



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura e do AbastecimentoRua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP
Telefone: (16) 274 2477 - Fax: (16) 272 5958 - e-mail: postmaster@cnpdia.embrapa.br

ISSN 1413-6244

COMUNICADO TÉCNICO

Nº 40, out/2000, p.1-5

USO DE FTIR PARA ANÁLISE DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DO CANCRO CÍTRICO E CVC

Denise Osiro¹
Helvécio Della Coleta Filho²
Marcos Antônio Machado²
Luiz Alberto Colnago³

Introdução

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma das espectroscopias vibracionais cujas bandas espectrais são função da força das ligações químicas e das massas dos átomos envolvidos nessas ligações. Por isso é extremamente útil para a identificação de componentes de moléculas orgânicas como os grupos O-H, N-H, C=O, C-N, C-O etc, que são os principais constituintes das proteínas, açúcares, DNA, ácidos graxos, entre outras moléculas.

As aplicações de FTIR em biologia envolvem tanto os estudos das estruturas de DNA, proteínas e polissacarídeos *in vitro* quanto as aplicações como a avaliação da composição química de bactérias e tecidos animais e vegetais *in vivo* (Mantsch & Chapman, 1996). Como os polissacarídeos exacelulares das bactérias *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis pv citri*, causadoras da clorose variegada dos citruses (CVC) e cancro cítrico respectivamente, são considerados os fatores de patogenicidade dessas bactérias, apresenta-se neste trabalho uma metodologia com o uso da espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para análise desses polissacarídeos.

As bactérias *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis pv citri* foram cultivadas no meio PW e M9, respectivamente. As culturas permaneceram sob agitação constante a 28°C. As culturas de *Xanthomonas* e *Xylella* foram centrifugadas a 4000rpm por 20 minutos, em seguida, o precipitado contendo a bactéria foi suspenso em solução de NaCl 0,05% e uma nova centrifugação foi feita a fim de remover resíduos do meio de cultura. O precipitado final foi novamente

¹Instituto de Química de São Carlos - USP

²Instituto Agronômico de Campinas

³Embrapa Instrumentação Agropecuária, Cx Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos-SP

CT/40, CNPDIA, out/2000, p.2

suspendido em solução de NaCl 0,05%. A solução salina contendo a bactéria foi depositada em janela de silício e após a secagem, foi analisada em um espectrômetro de FTIR Paragon 1000. Os espectros foram coletadas com um total de 16 varreduras, com uma resolução espectral de 4cm^{-1} , de 4000 a 400cm^{-1}

