

Nanoencapsulamento de DNA plasmidial de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e dsRNA como veículo de entrega de agentes de controle de doenças e pragas

Laislane Mirela Delmondes Mudo¹; Maria Angélica Guimarães Barbosa²; Nataniel Franklin de Melo³; Douglas de Britto⁴

Resumo

O objetivo deste estudo foi aperfeiçoar o encapsulamento dos ácidos nucleicos como veículo de entrega de agentes de controle de pragas e doenças. Como modelos, foram estudados o encapsulamento do DNA plasmidial (DNA-p) de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, causadora do cancro-bacteriano na uva, e do dsRNA, objetivando o silenciamento do psíldeo *Diaphorina citri*, que é o inseto-vetor da bactéria que causa o grenning (Huanglongbing/HLB). Ambos os encapsulamentos ocorreram via gelificação ionotrópica a partir de soluções diluídas de quitosana em ácido clorídrico e ácido acético com tripolifosfato. As suspensões obtidas foram caracterizadas por espectroscopia no UV-visível, eletroforese, tamanho (espalhamento de luz dinâmico - DLS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A síntese em ácido acético gerou melhores resultados, pois tanto as nanopartículas obtidas com dsRNA como aquelas com DNA plasmidial apresentaram tamanhos menores e distribuições mais homogêneas. Assim, o nanoencapsulamento de ácido nucleico via gelificação ionotrópica é viável, com potencialidade de aplicação no controle de doenças e pragas.

Palavras-chave: fitopatologia, nanopartículas, quitosana, sanidade vegetal.

¹Licenciada em Química, mestranda em Ciência dos Materiais (PGCM), Univasf, Petrolina, PE.

²Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

³Biólogo, D.Sc. em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

⁴Químico, D.Sc. em Química, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. douglas.britto@embrapa.br.

Introdução

Por causa do crescente aumento do surgimento de pragas e doenças na agricultura, bem como do aumento de resistência de pragas e patógenos aos tratamentos convencionais, métodos alternativos de controle têm surgido como forma de minimizar este problema. Controle biológico, vacinas não virais e tecnologia de RNA interferente (RNA-i) são alguns exemplos que têm gerado resultados promissores.

Nanopartícula (NP) baseada em quitosana tem sido utilizada para encapsular DNA plasmidial com o objetivo de estruturar um vetor não viral. Os vetores não virais têm sido extensivamente estudados e aplicados como sistemas de transfecção estáveis com baixa toxicidade. NP catiônicas possuem a propriedade de atuar como vetores, formando complexos que são capazes de direcionar o material genético para a célula-alvo.

A formação desses complexos ocorre pelo fato de a carga negativa dos grupos de ácidos nucleicos interagirem eletrostaticamente com os grupos catiônicos da matriz de NP. Assim, uma estrutura é criada envolvendo o ácido nucleico e serve como uma barreira contra as nucleases ou macrófagos. No segundo caso, o dsRNA, obtido por Engenharia Genética, pode ser usado como agente biológico para controlar pragas de interesse agrícola (Hunter et al., 2012; Gillet et al., 2017).

Este trabalho objetivou o desenvolvimento de sistemas baseados em quitosana e tripolifosfato para o nanoencapsulamento de material genético por gelificação iônica para aplicação no controle de pragas e doenças.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido, no período de abril de 2017 a julho de 2018.

O meio de cultura NYDA, constituído por dextrose, extrato de carne, extrato de levedura e ágar foi utilizado para a multiplicação de *X. campestris* pv. *viticola* (X_{cv}). O pré-inóculo da bactéria foi feito retirando-se com uma alça esterilizada uma amostra das colônias de bactérias dos tubos de microcentrifugas que foram plaqueadas em meio NYDA.

Na extração do DNA plasmidial de X_{cv} , todos os reagentes usados estão descritos no protocolo de miniprep para a extração de DNA-plasmidial (DNA-p). O dsRNA foi preparado por empresa especializada, de acordo com projetos em condução na Embrapa Mandioca e Fruticultura.

