

Manual prático para obtenção de metabólitos secundários produzidos por microrganismos (Cultivo submerso e cultivo em estado sólido)

*Ronney Fernandes Chagas
Patrícia Thieme Onofri Saiki*

*Coordenação de Biologia
Departamento II
IFG – Câmpus Goiânia*

SUMÁRIO

1- Referencial teórico

1.1 – Produção de biomoléculas por microrganismos.....	3
1.2 – Produção de metabólitos secundários e condições otimizadas para síntese em laboratório	3

2- Produção de metabólitos secundários

2.1 – Produção por cultivo submerso.....	5
2.1.1 - Fermentação por cultivo submerso.....	5
2.1.2 – Obtenção da amostra contendo o metabólito	6
2.1.3 - Obtenção do extrato bruto	7
2.2 – Produção por cultivo submerso.....	8
2.2.1 - Fermentação por cultivo submerso.....	8
2.2.2 – Obtenção da amostra contendo o metabólito	9
2.2.3 - Obtenção do extrato bruto	9

3- Referências bibliográficas11

1- REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 – Produção de biomoléculas por microrganismos

Microrganismos representam uma fonte inestimável e diversa de biomoléculas, sendo capazes de sintetizar uma vasta gama de compostos essenciais para aplicação na indústria, saúde e agricultura (TRABULSI e ALTERTHUN, 2015).

A síntese microbiana abrange tanto os metabólitos primários (como aminoácidos, vitaminas e enzimas), fundamentais para o crescimento e reprodução destes organismos, quanto os metabólitos secundários, que são compostos não vitais, geralmente produzidos em condições excepcionais, como estresse, mas importantes para a sobrevivência, adaptação e interação do organismo no ambiente. Metabólitos secundários, em particular os produzidos por microrganismos, têm ganhado destaque, e incluem uma ampla gama de moléculas (antibióticos, antimicrobianos, imunossuppressores, agentes antitumorais, agentes de controle biológico) (TRABULSI e ALTERTHUN, 2015).

A identificação de organismos produtores de metabólitos secundários, a avaliação do potencial dos mesmos na produção destas biomoléculas e a otimização de vias de fermentação desses organismos em condições laboratoriais, coloca-os como agentes promissores para o mercado biotecnológico voltado para produção de compostos de alto valor agregado, com aplicações que vão desde a medicina regenerativa até a melhoria da produtividade agrícola e a biorremediação ambiental.

1.2 – Produção de metabólitos secundários e condições otimizadas para síntese em laboratório

Os metabólitos secundários microbianos são obtidos principalmente através de processos de fermentação, que podem ser conduzidos em sistemas de Cultivo Submerso (CS) ou Cultivo em Estado Sólido (CES).

O Cultivo Submerso, método industrial mais difundido, envolve o crescimento do microrganismo em meio líquido sob agitação, permitindo um controle rigoroso de parâmetros ambientais e facilitando a extração de metabólitos hidrossolúveis liberados no caldo de cultura (fração extracelular). Por outro lado, o Cultivo em Estado Sólido, que

simula o habitat natural de muitos fungos e algumas bactérias, utiliza substratos agroindustriais umedecidos. O CES frequentemente resulta em rendimentos superiores de metabólitos específicos, devido à baixa atividade de água e maior concentração de nutrientes.

A escolha da técnica ideal de fermentação para produção dos metabólitos secundários é determinada pela natureza química e localização do metabólito de interesse, bem como pela viabilidade de escalada do processo para um sistema produtivo em larga escala (MADIGAN *et al.*, 2016).

As condições ideais para a produção desses metabólitos diferem acentuadamente daquelas que promovem o crescimento celular máximo, responsável pela síntese de moléculas do metabolismo primário, que geralmente exige condições nutricionais mais favoráveis e uso de células que se encontram na fase de crescimento exponencial.

A produção máxima de metabólitos secundários, diferentemente, ocorre tipicamente quando o microrganismo entra na fase estacionária do crescimento, sendo geralmente desencadeada por uma condição de estresse nutricional ou ambiental, como a limitação de fontes de carbono, nitrogênio ou fósforo no meio de cultivo. Além disso, o ajuste preciso da temperatura, pH e aeração é fundamental para direcionamento do metabolismo celular para vias secundárias (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

A regulação destas condições é fundamental para otimização do rendimento e seletividade dos compostos bioativos almejados. Assim, o objetivo desse material é apresentar uma forma padronizada de obtenção de extratos formados por metabólitos secundários, produzidos tanto em condição de fermentação submersa quanto em condição de fermentação em estado sólido.

2- PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

2.1 – Produção por cultivo submerso

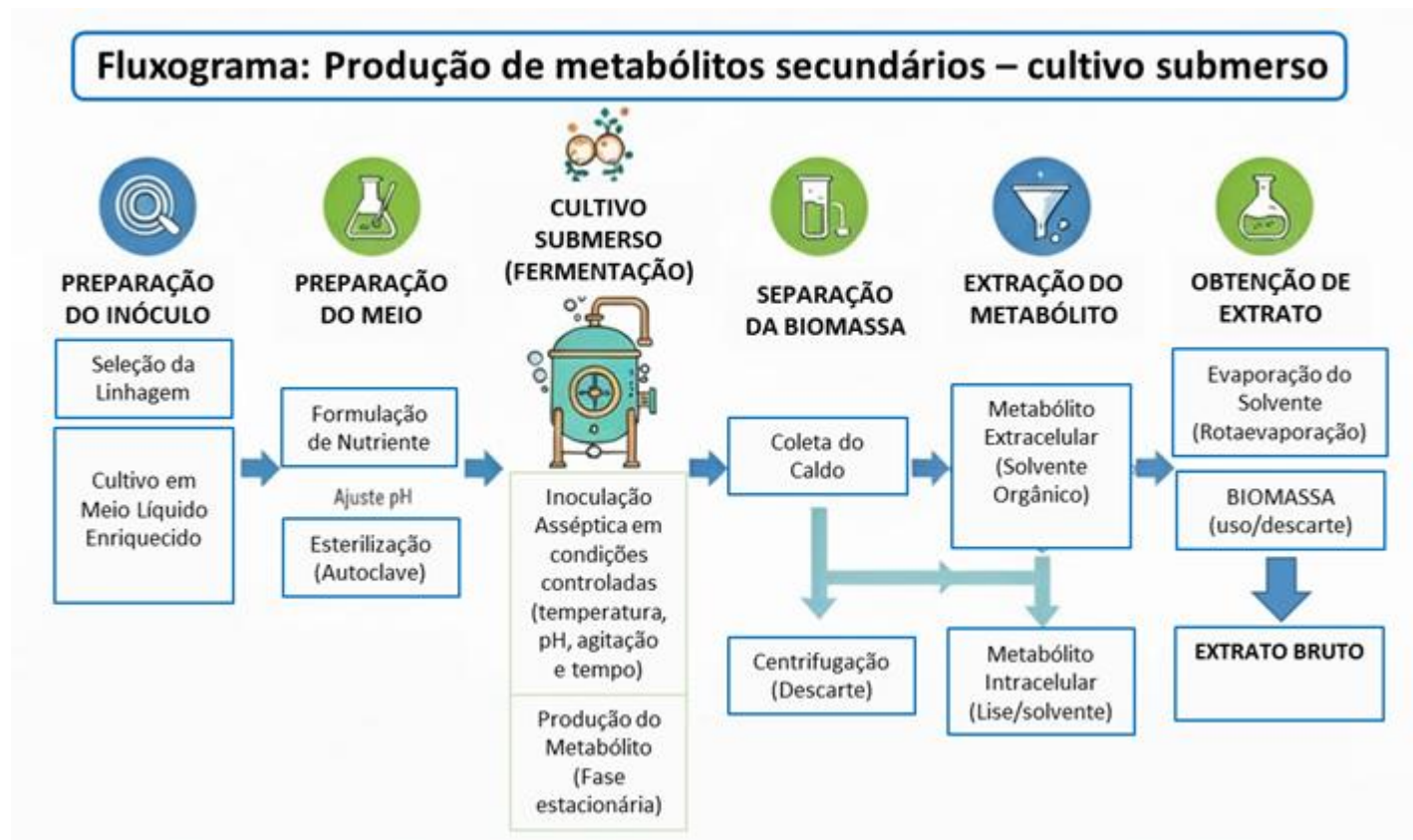


Figura 1 – Etapas procedimentais da produção de metabólitos secundários por cultivo submerso. Fonte: imagem gerada por inteligência artificial (<https://gemini.google.com/app>).

2.1.1 – Fermentação por cultivo submerso

Materiais

- ✓ Culturas de células padronizadas a 10^8 UFC.mL⁻¹;
- ✓ Pipeta e ponteira;
- ✓ Meios de cultura: Meio Czapek-Dox modificado;
- ✓ Erlenmeyers esterilizados;
- ✓ Incubadora de agitação orbital (shaker).

