

PROPOSTA PARA BOLSA PIBIC – LNBR e LNNano/CNPEN

Estudo de moléculas sinalizadoras voláteis como indutores de crescimento vegetal e de estratégias de *delivery* por nanoencapsulamento

Orientadores: Dr^a Juliana Velasco de Castro Oliveira (LNBR)/Juliana Damasceno (LNNano)

1. INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE

Embora o uso de agroquímicos possibilite a obtenção de altas produtividades em diferentes culturas, sua aplicação pode ocasionar diversos impactos ambientais, tais como aumento da emissão de gases de efeito estufa, contaminação de solo, água, morte de organismos não-alvo, bem como problemas à saúde humana¹. Como uma alternativa ambientalmente amigável, microrganismos podem produzir diversos compostos bioativos capazes de promover o crescimento vegetal, bem como inibir o crescimento de fitopatógenos²⁻⁴. Uma classe destas moléculas bioativas é formada por compostos orgânicos voláteis (COVs), que são pequenas moléculas sinalizadoras de natureza lipofílica (<300 Dalton), que possuem alta pressão de vapor, e volatilizam facilmente em temperatura ambiente⁵⁻⁸. Tais características permitem a fácil difusão destes compostos pelo solo, água e ar e sua absorção pelas plantas. Cada espécie ou cepa bacteriana produz uma gama diferente de COVs (o que é denominado volatiloma) que interagem de forma bastante singular com outros organismos e geram respostas específicas^{3,9}.

Até o momento, já existem diversos estudos com mostrando a ação de COVs em *Arabidopsis thaliana* (principalmente), *Nicotiana attenuata*, alface, alfafa, pepino, repolho, tomate, e outras espécies de metabolismo fotossintético C3. Entretanto, há poucos estudos com espécies C4^{3,4,10,11}, como o milho e sorgo, importantes para produção de diversos biorrenováveis. Assim, para aumentar o conhecimento nesta área, nosso grupo vem estudando promoção de crescimento de *Setaria viridis*, uma planta modelo de metabolismo C4, por meio de COVs bacterianos. Neste estudo, já fomos capazes de identificar bactérias que promovem crescimento de *S. viridis* em até 4 vezes por meio dos COVs, além de identificar quais voláteis são produzidos por estas bactérias. Por meio de uma abordagem multi-ômicas, observamos diversas vias metabólicas que estão sendo moduladas por estes compostos. Com a adição de outras análises moleculares e fisiológicas, espera-se obter sólidas evidências de quais processos metabólicos de fato levam à promoção de crescimento.

Os resultados deste projeto permitirão um entendimento profundo da ação das moléculas indutoras de crescimento no crescimento vegetal, o que, a longo prazo, pode ajudar no desenvolvimento de novas práticas agrícolas visando uma agricultura mais sustentável. Neste sentido, pensando no desenvolvimento de bioprodutos e em uma estratégia de *delivery* destas moléculas, nosso grupo em colaboração com o LNNano pretende explorar a nanoencapsulação dos COVs a partir de carreadores lipídicos nanoestruturados. A nanoencapsulação destas moléculas voláteis pode diminuir a volatilidade dos compostos bioativos, protegê-los de fatores deteriorantes externos como oxigênio, luz, umidade e pH, e aumentar a solubilidade destas moléculas que, em geral, são lipofílicas¹². De forma geral, o projeto envolve estudos de microbiologia aplicada, e o (a) bolsista(a) terá a oportunidade de aprender e ter independência em técnicas de microbiologia (preparo de meio de cultivo, crescimento de bactérias), ensaios de co-cultivo (planta-bactéria), biologia molecular (DNA, purificação de ácidos nucleicos, PCR em tempo real, entre outros), e em técnicas de nanotecnologia.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste projeto é aprofundar o conhecimento sobre moléculas sinalizadoras voláteis atuando no crescimento vegetal e em sistemas de *delivery* por nanoencapsulamento. Têm-se como objetivos específicos:

- i. Realizar uma análise temporal da expressão de genes candidatos relacionados ao crescimento por PCR em tempo real;
- ii. Analisar os resultados do volatiloma das bactérias e realizar a validação funcional utilizando COVs sintéticos (individual e em *mix*);
- iii. Avaliar sistemas de nanoencapsulamento de COVs.

3. METODOLOGIA RESUMIDA

3.1 Avaliação da expressão temporal de genes que podem estar associados ao crescimento de *S. viridis*

Anteriormente foi feito o co-cultivo de *S. viridis* com as bactérias de estudo e foram coletados pontos 1, 2, 3, 5 e 7 dias após início do co-cultivo para avaliação da promoção de crescimento por peso seco e extração de RNA para análise da expressão de genes selecionados. As amostras estão congeladas a -80 °C e será feita a extração de RNA utilizando o *kit* SV Total RNA Isolation System (Promega) seguindo o protocolo do fornecedor, com algumas modificações. A qualidade e integridade dos RNAs será determinada utilizando o *kit* Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies) em um equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), seguindo protocolo do fornecedor. A quantificação será realizada utilizando o *kit* Invitrogen Qubit™ RNA BR Assay (ThermoFisher Scientific) em aparelho Qubit (ThermoFisher Scientific), de acordo com as especificações do fabricante. Será feito tratamento com DNase (*kit* Turbo DNA-free, Invitrogen) para eliminar qualquer vestígio de DNA, seguido de síntese de cDNA utilizando entre 100 a 500 ng de RNA tratado (*kit* Revertaid First Strand cDNA Synthesis, ThermoFisher). A análise de expressão gênica por RT-qPCR será realizada seguindo metodologia já padronizada no grupo, descrita por Neto *et al.* (2016)¹³.

