

## Caracterização de Poli-*N*-Acetilglicosamina extraído de *Staphylococcus aureus* por espectroscopia Raman<sup>1</sup>

Danielle dos Santos Cinelli Pinto<sup>2</sup>, Cynthia Penoni Volpi Abreu<sup>3</sup>, Nelson Luis Gonçalves Dias de Souza<sup>4</sup>, Juliana Carine Gern<sup>5</sup>, Camila Guimarães de Almeida<sup>6</sup>, Luiz Fernando Cappa de Oliveira<sup>7</sup>, Wanessa Araujo Carvalho<sup>5</sup>, Patricia Vilhena Dias de Andrade<sup>6</sup>, Humberto de Mello Brandão<sup>5,9</sup>

<sup>1</sup>O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil: Parte do projeto: Caracterização de fatores de virulência e nanoestruturação de imunógenos de *Staphylococcus aureus* para controle da mastite bovina". CNPq403098/2013-0 / SEG nº 02.13.14.001.00.04 liderado por Humberto de Mello Brandão; Parte da dissertação de mestrado de Cynthia Penoni Volpi Abreu, financiada pela Capes, Bolsista do CNPq, Embrapa.

<sup>2</sup>Graduanda em Medicina Veterinária- UFJF/Juiz de Fora. Bolsista do CNPq. E-mail: daniellecinep@gmail.com

<sup>3</sup>Doutoranda em Medicina Veterinária - UFLA, Lavras/MG. E-mail: cynthiapenoni@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Professor de Química - UFT/Tocantins. E-mail: nelson.luis@uft.edu.br

<sup>5</sup>Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG. E-mail: juliana.gern@embrapa.br, humberto.brandao@embrapa.br, wanessa.carvalho@embrapa.br

<sup>6</sup>Pós doutoranda - Embrapa Gado de Leite. E-mail: camilagdealmeida@gmail.com, andrade.pvd@gmail.com

<sup>7</sup>Professor de Química- UFJF/Juiz de Fora. E-mail: luiz.oliveira@ufjf.edu.br

<sup>9</sup>Orientador

**Resumo:** A mastite é uma das principais doenças que acomete os rebanhos leiteiros no mundo, e tem como principal agente etiológico o *Staphylococcus aureus*; bactéria recentemente classificada pela OMS como "alta prioridade" no ranqueamento mundial de P&D, por apresentar grandes ameaças à saúde humana e animal, portanto, necessita de intensas pesquisas e desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas mais eficientes. O biofilme é um importante fator de virulência produzido por esta bactéria e tem como principal componente o poli-*N*-acetilglicosamina (PNAG). Dessa forma, este trabalho propõe o estudo por espectroscopia Raman do PNAG de *S. aureus* e sua aplicação como alternativa não destrutiva para determinação do grau de desacetilação deste polímero. A caracterização do polissacarídeo foi realizada pela espectroscopia Raman.

**Palavras-chave:** Biofilme, Grau de desacetilação, Mastite, Polímero, Raman, *S. Aureus*

### Characterization of Poly-*N*-Acetylglucosamine extracted from *Staphylococcus aureus* by Raman spectroscopy

**Abstract:** Mastitis is a important disease that affect the dairy herds around the world, and its main etiological agent is *Staphylococcus aureus*. This bacteria recently classified by the WHO as a "high priority" in the ranking of the world's R&D priority, because it poses great threats to human and animal health. Thus, is needed constant research for development of new drugs and vaccines. Biofilm is an important virulence factor produced by this pathogen and its main component is poly-*N*-acetylglucosamine (PNAG). In this context, we used the spectroscopy to characterize the PNAG of *S. aureus* and to determine its degree of deacetylation.

**Keywords:** Biofilm, Deacetylation degree, Mastitis, Raman, *S. aureus*, Polymer

### Introdução

Considerando o grupo de bactérias patogênicas para mamíferos, *Staphylococcus aureus* é classificada pela OMS como de "alta prioridade", devido à variabilidade genética, histórico de multirresistência a antibióticos e por apresentar grandes ameaças à saúde humana e animal. Esta bactéria é o principal agente etiológico causador da mastite bovina, possui alta prevalência nos

rebanhos leiteiros especializados e, devido a sua grande variabilidade genética, apresenta diversos fatores de virulência, em especial o biofilme.

