos por parte de microrganismos pode ser realizada de maneira rápida e eficiente utilizando-se métodos quimiométricos de análise.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao CEBIMar pelo apoio logístico e à FAPESP pelo apoio financeiro, processos (05/57260-8 e 03/08899-0).