



Investigação da inibição da bactéria *Xanthomonas axonopodis* spp. *citri* responsável pelo cancro cítrico

Palavras-Chave: *Potencial inibitório-1, Perfis metabólicos-2, Nanopartícula de prata-3*

Lyvia Malvestiti Cardoso da Cunha, IQ - UNICAMP
MSc. Gonzalo García Delgado (co-orientador), IQ - UNICAMP
Profª. Drª. Ljubica Tasic (orientadora), IQ - UNICAMP

INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das atividades agroindustriais mais importantes para a economia mundial, com as plantas cítricas sendo cultivadas em mais de 140 países, abrangendo climas tropicais, subtropicais e mediterrâneos. E, no Brasil é uma atividade agroindustrial de grande importância econômica, contribuindo significativamente para a economia global. A produção brasileira de citros é concentrada principalmente no cinturão citrícola, que abrange os estados de São Paulo e Minas Gerais, responsáveis por aproximadamente 70% da área cultivada no país. Em termos de volume, São Paulo destaca-se por 63% da área cultivada e 77% da produção nacional. Na safra 2023/24, a produção brasileira de laranja está projetada em 408 milhões de caixas, o que representa uma leve queda em relação à safra anterior, devido principalmente à incidência de doenças e condições climáticas desfavoráveis (USDA, 2024) [1-4].

Além da importância econômica, a citricultura brasileira enfrenta desafios fitossanitários significativos. Uma enfermidade de grande impacto é o cancro cítrico, causado pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*). Esta doença afeta todas as variedades comerciais de citros, resultando em lesões necróticas nos ramos e frutos das plantas. Além disso, o cancro cítrico tem implicações econômicas substanciais, uma vez que diminui a produtividade dos pomares, induz a desfolha das plantas afetadas e antecipa a queda dos frutos. Isso não apenas reduz a quantidade de colheita disponível, mas também restringe a utilização de cultivares altamente suscetíveis à doença [4,5].

Atualmente, a *Xac* é controlada usando complexos que contêm íons de cobre (II), amplamente usados no Brasil e na Argentina. Formulações como oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre e óxido cuproso protegem brotos e frutos contra *Xac*. Contudo, esse método pode levar ao desenvolvimento de resistência ao cobre em *Xac*, comprometendo a sustentabilidade do controle da doença [6,7]. Métodos físicos, como a poda de árvores infectadas, também são usados, mas são menos eficazes e causam maiores perdas comparado ao combate direto à bactéria.

Devido ao impacto econômico do cancro cítrico na agricultura brasileira e à falta de métodos de controle eficientes, é necessário investigar métodos químicos seletivos. Este projeto de pesquisa visa testar a atividade biológica de nanopartículas de prata (AgNP) obtidas a partir de hesperidina (AgNP@Hsd) e hesperetina (AgNP@Hst), bioflavonóides comumente encontrados em espécies de cítricos. As

propriedades antimicrobianas das AgNP provêm da capacidade de penetrar poros e pequenas aberturas em microrganismos, o que adicionado à sua alta área superficial, permite ter maior contato com os patógenos em comparação com outras formas da prata [8].

As AgNP têm a capacidade de se ligar à parede celular ou membrana celular do microrganismo, o que perturba a estabilidade estrutural levando à perda de sua função celular e com isso a morte do microrganismo. Essas nanopartículas têm a capacidade de se ligar às proteínas e enzimas dos microrganismos, o que pode interferir nas atividades metabólicas. Finalmente, elas podem gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) que são tóxicas para diferentes organismos e podem alterar a estrutura da membrana celular ou interferir com o metabolismo celular do organismo [8-10].

METODOLOGIA

Síntese de nanopartículas de hesperidina e hesperetina:

A síntese foi iniciada com uma solução de AgNO_3 ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e hesperidina $3,27 \text{ mmol L}^{-1}$ (Hsd), extraída de bagaço de laranja, em uma solução de NaOH a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução de AgNO_3 foi adicionada gota a gota à solução da Hsd e sob agitação para formar as AgNP@Hsd. O mesmo procedimento foi seguido para sintetizar nanopartículas nomeadas - AgNP@Hst, apenas substituindo a solução da Hsd por hesperetina (Hst). As nanopartículas foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz, UV-Vis e FTIR (infravermelho) [9].

