



EXPLORANDO O PERFIL QUÍMICO DE CULTIVOS MISTOS ENTRE *Streptomyces* spp. E *Rhinocladiella similis*

Adriana S. Oliveira¹; Alef dos Santos²; Antônio J. Cantanhede Filho³; Edson Rodrigues Filho¹

¹Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, São Carlos, SP, Brasil

²Department of Chemistry, Umeå University, Umeå SE-90187, Sweden

³Instituto Federal Do Maranhão Campus Monte Castelo, São Luis, Maranhão, Brasil.
adrianaoliveira3200@gmail.com

Palavras-Chave: LC-MS/MS, metabólitos secundários, metabolômica.

Introdução

Os produtos naturais constituem uma das principais fontes de diversidade química exploradas pela Química Orgânica. Entre estas fontes estão os micro-organismos, que se encontram em foco desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, um marco que evidenciou o potencial de fungos e bactérias como produtores de metabólitos secundários aplicáveis à medicina, agricultura, indústria alimentícia e biotecnologia (BRITO, 2021). Os fungos filamentosos e as actinobactérias destacam-se pela diversidade de metabólitos e pela capacidade de modular seu metabolismo frente às diferentes condições de cultivo, nutrientes e interações ecológicas (BRITO, 2021; BERTRAND et al., 2014).

Entre as actinobactérias, o gênero *Streptomyces* ocupa posição central na prospecção de produtos naturais microbianos. Esse grupo reúne bactérias filamentosas com desenvolvimento morfológico complexo e elevado potencial biossintético, sendo historicamente associado à produção de antibióticos, antifúngicos, herbicidas, fungicidas, enzimas de interesse industrial e outros metabólitos secundários bioativos. A relevância desse gênero é evidenciada pela produção de compostos clássicos, como estreptomicina, cloranfenicol, anfotericina B, nistatina e natamicina, além de outras substâncias associadas à atividade contra fungos patogênicos (BRITO, 2021). Dessa forma, linhagens de *Streptomyces* permanecem como modelos relevantes para estudos voltados à diversidade química e à modulação da produção de metabólitos secundários.

Apesar desse potencial, a diversidade química observada em cultivos axênicos convencionais representa apenas parte do repertório metabólico disponível, visto que as vias biossintéticas podem permanecer pouco expressas ou silenciadas. Nesse contexto, uma proposta de ativar essas vias é empregar o co-cultivo como estratégia de indução biótica, aproximando organismos distintos e favorecendo competição, interação e sinalização química. Essas interações podem resultar no surgimento de substâncias ausentes em monocultivo, na intensificação de metabólitos ou na supressão de vias metabólicas



(RUTLEDGE; CHALLIS, 2015; SCHERLACH; HERTWECK, 2009; BERTRAND et al., 2014; MARMANN et al., 2014). Para favorecer esse tipo de interação em laboratório, o meio sólido à base de arroz fornece uma matriz nutritiva complexa e heterogênea, permitindo crescimento sobre superfície sólida, contato prolongado entre os micro-organismos e formação de microambientes com diferentes disponibilidades nutricionais e de umidade.

A interação entre fungos filamentosos e actinobactérias do gênero *Streptomyces* é particularmente relevante por envolver organismos com repertórios biossintéticos distintos e potencialmente complementares. Neste trabalho, o fungo *Rhinochadiella similis* foi selecionado como parceiro de interação devido às suas características ecológicas e fisiológicas. Espécies desse gênero pertencem ao grupo dos fungos melanizados, também denominados dematiáceos, cuja melanização está associada à tolerância a estresses ambientais e à adaptação a condições adversas. Além disso, *R. similis* já foi descrita como fungo endofítico isolado de ambiente de Caatinga, indicando sua capacidade de associação com sistemas biológicos complexos (PÁDUA et al., 2022). Estudos recentes com *R. similis* LaBioMMi 1217 também indicam flexibilidade morfológica e metabólica em resposta a condições ambientais específicas, incluindo alterações relacionadas à melanização, oxilipinas e metabolismo de ferro (DOS SANTOS et al., 2025). Essas características tornam esse fungo um organismo interessante para estudos de interação microbiana, principalmente em sistemas destinados à avaliação de respostas químicas induzidas por convivência com actinobactérias.

