Avaliação da produção de policetídeos macrolídicos por linhagens de *Streptomyces* sp. isoladas no território nacional

Leila Regina Giarola¹ (IC), Luciana Gonzaga de Oliveira^{2,*} (PQ)

¹Curso de Farmácia, Universidade Estadual de Campinas.

²Instituto de Química, UNICAMP, Caixa Postal 6154, CEP 13084-971, Campinas, São Paulo, Brasil. E-mail: luciana@iqm.unicamp.br

Palavras Chave: *Streptomyces*, antibiótico, metabólito secundário, policetídeos macrolídicos.

Introdução

Streptomyces são bactérias Gram positivas, pertencentes ao grupo dos *Actinomicetos*, amplamente espalhadas no solo. São conhecidas pela produção de antibióticos policetídeos e outros metabólitos secundários biologicamente ativos¹ e estruturalmente complexos.

A produção dos metabólitos se dá por uma complexa via biossintética, influenciada por vários fatores ambientais e fisiológicos, sob atuação de enzimas modulares conhecidas como policetídeo sintases (PKS), e peptídeo sintetases não-ribossomais (NRPS). Utilizando ferramentas de biologia molecular é possível modificar os genes que expressam estas enzimas e obter metabólitos modificados conhecidos como produtos naturais “não naturais”.²

Neste trabalho estamos apresentando os primeiros resultados da avaliação da produção de antibióticos por *Streptomyces* isolados de *Citrus* ssp.³

Resultados e Discussão

Os microrganismos A30 e B1, *Streptomyces cyaneus* e *Streptomyces* sp. respectivamente, foram cultivados em 7 meios de cultura diferenciados utilizados em triagem industrial⁴ (Medium B, C, INA, RA3, V6, AF/MS e GYM). O processo fermentativo foi monitorado por 14 dias e foram retiradas alíquotas após 4, 10 e 14 dias. As alíquotas foram saturadas com NaCl(s), extraídas com AcOEt e os extratos analisados por CCD, RMN e CG-MS. O processo de identificação dos metabólitos encontra-se em andamento.

Qualitativamente, foram feitos testes de difusão em ágar para verificar a possível produção de antibióticos.⁵ Após inoculação das linhagens (crescimento por 5 dias a 30 °C, inóculo vertical), culturas padrão de *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *S. triphymurium* e *B. megaterium*, foram semeadas em paralelo na direção horizontal. As placas foram incubadas por mais 24 horas e foi possível verificar inibição do crescimento de todos os microrganismos, mais acentuada para *S. triphymurium* e *B. megaterium*, mostrando que compostos ativos estavam difusos no meio.

Em paralelo, para avaliar o potencial das linhagens na produção de policetídeos e peptídeos não-ribossomais, foram feitas triagens por PCR,

seguindo o protocolo descrito por Ayuso e Genilloud.⁶ Foram utilizados *primers* degenerados desenhados para amplificar regiões específicas. Este procedimento permite que seja feito um trabalho de derreplicação, por comparação com seqüências descritas em banco de dados e relacionadas a compostos já identificados. Os melhores resultados foram obtidos para ampliações de domínios interligados de cetosintase e metilmalonil transferase (PKS) utilizando os pares de *primers* K1F/M6R e para seqüências de adenilação em NRPS. Utilizando uma reação de PCR Multiplex, empregando os *primers* K1F/M6R e A3F/A7R, foi possível amplificar ambas as seqüências simultaneamente, o que pode facilitar o processo de triagem. Outras reações de amplificação foram realizadas (buscando seqüências conservadas de domínios KS α e KS β em PKS-II, mas nas condições utilizadas as ampliações foram bastante inespecíficas.

Conclusões

Os resultados observados no teste de difusão em placa permitiram verificar que os microrganismos testados produzem antibióticos, dada inibição de crescimento das espécies testadas. As informações obtidas por PCR permitiram confirmar que as linhagens em estudo apresentam potencial para produção de policetídeos macrolídicos e peptídeos não-ribossomais. Os próximos passos envolvem subclonagem e seqüenciamento dos genes amplificados para derreplicação por comparação em bancos de dados (NCBI). Melhores condições para amplificação de outras seqüências estão sendo testadas, assim como a identificação dos metabólitos produzidos nas fermentações.

Agradecimentos

FAEPEX e IQ/UNICAMP, FAPESP, Prof. Wellington L. Araújo.

¹ Kieser, T; Chater, K. F.; Bibb, M. J.; Buttner, M. J.; Hopwood, D. A.; *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation, Norwich: England, 2000.

² Khosla, C.; *Chem. Rev.* 1997, 97, 2577.

³ Isoladas no grupo de pesquisas do Prof. Wellington L. Araújo – NIB-UMC

⁴ Marinelli, F., comunicação pessoal.

⁵ Difco™ Antibiotic Medium 1 e Antibiotic Medium 2.

⁶ Ayuso, A.; Genilloud, O.; *Microb. Ecol.* 2005, 49, 10.