

Desenvolvimento do Processo de Produção de Valinomicina por *Streptomyces carpaticus*

F. B.D. PONTES¹, A. BAPTISTA NETO¹

¹ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia
E-mail: feer.pontes@hotmail.com

RESUMO- Atualmente a busca por novos compostos bioativos tem sido cada vez maior, a fim de obter substâncias que apresentem atividades antimicrobiana, anti-HIV, anti-tumoral, entre outras, desta forma, pesquisas em áreas e regiões ainda pouco exploradas são realizadas para que seja possível estudar e analisar microrganismos que produzam tais substâncias. As bactérias do gênero *Streptomyces* são importantes produtoras de diversos metabólitos secundários de grande interesse. *Streptomyces carpaticus* é uma bactéria de origem marinha, e produtora da Valinomicina, composto ionóforo com potencial aplicação como aditivo em ração animal e como antibiótico em dornas de fermentação de etanol. Além disso, o microrganismo em questão é capaz de produzir pigmentos com possível interesse industrial. Desta forma, o projeto objetivou o estudo e avaliação de diferentes meios de cultivo encontrados na literatura para a produção de valinomicina, além disso, caracterizou-se o caldo de cultivo em diferentes intervalos de tempo, pela metodologia de massa seca, identificando que os diferentes componentes do meio interferem diretamente no crescimento bacteriano e na produção dos biocompostos. Através de testes de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) determinou-se ausência ou presença de valinomicina. Os meios NBIMCC 185, AIRDP e IPS4 propiciaram a produção desta substância, sendo meios potenciais para futuras etapas do projeto.

1. INTRODUÇÃO

A crescente necessidade em encontrar novos compostos bioativos que possuam atividades antimicrobiana, anti-HIV, anti-tumoral, entre outras, está propiciando grande aumento nas buscas por fontes alternativas para a obtenção destes compostos, para isto tem-se estudado, principalmente, microrganismos que até então são pouco explorados. Sabe-se que os microrganismos são excelentes produtores das mais variadas moléculas através de seu metabolismo primário ou secundário, as quais muitas vezes são dificilmente produzidas sinteticamente, sendo que a produção destas moléculas ocorre para as mais diversas finalidades, porém todas voltadas à perpetuação da espécie, e em muitos casos podem trazer benefícios a outros organismos (RUIZ, 2010). Cerca de 70% de todas as substâncias bioativas conhecidas são produzidas pelos Actinomicetos (RACHEV *et al*, 2003), bactérias gram-positivas de importante papel na decomposição da matéria orgânica (KORN-WENDISCH, 1992).

Visando atender a demanda por novos compostos bioativos, tem-se intensificado a procura por locais que contenham microrganismos ainda pouco explorados, como exemplo o ambiente marinho. Estes microrganismos, que ocupam locais de temperaturas e pHs extremos, desenvolveram capacidades metabólicas únicas fornecendo grande potencial para produzir compostos não produzidos pelos microrganismos terrestres (CARVALHO & FERNANDES, 2010), o que os torna altamente vantajosos.

Estão sendo desenvolvidas novas pesquisas relacionadas ao *Streptomyces carpaticus*, microrganismo de origem marinha, que por ser do grupo das actinobactérias é importante fonte de metabólitos secundários, incluindo a valinomicina A princípio, esta molécula foi isolada por Brockmann e Schmidt-Kastner e pode ser utilizada para os mais diversos fins, uma vez que apresenta atividade antibiótica e antifúngica, o que permite sua aplicação em dornas de fermentação atuando como antibiótico. Além disso, a valinomicina apresenta a capacidade de solubilizar em lipídeos, possibilitando sua atuação no transporte de íons através da membrana celular (XU et al, 2016). Pesquisas recentes demonstram que a adição de valinomicina a moléculas responsáveis pelo transporte de ânions pode ser benéfica, sendo assim, o estudo de meios alternativos para otimizar a produção deste composto é interessante uma vez sua aplicação pode ser um grande passo nas áreas biomédica e biotecnológica (XU et al, 2016).

Objetivando a obtenção de valinomicina, é necessário formular meios de cultivos capazes de proporcionar o crescimento celular e que propiciem maiores rendimentos de produção desta substância (FERREIRA, 2011). Considerando-se o exposto, o presente projeto tem por finalidade o estudo do crescimento e processo de produção de valinomicina em diferentes meios de cultivo por *Streptomyces carpaticus*, isolado de sedimentos marinhos coletados em São Sebastião, litoral sul de São Paulo.

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismos E Reativação Das Cepas

Utilizou-se *Streptomyces carpaticus* isolado a partir de sedimentos marinhos em São Sebastião-SP, armazenados em solução de glicerol 20% a -80°C.

