Otimização da Produção de Triacsin-C e Produtos Naturais Antimicrobianos pela bactéria *Streptomyces glomeratus*

Palavras-Chave: Greening, *Streptomyces glomeratus*, produtos naturais antimicrobianos

Autores(as):

Luís Guilherme Herreira Maciel, IQ – UNICAMP

Hellen Bertoletti Barbieri, IQ – UNICAMP

Profª. Drª. Taicia Pacheco Fill (orientadora), IQ – UNICAMP

1. Introdução

A doença *Huanglongbing* (HLB), também conhecida como *greening*, é uma das maiores preocupações na citricultura mundial, sendo uma doença que causa redução na qualidade do fruto e do suco feito a partir dele (DALA-PAULA *et al.*, 2019), além de reduzir a produção de frutos em 30 a 100% (IFTIKHAR *et al.*, 2016). O principal agente causador da doença é a bactéria *Candidatus* Liberibacter asiaticus (*C*Las) cujo principal vetor é o psilídeo *Diaphorina citri* (HU et al., 2021).

A *C*Las é uma bactéria que está presente no floema da planta e é dependente dos nutrientes e da microbiota presente no floema para sua colonização. Entretanto, a relação entre a *C*Las e a microbiota é muito pouco entendida (FUJIWARA *et al.*, 2018). O cultivo *in vitro* da *C*Las não foi possível através de protocolos convencionais, o que pode estar relacionado com a microbiota no floema da planta, assim como a dependência de nutrientes do hospedeiro. Por conta disso, o mecanismo de infecção da bactéria não é completamente conhecido, e não se conhecem estratégias de controle eficientes para a doença.

Além disso, a HLB não é detectada assim que a planta é infectada, já que a infecção possui uma fase inicial assintomática, cujo período de incubação costuma ser longo, de 3 a 36 meses, seguida de uma fase sintomática (PEREIRA *et al.*, 2010), resultando em outra problemática relacionada à detecção da doença.

Estudos desenvolvidos previamente no Laboratório de Biologia Química Microbiana (LaBioQuiMi) observaram que árvores de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) infectadas por *C*Las apresentam um aumento na produção de ácidos graxos de cadeia muito longa que podem estar relacionados com a infecção e adaptação da bactéria *C*Las ao seu hospedeiro. Ademais, a aplicação de um inibidor da via de alongamento de ácidos graxos, como o composto Triacsin-C, apresentou um potencial efeito mitigatório frente à *C*Las, o que despertou interesse de estudo. O Triacsin-C é um inibidor da enzima acil-CoA sintetase, enzima que é responsável pela ativação de ácidos graxos de cadeia longa para serem utilizados em processos metabólicos intracelulares, sendo um produto natural descrito na bactéria *Streptomyces aureofaciens* (DEL RIO FLORES *et al.*, 2021). Entretanto, sua aplicação no campo como estratégia de controle poderia ser inviabilizada devido aos altos custos do padrão comercial (1mg – R$

9.472,00). Nesse sentido, a bactéria *S. glomeratus*, disponível no acervo do laboratório, também apresenta um *cluster* biossintético com alta homologia para a sua produção e foi objeto de estudo desse projeto, visando a obtenção de triacsin C de outras fontes naturais.

O projeto buscou, então, estudar o metabolismo secundário da *S. glomeratus* em diferentes condições, visando a produção e otimização de Triacsin-C devido ao seu grande efeito mitigatório frente à *C*Las, o que teria interesse biotecnológico para maiores estudos de manejo do *greening*. Assim como objetivou-se verificar o potencial da bactéria na produção de outros compostos antimicrobianos frente à *C*Las.