A preparação das nanopartículas de quitosana com tripolifosfato de sódio (TPP), contendo material genético incorporado, foi realizada conforme descrito na literatura com ajustes (Britto et al., 2012). A solução estoque de TPP, para o encapsulamento do dsRNA, foi preparada dissolvendo-se 60 mg de TPP em 50 mL de água destilada. Para o encapsulamento do DNA-p, a solução de TPP foi feita dissolvendo-se 30 mg em 50 mL de água. A solução estoque de quitosana foi preparada dissolvendo-se 150 mg de quitosana purificada em 50 mL de ácido acético (HAc) a 0,1% (v/v) e em 50 mL de ácido clorídrico a 0,1% (v/v) sob agitação magnética por 4 horas. Em seguida, foi separada uma alíquota de 300 μL das soluções de dsRNA e misturada com 700 μL da solução estoque de TPP. Para o DNA-p, um volume de 100 μL foi adicionado a 200 μL de TPP. A formação das NP via gelificação iônica e encapsulamento se deu pela adição desta solução de TPP + material genético a 1.000 μL da solução estoque de quitosana, perfazendo-se, assim, um volume final de 2.000 μL para o dsRNA e de 1.300 μL para o DNA-p.

A espectroscopia no UV-visível e a eletroforese em gel de agarose foram utilizadas para quantificar a o DNA-p extraído, bem como para confirmar a eficiência da extração.

Resultados e Discussão

O procedimento para isolamento do DNA-p de *X_{cv}* foi satisfatório, conforme observado pela técnica de eletroforese (Figura 1). De acordo com as caracterizações por eletroforese (Figura 1) e espectroscopia no UV-visível (Tabela 1), ocorreu variação de concentração significativa durante as extrações. Isso pode ser constatado na Figura 1, spots C, D, E e F.

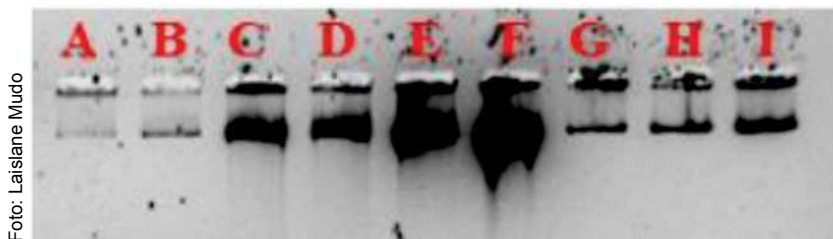


Figura 1. DNA-p em gel de agarose extraído de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (A - I). Nas cavidades (G) 25 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, (H) 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e (I) 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foram aplicados os padrões.

Tabela 1. Concentração de DNA plasmidial ($\mu\text{g/mL}$) e volume (μL) de X_{cv} para as diferentes extrações de acordo com espectroscopia no UV-visível.

Amostras	Extração 1	Extração 2	Extração 3	Extração 4	Extração 5
Conc. DNA	624 \pm 21	355 \pm 8	1195 \pm 262	570 \pm 53	1840 \pm 113
Volume	40	100	500	100	400

No processo de encapsulamento pelo método de gelificação iônica forma-se uma suspensão opalescente (aparência leitosa) que indica o ponto ideal de encapsulamento (Calvo et al., 1997; Janes et al., 2001; Pan et al., 2002).

A análise por espectroscopia no UV-visível indicou que houve o encapsulamento do DNA-p (Figura 2A). Observou-se, ainda, que, após o encapsulamento em NP de quitosana, a concentração de DNA-p no sobrenadante caiu para próximo de zero, ficando próximo do branco (solvente). Isto indica eficiência no encapsulamento próximo de 100%.

Pela variação da concentração do dsRNA após o encapsulamento, observou-se que a síntese foi efetiva (Figura 2B). No entanto, em valor inferior ao observado para o DNA-p (Tabela 2). Apesar disso, valores obtidos acima de 50% são satisfatórios e estão de acordo com o reportado na literatura para o encapsulamento de dsRNA (Gharehdaghi et al., 2014). Neste caso, foi alcançada uma eficiência de encapsulamento que variou de 10% a 90%.