Considerando que essas respostas podem envolver alterações sutis e simultâneas em extratos complexos, a avaliação dos cultivos mistos exige abordagens capazes de comparar perfis metabólicos de forma ampla. A análise por LC-MS/MS fornece informações cromatográficas e espectrométricas, enquanto as redes moleculares, especialmente na plataforma GNPS, organizam espectros de MS/MS por similaridade de fragmentação, permitindo visualizar famílias moleculares e comparar sinais entre amostras (PILON et al., 2021; MOURA et al., 2022). Em abordagens baseadas em *features*, a integração entre tempo de retenção, massa, fragmentação e abundância relativa permite a comparação entre condições de cultivo, ajudando a reconhecer sinais exclusivos, intensificados ou reduzidos nos cultivos mistos.

Este trabalho tem como objetivo avaliar alterações no perfil químico de cultivos mistos entre *Rhinochadiella similis* e linhagens de *Streptomyces*, em comparação aos cultivos axênicos. A hipótese é que a interação fungo-actinobactéria module a produção de metabólitos secundários, gerando alterações qualitativas e/ou quantitativas nos perfis químicos e permitindo selecionar sistemas promissores para investigações posteriores.

Material e Métodos

Foram analisados cultivos axênicos e mistos envolvendo o fungo filamentoso *Rhinochadiella similis* e duas actinobactérias do gênero *Streptomyces*: *Streptomyces murinus* e



uma cepa de *Streptomyces* sp. ainda não identificada em nível de espécie, ambas pertencentes à coleção microbiana do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos (LaBioMMi). A comparação foi realizada entre os cultivos axênicos de cada micro-organismo e os cultivos mistos obtidos pela interação de *R. similis* com cada linhagem de *Streptomyces*. Os cultivos foram conduzidos em meio sólido à base de arroz, utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 35 g de arroz parboilizado e 25 mL de água destilada. Após absorção da água pelo substrato, os frascos foram esterilizados em dois dias consecutivos.

Os co-cultivos foram preparados empregando duas estratégias de inoculação. Na primeira, os micro-organismos foram inoculados simultaneamente no meio sólido, utilizando suspensões celulares ou de esporos em volume padronizado. Na segunda, adotou-se inoculação sequencial, na qual *R. similis* foi inicialmente cultivada no arroz e, posteriormente, três dias depois, recebeu a inoculação da respectiva linhagem de *Streptomyces*. Após o período de cultivo, os extratos brutos foram obtidos por extração sólido-líquido com etanol, seguida de filtração e concentração do solvente.

As análises por LC-MS/MS foram conduzidas em sistema HPLC acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo QTOF Bruker, com ionização por eletrospray em modo positivo. A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa, empregando água como fase móvel A e acetonitrila como fase móvel B. O gradiente iniciou em 95% de A e 5% de B, mantido até 1 min, seguido de aumento até 100% de B em 15 min, manutenção em 100% de B até 19 min e retorno às condições iniciais entre 20 e 25 min.

Os dados obtidos foram inicialmente convertidos para formatos compatíveis com o processamento metabolômico e, posteriormente, utilizados para a construção de redes moleculares na plataforma GNPS, por meio do workflow Feature-Based Molecular Networking (FBMN). Essa abordagem permitiu organizar as features cromatográficas e os espectros de MS/MS com base na similaridade dos padrões de fragmentação, possibilitando a visualização de famílias moleculares e a comparação da distribuição dos íons entre os cultivos axênicos e mistos. As anotações foram consideradas putativas e avaliadas com base em tempo de retenção, relação massa/carga, erro de massa, adutos, similaridade espectral e ocorrência dos sinais nos diferentes sistemas de cultivo. A interpretação dos dados foi realizada de forma comparativa, sem aplicação de análise estatística inferencial.

Resultados e Discussão

A análise por LC-MS/MS associada às redes moleculares permitiu avaliar, de forma comparativa, os perfis químicos dos cultivos axênicos e mistos envolvendo *Rhinochrysiella similis* e linhagens de *Streptomyces*. Nas redes, os nodos foram agrupados conforme a similaridade entre os espectros de MS/MS, de modo que compostos estruturalmente relacionados tenderam a se organizar em um mesmo cluster. Assim, a interpretação considerou a distribuição dos nodos entre cultivos axênicos e mistos, as massas dos íons



precursores, os tempos de retenção, as classes químicas previstas e a coerência dos padrões de fragmentação.