Pela importância, o biofilme, tornou-se alvo de pesquisa para desenvolvimento de vacinas e de novos medicamentos para controlar infecções causadas por este patógeno. O principal componente do biofilme é um exopolissacarídeo formado por Poli-*N*-acetilglucosaminas (PNAG) que, quando parcialmente desacetilado recebe o nome de adesina polissacarídica intercelular (PIA ou PNAGd). O grau de desacetilação do PNAG é uma variável biológica que faz com que a cadeia polimérica fique parcialmente protonada em ambientes neutros e ácidos, aumentando a estabilidade do biofilme ao favorecer sua ligação a superfície bacteriana (OTTO, 2008) e com outras superfícies negativas, como células de hospedeiros e biomateriais (STOODLEY et al., 2004). Assim, é importante determinar o grau de desacetilação da cadeia polimérica do PNAG/PIA de cada estirpe bacteriana, para propor sua aplicação biotecnológica, ou mesmo, para realizar estudos de imunologia, patogenicidade e resistência antimicrobiana associados ao *S. aureus*.

A espectroscopia Raman, técnica baseada no fenômeno de espalhamento de luz, cujo espectro final pode ser investigado pelo exame das frequências relativas à radiação espalhada pelos grupos funcionais presentes nas estruturas químicas, vem sendo bastante utilizada na caracterização deste tipo de amostras (FARIA et al., 1995). Quando comparada com outras técnicas de quantificação do grau de desacetilação (RMN ou titulação) esta é vantajosa, por não ser destrutiva, por obter rápida aquisição de dados, por possibilitar análises micrométricas e necessitar de pouco ou nenhum tratamento prévio da amostra a ser analisada (ASHTON et al., 2011).

Neste contexto, o presente trabalho propõe o estudo por espectroscopia vibracional do PNAG de *S. aureus* e sua aplicação como alternativa não-destrutiva para determinação do grau de desacetilação deste polímero.

## Material e Métodos

**Cultivo de bactérias:** Foi utilizada a estirpe 2309 de *S. aureus* isolada de mastite bovina, pertencente a Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária, da Embrapa Gado de Leite, sediada em Juiz de Fora, Minas Gerais. O cultivo foi realizado em ágar BHI em placas descartáveis para o crescimento bacteriano por 24 horas a 37 °C em estufa.

**Produção, extração e purificação do exopolissacarídeo:** O inóculo foi produzido a partir de uma alçada da cepa de interesse em caldo TSB e armazenadas numa estufa a 35° ± 2 °C/72 horas para o crescimento bacteriano e formação do biofilme. Após remoção mecânica do biofilme com pérolas de vidro foram adicionados solução de NaOH 1M. A amostra foi incubada à 20°/3 horas e depois centrifugada, e o sobrenadante dialisado por 24 horas em membrana MWCO 12-14KDa. Após a diálise do material, adicionou-se ácido tricloroacético, incubou-se por 30 min e centrifugou. Ao sobrenadante foi adicionado etanol e condicionado à 4 °C/24 horas e centrifugado. A mistura foi resfriada até 10 °C, e depois o sobrenadante foi removido. O corpo de fundo foi ressuspenso em H<sub>2</sub>O ultrapura e submetido a diálise por 24 horas. O material dialisado foi filtrado em membrana de nylon 0,22 µm.

**Desacetilação do polímero:** Para remover os substituintes ligados ao nitrogênio (N<sub>2</sub>) o polímero purificado foi dissolvido em NaOH 5N e incubado sob ambiente de N<sub>2</sub> durante 20 horas a 37 °C. A mistura foi resfriada até 10 °C em banho de gelo e neutralizada por adição lenta de HCl 5N, também em gelo. O material polimérico foi concentrado em membrana de diálise durante três dias a 4 °C e liofilizado.