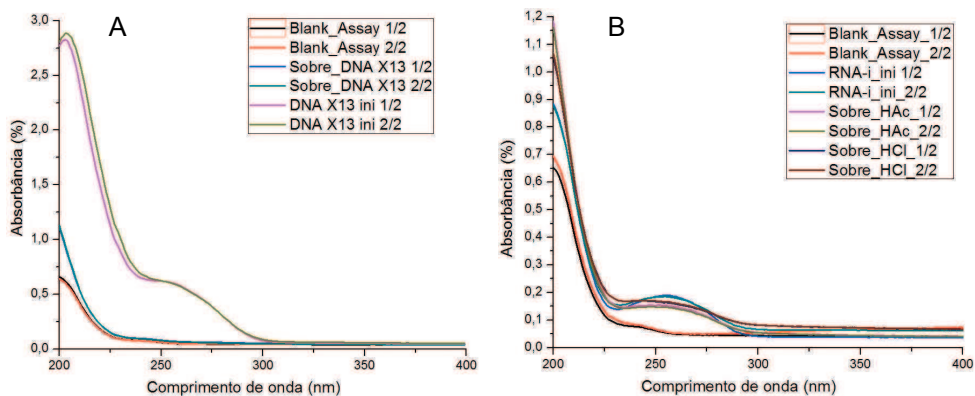


Figura 2. Espectros UV-visível do DNA-p inicial de X_{cv} e da solução sobrenadante de nanopartícula após centrifugação (A) e do RNA-i inicial e da solução sobrenadante de NP após centrifugação (B), sintetizadas a partir de ácido clorídrico e ácido acético.

Tabela 2. Valores das concentrações inicial e do sobrenadante ($\mu\text{g/mL}$) e de eficiência de encapsulamento (EE) para o do RNA-i.

Amostras	Conc. inicial RNA-i	Conc. Sobrenadante	EE (%)
NP HAc	60 \pm 14	27,7 \pm 0,7	53,8
NP HCl	60 \pm 14	21 \pm 1,6	65,0

Conclusões

O método de extração mini-prep do DNA plasmidial de *X. campestris* pv. *viti-cola* foi adequado, possibilitando recuperar DNA puro para o encapsulamento.

O protocolo de encapsulamento de DNA-plasmidial e do dsRNA pelo método de gelificação iônica foi eficiente, resultando em percentagem alta de encapsulamento, principalmente para o DNA plasmidial. A tecnologia é, portanto, adequada como veículo de entrega de material genético, objetivando o tratamento de doenças e controle de pragas.

Agradecimentos

À Rede AgroNano, pelo apoio financeiro, e ao pesquisador Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade, da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Referências

BRITTO, D.; MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C.; ASSIS, O. B. G. N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 487-493, 2012.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carrier. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p. 125-132, 1997.

GHAREHDAGHI, E. E.; AMANI, A.; KHOSHAYAND, M. R.; BANAN, M.; GHAREHDAGHI, E. E.; AMINI, M. A.; FARAMARZI, M. A. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimization of processing/formulation parameters. **Nucleic Acid Therapeutics**, v. 24, n. 6, p. 420-427, 2014.

GILLET, F. X.; GARCIA, R. A.; MACEDO, L. L. P.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SA, M. F. Investigating engineered ribonucleoprotein particles to improve oral RNAi delivery in crop insect pests. **Frontiers in Physiology** 8, 1-14, 2017.

HUNTER, W. B.; GLICK, E.; PALDI, N.; BEXTINE B. R. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest population suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 85-87, 2012.

JANES, K. A.; FRESNEAU, M. P.; MARAZUELA, A.; FABRA, A.; ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 255-267, 2001.

PAN, Y.; LI, Y.; ZHAO, H.; ZHENG, J.; XU, H.; WEI, G.; HAO, J.; CUI, F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, p. 139-147, 2002.