2.2. Meios De Cultivo

Utilizaram-se os meios GYM (extrato de levedura (4,0g/L); glicose (4,0g/L); extrato de malte (10,0g/L); CaCO₃ (1,0g/L)) para reativação e meios NBIMCC (extrato de levedura (1g/L), glicose (10g/L), extrato de carne (4g/L), peptona (4g/L), cloreto de sódio (2,5 g/L)), IPS4 (amido solúvel (10g/L), MgSO₄ 7H₂O (1g/L), cloreto de sódio (1g/L), (NH₄)₂SO₄ (1g/L), CaCO₃ (2g/L), solução de sais traço* (1mL/L)), AIRDP (amido solúvel (10g/L), extrato de levedura (4g/L), peptona (2g/L), MI (farinha de soja (10g/L), glicose (10g/L), CaCO₃ (1g/L), cloreto de sódio (5g/L)), DSMZ (extrato de levedura (4g/L), glicose (4g/L), glicose (10g/L), extrato de malte (10g/L), sal marinho (33,33g/L) como meios de produção. Todos os meios foram ajustados para o pH de 7.2, pH ótimo para o microrganismo em questão.

2.3. Cultivos Em Mesa Incubadora Rotativa

Na etapa de reativação, 3,5mL de suspensão de células vegetativas de bactérias contidas nos criotubos foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 500mL contendo 50mL de meio GYM e incubados por 24h. Na etapa de produção, 5mL da suspensão anterior foram adicionados a Erlenmeyers de 500mL contendo 45mL de meio de produção e incubados por 120h. O cultivo foi realizado a 28°C, controlado pelo “shaker” agitado orbitalmente a 250rpm. Ao final do cultivo, o caldo passou por etapa de centrifugação (11.000rpm, 15 minutos, 25°C) para posterior análise das amostras quanto à produção de pigmentos.

2.4. Determinação Da Concentração Celular

A concentração celular foi obtida por análise gravimétrica através da determinação da massa seca. Foram obtidas amostras de diferentes caldos de cultivo nos intervalos de 72h, 96h e 120h, os quais passaram por dois ciclos consecutivos de centrifugação (11.000rpm, 15 minutos, 25°C). Após o primeiro ciclo, o precipitado foi ressuspêndido em água destilada, passando por nova centrifugação, ao final o pellet foi mantido em estufa a 100°C em recipiente cuja massa era conhecida. O cálculo da concentração celular foi expresso na relação da massa seca e volume da amostra (45mL).

2.5. Determinação Da Produção De Valinomicina

Inicialmente, os conteúdos armazenados dos sobrenadantes do 1º ciclo de centrifugação passaram por sistema de extração líquido-líquido de duas fases. A fase orgânica foi composta por acetato de etila. O conjunto foi formado por 30mL da fase aquosa e 30mL do sobrenadante, em seguida, agitado e mantido em repouso até completa separação das fases. Em seguida a fase topo (orgânica) foi secada em evaporador speedvac. Para a determinação da presença de valinomicina, em conjunto com o Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, da Universidade de São Paulo- USP Ribeirão Preto realizou-se testes de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

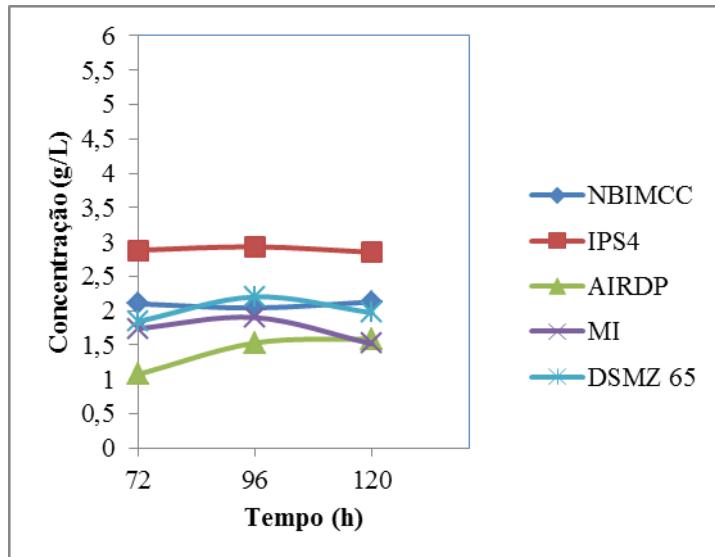
3. RESULTADOS

3.1. Avaliação Do Meio De Cultivo

Os dados obtidos para concentração celular através da análise de massa seca indicaram valores aproximadamente constantes nos três pontos analisados para todos os meios, o que possibilita inferir que o máximo crescimento já havia sido atingido a 72h. Porém, por ser um método de pouca precisão, o qual é influenciado por variáveis externas, como umidade ao ser retirado da estufa, ocorreram algumas pequenas variações nos resultados, como observado na Figura 1.