Procedimentos

- ✓ Adicionar a quantidade padronizada de inóculo ao meio de cultura no erlenmeyer esterilizado.
- ✓ Colocar o material preparado em uma incubadora de agitação orbital a 30°C, com agitação constante de 200 rpm, pelo tempo necessário e padronizado para o microrganismo utilizado (24 a 48 hs - para produção por bactérias ou 3 a 5 dias - para produção por fungos).

Obs: O tempo de cultivo deverá ser previamente estabelecido de acordo com a curva de crescimento do microrganismo utilizado, sendo definido um período de tempo que esteja presente na fase de crescimento estacionária.

- ✓ Após o período de cultivo, a cultura deve ser mantida a 4°C até que sejam realizadas as próximas etapas de obtenção dos metabólitos produzidos.

2.1.2 – Obtenção da amostra contendo o metabólito

Materiais

- ✓ Centrífuga;
- ✓ Tubos de centrifugação (Falcon) esterelizados;
- ✓ Solução de ajuste de pH;
- ✓ Solvente orgânico – acetato de etila ou clorofórmio;
- ✓ Funil de separação.

Procedimentos

- ✓ Transferir o produto da fermentação submersa, mantido refrigerado, para tubos de centrifugação estéreis e centrifugar o material por 15 min, rotação de 10.000 rpm, à 4°C.
- ✓ Após a centrifugação, transferir o sobrenadante para um tubo novo também estéril.
- ✓ Ajuste o pH do sobrenadante para migração dos metabólitos para a fase orgânica.

Obs: Se o objetivo é a extração de **metabólitos ácidos**, ajustar para um pH 2.0, caso o objetivo seja a obtenção de **metabólitos básicos**, ajustar para pH 9.0.

- ✓ Transferir o sobrenadante com o pH devidamente ajustado para um funil de separação e adicionar o solvente orgânico (acetato de etila ou clorofórmio) na proporção de 1:1 v/v.

- ✓ Agitar vigorosamente a solução para mistura das fases e aguardar a separação das fases por decantação.
- ✓ Após a decantação, a fase orgânica é coletada e reservada.

2.1.3 – Obtenção do extrato bruto

Materiais

- ✓ Rotaevaporador;
- ✓ DMSO ou metanol 1%.

Procedimentos

- ✓ Adicionar a fase orgânica em um rotaevaporador para evaporação do solvente orgânico e obtenção do extrato concentrado.

Obs: A temperatura não deve exceder 40°C, para preservação de moléculas termossensíveis, e o sistema deve operar à vácuo.

- ✓ Após evaporação do solvente, obtém-se o extrato bruto concentrado.
- ✓ Pesar o extrato bruto para análise do rendimento da extração.
- ✓ Ressuspender o material em DMSO ou metanol 1% e armazenar à temperatura de aproximadamente -18°C e sempre mantido protegido da luz.

