

# Caracterização de metabólitos secundários produzidos por isolados do gênero *Streptomyces* com atividade contra fungos fitopatogênicos

Autores: Witusk, João Paulo; Van Der Sand, Sueli

Email: joao\_witusk@hotmail.com

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brasil

## Introdução

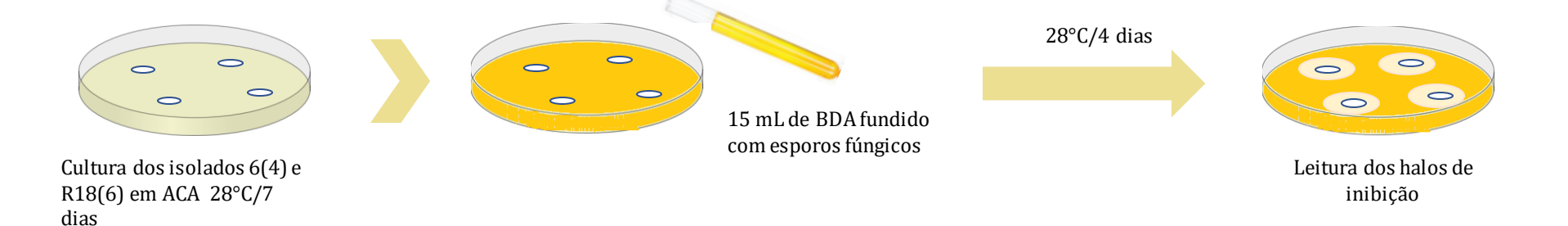
A agricultura é uma prática humana de indispensável importância para a população mundial sendo responsável por produzir a base da alimentação de todos os seres humanos e tida como uma atividade de grande impacto econômico. Danos causados por micro-organismos impactam a produção agrícola e, dentre estes micro-organismos, os fungos se destacam por serem um dos mais danosos aos cultivos. O combate a tais doenças é feito basicamente com o emprego de agrotóxicos, que são compostos químicos agressivos ao meio ambiente e à população em geral. Uma alternativa ao uso desses compostos é a prática de biocontrole, uma alternativa mais eficaz, mais segura e de menor impacto ambiental. Dentre os micro-organismos com maior potencial para produção de compostos com atividade microbiana e, por consequência, com maior potencial para serem utilizados como biocontroladores, destacam-se as actinobactérias do gênero *Streptomyces*.

## Objetivos

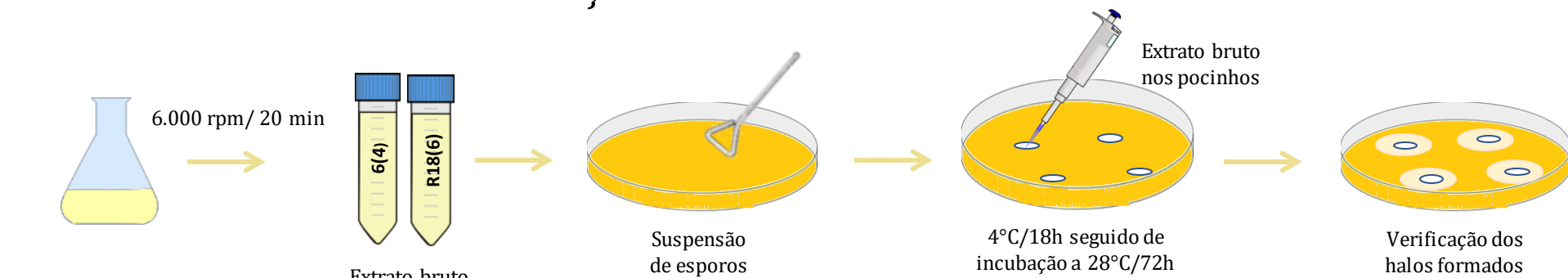
Este trabalho se propõe a testar extratos produzidos por dois isolados do gênero *Streptomyces* frente a diferentes fungos fitopatogênicos e, posteriormente, purificar e caracterizar eventuais moléculas presentes no extrato que apresentem atividade antimicrobiana.