Em estudo realizado por Ferreira (2011) determinou-se a máxima concentração celular em aproximadamente 24h, atingindo em 72h valores de concentração celular próximas às encontradas neste trabalho, ou seja, valores variando entre 2 a 3g/L para os meios NBIMCC 185 e DSMZ 65.

Figura 1- Concentração celular nos intervalos de 72, 96 e 120h para os cinco meios de cultura estudados.



Na Figura 1 identifica-se que o maior crescimento ocorreu no meio IPS4, o qual não continha em sua composição um açúcar simples e sim um açúcar complexo, o amido solúvel, sendo assim evidencia-se a capacidade do microrganismo em hidrolisar este amido e utilizá-lo em seu metabolismo, porém o meio AIRDP, também contendo amido solúvel em sua composição, não apresentou crescimento tão favorável, o que talvez possa ser justificado pela ausência de diversos sais presentes no meio IPS4. De maneira geral, os meios apresentaram concentração celular semelhante para os pontos analisados, desta forma, acredita-se que a diferença dos substratos, das fontes de açúcar e de nitrogênio não afetaram fortemente o crescimento bacteriano.

3.2. Avaliação Da Produção De Valinomicina

Através de cromatografia líquida aplicada a espectrometria de massas determinou-se em quais dos meios ocorreu produção de valinomicina. As amostras que apresentassem picos nos tempos de retenção (*tr*) característicos para valinomicina, determinados em análise, eram as amostras que continham esta molécula. Nos meios AIRDP, IPS4 e NBIMCC 185 foi identificado a presença de valinomicina.

Esta molécula poderia ser identificada ligada a íons hidrogênio (H^+) atingindo massa molar final 1111,7g/mol, amônio (NH_4^+) de massa molar final 1128,7g/mol, sódio (Na^+) com massa molar final 1133,7 g/mol e por fim ligada a íons potássio (K^+) tendo massa molar final 1149,7 g/mol quando percebido picos nos tempos de retenção determinados. Para o meio AIRDP determinou $tr= 26,68\text{min}$, para IPS4 $tr=26,71$ e para NBIMCC 185 $tr=26,65$. As amostras referentes aos meios DSMZ 65 e MI não possuíram picos no tempo de retenção correspondente ao composto valinomicina.

A Figuras 2 e 3 demonstram os picos nos tempo de retenção e as massas moleculares encontradas no *tr* para os meios AIRDP, curvas características foram determinadas para os outros dois meios mencionados

Figura 2- Análise em LC-MS evidenciando pico no tempo de retenção característico para valinomicina