**Espectroscopia Raman:** Foram realizados espectros do PNAG nativo e do PNAG desacetilado (PIA) quimicamente. As medições de Raman foram realizadas com um espectrômetro Bruker RFS 100, laser Nd+3/YAG operando a 1064 nm, com detector InGaAs. Os espectros foram adquiridos com resolução de 4cm<sup>-1</sup>, média de 2000 varreduras e potência de laser de 60Mw. O grau de desacetilação foi calculado segundo (ZAJAC et al, 2015; MANSUR et al, 2015).

## Resultados e Discussão

Ao analisar o espectro Raman do PNAG nativo (Figura 1) verificou-se a presença da banda em 1381 cm<sup>-1</sup>, característica do estiramento simétrico do grupamento COO-, presente na estrutura dos polissacarídeos. Além desta, notaram-se as bandas atribuídas aos modos vibracionais, d(CH<sub>2</sub>), d(CH), n(C-O)/n(C-C)/d(C-OH), n(O-CH<sub>3</sub>) e n(C-O-C) da ligação glicosídica,

presentes na estrutura química dos polissacarídeos (IVLEVA et al, 2009). Por sua vez, no PNAG nativo também pôde-se observar a presença de uma banda característica de polissacarídeos nitrogenados em  $288\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao modo vibracional  $d(\text{C-NH-C})/g(\text{OH})$ . Notou-se ainda, bandas em  $748$ ,  $687$  e  $434\text{ cm}^{-1}$  atribuídas respectivamente aos modos  $d(\text{CH}_2)$ ,  $d(\text{COO}^-)$  e  $d(\text{C-C-O})/d(\text{C-C-C})$  presentes na estrutura química do anel glicosídico (ALMEIDA et al, 2010). A presença de diferentes bandas atribuídas a mesma substância é explicada pelas diferentes interações dos componentes da amostra (IVLEVA et al, 2009).

Para demonstrar que a técnica de espectroscopia Raman pode ser utilizada para avaliar o grau de desacetilação do PNAG nativo, foi desacetilado quimicamente o mesmo PNAG nativo (PNAGd) extraído da estirpe 2309. No espectro Raman do PNAGd, diferentemente do espectro do PNAG nativo, há a presença de uma banda intensa em  $1081\text{ cm}^{-1}$ . Esta banda é atribuída aos modos vibracionais  $n(\text{C-O-C})/n(\text{C-OH})/n(\text{C-C})$  (RAMYA et al., 2010). Esse fato indica que o processo de desacetilação altera tanto os modos vibracionais relacionados ao grupamento amina, quanto os modos vibracionais da estrutura polimérica, a qual não foi diretamente modificada pelo processo de desacetilação. Por fim, após o cálculo de intensidade de bandas, o polímero nativo apresentou-se em 60%, que o PNAGd conseguiu-se expandir a percentagem de desacetilação para 92%.