Experimentos de investigação do perfil metabólico:

O um volume de pré-inóculo da bactéria *Xac* foi adicionado em meio SB (5 g L^{-1} de sacarose, 5 g L^{-1} de extrato de levedura, 5 g L^{-1} de peptona e 1 g L^{-1} de ácido glutâmico) em uma relação 1:10 (v/v) e sometido por 16 h, a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ a agitação constante de 200 rpm. Para os testes de perfil metabólico, as bactérias foram submetidas a concentrações de AgNPs@Hsd e AgNPs@Hst de $1,33 \text{ mg mL}^{-1}$ [7]. As células foram centrifugadas a 3500 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min e então, o pellet bacteriano foi ressuscitado em tampão fosfato 20 mmol L^{-1} , NaCl 150 mmol L^{-1} e posteriormente foi feita a lise celular usando ultrassom. O material lisado foi centrifugado 14000 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min e o sobrenadante foi seco (*SpeedVac*). O sólido obtido foi submetido a uma extração líquido-líquido usando uma mistura de água e clorofórmio em relação 1:1 (v/v). As fases polares e apolares foram analisadas com um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker Avance III 600 MHz, permitindo a identificação dos metabólitos utilizando a sequência de pulsos CPMG e TOCSY. Para os testes *in vivo* foi utilizada a técnica de RMN de semissólidos (HRMAS -*High Resolution Magic Angle Spinning*) em um equipamento Bruker Advance II 400 MHz. Os pellets bacterianos obtidos foram ressuscitados usando uma solução de fosfato 20 mmol L^{-1} , NaCl 150 mmol L^{-1} e glicerol 10% e analisados adicionando a 10 μL de bactérias vivas e 10 μL de D_2O usando sequências de pulsos NOESY 1d, CPMG, HSQC e TOCSY.

Teste de atividade microbiana:

O teste de atividade biológica foi feito usando microplacas de 96 poços, cada poço foi preenchido com diferentes concentrações de nanopartículas (concentrações entre $3,9$ e $32,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com intervalos de $3,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), 25 μL de suspensão de bactérias *Xac* e meio SB até 250 μL . A concentração mínima inibitória foi determinada medindo a absorbância em 600 nm utilizando um leitor de microplacas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de caracterização das nanopartículas indicam que as AgNP@Hsd e AgNP@Hst apresentaram as bandas de Plasmon (UV-Vis), em torno de 410 nm e 380 nm,

respectivamente. Ainda, as AgNP mostraram potenciais zeta de $-33,9 \text{ mV} \pm 5,8 \text{ mV}$ para AgNP@Hsd e $-42,6 \text{ mV} \pm 8,91 \text{ mV}$ para AgNP@Hst, sugerindo alta estabilidade coloidal. O tamanho médio das nanopartículas foi de $67,09 \pm 10,63 \text{ nm}$ para AgNP@Hsd e $63,40 \pm 8,28 \text{ nm}$ para AgNP@Hst. Os resultados das análises por espectroscopia no infravermelho foram indicativos para bandas características dos flavonoides, como estiramentos de $-\text{OH}$, $-\text{CH}$, $\text{C}=\text{O}$, e ligações $\text{C}=\text{C}$ aromáticas, confirmando a presença de funcionalidades orgânicas estabilizadoras nas nanopartículas.

Através do teste de 96 poços, determinou-se que a mínima concentração inibitória frente a *Xac* e para ambas as AgNP foi de $1,93 \mu\text{g mL}^{-1}$. Dessa forma, foram realizados testes estatísticos para identificar a diferença significativa entre a absorbância a 600 nm (Figura 1) após das adições de AgNP em relação aos controles positivos - sem adição de AgNP, utilizando os testes ANOVA e Tukey (Figura 1).

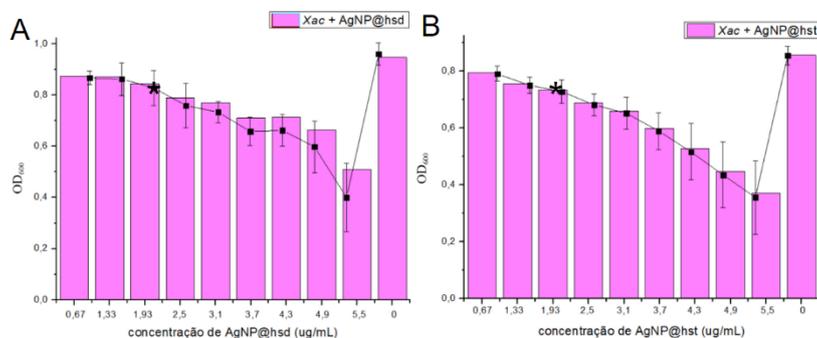


Figura 1. Ilustrações de dados obtidos para as mínimas concentrações inibitórias da A) AgNP@Hst e B) AgNP@Hsd

