

2.10.07

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

Susiele M. A. Lima<sup>1</sup>; Sandrine M. A. Lima<sup>2\*</sup>; Teresinha G. Silva<sup>3</sup>

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 CO<sub>2</sub> 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 DL<sub>50</sub> 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**

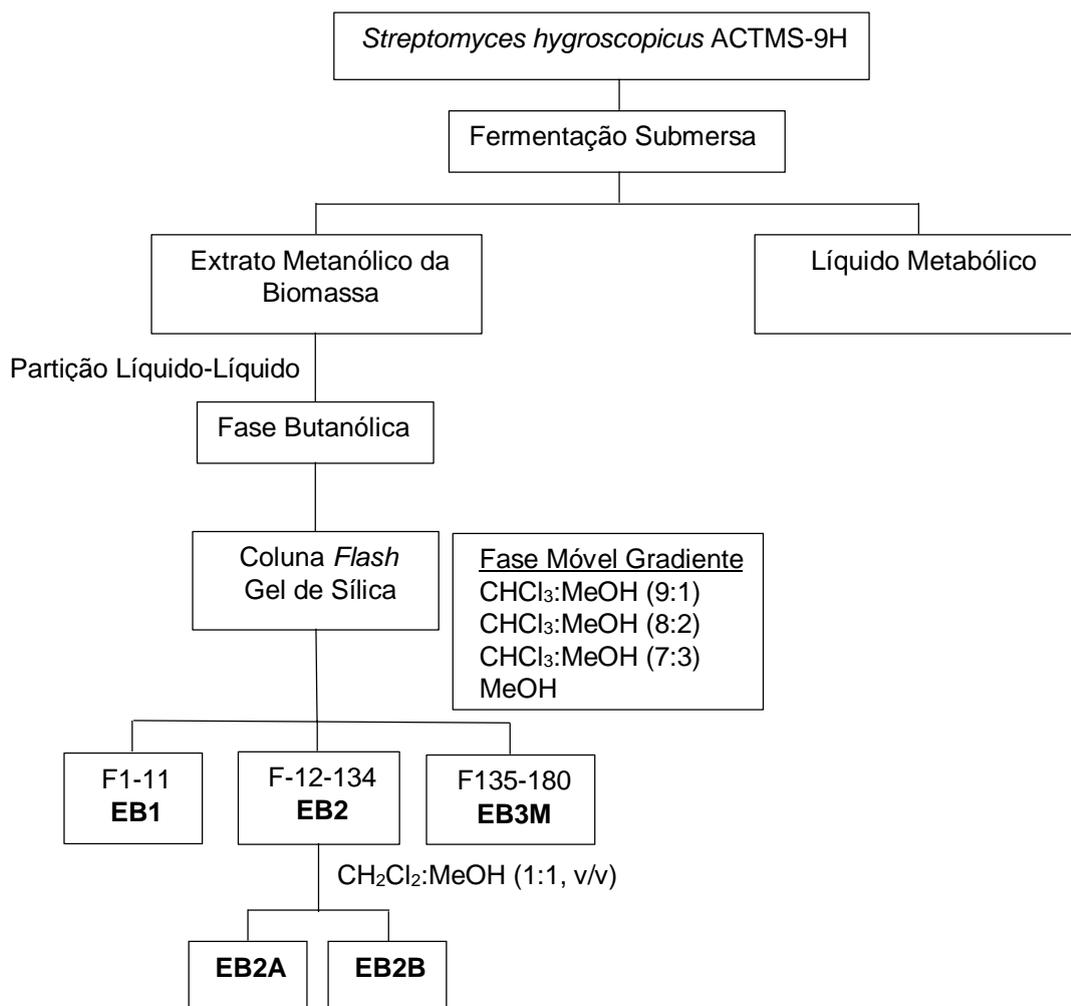
A linhagem bacteriana *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H foi isolada da rizosfera do guaranazeiro [*Paullinia cupana* (Kunth) var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] do município de Maués - Amazonas e encontra-se depositada na Coleção Microbiana do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco 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  $\text{CHCl}_3$ :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  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1); EB2 eluída no sistema  $\text{CHCl}_3$ :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  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :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  $25 \pm 5$ 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.