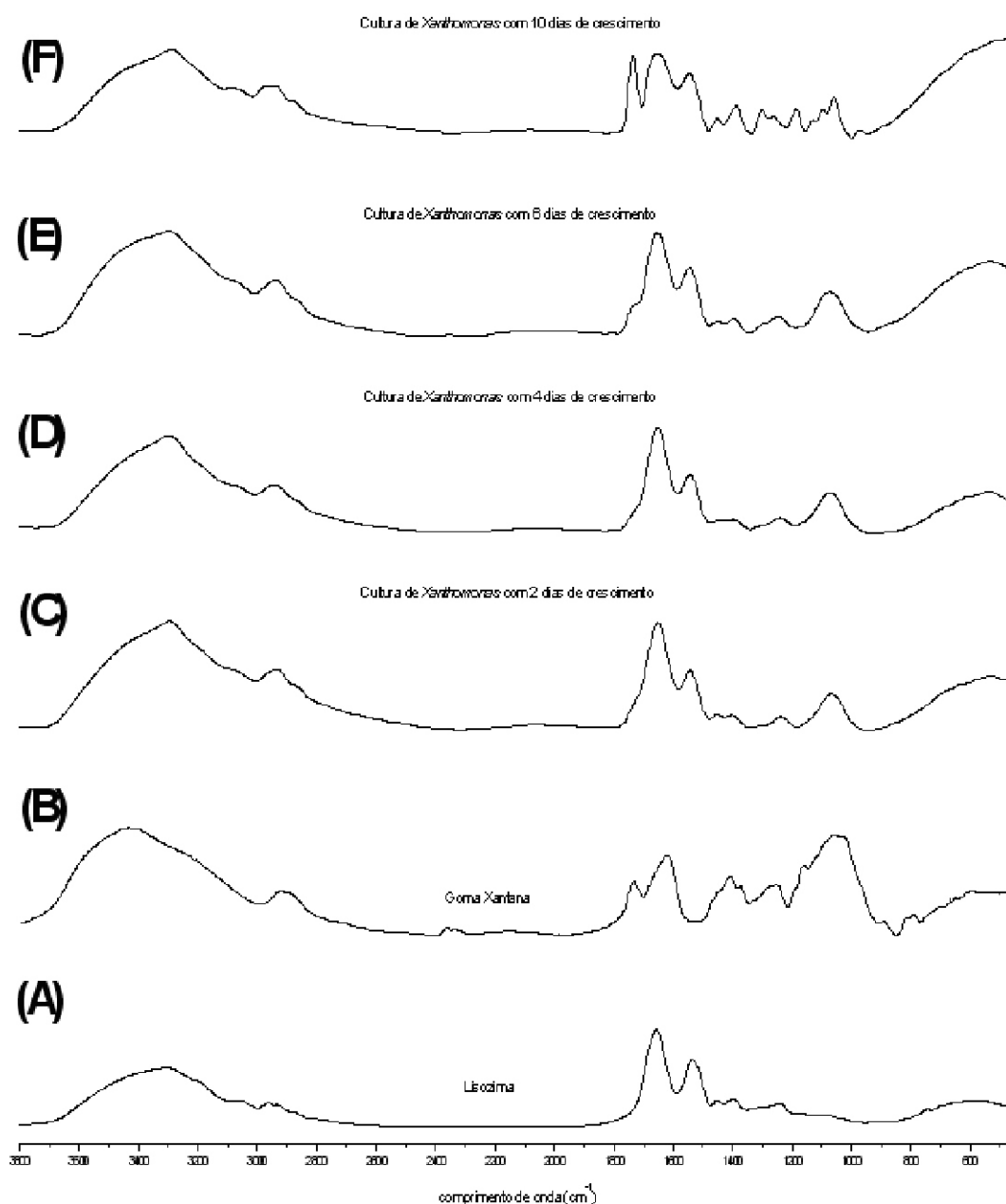


Figura 1- Espectros de FTIR da proteína lisozima (A), da goma xantana (B) e da bactéria *Xanthomonas* em diferentes tempos de crescimento (C, D, E e F).

Na figura 1 estão os espectros de FTIR da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* em diferente tempo de crescimento, um espectro típico de proteína (lisozima) e um espectro da goma xantana que é principal polissacarídeos das bactérias do gênero *Xanthomonas*. As bandas mais intensas do espectro das proteínas são

CT/40, CNPDIA, out/2000, p.3

devido principalmente aos grupo peptídicos. A banda intensa, larga e centrada em 3300cm^{-1} é devido principalmente ao estiramento do grupo NH (amida A). As bandas intensas entre 1700 e 1600 cm^{-1} e entre 1600 e 1500 cm^{-1} , são conhecidas como bandas de amida I e amida II. A banda de amida I é devido principalmente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ dos grupos peptídicos e a de amida II aos estiramento da ligação $\text{C}-\text{N}$ e deformação angular da ligação $\text{N}-\text{H}$, ambas também dos grupos peptídicos. Os outros sinais de baixa intensidade entre 3100 e 2800 cm^{-1} e abaixo de 1500cm^{-1} são devido outras vibrações de menor importância. Os principais sinais da goma xantana, figura 1B, são o sinal largo e centrado em 3300 cm^{-1} , devido ao estiramento das ligações OH (esse sinal ocorre na mesma região das ligações NH das proteínas). O sinal em 1740cm^{-1} é típico da goma xantana e é devido aos estiramento $\text{C}=\text{O}$ dos resíduos de esterificação com o piruvil ($\text{CH}_3\text{-CO-COO}$) e acetil ($\text{CH}_3\text{-COO}$) e ao grupo COOH do ácido glicurônico. O sinal em 1640 cm^{-1} , devido as deformações angulares da ligação OH dos açúcares, ocorre na mesma região da banda de amida I das proteínas. Os sinais intenso entre 1000 e 1150cm^{-1} , são devido aos estiramentos grupo $\text{C}-\text{O}$, presentes em todos os açúcares. Como pode-se ver o sinal da banda de amida II é exclusivo de proteínas, o sinal entre 1000 e 1150 cm^{-1} é devido somente aos resíduos de açúcares e os sinais em 1740 cm^{-1} à esterificação da goma xantana.