Os resultados, representados nas Figuras 2 e 3, indicaram diferenças significativas nos perfis metabólicos das amostras submetidas aos tratamentos com AgNPs@Hsd e em comparação com as amostras de controle. A subfigura 2A mostra uma separação entre os grupos de tratamento e o controle para fases polares usando dados de RMN cpmg, sugerindo que os tratamentos com nanopartículas influenciam significativamente os metabólitos na fase polar, utilizando o gráfico de loadings (subfigura 2C) é possível determinar que os principais metabólitos que causam essa separação são, a valina, tirosina, alanina, fumarato, glutamina e leucina presente no controle, tirosina, histidina, lactato, leucina, glutamina e valina presente na amostra tratada com AgNP@Hsd e galactose, treonina, fenilalanina, colina, fosfocolina, isoleucina, glutamina, lactato e valina presente na amostra tratada com AgNP@Hst, o desempenho do Q^2 (subfigura 2E) é otimizado com a utilização de uma componente. Na subfigura 2B, utilizando dados de RMN de espectros editados por filtro T_2 da fase apolar, também é evidente a

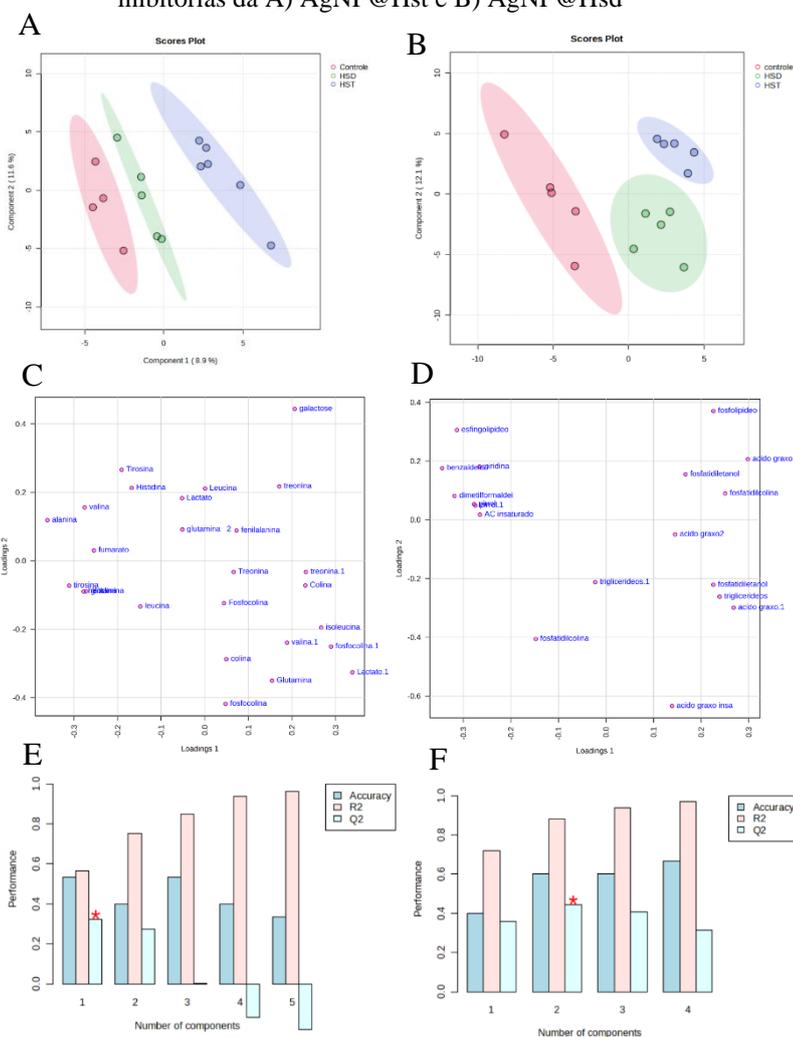


Figura 2. Ilustração dos principais resultados metabonômicos por RMN de líquidos. Dados de gráficos de scores de modelos de PLS-DA obtidos usando espectros de RMN de ^1H de A) frações polares e B) apolares e gráfico de loadings de C) frações polares e D) frações apolares e gráfico de cross validation Q^2 de E) frações polares e F) frações apolares