## Materiais e métodos

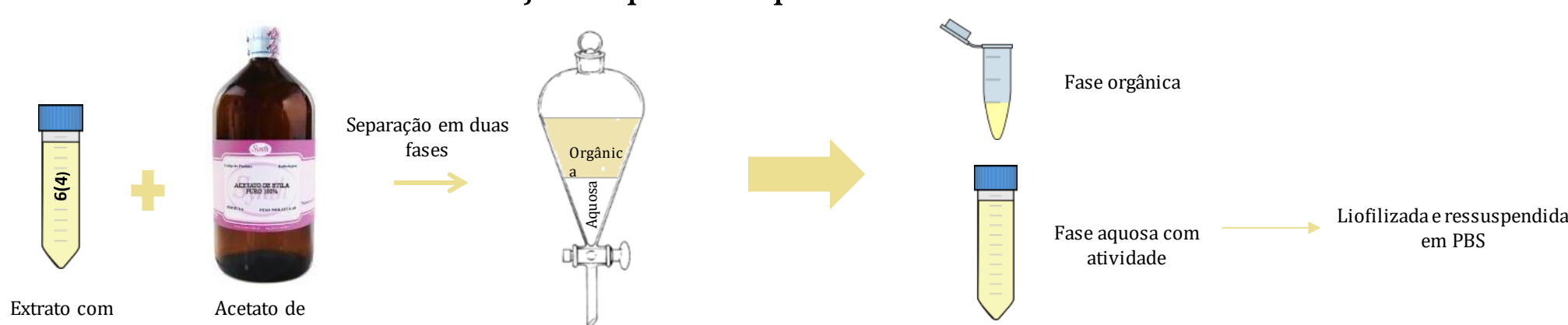
### Ensaio da dupla-camada



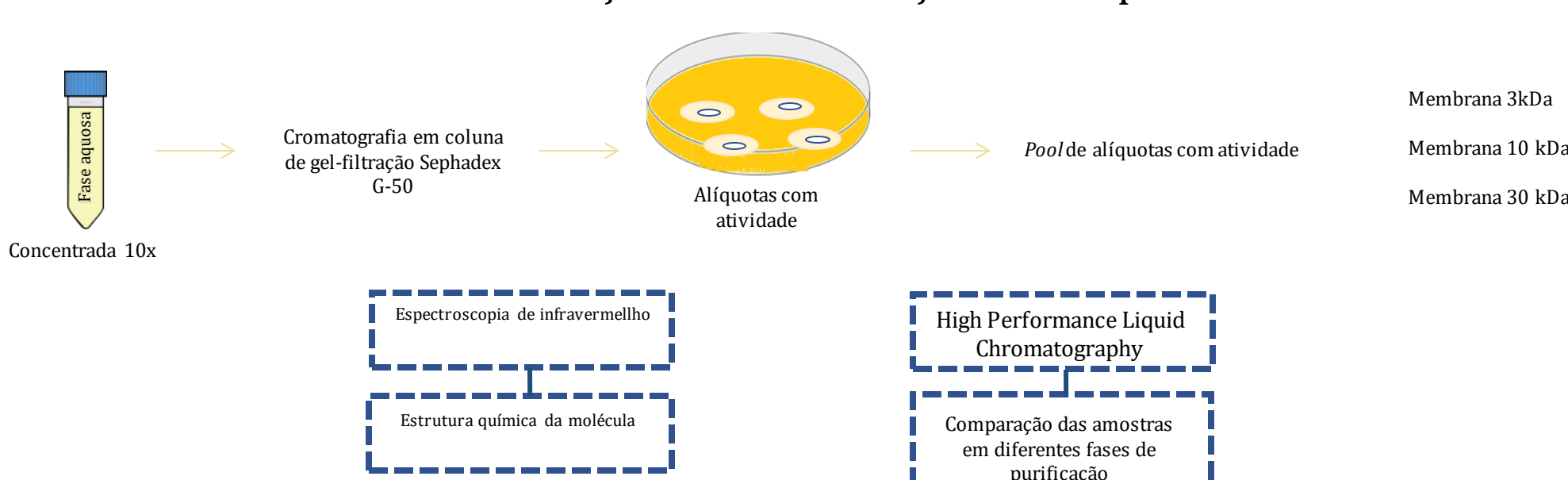
### Produção do extrato bruto



### Extração líquido-líquido



### Purificação e caracterização do composto



## Resultados e discussão

Os ensaios de dupla-camada (**Figura 1**) evidenciaram a atividade antifúngica dos isolados de actinobactérias R18(6) e 6(4) frente aos fungos fitopatogênicos testados, sendo que o isolado R18(6) apresentou atividade antifúngica contra 80% dos fungos testados e o 6(4) apresentou atividade contra 33%. Tais resultados são bastante significativos quando comparados com outros estudos (Thakur *et al.*, 2007; Salamoni *et al.*, 2010) que encontraram percentuais menores de atividade antifúngica (60% e 8%, respectivamente). No ensaio de difusão em ágar (**Figura 2**), observou-se uma inversão na capacidade dos dois isolados em inibir o crescimento fúngico, visto que o isolado 6(4) apresentou atividade contra 90% dos fungos testados enquanto que o isolado R18(6) inibiu o crescimento de apenas 4% dos fungos testados. Essa mudança no perfil de inibição pode ter acontecido devido à mudança do meio sólido para o meio líquido, como observado em outros estudos (Anibou *et al.*, 2008; Salamoni *et al.*, 2010; Spadari *et al.*, 2013).