Dentre as condições testadas, foram utilizados quatro meios líquidos diferentes suplementados com uma solução de aminoácidos, de modo a tentar induzir a biossíntese de Triacsin-C. Dentre os aminoácidos, uma potencial fonte promissora de nitrogênio é a lisina (THEOBALD *et al.*, 2000), com a glicina sendo uma opção viável. Isso porque ambos são precursores biossintéticos da via das triacsinas, dessa maneira (DEL RIO FLORES *et al.*, 2021), sua suplementação nos meios de cultivo poderia favorecer a biossíntese dessa classe de compostos.

Além disso, foi testada a co-cultura com o fungo *Geotrichum candidum*, um fungo que apresenta um metabolismo lipídico pronunciado durante a infecção na laranja, o que despertou interesse no estudo do comportamento dele frente à uma bactéria que produz um inibidor do metabolismo de lipídios e pode induzir a biossíntese de Triacsin-C pela bactéria.

2. Metodologia

A bactéria *S. glomeratus* foi cultivada em quatro condições diferentes de modo a avaliar o metabolismo com ênfase na produção de Triacsin-C, com seis replicatas biológicas para cada amostra. Entre os meios de cultivo avaliados, têm-se os meios líquido CM (*Complete Medium*) e ISP-2 (*International Streptomyces Project-2*) com a adição de uma solução de aminoácidos com concentração de 1 g/L (com 60% de lisina e 40% de glicina), o meio de cultura R5, o meio com o mínimo de nutrientes (aqui, denominado como Meio Mínimo) e o meio sólido TSA (*Tryptic Soy Agar*) em monocultura e em co-cultura com o fungo *Geotrichum candidum*, de modo a verificar se a presença do fungo induziria a produção de Triacsin-C.

Inicialmente, foi realizado o pré-inóculo da bactéria em meio líquido TSB (*Tryptic Soy Broth*) por uma semana e, após esse período, foi adicionado 100 µL do pré-inóculo em 100 mL de cada meio líquido avaliado, juntamente com 100 µL de ácido nalidíxico. Os meios com o organismo alvo de estudo foram colocados em incubadora a 30 °C e 140 rpm por 15 dias. Após o cultivo foi realizada a extração dos metabólitos utilizando acetato de etila em proporção 1:1 e, em seguida, o preparo de amostras utilizando metanol grau HPLC para realização das análises em um cromatógrafo líquido Thermo Fisher Scientific UltiMateTM 3000 acoplado a um espectrômetro de massas Thermo Orbitrap Q-Exactive (Waltham, MA).

O processamento dos resultados foi realizado com auxílio do *software* MZzMine 4 para tratamento dos dados obtidos pelo cromatógrafo líquido seguido de uma análise de *Feature Based Molecular Network* (FBMN) na plataforma GNPS, seguido da criação de uma rede molecular por meio do *software* CytoScape e uma análise das

classes e superclasses metabólicas utilizando o *software* Sirius. Para a co-cultura, adicionalmente foi realizado um cálculo de inibição do crescimento do fungo através do *software* Fiji.

3. Resultados e Discussão

Inicialmente, avaliou-se a co-cultura entre a bactéria *S. glomeratus* e o fungo *G. candidum* como uma estratégia para induzir a produção de triacsin C. A avaliação da co-cultura realizada, indicou o potencial da bactéria em inibir o crescimento do fungo *G. candidum* (**Figura 1**). Diante disso, foi realizado o cálculo de inibição do crescimento do fungo de modo a medir o diâmetro médio do fungo na presença da bactéria e do fungo em monocultura. Os resultados indicaram uma inibição de 61,21%, o que indica o grande potencial da bactéria *S. glomeratus* em produzir compostos com grande potencial antimicrobiano e poderia possibilitar o estudo de estratégias alternativas para o controle de um importante fitopatógeno de laranja.

