Caracterização de sideróforos sintetizados *in vitro* por cianobactérias utilizando espectrofotometria UV-visível.

Amanda Araujo Leitão[1] (IC)[*], Caroline Souza Pamplona da Silva[2] (PG), Marli de Fátima Fiore[2] (PQ), Ana Valéria Colnaghi Simionato[1] (PQ)

[*]amanda_leitao@terra.com.br

[1]Departamento de Química Analítica - Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, C.P.: 6154, CEP: 13083-970, Campinas – SP - Brasil

2Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo, C.P.:96, CEP: 13400-970, Piracicaba – SP - Brasil

Palavras Chave: *sideróforos, bioensaios, espectrofotometria.*

Introdução

O ferro, enquanto nutriente essencial, não está prontamente disponibilizado em ambientes aquáticos, terrestres ou em hospedeiros animais. Desta forma, os microorganismos desenvolvem várias estratégias para adquiri-lo e, ao mesmo tempo, proteger-se de seus efeitos tóxicos potenciais. Uma das estratégias mais eficazes é a produção e utilização de sideróforos, que são peptídeos de síntese não-ribossômica com altíssima afinidade por ferro.[1] Estes metabólitos são produzidos e secretados sob estresse de ferro para seqüestrar este elemento do ambiente externo ou do hospedeiro e podem apresentar, principalmente, as funções hidroxamato e catecol. Dentre as bactérias produtoras de sideróforos estão as cianobactérias, que são encontradas em ecossistemas terrestres e aquáticos, incluindo condições ambientais extremas. A investigação e identificação dos sideróforos contribuem para a exploração no campo da biotecnologia.[2] Neste trabalho foram realizados bioensaios para determinação da função química do(s) sideróforo(s) produzido(s) pela cianobactéria *Phormidium* sp. isolada de manguezal da Ilha do Cardoso.

Resultados e Discussão

Foram realizados testes para a detecção dos sideróforos do sobrenadante estéril (centrifugado e filtrado) do meio de cultura da estirpe 135 da cianobactéria *Phormidium* sp. O teste universal com cromo azurol S (CAS)[3], indicou a presença de sideróforos na amostra pela mudança da coloração de azul para laranja (Equação 1). Outros testes, baseados nas propriedades químicas, foram também realizados: o teste de Csáky[4], específico para sideróforos com a função hidroxamato e o de Arnow[5], que apresenta resposta para amostras contendo sideróforos com a função catecol. Ambos são baseados no desenvolvimento de cor quando reagentes específicos são adicionados à amostra, sendo avaliados por espectrofotometria UV-visível. No teste de Csáky, a amostra é hidrolisada com ácido sulfúrico concentrado e o grupo hidroxâmico é oxidado a nitrito pela adição de iodo, formando um complexo colorido via acoplamento azóico, que absorve luz visível em 526 nm. Já no de Arnow, a amostra é reagida com HCl. Em seguida, adiciona-se o regente nitrito/molibdato formando uma solução amarela que torna-se vermelha pela diminuição da acidez do meio. O complexo obtido tem um máximo de absorção em 510 nm. Para esses dois testes foram feitas curvas analíticas de concentração × absorbância com padrões de cloridrato de hidroxilamina e ácido dihidroxibenzóico, nas faixas de concentração de 10 a 400 e 10 a 590 $\mu mol.L^{-1}$, respectivamente. Obteve-se um coeficiente de regressão linear de 0,99931 para a curva com a hidroxilamina e um de 0,99868 para a curva com o ácido benzóico.

O resultado do teste Csáky foi positivo, uma vez que os valores das absorbâncias estavam dentro da curva (0,218 para a amostra controle, que também produziu sideróforos, e 0,238 para a amostra). Por outro lado, o teste de Arnow foi negativo já que os valores de absorbância não estavam dentro da curva (0,017 e 0,014 para o controle e a amostra, respectivamente).

$$\underset{\text{Azul}}{FeCAS^{3-\lambda}} + L^{\kappa-} \rightarrow \underset{\text{laranja ou amarelo}}{FeL^{3-\kappa}} + CAS^{\lambda-} \quad \textbf{Equação 1}$$

Conclusões

O teste com CAS indicou a presença de sideróforo na amostra. Através do bioensaio de Csáky foi identificado sideróforo(s) com a função hidroxamato no sobrenadante do meio de cultura da cianobactéria. Futuramente, amostras de outras bactérias serão analisadas. Análises destas amostras por eletroforese capilar também estão sendo realizadas.

Agradecimentos

À Dra. Maria Estela Silva-Stênico, à FAPESP e ao CNPq.

[1] Benite, A.M.C.; Machado, S.P.; Machado, B.C. *Química Nova*. **2002**, 25,1155-1164.

[2]Pamplona, C.; Dissertação de mestrado apresentada ao CENA/ESALQ/USP, 2006.

[3]Schwyn, B.; Neilands, J.B. *Analytical Biochemistry*. 1987, 160, 47-56.

[4]Csácky, T.Z. *Acta Chemica Scandinavica*. 1948, 2, 450-*454.*

[5]*Arnow, L.E. Journal of Biological Chemistry*. 1937, 118, 531-537.