distinção entre os grupos, com o gráfico de loadings (subfigura 2D) determina-se que os principais metabólitos na separação dos perfis metabólicos são esfingolípídios, ácido graxo insaturado, dimetilformaldeído e fosfatidilcolina presente no grupo de controle, triglicerídeos, ácido graxo, ácido graxo insaturado e fosfatidiletanol presente na amostra tratada com AgNP@Hsd e fosfolípídios, fosfatidilcolina e fosfatidiletanol presente no grupo tratado com AgNP@Hst, o desempenho do Q^2 (subfigura 2F) é otimizado com a utilização de duas componentes. A figura 3 apresenta os scores VIP (*Variable Importance in Projection*) dos metabólitos identificados em cpmg polar e apolar (subfiguras 3A e 3B respectivamente).

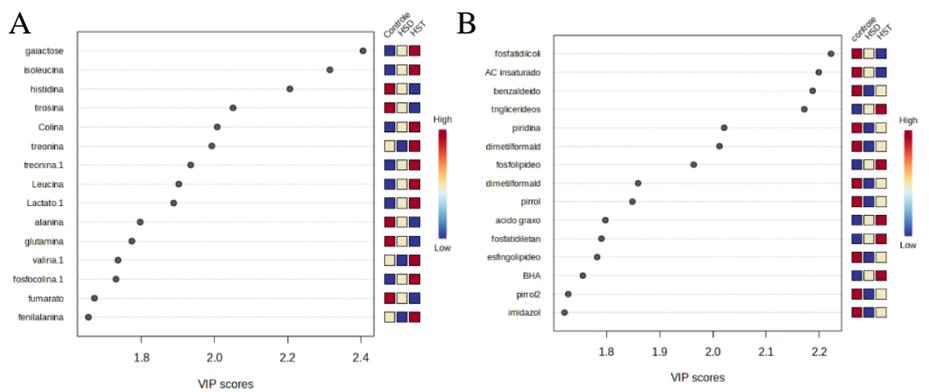
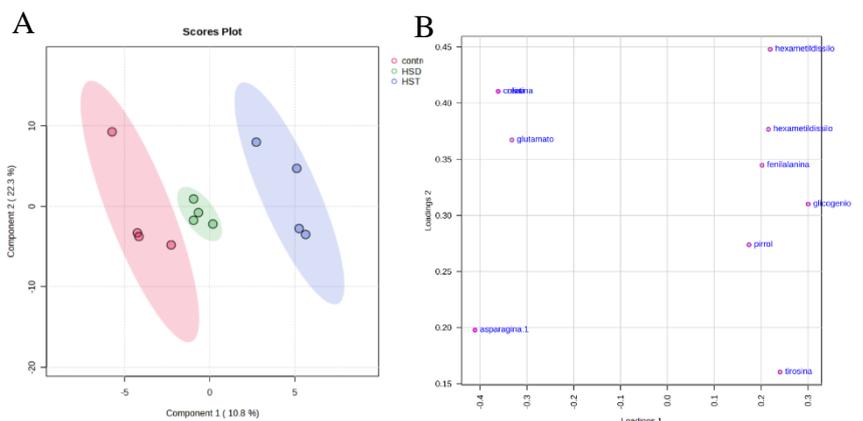


Figura 3. Ilustração dos principais resultados metabonômicos por RMN de líquidos. Metabólitos identificados em cpmg de A) frações polares e B) frações apolares



Na Figura 4, a subfigura 4A mostra os resultados de análises de gerados a partir dos dados de RMN de ^1H cpmg, para as amostras da *Xac* analisadas aplicando a RMN no estado de semissólidos. Os resultados foram indicativos para uma distinção entre as amostras de controle e as tratadas com nanopartículas de AgNPs@Hsd e AgNPs@Hst. A subfigura 4B mostra o gráfico de loadings, onde apresenta os metabólitos identificados destacando asparagina, creatina, colina e glutamato presente no grupo de controle, glicogênio, tirosina, pirrol e fenilalanina presente na amostra tratada com AgNP@Hsd como os mais relevantes para a discriminação entre os grupos, o desempenho do Q^2 (subfigura 4D) é otimizado com a utilização de uma componente.