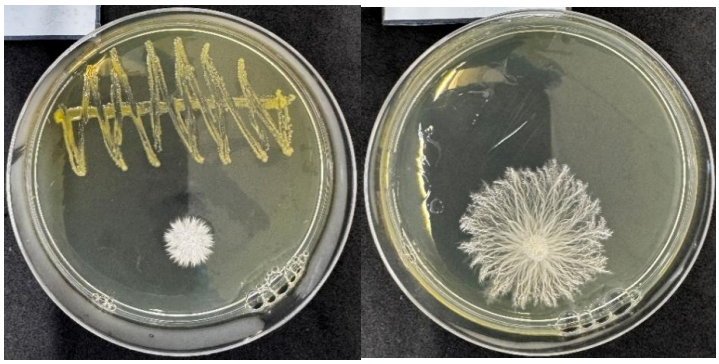

Figura 1. *Co-cultura do fungo G. candidum com a bactéria S. glomeratus (esquerda) e monocultura do fungo (direita).*

Dessa maneira, os extratos da co-cultura foram avaliados via LC-MS e em seguida, avaliados em softwares de análises estatísticas e de identificação de metabólitos. Iniciou-se utilizando o *software* MZmine 4 e, em seguida, foi realizada uma análise de FBMN para anotação dos metabólitos através da comparação dos espectros de massa depositados na plataforma GNPS. Com os resultados obtidos, foi criada uma rede molecular das amostras excluindo os *features* advindos dos meios de cultivo para mostrar apenas as moléculas produzidas pela bactéria *S. glomeratus*. Os *features* foram agrupados em *clusters* baseados em suas similaridades espectrais (*cosine score*). Foi criada uma rede englobando os meios sólidos (monocultura e co-cultura com *G. candidum*) disposta na **figura 2**. O metilcinamaldeido foi um dos compostos identificado pelo banco de dados do GNPS que foi encontrado exclusivamente no meio R5 e possui atividade antibacteriana e antifúngica frente a fungos do gênero *Aspergillus* (WU *et al.*, 2025), além de ser comumente utilizada na indústria alimentícia como agente aromatizante.

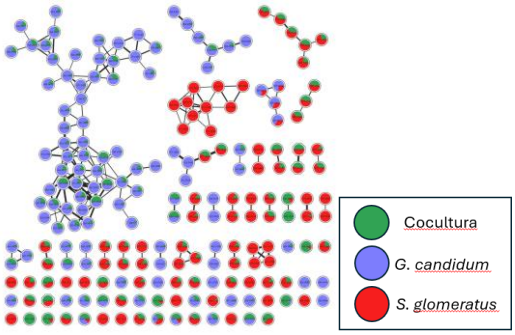

Figura 2. *Rede molecular dos meios sólidos.*

Através do *software* SIRIUS, uma ferramenta *in sílico* que auxilia na predição de *features* (GODZIEN *et al.*, 2018), foi possível caracterizar as amostras em relação a classes e superclasses metabólicas, e pela via bioquímica. As **figuras 3** e **4** ilustram a distribuição dessas classes para as diferentes condições experimentais, mantendo-se apenas os resultados com um nível de confiança acima de 80%.

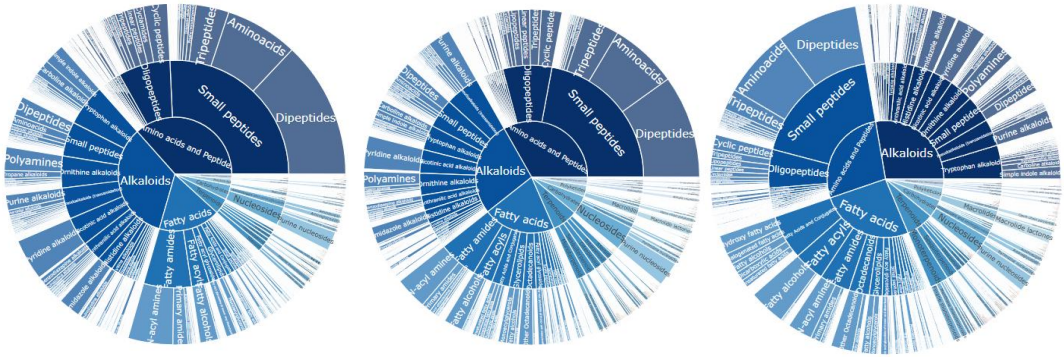

Figura 3. *Distribuição dos features anotados pelo SIRIUS para meio CM (esquerda), ISP-2 (centro) e R5 (direita).*