No conjunto de dados, foi indicada a predominância de famílias associadas a aminoácidos e peptídeos, alcaloides, ácidos graxos, terpenoides e policetídeos, classes compatíveis com o metabolismo secundário de fungos filamentosos e actinobactérias. Essas classes incluem metabólitos frequentemente relacionados à competição microbiana, sinalização química, captação de nutrientes e defesa química. Portanto, as alterações observadas nos cultivos mistos podem refletir mudanças na expressão de famílias metabólicas associadas à interação entre *R. similis* e linhagens de *Streptomyces*.

No sistema *R. similis* × *Streptomyces murinus*, um dos agrupamentos mais relevantes foi associado a compostos peptídicos, em especial, as actinomicinas. Esse cluster apresentou uma série de nodos com íons em torno de m/z 628,32–628,82 e tempos de retenção concentrados principalmente entre 12,41 e 15,04 min, classificados como oligopeptídeos, actinomicinas e depsipeptídeos cíclicos. A presença de vários nodos em uma mesma região química sugere uma família de compostos relacionados, e não um metabólito isolado. Esse comportamento é coerente com metabólitos de origem actinobacteriana, nos quais pequenas modificações estruturais podem gerar análogos com massas próximas e padrões de fragmentação semelhantes. Embora parte dos sinais também esteja presente no cultivo axênico de *S. murinus*, a distribuição e a intensificação de determinados nodos nos cultivos mistos sugerem modulação dessa família durante a interação com *R. similis*. Esse resultado é relevante visto que as actinomicinas são metabólitos bioativos frequentemente associados a mecanismos de competição, defesa e comunicação microbiana. Assim, o cluster de actinomicinas representa uma das principais assinaturas químicas do sistema *R. similis* × *S. murinus*.

No sistema envolvendo *R. similis* e a cepa de *Streptomyces* sp., a rede apresentou uma assinatura química distinta da observada para *S. murinus*. Foi observado um agrupamento associado a sideróforos, contendo sinais putativamente relacionados a desferrioxaminas, ferrioxaminas e análogos. Esse cluster reuniu nodos com íons em torno de m/z 545,36, 561,36, 601,35 e 619,36, com tempos de retenção concentrados principalmente entre 5,13 e 7,79 min. A organização desses sinais em uma mesma família molecular reforça a relevância de metabólitos associados à quelação de ferro nesse co-cultivo, sugerindo uma possível resposta química relacionada à competição por nutrientes essenciais.

Outro agrupamento observado nesse sistema envolveu sinais compatíveis com antimicinas, policetídeos e terpenoides. Os nodos relacionados à antimicina A1 e antimicina A2 apresentaram maior associação com os co-cultivos, sugerindo que essa cepa de *Streptomyces* sp. pode responder à presença de *R. similis* por meio da intensificação de metabólitos relacionados ao antagonismo químico. Além disso, agrupamentos relacionados a



policetídeos e terpenoides também foram observados com destaque nesse sistema, incluindo features próximas de m/z 377,32 e 379, distribuídas principalmente entre t.r. 17,30 e 21,29 min. Embora a atribuição estrutural deva ser tratada com cautela, esse conjunto aponta para uma região química menos polar da rede, potencialmente relacionada a compostos envolvidos em interações de membrana, defesa química ou adaptação ao ambiente de cultivo.

A presença de nodos não anotados conectados a famílias conhecidas não devem ser tratados apenas como desconhecidos, pois sua inserção em clusters contendo actinomicinas, antimicinas, desferrioxaminas, peptídeos ou policetídeos indica semelhança espectral com compostos dessas famílias. Portanto, eles podem corresponder a análogos estruturais, derivados modificados ou metabólitos ainda ausentes nas bibliotecas espectrais utilizadas. Quando esses nodos aparecem preferencialmente nos co-cultivos, tornam-se alvos importantes para fracionamento e caracterização.

