

Isolamento e caracterização de PHB de baixo peso molecular produzido por microrganismo com atividade herbicida

Tânia Petta^{1*}(PG), Fernanda Sales Figueró¹(IC), Luis Henrique Souza Guimarães²(PQ), Itamar Soares de Melo³(PQ) e Luiz Alberto Beraldo de Moraes¹(PQ).

taniapetta@pg.ffclrp.usp.br

¹ Departamento de Química-FFCLRP ²Departamento de Biologia-FFCLRP. ³Laboratório de Microbiologia Ambiental Embrapa-Jaguariúna.

Palavras chave: Espectrometria de massas, bioherbicidas, microrganismos, bioensaio, fitotoxicidade, polihidroxibutiratos

Introdução

Microrganismos são capazes produzir uma série de metabólitos cujas características são variadas em relação à diversidade em estrutura e atividade biológica. Compostos fitotóxicos produzidos por microrganismos são potenciais para serem empregados como herbicidas, pois possuem alvos moleculares específicos, são biodegradáveis e fornecem novas estruturas químicas que servem de modelo para o desenvolvimento de novos pesticidas.¹ O objetivo desse trabalho é aplicar a versatilidade da espectrometria de massas, para uma análise rápida e eficiente de fitotoxinas provenientes de processos de fermentação de microrganismos. No presente trabalho foi identificado um macropentólido cíclico, um composto que pertence à família dos polihidroxibutiratos (PHBs). Os PHBs com cadeias lineares de alto peso molecular oriundos da fermentação de microrganismos são de grande importância comercial, pois são biopolímeros que possuem propriedades semelhantes ao polietileno sendo potenciais alternativas biodegradáveis aos plásticos petroquímicos.²

Resultados e Discussão

Cinco bactérias simbióticas isoladas do esclerócio do fungo fitopatogênico *Sclerotium rolsii*, foram fermentadas em meio líquido BD (batata-dextrose) a 28°C e 130 rpm. Seus respectivos extratos orgânicos foram submetidos à bioensaio de fitotoxicidade com *Lemna minor*, onde foi constatada que a bactéria EMB5B foi ativa, inibindo o crescimento e causando início de necrose nas pétalas. Esta foi fermentada em maior escala por 15 dias, e seu extrato orgânico fracionado por cromatografia líquida originando cinco frações. O ensaio com *L. minor* revelou uma fração ativa, F1. O ESI-MS no modo positivo dessa fração apresentou um "cluster" de sinais em m/z 448 ($M + NH_4$)⁺, m/z 453 ($M + Na$)⁺ e m/z 469 ($M + K$)⁺, que confirmam que o princípio ativo possui uma massa molecular de 430 Da e que, além disso, possui grande afinidade por cátions. O ESI-MS/MS mostrou que a fragmentação do sinal de m/z 431 ($M+H$)⁺ ocorre através de perdas consecutivas de unidades

monoméricas de 86 u.m.a. ($C_4H_6O_2$). Esses dados, juntamente com os dados de ¹H NMR,

¹³C NMR e IR para o composto ativo, foram idênticos aos da literatura para o composto previamente sintetizado e reportado por Seebach e colaboradores, 1988³ e permitiu sua caracterização estrutural, que está apresentada na Figura 1a, um oligômero cíclico de massa molecular 430,1839 e fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_{10}$ pertencente à família dos polihidroxibutiratos (PHBs).

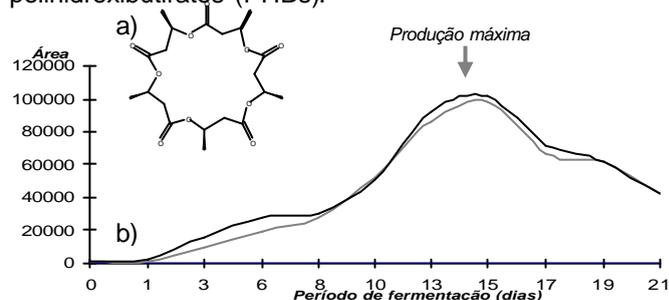


Figura 1. Curva de monitoramento da produção do princípio ativo.

A produção desse metabólito foi monitorada a cada 2 dias, em um total de 21 dias por LC-MS/MS, no modo MRM (Multiple Reaction Monitoring) (Figura 1b) com o monitoramento das transições m/z 431>155 para o composto ativo protonado (curva em preto) e m/z 453>281 para o composto ativo sodiado (curva em cinza), onde foi constatado que com 15 dias a produção do metabólito pela bactéria é máxima. Através da derreplicação do extrato bruto EMB5B foram identificados outros PHBs de cadeias lineares com diferenças de massa de 86 u.m.a.

Conclusões

O composto ativo produzido pela bactéria EMB5B, já foi previamente sintetizado, porém nunca foi isolado de fontes naturais e é a primeira vez que sua atividade fitotóxica é relatada. Além dos PHBs empregados como biopolímeros as bactérias também produzem PHBs de baixos pesos moleculares que podem apresentar importantes aplicações.

Agradecimentos

CNPQ, FAPESP

¹ Demain, A. L.. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 52, 455.

² Anderson, A. J.; *Microbiol. Mol. Bio. l Rev.* **1990**, 54, 450.

³ Seebach, D., Brändli, U., Schnurrenberger, P., *Helv. Chim. Acta.* **1988**, 71, 155.