



Desenvolvimento de um método de captação química de Óxido Nítrico Por CLAE para aplicação em sistemas biológicos

Marilene Silva Oliveira¹ (PG)*, Karina F. D. N. Santos¹ (PG), Railane Monteiro de Paula¹ (IC),
Giuliana M. Vila Verde¹ (PG), Gilberto L. B. de Aquino (PQ)¹, Claudia C. G. Martin-Didonet¹ (PQ)

e-mail: marilenes36@gmail.com

¹Câmpus De Ciências Exatas E Tecnológicas – CCET, BR 153 n°3105 - Fazenda Barreiro do Meio,
Anápolis - GO, CEP 75132-903.

Resumo: O Óxido Nítrico (NO) é um radical livre o qual possui um tempo de vida menor que 1s em sistemas biológicos e está envolvido em vários processos fisiológicos, incluindo a regulação da pressão arterial, a resposta imunitária e comunicação neural. Além disso, ele é um importante mensageiro secundário em plantas com um papel central nas vias de sinalização para o crescimento e desenvolvimento da raiz. Assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver um método de detecção de NO utilizando um captador químico conhecido, o 2,3-diaminonaftaleno (DAN,) por fluorescência e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este captador ao entrar em contato com NO forma um complexo fluorescente (NAT), e para padronização do método foi utilizado um gerador de NO conhecido como DEA NONOate. A produção de NO foi monitorada durante 72 horas, sendo utilizada a bactéria do gênero, *Azospirillum brasilense* (HM053). Esta estratégia de estudo permitirá monitorar bactérias em diferentes ambientes, quanto à produção de NO para elaboração de novas tecnologias para a utilização na agricultura.

Palavras-chave: Óxido Nítrico, Fluorescência, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Introdução

Óxido Nítrico (NO) é um radical livre diatômico o qual possui um tempo de vida curto em sistemas biológicos (menos que 1s no sangue) e está envolvido em vários processos fisiológicos, incluindo a regulação da pressão arterial, a resposta imunitária e comunicação neural. Portanto, sua detecção e quantificação precisas são fundamentais para a compreensão da saúde e da doença. Devido à curtíssima meia-vida fisiológica deste gasoso radical livre, estratégias para a detecção de produtos de reação de NO foram desenvolvidas. Um dos métodos indiretos para a determinação de NO envolve a medida espectrofotométrica de seus instáveis produtos de decomposição NO_3^- e NO_2^- . Este método conhecido como reação de Greiss onde forma um produto azo-composto cromóforo que absorve fortemente em



540 nm. Outro método é a utilização do composto diaminoaromático o 2,3-diaminonaftaleno (DAN) como um indicador da formação de NO. O composto DAN é relativamente não fluorescente reage rapidamente com N_2O_3 gerado por nitrito em presença de ácido ou da interação do NO com oxigênio para produzir um produto fortemente fluorescente o 2,3-naphthotriazole. Estudos recentes demonstraram que 2-diaminofluoresceína (DAF-2) pode ser usado para determinar a presença de NO *in vitro* e *in situ*, similar ao método utilizando DAN forma um composto fluorescente [HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C., 1999; MILES, A. M., 1996; NAGANO T., 1999]. Óxido nítrico está envolvido no crescimento, desenvolvimento e na resposta de defesa das plantas [LAMATTINA, L. et al., 2003]. Esta molécula sinal induz a produção de AIA, promovendo a formação de raízes adventícias, raízes laterais e pêlos radiculares, o que contribui para o melhoramento do crescimento e desenvolvimento das plantas [PAGNUSSAT, G. et al., 2002].

Azospirillum é um dos gêneros de bactérias mais bem estudado e caracterizado, por ser uma bactéria fixadora de nitrogênio (diazotrófico) que também pode promover o crescimento de plantas. Esta bactéria pode ser encontrada em uma grande gama de ambientes associado a várias espécies de plantas [BASHAN, Y. et al., 2004; SPAEPEN, S. et al., 2009]. Estudos utilizando condições de aerobiose e anaerobiose para as bactérias do gênero *Azospirillum* mostraram que elas podem utilizar nitrato (NO_3), nitrito (NO_2) ou óxido nítrico (NO) comoceptor final de elétrons. O óxido nítrico pode ser produzido também na presença de oxigênio e faz parte do processo dissimulatório de nitrogênio em bactérias denitrificantes [BRAKER, G.; TIEDJE, J. M., 2003].

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica fundamental quando se trata da detecção de produtos de reação com alta sensibilidade. Alguns autores relatam a detecção de NO em células de mamíferos e de plantas utilizando 2,3-diaminonaftaleno, um captador específico de NO por CLAE com detecção por fluorescência visto que o complexo formado entre o captador e o NO é bastante fluorescente [WADA, M. et al., 2002]. Diante disto, temos trabalhado em um método de detecção de NO, utilizando DAN, para entender o processo de produção desta espécie reativa por Bactérias.



