

2.10.07

AValiação DA TOXICIDADE AGUDA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H.

Susiele M. A. Lima¹; Sandrine M. A. Lima^{2*}; Teresinha G. Silva³

1. Enfermeira, Especialista em Traumatologia-Ortopedia pela Universidade Federal de Pernambuco
2. Bióloga, Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco
3. Farmacêutica, Professora na Universidade Federal de Pernambuco

Resumo:

Bactérias do gênero *Streptomyces* são uma fonte promissora de produtos naturais biologicamente ativos, com aplicação na medicina, indústria e agricultura. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda de metabólitos produzidos por *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9. A linhagem foi fermentada em cultivo submerso com farinha de soja, sua biomassa foi extraída com metanol, particionada com butanol e fracionada em cromatografia em coluna *flash*. Na avaliação da toxicidade aguda foram usados camundongos albinos Swiss fêmeas seguindo o Protocolo OECD 423. Os animais dos grupos testes receberam, por via oral, a fração EB2A 2000 mg/kg (grupo tratado) e solução fisiológica a 0,9 % (grupo controle). Após a aplicação, foram observados parâmetros do *screening* hipocrático. A evolução ponderal e consumo de ração e água foram avaliados durante os 14 dias seguintes. Após este período, foi coletado sangue por punção cardíaca dos animais devidamente anestesiados, depois de eutanasiados em câmara de CO₂ foram removidos baço, fígado e rim, pesados e analisados macroscopicamente. Não foi observada nenhuma variação significativa no peso, consumo de ração e água em relação aos animais do grupo controle. Não houve diferença nos parâmetros hematológicos, no peso dos órgãos e na análise macroscópica dos mesmos. Os resultados indicam que a fração EB2A apresentou baixa periculosidade aguda com DL₅₀ superior a 5000 mg/kg, sendo considerada segura.

Autorização legal: O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº. 23076.023704/2014-86).

Palavras-chave: Produtos Bioativos; Micro-organismo; Estudo Toxicológico.

Apoio financeiro: CAPES e UFPE.

Introdução:

A natureza é uma fonte de novos agentes terapêuticos, com isso a percentagem de medicamentos à base de produtos naturais no mercado tem aumentando e por conta da grande biodiversidade taxonômica dos micro-organismos, eles representam uma alternativa para a descoberta de novos metabólitos secundários biologicamente ativos. Os micro-organismos são fáceis de cultivar e podem ser adaptados metabolicamente para produção de medicamentos, em comparação com as plantas cujo acesso é limitado e a taxa de crescimento lenta (Dias; Urban; Roessner, 2012).

Bactérias do gênero *Streptomyces* são precursores notáveis de produtos bioativos, onde a partir de seus metabólitos secundários são produzidos mais de 85% dos antibióticos não-sintéticos (Saurav; Kannabiran, 2012). Estas bactérias são também produtoras de compostos com atividade antifúngica, antiparasitária, antiviral, herbicida e antitumoral (Hasani; Kariminik; Issazadeh, 2014).

A introdução de um novo fármaco no mercado é um processo demorado, oneroso e muitas vezes falho devido, em parte, à deficiência na previsão de efeitos colaterais de testes pré-clínicos. Deste modo, testes pré-clínicos em modelos animais e ensaios *in vitro* celular, tecidual ou em funções bioquímicas são fundamentais para garantir a segurança e continuidade da prospecção de novos fármacos em humanos (Khanna, 2012).

O interesse da pesquisa em investigar a toxicidade aguda de fração do metabólito secundário de *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H isolados da região Amazônica é justificado pelo potencial que o gênero *Streptomyces* apresenta em produzir metabólitos úteis na indústria farmacêutica, além de contribuir para o conhecimento do potencial biotecnológico dos micro-organismos dessa região.

Metodologia:

Linhagem Utilizada

A linhagem bacteriana *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H foi isolada da rizosfera do guaranazeiro [*Paullinia cupana* (Kunth) var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] do município de Maués - Amazonas e encontra-se depositada na Coleção Microbiana do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco sob imersão em óleo mineral e liofilizada com o código UFPEDA 3370.

Extração e Fracionamento

O pré-inóculo de *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H ocorreu em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio ISP-2 líquido com inoculação de 6 blocos de gelose retirados do crescimento da linhagem em ISP-2, cultivada por 14 dias a 30 °C, e submetido a agitação por 48 h (200 rpm 30 °C). Em

Fernenbach com 500 mL do meio líquido MPE foi inoculado 50 mL do pré-inóculo e submetido à agitação por 96 h (200 rpm 30 °C). Após a fermentação, a biomassa foi separada do líquido metabólico por centrifugação a 3.000 rpm durante 3 min e extraída três vezes com metanol na proporção 1:2 (p/v). O extrato foi rotaevaporado a 50 °C.