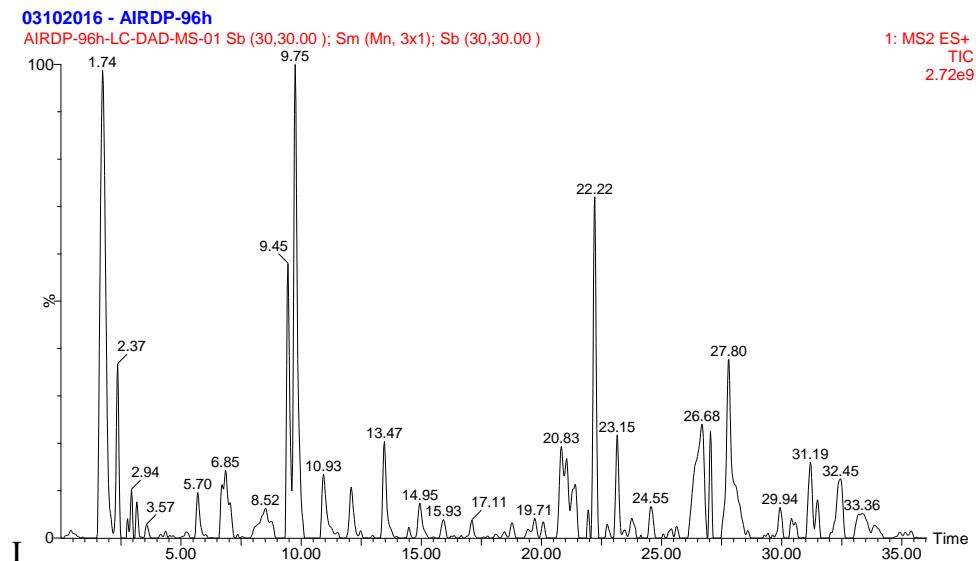
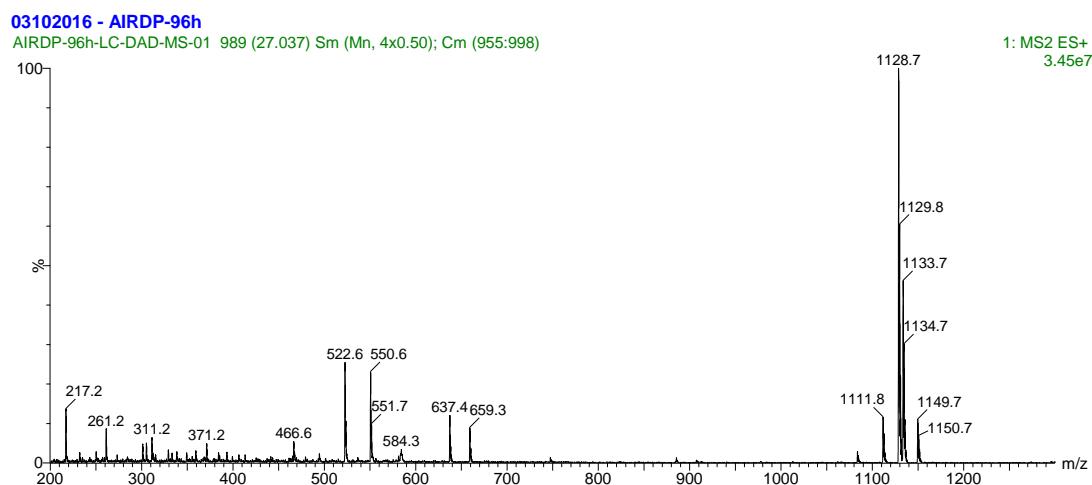


Figura 3- Massa moleculares encontradas identificando valinomicina ligada a íons NH_4^+ , Na^+ e (K^+)



4. CONCLUSÃO

Os meios analisados demonstraram ação semelhante quanto ao crescimento bacteriano, porém a produção de valinomicina foi influenciada pelos componentes presentes em cada um dos meios, visto que dois dos cinco meios analisados demonstraram resultados negativos quanto à produção desta substância. Ou seja, este estudo torna-se importante por demonstrar que diferentes composições de meios podem contribuir para maior produção deste antibiótico com potencial aplicação em diversos setores industriais. O estudo dos biocompostos produzidos por *Streptomyces carpaticus*, incluindo a valinomicina ainda é recente por se tratar de um microrganismo pouco explorado, desta forma fica estabelecido neste estudo meios que permitem boa produção desta molécula. Levando em conta o crescimento celular e a produção de valinomicina, considera-se como melhor meio o IPS4, sendo este adotado para etapas futuras do projeto em que será avaliada a ação de valinomicina produzida frente a contaminações em dornas de fermentação.

5. AGRADECIMENTOS

Ao professor Luiz Alberto Beraldo de Moraes e Eduardo José Crevelin da Universidade de São Paulo (FFCLRP/USP) por disponibilizarem tempo e estrutura de seu laboratório para desenvolver a metodologia de LC-MS.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, C. C. C. R. de, FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Marine Drugs*, v.8, p. 705-727, 2010.

FERREIRA, D. Produção, isolamento e identificação de metabólito com atividade antitumoral de cultura de *Streptomyces carpaticus*.; 141f.; Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

KORN-WENDISCH, F. KUTZNER, H. J. The Family Streptomycetaceae. In: BALLOWS, A: TRUPER, H. G., DWORAKIN, M. HARDER, W. SCHLEIFER, K. H. The Prokaryotes handbook on the biology of bacteria: edophysiology, isolation, identifications, application. New York, Springer-Verlag, 1992, v.1, p 921-995.

RACHEV, R. et al. A new antibiotic, TH818, and its properties. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.37, p.21-26, 2003.

RUIZ, B., CHÁVEZ, A., FORERO, A., GARCÍA-HUANTE, Y., ROMERO, A., SÁNCHEZ, M., & LANGLEY, E. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology*, 36(2), 146-167. 2010.

WU, X., JUDD, L. W., HOWE, E. N., WITHECOMBE, A. M., SOTO-CERRATO, V., LI, H. & JIANG, Y. B. Nonprotonophoric Electrogenic Cl⁻ Transport Mediated by Valinomycin-like Carriers. *Chem.* 2016.