Considerando o conjunto de dados, os cultivos mistos alteraram a organização das redes moleculares, com maior evidência de clusters peptídicos, depsipeptídicos, siderofóricos, policetídeos e terpenoides. Esses agrupamentos indicam que a interação entre *R. similis* e linhagens de *Streptomyces* modulou famílias químicas específicas, fornecendo alvos prioritários para investigação química posterior.

Conclusões

Os resultados obtidos demonstram que os cultivos mistos entre *Rhinochrysiella similis* e linhagens de *Streptomyces* promoveram alterações detectáveis no perfil químico dos extratos, evidenciando o potencial do co-cultivo em arroz como estratégia de indução biótica do metabolismo secundário. A análise por LC-MS/MS associada às redes moleculares permitiu reconhecer famílias químicas moduladas pela interação microbiana, ampliando a interpretação dos perfis metabólicos.

Essa resposta química, entretanto, não ocorreu de forma uniforme entre os sistemas avaliados, variando conforme a linhagem de *Streptomyces* utilizada. O sistema com *S. murinus* apresentou maior associação com famílias bioativas típicas de actinobactérias, enquanto o sistema com *Streptomyces* sp. revelou maior diversidade química, incluindo metabólitos relacionados à captação de ferro, compostos peptídicos e sinais de caráter lipofílico.

A presença de nodos não anotados conectados a famílias moleculares de interesse reforça o potencial desses sistemas como fonte de metabólitos ainda não caracterizados. Assim, os dados obtidos fornecem critérios para priorizar extratos, clusters e regiões cromatográficas em futuras etapas de fracionamento, isolamento e caracterização estrutural.



Agradecimentos

Ao LaBioMMi, pela orientação e formação. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Referências

- BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J.-L. Metabolite Induction via Microorganism Co-culture: A Potential Way to Enhance Chemical Diversity for Drug Discovery. **Biotechnology Advances**, 32, 1180-1204, 2014.
- BRITO, M. V. Estudo dos metabólitos secundários de actinobactérias dos gêneros *Streptomyces* (ACTB-77 e ACTB-242) e *Amycolatopsis* (ACTB-290) na inibição de fungos fitopatogênicos. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.
- DOS SANTOS, A.; SCHULTZ, J.; DAL'RIO, I.; MOLODON, F.; TRAPP, M. A.; TENÓRIO, B. G.; STAJICH, J. E.; TEIXEIRA, M. M.; PILAU, E. J.; ROSADO, A. S.; RODRIGUES-FILHO, E. *Rhinochlamydia similis*: A Model Eukaryotic Organism for Astrobiological Studies on Microbial Interactions with Martian Soil Analogs. **JACS Au**, 5(1), 187-203, 2025.
- MARMANN, A.; ALY, A. H.; LIN, W.; WANG, B.; PROKSCH, P. Co-cultivation: A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. **Marine Drugs**, 12(2), 1043-1065, 2014.
- MOURA, M. S.; BELLETE, B. S.; VIEIRA, L. C. C.; SAMPAIO, O. M. Uso de Redes Moleculares para Anotações de Compostos em Metabolômica. **Revista Virtual de Química**, 14(2), 214-223, 2022.
- PÁDUA, A. P. S. L.; KOEHLER, A.; PAGANI, D. M.; BEZERRA, J. D. P.; MOTTA, C. M. S.; SCROFERNEKER, M. L. Antifungal Susceptibility of the Endophytic Fungus *Rhinochlamydia similis* (URM 7800) Isolated from the Caatinga Dry Forest in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 53(4), 2093-2100, 2022.
- PILON, A. C.; VIEIRA, N. C.; AMARAL, J. G.; MONTEIRO, A. F.; SILVA, R. R.; SPÍNDOLA, L. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; LOPES, N. P. Redes Moleculares: Uma Análise sobre Anotações e Descoberta de Novos Ativos. **Química Nova**, 44(9), 1168-1179, 2021.
- RUTLEDGE, P. J.; CHALLIS, G. L. Discovery of Microbial Natural Products by Activation of Silent Biosynthetic Gene Clusters. **Nature Reviews Microbiology**, 13(8), 509-523, 2015.
- SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering Cryptic Natural Product Biosynthesis in Microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 7(9), 1753-1760, 2009.