As figuras 1C a F apresentam os espectros de FTIR da *Xanthomonas* nos intervalos de 2, 4, 6 e 10 dias de cultura. Nestes espectros pode-se ver que são uma combinação dos sinais de proteínas mais o da goma xantana. Na região espectral de 3700 a 1800cm^{-1} , não foi notada alteração significativa para as diferentes amostras de bactéria. Porém na região de 1800 a 900cm^{-1} , observam-se alterações nos espectros que caracterizam modificações na composição ou/e alterações na concentração química das bactérias. A principal mudança pode ser observada na banda em 1740 cm^{-1} , que aumenta muito com o tempo de cultura, principalmente no décimo dia de cultura.

Isso pode ser melhor observado no gráfico (figura 2) da razão entre as intensidade dos sinais em 1070 cm^{-1} (devido à cadeia glicosídica dos açúcares) e em 1550 cm^{-1} (devido apenas às proteínas), e da razão entre os sinais em 1740cm^{-1} (devido aos grupos piruvil e acetato da goma xantana) e em 1550 cm^{-1} , em função do tempo de crescimento da cultura. Como a razão dos sinais em $1070\text{ cm}^{-1}/1550\text{cm}^{-1}$ permanece constante até o sexto dia, pode se concluir que a proporção proteína/polissacarídeos também se manteve constante neste período. No décimo dia teve uma pequena redução dessa razão. O grau de substituição com o grupo acetil/piruvil (razão $1740/1550\text{ cm}^{-1}$) aumentou do primeiro para o segundo dia, ficando praticamente constante até o quinto dia e depois aumentou muito, demonstrando que há um aumento significativo do grau de esterificação dos polissacarídeos, para longos tempo de cultura. Essas observações demonstram que a bactéria ao consumir os nutrientes do meio de cultura entra em uma fase de dormência, elevando o grau de esterificação da xantana, que lhe dá maior rigidez estrutural. Com esse demonstrasse também que o FTIR pode ser usado para monitorar tanto a proporção proteínas/goma xantana e quanto o grau de esterificação com os grupos piruvil e acetato.

CT/40, CNPDIA, out/2000, p.4

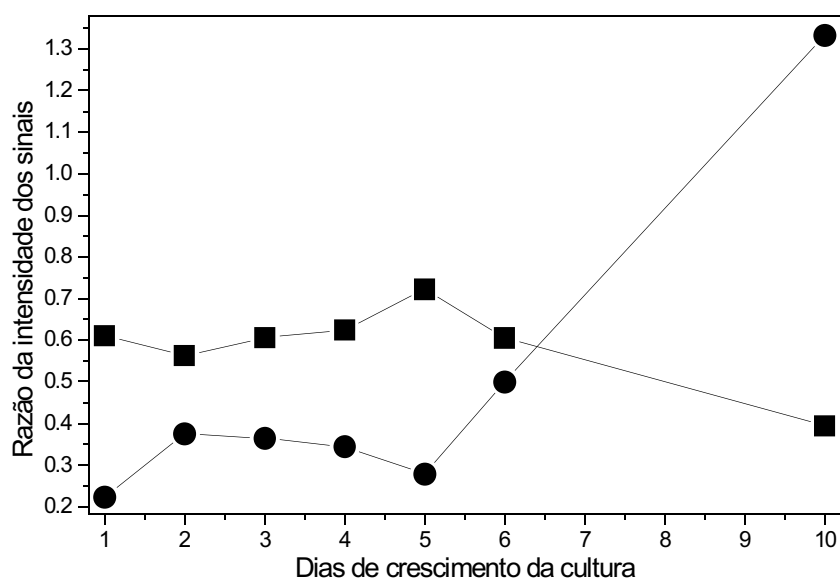


Figura 2- Gráfico da razão da intensidade dos sinais em 1070/1550 cm⁻¹ (■) e 1740/1550 cm⁻¹ (●) em função do tempo de crescimento da cultura de *Xanthomonas*.