3.2 Validação funcional com o uso de COVs sintéticos na promoção de crescimento de *S. viridis*

Depois de identificar os perfis de COVs produzidos pelas melhores cepas, queremos verificar qual (quais) destes voláteis possui(em) a capacidade de promover o crescimento de *S. viridis*, testando-os individualmente ou combinados. Os dados de volatiloma serão analisados e escolheremos dez metabólitos sintéticos que serão comercialmente adquiridos para realizar os testes promoção *in vitro*. O sistema de co-cultivo será montado de forma similar ao descrito no item 3.1, mas ao invés da cepa teste na placa de petri menor, será um dos compostos testados (ou uma mistura) dissolvido em metanol (ou outro solvente recomendado, dependendo do composto) nas concentrações finais de 5, 50 e 500 ng. As placas serão incubadas durante um período de dias (de acordo com a inspeção visual) nas condições citadas anteriormente e a promoção de crescimento será avaliada pelo peso seco. Este passo é muito importante porque será estabelecido quais são os COVs que de fato promovem o crescimento e se o fazem individualmente ou de forma combinatória. Estes dados podem levar à produção de um bioinoculante ou uma formulação química utilizando os compostos mais promissores.

3.3 Síntese e Caracterização do sistema de nanoencapsulamento de COVs

Com objetivo de encapsular os compostos orgânicos voláteis, os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) serão avaliados. Os NLCs, devido a sua natureza química, possuem a capacidade de incorporar

compostos lipofílicos/hidrofóbicos, controlando a liberação, aumentando a biodisponibilidade e a estabilidade dos compostos encapsulados^(14,15). Para tal, os carreadores lipídicos nanoestruturados serão preparados pelo método de emulsificação e sonicação, à quente. Primeiramente o lipídio sólido (manteiga de cacau) e o lipídio líquido (óleo de oliva ou óleo de gergelim) serão aquecidos em banho-maria até a temperatura de fusão do lipídio sólido (40°C)⁽¹⁶⁾. A razão entre o lipídio sólido e o líquido será de 2:1. A mistura será mantida sob agitação por 2 min e em seguida serão adicionado os COVs. Uma fase aquosa contendo Pluronic F68 a 2%, será aquecida a 40°C e homogeneizada por 5 minutos e em seguida despejada sobre a fase lipídica. A mistura ficará sob agitação por 10 min, formando uma emulsão que, posteriormente, será homogeneizada em alta velocidade (24.000 rpm, 5 min.) em equipamento Ultra-Turrax. Após, a emulsão será submetida à ultrassom, em sonificador de ponteira (potência de 50W e 37 kHz de frequência nominal) por 10, 15; 20 e 25 minutos 25°C e resfriada em banho de gelo (2 a 8°C), para formação das nanopartículas. O sistema será caracterizado por espalhamento de luz dinâmico (DLS) para diâmetro hidrodinâmico e índice polidispersão, determinação do potencial zeta por espalhamento de luz eletroforético (ELS), análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e avaliação da porcentagem de encapsulação (%EE) por CG-MS.

4. REFERÊNCIAS

1. Devi, P. I. *et al.* Agrochemicals, environment, and human health. *Annu Rev Environ Resour* **47**, 399–421 (2022).
2. Ryu, C. M. *et al.* Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4927–4932 (2003).
3. Sharifi, R. & Ryu, C. M. Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals of Botany* vol. 122 349–358 Preprint at <https://doi.org/10.1093/aob/mcy108> (2018).
4. Fincheira, P. *et al.* O. Current advances in plant-microbe communication via volatile organic compounds as an innovative strategy to improve plant growth. *Microbiological Research* **247**, 126726 (2021).
5. Kanchiswamy, C. *et al.* Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science* vol. 6 151 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00151> (2015).
6. Lemfack, M. C. *et al.* MVOC 2.0: A database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research* **46**, D1261–D1265 (2018).
7. Piechulla, B., *et al.* Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. *Plant, Cell & Environment* **40**, 2042–2067 (2017).
8. Fischer, G., *et al.* Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere* **39**, 795–810 (1999).
9. Schulz-Bohm, K., *et al.* Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. *Frontiers in Microbiology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02484> (2017).
10. Yasmin, H. *et al.* Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* alleviated drought stress by modulating defense system in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum* **172**, 896–911 (2021).
11. Castulo-Rubio, D. Y. *et al.* Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (Strategy II plant) morphogenesis and *SbFRO1* transcription *in vitro*. *Journal of plant growth Regulation* **34**, 611–623 (2015).
12. Mun, H. & Townley, H. Nanoencapsulation of plant volatile organic compounds to improve their biological activities. *Planta Med* **87**, (2020).
13. Neto, A. A. K., *et al.* Insights into the plant polysaccharide degradation potential of the xylanolytic yeast *Pseudozyma brasiliensis*. *FEMS Yeast Research* **16**, (2016).
14. Montenegro, L. *et al.* Rosemary essential oil-loaded lipid nanoparticles: *in vivo* topical activity from gel vehicles. *Pharmaceutics* **9**, 48 (2017).
15. Khezri, K., *et al.* Accelerated infected wound healing by topical application of encapsulated Rosemary essential oil into nanostructured lipid carriers. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **47**, 980–988 (2019).
16. Saporito, F. *et al.* Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing. *International Journal Of Nanomedicine* **13**, 175–186 (2018).