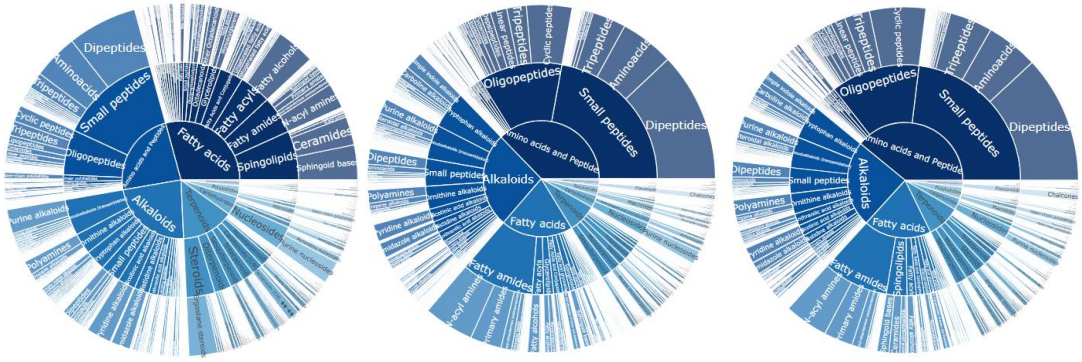

Figura 4. *Distribuição dos features anotados pelo SIRIUS para meio mínimo (esquerda), monocultura (centro) e cocultura (direita).*

Com esses resultados, foi possível observar que a classe predominante em praticamente todos os grupos são os aminoácidos e peptídeos, seguido de alcaloides, metabólitos secundários que, de forma geral, possuem grande potencial biológico, apresentando propriedades antivirais, antibacterianas e anti-inflamatórias. Dentro das classes de aminoácidos e peptídeos, foi observado uma predominância de dipeptídeos em todos os grupos (peptídeos formados por dois aminoácidos). Além disso, a fenilalanina foi detectada nos meios, um aminoácido que embora tenha grande importância, não está ligado a biossíntese do Triacsin-C, mas que pode servir como precursor de metabólitos secundários. É interessante ressaltar que o crescimento da *S. glomeratus* no meio CM parece ter favorecido a biossíntese de alcaloides em comparação ao meio ISP2, visto que é um meio de cultura rico em fontes de carbono e nitrogênio, o que favorece à biossíntese de metabólitos especializados.

Para o Triacsin-C, foi feita uma comparação dos resultados obtidos para cada meio com um padrão analítico, de modo a observar em quais meios houve a produção deste metabólito. Para isso, foram utilizados os cromatogramas dos meios ajustados para íons de *m/z* 208,1434 $[M+H]^+$. O íon *m/z* 208,1434 foi observado nos meios CM, ISP-2, R5, bem como na monocultura em meio sólido e co-cultura com o fungo *G. candidum*. Na **figura 5** estão os cromatogramas obtidos para os meios R5 para os íons de interesse de modo a exemplificar os resultados.