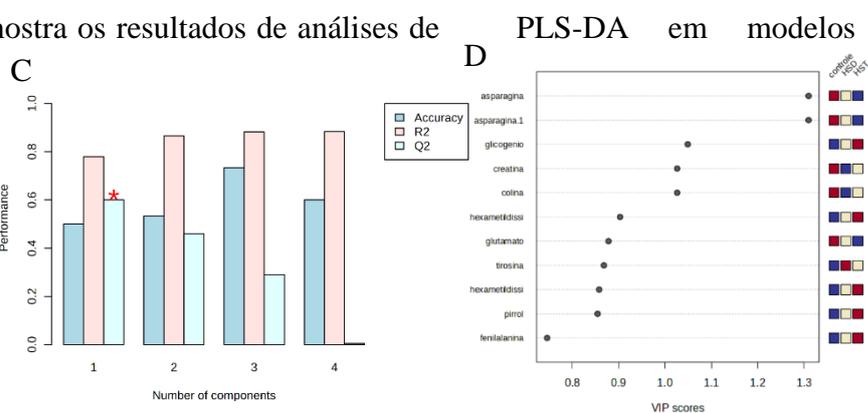


Figura 4. Ilustração dos principais resultados metabonômicos por RMN de semissólidos (HRMAS). Dados de gráficos de PLS-DA obtidos usando (A) espectros de RMN de ^1H , cpmg HRMAS e (B) gráfico de loadings e (C) gráfico de cross validation Q^2 Q^2 e (D) metabólitos identificados.

CONCLUSÃO

Foi possível demonstrar que as nanopartículas de prata derivadas de hesperidina e hesperetina possuem um forte potencial inibitório contra *Xanthomonas axonopodis* spp. *citri*, a bactéria causadora do cancro cítrico. As análises de caracterização confirmaram a formação e a estabilidade dessas nanopartículas, e os testes de atividade microbiana determinaram uma concentração mínima inibitória de

1,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente a *Xac*. Além disso, os experimentos de perfil metabólico no extrato e *in vivo* mostram mudanças nos perfis metabólicos da bactéria sob efeito de AgNP@Hsd e AgNP@Hst e a identificação dos principais metabólitos presentes nas amostras. Esses resultados mostram que as nanopartículas de prata podem servir como alternativa para o controle desta praga devido ao seu alto poder antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

- [1] VIDAL, Maria de Fátima. CITRICULTURA (LARANJA). Caderno Setorial ETENE, Fortaleza, v. 9, 2024.
- [2] Rosseto, P., Silva, G. B., Botta, N. V., Zanutto, C. A., & Nunes, W. M. de C. (2024). Avaliação da severidade de cancro cítrico e quantificação de peróxido de hidrogênio em genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES*, 17(2), e5343. doi: 10.55905revconv.17n.2-261
- [3] CASTRO, Carolina. *Citrus Semi-annual*. Brasília. United States Department of Agriculture, 2024.
- [4] CASTRO, Carolina. *Citrus Annual*. Brasília. United States Department of Agriculture, 2024.
- [5] Martins, PMM, de Oliveira Andrade, M., Benedetti, CE et al. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: interação com o hospedeiro e estratégias de controle. *Tropa. patol vegetal*. 45, 213–236 (2020). doi: 10.1007/s40858-020-00376-3
- [6] Graham, J.H., Brooks, C., Yonce, H.D. 2016. Importance of early season copper sprays for protection of Hamlin orange fruit against citrus canker infection and premature fruit drop. *Proceedings Florida State Horticultural Society*. 129:74-78.
- [7] Zimaro, T., Thomas, L., Maronedze, C. et al. Insights into *xanthomonas axonopodis* pv. *citri* biofilm through proteomics. *BMC Microbiol* 13, 186 (2013). doi: 10.1186/1471-2180-13-186
- [8] C. A. Dos Santos et al., “Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues,” *J Pharm Sci*, vol. 103, no. 7, pp. 1931–1944, 2014, doi: 10.1002/jps.24001.
- [9] E. Abbasi et al., “Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties,” *Crit Rev Microbiol*, pp. 1–8, 2014, doi: 10.3109/1040841X.2014.912200.
- [10] M. Arif et al., “Green synthesis of silver nanoparticles using *Euphorbia wallichii* leaf extract: Its antibacterial action against citrus canker causal agent and antioxidant potential,” *Molecules*, vol. 27, no. 11, p. 3525, 2022, doi: 10.3390/molecules27113525.