O extrato metanólico da biomassa foi diluído em água destilada e particionado com 2-butanol nas proporções de 1:3 e rotaevaporado a 50 °C. O extrato butanólico foi fracionado utilizando cromatografia em coluna *flash* (26,5 x 2,6 cm) sobre gel de sílica (230 – 400 Mesh), na fase estacionária e, uma fase móvel gradiente CHCl_3 :MeOH (9:1, 8:2, 7:3) e MeOH. As frações que apresentaram um perfil semelhante foram reunidas, sendo obtidas três frações: EB1 eluída no sistema CHCl_3 :MeOH (9:1); EB2 eluída no sistema CHCl_3 :MeOH (8:2 e 7:3); e EB3M em MeOH. Essas frações foram rotaevaporadas a 50 °C e reavaliadas. Observou-se que a fração EB2 quando dissolvida em CH_2Cl_2 :MeOH (1:1) formou um precipitado branco, denominado EB2B que foi separado do dissolvido, denominado EB2A. Esses extratos foram novamente concentrados (Figura 1).

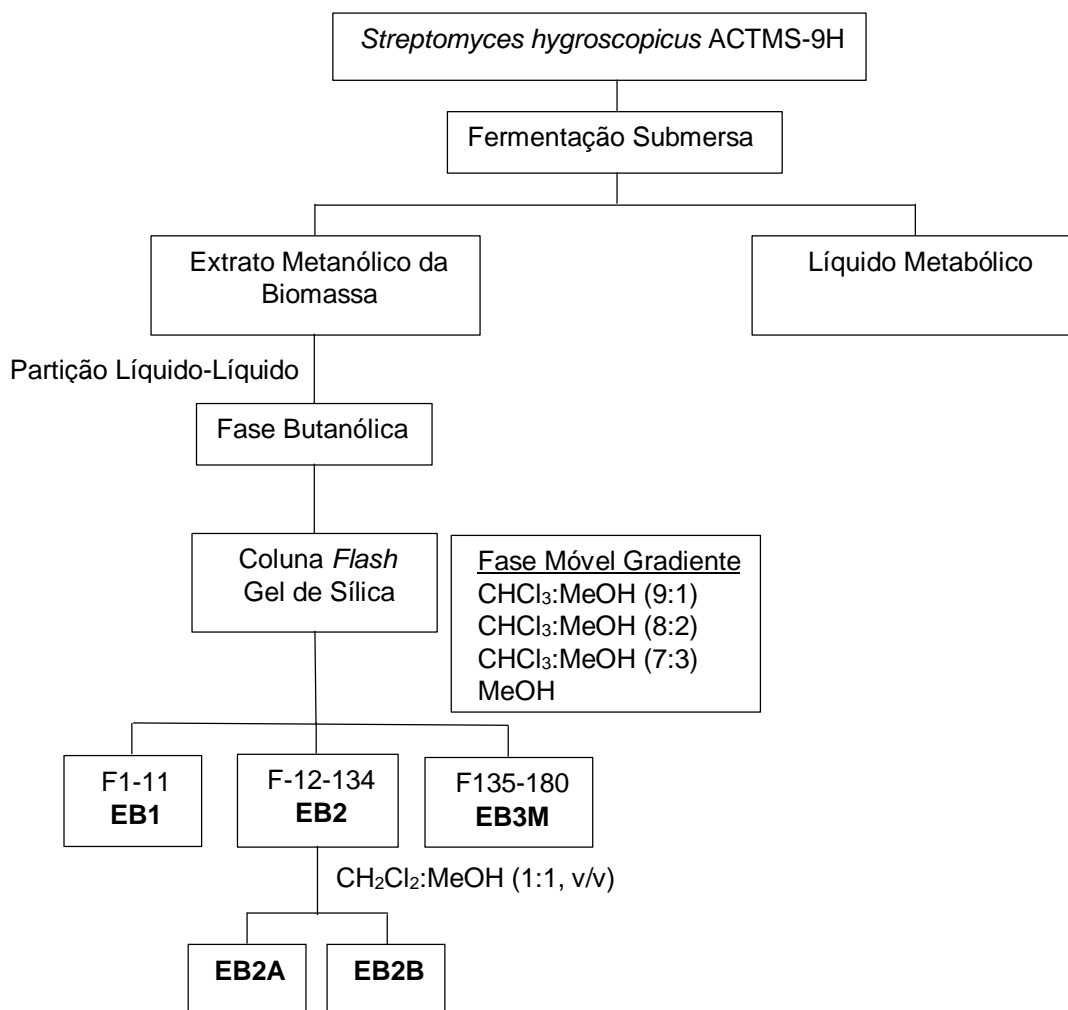


Figura 1. Fluxograma para obtenção do extrato metanólico da biomassa (EMeOH 9H-B) de *S. hygroscopicus* ACTMS-9H em fermentação submersa, partição líquido-líquido com 2-butanol (fase butanólica) e frações da fase butanólica (EB1, EB2A, EB2B e EB3M).

