VII EAITI 2017 — Encontro Anual de Iniciação Tecnológica e Inovação
Universidade Estadual de Ponta Grossa | 09 e 10 de novembro de 2017

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE RMN ^{1}H PARA OBTENÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Pseudomonas* spp.

Maria Luiza Abreu de Jesus (PIBITI/UEL), Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, admilton.oliveira@gmail.com.
Universidade Estadual de Londrina/Departamento de Microbiologia.

Microbiologia / Microbiologia aplicada

Palavras Chave: *Metabolômica, Fenazinas, Impressão digital metabólica.*

Resumo

A identificação de moléculas em uma mistura complexa é um procedimento dispendioso e de alto custo. O objetivo do presente trabalho foi a identificação de moléculas heterocíclicas nitrogenadas utilizando-se somente da ressonância magnética nuclear (RMN-^{1}H). Foi realizado o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* cepas PAO1, PW16.1 e PW16 M1 em dois meios distintos; o sobrenadante livre de células foi extraído por partição líquido-líquido e as frações obtidas, após concentradas, foram analisadas por RMN ^{1}H.

Introdução

A espectroscopia de RMN-^{1}H é um método bastante explorado na área da metabolômica, não direcionado, rápido, baixo custo, produzindo sinais para todas as espécies químicas contendo prótons. Para os extratos microbianos brutos, os espectros são complexos, com muitos sinais sobrepostos. A "impressão digital de metabólitos", visa destacar as semelhanças de composição e explorar a variabilidade natural geral em uma população de amostras. O objetivo deste trabalho foi a obtenção do perfil metabólico de espécies do gênero *Pseudomonas* spp., por meio da técnica de RMN-^{1}H para a identificação de moléculas de baixo peso molecular heterocíclicas nitrogenadas.

Material e Métodos

Foram utilizadas três cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: PAO1 uma cepa padrão e isolados ambientais PW16.1 e PW16-M1. Para o preparo do pré-inóculo, colônias isoladas foram suspensas em solução salina ajustadas a 0,5 na escala nefelométrica de McFarland; 30 µl da suspensão foi inoculado em um frasco Erlenmeyer contendo 30 ml de caldo LB e incubado a 28 °C por 24 h, à 200 rpm. Para o cultivo foram utilizados dois meios, o Meio 1 contendo (g/L): 20 g de glicose, 12,4 g de tryptona, 5 g de NaCl, 1,5 g de $K_2HPO_4.3H_2O$, 0,04 g de $MnSO_4.H_2O$, 1,67 g de $FeSO_4.7H_2O$, 1,22 g de $MgCl_2.6H_2O$, pH 7; e o Meio 2 contendo: 20 g de peptona, 20 ml de glicerol, 5 g de NaCl, 1 g de KNO_3 dissolvidos em 1000 ml de água destilada, pH 7. Uma alíquota de 1% do pré-inoculo foi transferida para um frasco Erlenmeyer contendo 200 ml do meio. Em sequência, o cultivo de células foi centrifugado (3.500 rpm, 10 min), e o sobrenadante livre de células foi concentrado em rotaevaporador (70 ºC, 100 rpm, -600 mmHg). A extração dos bioativos foi realizada conforme descrito por De Oliveira et al, (2011)[1]. As amostras foram diluídas em diclorometano, filtradas e concentradas em rotaevaporador. Após, foram diluídas em clorofórmio deuterado e analisadas por meio da técnica de RMN ^{1}H.

Resultados Obtidos

A partir de análises do espectro (Figura 1), foi possível detectar e identificar compostos heterocíclicos aromáticos nitrogenados baseando-se na literatura. Além disso, comparando os espectros apresentados no Meio de cultura 1 e o Meio de cultura 2, este último apresentou uma maior intensidade nos picos que o primeiro. Isso se deve ao maior rendimento dos metabólitos no Meio 2 em relação ao Meio 1, o que leva concomitantemente a maior concentração dos compostos de baixo peso molecular heterocíclicas nitrogenadas no meio.

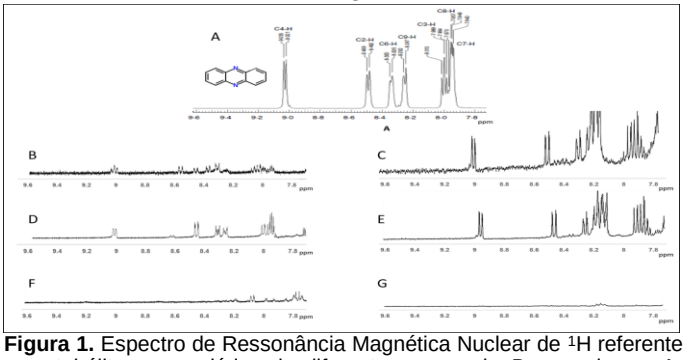


Figura 1. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H referente a metabólitos secundários de diferentes cepas de *P. aeruginosa*. A-Espectro de fenazinas obtido por Kumar et al. (2005)[2]; B- D-F-Espectro dos metabólitos no Meio 1 pelas cepas PAO1, PW16.1 e PW16 M1, respectivamente; C-E-G- Espectro dos metabólitos no Meio 2 pelas cepas PAO1, PW16.1 e PW16 M1, respectivamente.

Conclusão

Com os métodos descritos neste estudo obtivemos o perfil metabólico das *Pseudomonas aeruginosas* PAO1, PW16.1 e PW16 M1, detectando e identificando metabólitos de classes específicas no sobrenadante de cultivo. Tal procedimento reduz custos nos experimentos e potencializa a produção destes compostos por microrganismos produtores de moléculas do grupo das fenazinas.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina e ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear pelo suporte dado.

[1] De Oliveira, A. G et al. *Biological Control.* **2011**, *56*, 125-131.
[2] Kumar R. S. et al. *J Appl Microbiol*. **2005**, 98, 145-154.