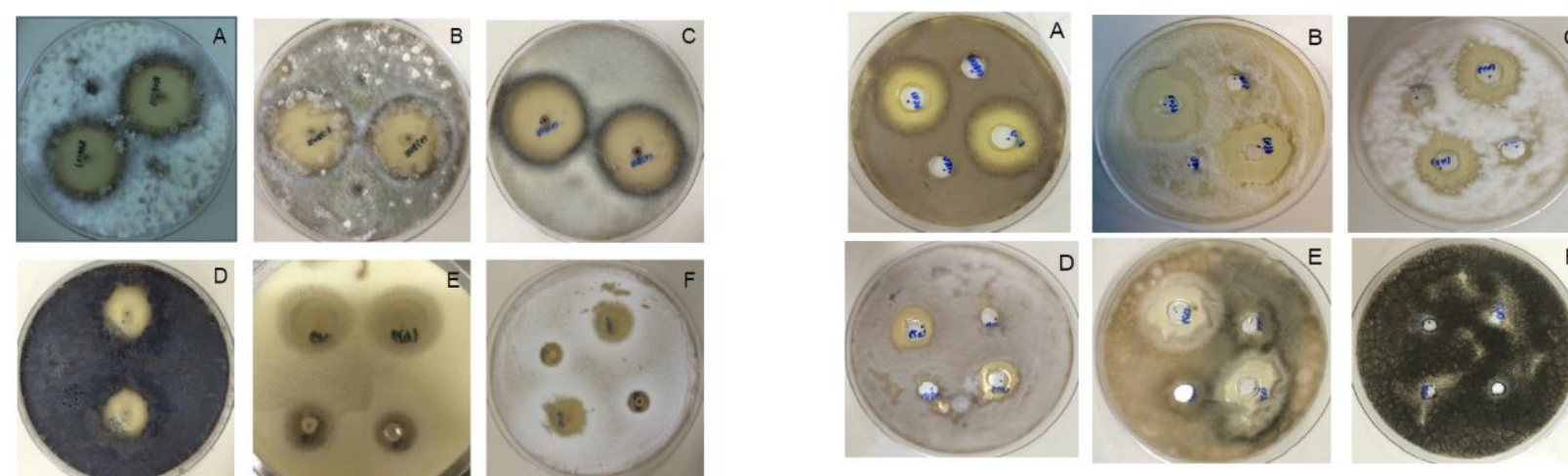


Figura 1. Ensaio da dupla-camada. Nas fotos observa-se a formação de halos pelos isolados R18(6) e 6(4) contra os fungos testados.

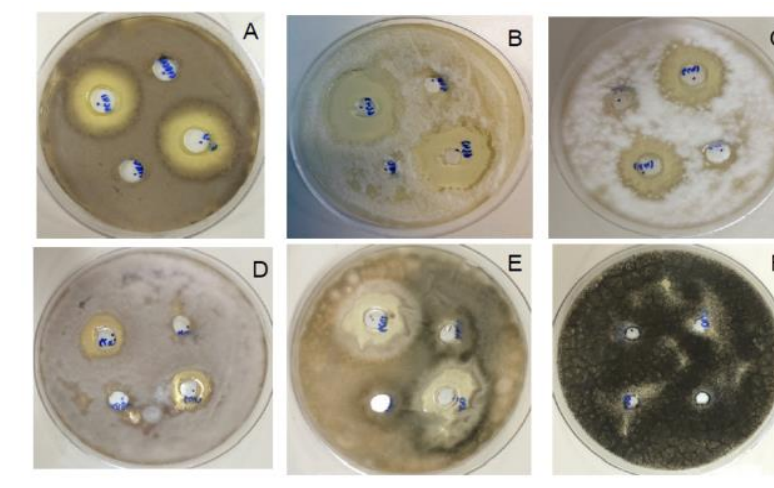


Figura 2. Ensaio de difusão em poços de ágar. Nas fotos observamos a atividade antifúngica do isolado 6(4) frente às cepas de *Paecilomyces* sp., *P. oryzae*, *Fusarium* sp., *A. alternata*, *A. alternata* e *A. niger*.

O extrato bruto com atividade passou por método de extração líquido-líquido para separação em fase aquosa e orgânica com intuito de caracterizar o composto quanto a sua solubilidade porém, ambas as fases apresentaram atividade após a extração. Isso pode indicar uma incapacidade do solvente em separar o composto entre as duas fases. Outra hipótese que pode ser levantada é de que o composto possui características anfipáticas. Após submeter a fase aquosa à cromatografia em coluna de gel-filtração, o *pool* de alíquotas com atividade foi submetido a passagens em membranas de ultrafiltração de 3, 10 e 30 kDa, e foi observado que a molécula com atividade possui uma massa molecular maior que 30 kDa, valor maior do que os antifúngicos conhecidos. A fase orgânica do extrato bruto foi analisada por espectroscopia de infravermelho e foi verificada a presença de grupamentos carboxila e amina. Isso sugere que a(s) molécula(s) pode se tratar de uma proteína. A análise por HPLC evidenciou a necessidade de mais etapas de purificação devido à presença de mais de um pico de leitura nas amostras com atividade.

## Conclusão

Os ensaios de dupla-camada e de difusão em ágar mostraram o potencial que dois isolados de actinobactérias têm para inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos. A caracterização da molécula com atividade antifúngica, por diferentes métodos, mostrou que possui massa molecular maior que 30 kDa, diferente de todos os antifúngicos conhecidos, que possuem massa molecular menor do que 30 kDa. A espectroscopia de infravermelho evidenciou a presença de grupamentos químicos característicos de proteínas, portanto, a molécula com atividade antifúngica pode se tratar de uma proteína.