Toxicidade aguda

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas procedentes do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE, com faixa etária de 60 dias, pesando 25 ± 5 g, separados em grupos de três animais por gaiola. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente $23 \pm 2^\circ\text{C}$ sob o ciclo claro/escuro, com água e alimento a vontade durante o experimento. Os grupos testes receberam, por via oral, a fração EB2A na dose de 2000 mg/kg (grupo tratado) e solução fisiológica a 0,9 % (grupo controle). Após a administração, os animais foram observados nas primeiras horas e depois a cada 24 h diariamente (OECD, 2001). Em seguida utilizou-se o método de *screening* hipocrático, o qual examina aspectos importantes dos animais como: o estado de consciência, disposição, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, atividade do sistema nervoso central e autônomo. Também foi observado o consumo de água, ração e peso dos animais. No 14º dia, foi coletado sangue por punção cardíaca dos animais devidamente anestesiados. Para avaliação dos possíveis efeitos tóxicos sistêmicos, os órgãos (fígado, rins e baço) foram extirpados e seus índices calculado seguindo a fórmula: Índice = Peso do órgão (g) / Peso do animal (g). O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética

na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº. 23076.023704/2014-86).

Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm SEM ($n = 6$ para cada grupo) na toxicidade aguda. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos usando ANOVA uma via seguido pelo teste de Bonferroni no programa *Graphpad Prism 5.0*.

Resultados e Discussão:

Durante o período de observação de 14 dias da toxicidade aguda, não foi registrado óbito e nenhum comportamento anômalo que pudesse ser atribuído à administração da fração EB2A. O consumo de água e ração dos animais tratados com a fração EB2A não diferiu significativamente dos animais do grupo controle.

A média de peso corporal dos animais do grupo tratado no final do experimento não apresentou diferença significativa em relação ao controle. Não houve redução de peso nos animais, o que indica não ter havido grandes efeitos colaterais sobre o peso corpóreo. Este é um parâmetro usado para avaliar a resposta terapêutica de fármacos e também indicar efeitos adversos relacionados ao seu uso (Suganthi; Ravikumar, 2012).

Os órgãos (baço, fígado e rim) não apresentaram alterações macromorfológicas importantes quanto ao aspecto ou cor, assim como os valores de peso relativo não diferiram estatisticamente entre os animais tratados com a fração EB2A e os animais controle. A fração EB2A na dose de 2000 mg/kg não apresentou toxicidade frente a células sanguíneas de camundongos, pois, não houve diferença significativa entre os parâmetros hematológicos analisados dos animais tratado com a fração EB2A quando comparados aos animais controle.

A toxicidade de uma substância por via oral pode ser classificada como extremamente tóxica ($DL_{50} \leq 25$ mg/kg), altamente tóxica ($DL_{50} 100 - 500$ mg/kg), mediamente tóxica ($DL_{50} 500 - 2000$ mg/kg) e pouco tóxica ($DL_{50} > 2000$ mg/kg) (Zanetti et al., 2003). Os resultados obtidos neste estudo sugerem a fração EB2A do metabólito de *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H apresenta pouca ou nenhuma toxicidade para os animais nas condições experimentais realizadas neste trabalho, sendo sua DL_{50} superior a 2000 mg/kg. Com base na DL_{50} , a fração EB2A se enquadra na categoria 5 de toxicidade da *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS), onde são agrupadas substâncias que apresentam baixa periculosidade aguda, mas que sob certas circunstâncias, podem apresentar perigo a populações mais susceptíveis, estando nessa categoria substâncias com DL_{50} de 2000 – 5000 mg/kg (OECD, 2001).

Conclusões:

Streptomyces hygroscopicus ACTMS-9H produz metabólitos secundários (fração EB2A) que apresenta baixa toxicidade aguda com DL_{50} superior a 5000 mg/kg, sendo por isso considerada segura. Entretanto, estudos complementares de toxicidade sub-crônica e crônica são necessários para uma melhor elucidação do perfil toxicológico desses metabólitos.

Referências bibliográficas

- Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012.
- Hasani A, Kariminik A, Issazadeh K. Streptomycetes: characteristics and their antimicrobial activities. **International journal of Advanced Biological and Biomedical Research**. v. 2, p. 63-75, 2014.
- Khanna I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. **Drug Discovery Today**. v. 17, p. 1088-1102, 2012.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Guideline for the Testing of Chemicals, p. 1-14, dezembro, 2001.
- Saurav K, Kannabiran K. Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4- dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 19, p. 81-86, 2012.
- Suganthi P, Ravikumar S. Toxicity studies of crude extracts from marine *Streptomyces* sp. With potential antibacterial sensitivity against antibiotic resistant human pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 1070-1076, 2012.
- Zanetti GD et al. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 22, p. 159 -162, 2003.