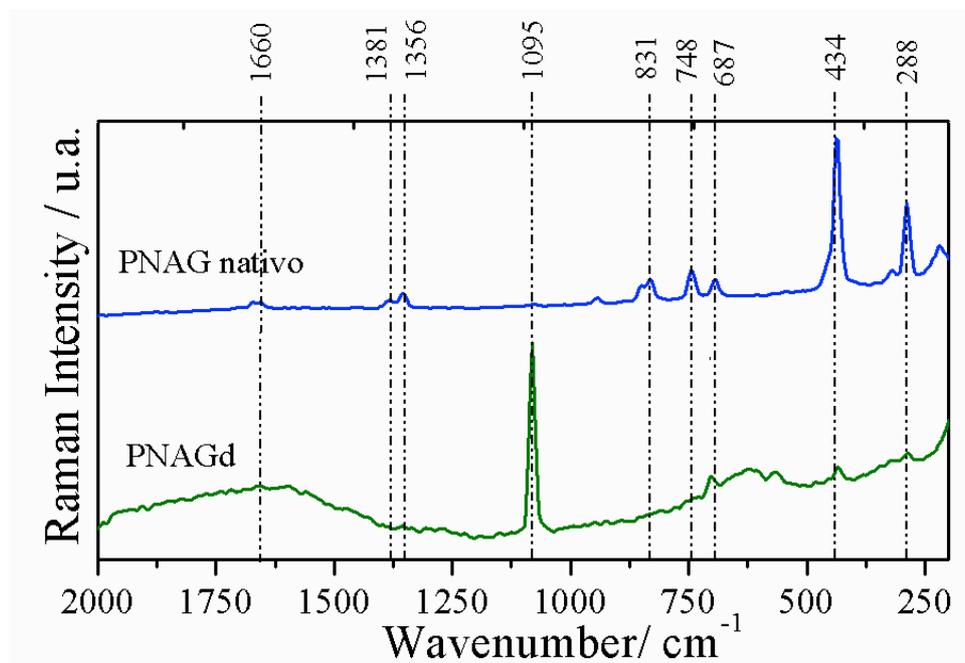


Figura 1. Espectro Raman dos polímeros PNAG nativo e PNAGd.

### Conclusões

Através da técnica de espectroscopia Raman foi possível obter a caracterização estrutural do biofilme de *S. aureus*, seguido de descrição detalhada de suas respectivas bandas espectrais típicas. Também foi possível calcular o grau de desacetilação do PNGA de forma rápida e não destrutiva, o que permite o reaproveitamento da amostra para outras abordagens experimentais ou biotecnológicas.

### Referências

FARIA, D.L.A.; SANTOS, L.G.C.; GONÇALVES, N.S. Uma Demonstração Sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: **Repetindo o Experimento de Raman**, Química Nova 20, 319, 1997; (b) O. Sala, Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho. Editora da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1995.

ALMEIDA, M.R.; ALVES, R.S.; NASCIMBEM, L.B.L.R.; STEPHANI, R.; POPPI, R.J.; DE OLIVEIRA, L.F.C. Determination of amylose content in starch using Raman spectroscopy and multivariate calibration analysis. **Anal Bioanal Chem**, 397, 2693-2701. 2010.

ASHTON, L.; LAU, K.; WINDER, C. L. GOODACRE, R. Raman spectroscopy: lighting up the future of microbial identification, **Future Microbiol.** V. 6(9), p.991-997, 2011.

DYBAS, J.; MARZEC, K.M.; PACIA, M.Z.; KOCHAN, K.; CZAMARA, K.; CHRABASZCZ, K.; STANISZEWSKA-SLEZAK, E.; MALEK, K.; BARANSKA, M.; KACZOR, A. Raman spectroscopy as a sensitive probe of soft tissue composition – Imaging of cross-sections of various organs vs. single spectra of tissue homogenates. **Trends in Anal Chemistry**, 85, Part C, 117-127. 2016.

GIERLINGER, N.; SCHWANNINGER, M. Chemical Imaging of Poplar Wood Cell Walls by Confocal Raman Microscopy. **Pl. physiology**, 140, 1246-1254. 2006.

IVLEVA, N.P.; WAGNER, M.; HORN, H.; NIESSNER, R.; HAISCH, C. Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix. **Raman microscopy Anal Bioanal Chem.**, 393, 197-206. 2009.

LITVINOV, RUSTEM I.; FAIZULLIN, DZHIGANGIR A.; ZUEV, YURIY F.; WEISEL, JOHN W. The  $\alpha$ -Helix to  $\beta$ -Sheet Transition in Stretched and Compressed Hydrated Fibrin Clots. **Biophys J.**, 103, 1020-1027. 2012.

OTTO M. Staphylococcal biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol** v.322, p.207–228. 2008.

RAMYA, S.; GEORGE, R.P.; RAO, R.V.S.; DAYAL, R.K. Detection of algae and bacterial biofilms formed on titanium surfaces using micro-Raman analysis. **Applied Surface Science**, 256, 5108-5115. 2010.

STOODLEY, L.H.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews–Microbiology**, London, v.2, p.95-108, 2004.

ZAJĄC, A.; HANUZA, J.; WANDAS, M.; DYMIŃSKA, L. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.**, 134, 114-120. 2015.