2.2 – Produção por cultivo em estado sólido

Fluxograma: Produção de metabólitos secundários – estado sólido

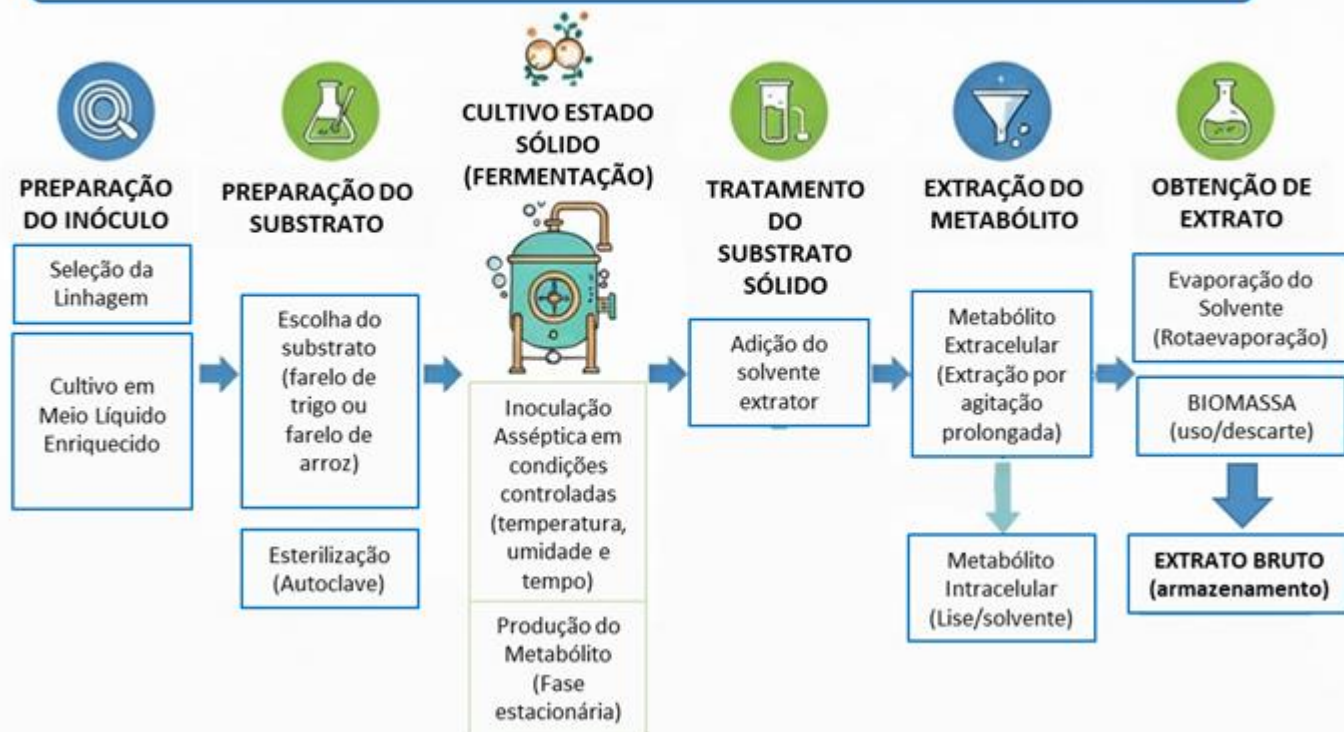


Figura 2 – Etapas procedimentais da produção de metabólitos secundários por cultivo em estado sólido. Fonte: imagem gerada por inteligência artificial (<https://gemini.google.com/app>).

2.2.1 – Fermentação por cultivo em estado sólido

Materiais

- ✓ Culturas de células padronizadas a 10^8 UFC.mL⁻¹;
- ✓ Pipeta e ponteira;
- ✓ Água destilada estéril;
- ✓ Meios de cultura: Farelo de arroz ou farelo de trigo;
- ✓ Erlenmeyers esterilizados.

Procedimentos

- ✓ Umedeça o substrato com água destilada estéril.

Obs: O nível de umidificação deve estar em torno de 40 a 60% em relação ao meio utilizado.

- ✓ Adicione a quantidade padronizada de microrganismos ao meio umidificado e incube o material a uma temperatura de 30°C, sem agitação, por 3 a 14 dias, dependendo do microrganismo.

Obs: O tempo de cultivo deverá ser previamente estabelecido de acordo com a curva de crescimento do microrganismo utilizado, sendo definido um período de tempo que esteja presente na fase de crescimento estacionária.

- ✓ Após o período de cultivo, a cultura deve ser mantida a 4°C até que sejam realizadas as próximas etapas de obtenção dos metabólitos produzidos.

2.2.2 – Tratamento e obtenção da amostra contendo o metabólito

Materiais

- ✓ Solvente orgânico extrator – acetato de etila ou metanol;
- ✓ Incubadora de agitação orbital (shaker);
- ✓ Sistema de filtração.

Procedimentos

- ✓ Adicionar ao estado sólido refrigerado o solvente extrator na proporção de 1:5 (massa de substrato por volume de solvente).
- ✓ Após a adição do solvente, submeter a mistura à condição de agitação lenta de 12 a 24 hs, para que o metabólito migre para a fase líquida do solvente.
- ✓ O solvente contendo o metabólito é então, em seguida, submetido a filtração, para separação do extrato líquido do substrato residual.

2.2.3 – Obtenção do extrato bruto

Materiais

- ✓ Rotaevaporador;
- ✓ DMSO ou metanol 1%.

Procedimentos

- ✓ Adicionar o extrato líquido filtrado em um rotaevaporador para evaporação do solvente orgânico e obtenção do extrato concentrado.

Obs: A temperatura não deve exceder 40°C, para preservação de moléculas termossensíveis, e o sistema deve operar à vácuo.

- ✓ Após evaporação do solvente, obtém-se o extrato bruto concentrado.
- ✓ Pesar o extrato bruto para análise do rendimento da extração.
- ✓ Ressuspender o material em DMSO ou metanol 1% e armazenar à temperatura de aproximadamente -18°C e sempre mantido protegido da luz.

3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MADIGAN, M. T. MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H., STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

ANOTAÇÕES