A *Xyllela fastidiosa* como o próprio nome diz é uma bactéria com crescimento muito lento, com dezenas de dias de cultura. Os espectros de FTIR da *Xyllela* com 30 (A) e 70 dias (B) de crescimento estão na figura 3. Esses espectros são típicos de bactéria onde se observa as bandas intensas em 3350cm⁻¹, o pico em 1652 cm⁻¹ (amida I), o pico em 1550 cm⁻¹ (amida II) e a banda em aproximadamente 1070cm⁻¹ é devido a deformação angular C-O, característica de açúcares.

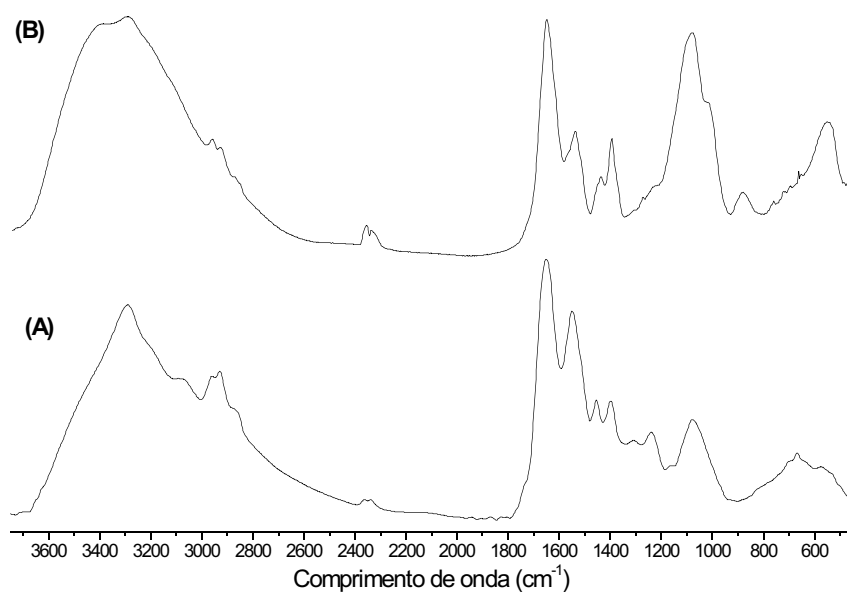


Figura 3- Espectros de FTIR de *Xyllela* depositada em janela de silício. A) após 30 dias e B) após 70 dias de crescimento.

CT/40, CNPDIA, out/2000, p.5

A principal diferença observada nestes espectros da *Xylella* foi que a banda em 1070cm^{-1} é muito mais intensa em 70 dias do que em 30 dias, demonstrando que há um aumento do teor de polissacarídeos com o tempo de crescimento, o que não foi observado com a *Xanthomonas*. O aumento do teor de polissacarídeos também pode ser observado com o aumento da intensidade do sinal entre 1700 e 1600cm^{-1} , que é devido deformação angular dos grupos OH.

Quando se compara os espectros de *Xylella* com os da *Xanthomonas* não se observa a banda em 1740cm^{-1} , devido ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ do resíduo piruvil ($\text{CH}_3\text{-CO-COO}$) e acetil presentes na estrutura da goma xantana. Esta observação está de acordo com os recentes resultados publicados sobre a *Xylella*, a partir do seqüenciamento do seu genoma (Simpson et al., 2000). No genoma da *Xylella* foram encontrados quase todos os genes que codificam as enzimas da síntese da xantana, os genes gumA, gumB, gum C, e gum F, porém, não foram encontrados os genes gumI, L e G, que incorporam a manose terminal, o piruvato e o acetato, respectivamente.

Esses resultados demonstram claramente a potencialidade do FTIR em caracterizar o polissacarídeo extracelular nas bactérias *Xylella* e *Xanthomonas in vivo*, bem como sua concentração de maneira rápida e com aproximadamente 1mg de amostra. Essa metodologia desenvolvida acima está sendo usada para avaliar a influência de ions de metais como cobre e manganês no metabolismo da *Xanthomonas*, principalmente na síntese da xantana.

Referências Bibliográficas

- MANTSCH, H.H. & CHAPMAN, D.ed. **Infrared spectroscopy of biomolecules**, New York, Wiley-Liss, 1996.
- SIMPSON ET AL. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.406, n.13, p.151-159, 2000.