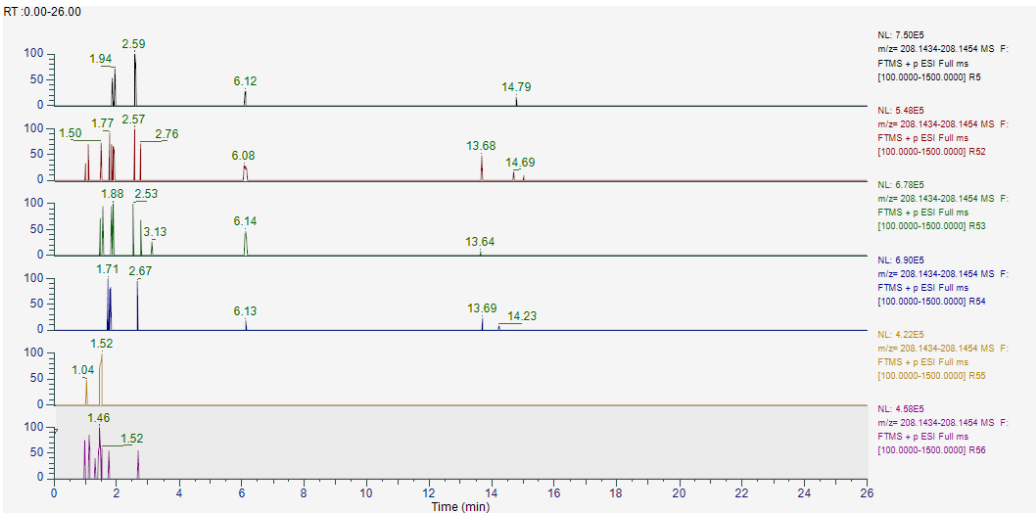

Figura 5. *Cromatogramas do meio R5 filtrados para íons de m/z 208,1434.*

A presença de íons com o filtro de *m/z* utilizado é um indicativo da presença de Triacsin-C no meio que foi testado. Assim, a bactéria apresentou potencial para ser uma fonte alternativa para a produção de Triacsin-C, o que pode reduzir os custos envolvidos na sua produção e torná-la uma alternativa viável para o controle de HLB pelo seu efeito mitigatório frente à *C*Las.

4. Conclusão

O estudo da otimização da produção do inibidor Triacsin-C como uma alternativa para mitigação da bactéria é de grande importância para esta área. Com os resultados foi possível observar a presença de Triacsin-C em algumas das condições testadas, como os meios R5, CM, ISP-2 bem como no meio sólido tanto em monocultura quanto na cocultura com o fungo *G.* candidum, o que abre margem para estudos mais direcionados para esses meios e testes em larga escala de modo a otimizar a produção e torná-la viável para ser aplicada para o controle do *greening*.

5. Bibliografia

DALA-PAULA, Bruno M. et al. Effect of huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. Frontiers in plant science, v. 9, p. 1976, 2019.

DEL RIO FLORES, Antonio et al. Biosynthesis of triacsin featuring an N-hydroxytriazene pharmacophore. **Nature chemical biology**, v. 17, n. 12, p. 1305-1313, 2021.

FUJIWARA, Kazuki; IWANAMI, Toru; FUJIKAWA, Takashi. Alterations of Candidatus Liberibacter asiaticus-associated microbiota decrease survival of Ca. L. asiaticus in in vitro assays. Frontiers in microbiology, v. 9, p. 3089, 2018.

GODZIEN, Joanna et al. Metabolite annotation and identification. In: **Comprehensive analytical chemistry**. Elsevier, 2018. p. 415-445.

HU, Bin et al. Molecular signatures between citrus and Candidatus Liberibacter asiaticus. PLoS pathogens, v. 17, n. 12, p. e1010071, 2021.

IFTIKHAR, Yasir et al. Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management–A review. Journal of the Saudi society of agricultural sciences, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2016.

PEREIRA, Fabíola Manhas Verbi et al. Evaluation of the effects of Candidatus Liberibacter asiaticus on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools. Talanta, v. 83, n. 2, p. 351-356, 2010.

THEOBALD, Uwe; SCHIMANA, Judith; FIEDLER, Hans-Peter. Microbial growth and production kinetics of Streptomyces antibioticus Tü 6040. Antonie Van Leeuwenhoek, v. 78, p. 307-313, 2000.

WU, Kegang et al. Antibacterial properties and mechanism of 2-methoxycinnamaldehyde against Salmonella enteritidis and its potential application in treating raw pork. **LWT**, v. 217, p. 117449, 2025.