Material e Métodos

Inicialmente foi realizado experimentos com um gerador de NO conhecido, DEA NONOate. Para as análises de fluorescência de DAN com DEA NONOate foram preparadas amostras em água e meio de cultura da seguinte forma: 1- água, 2- meio NFbHP-lactato, 3- DAN 0,005 mg/mL, 4- Reação de DAN 0,005 mg/mL com DEA NONOate 0,005 mg/mL, 5- Reação de DAN 0,005 mg/mL com DEA NONOate 0,0125 mg/mL, e 6- Reação de DAN 0,005 mg/mL com DEA NONOate 0,025 mg/mL.

Para as análises cromatográficas foi utilizado um equipamento CLAE da VarianProStar. O volume de injeção das amostras foram de 20 μ L e as injeções foram feitas em um injetor automático ProStar modelo 410. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Luna C18 (Phenomenex, 4.6 x 250 mm, 5 μ m). Para a análise de captação de NO produzido pelo gerador DEA NONOate o método utilizado foi um gradiente 30-90% de (A) em 15 min, 90-30% de (A) em 17 min e permanece em 30% de (A) até 20 min, sendo que (A) água e (B) acetonitrila.

A bactéria HM053 foi crescida em placa de 96 poços contendo meio líquido NFbHP-lactato acrescido de 10 mM de KNO₃, a 30°C sob 140 rpm de agitação na presença de DAN 80 μ g.mL⁻¹. Após 72 horas de crescimento a bactéria foi coletada, centrifugada e o sobrenadante utilizado para as dosagens de NO.

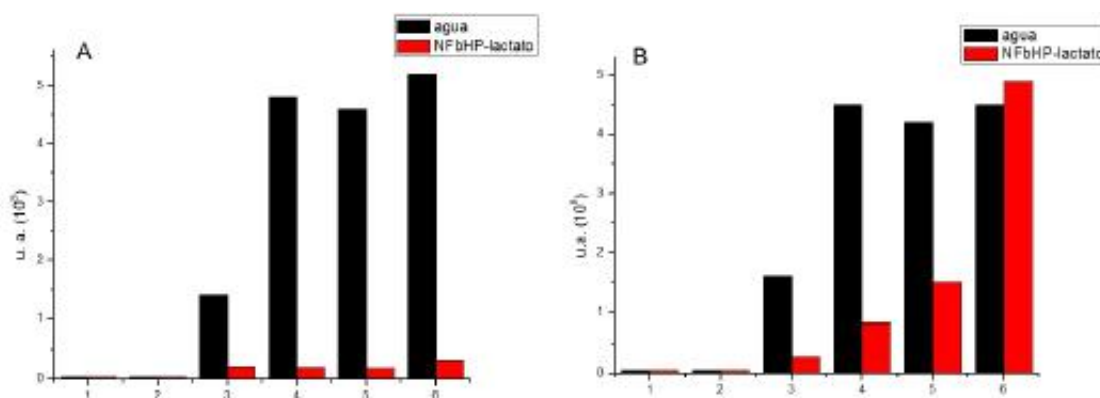
Resultados e Discussão

Íons de diazeniumdiolate possuem fórmula estrutural $R_2N[N(O)NO]$ e podem espontaneamente gerar NO quando dissolvidos em meio aquoso. Podem-se decompor totalmente em 16 min a 22-25 °C ou de 2-4 min a 37 °C em tampão fosfato 0,1 molL⁻¹ pH 7,4, e pode decompor instantaneamente em pH 5,0 [DAVIES, K. M. et al., 2001].

Uma análise feita por fluorescência com excitação em 365 nm e emissão em 465 nm mostrou a formação do produto pela reação de DAN com NO gerado pelo DEA NONOate, em água e em meio de cultura, os resultados são apresentados nas Figuras 1. Na Figura 1A observa-se que a intensidade de fluorescência aumenta com o aumento da concentração do gerador de NO em água com agitação por 30

min. Em meio de cultura a intensidade de fluorescência permanece inalterada com agitação por 30 min (Figura 1A), somente após 24h de agitação é possível ver o aumento a fluorescência (Figura 1B) devido a formação do complexo.

Figura 1 – Gráfico de Fluorescência obtido para a reação de DAN com DEA NONOate em (---) água e (---) meio NFbHP-lactato com KNO_3 . 1- Água, 2- meio NFbHP-lactato com KNO_3 . 1- Água, 2- meio NFbHP-lactato com KNO_3 , 3- DAN 0,005 mg/mL, 4- Reação de DAN 0,005 mg/mL com DEA NONOate 0,005 mg/mL, 5- Reação de DAN 0,005 mg/mL com DEA NONOate 0,0125 mg/mL, e 6- Reação de DAN 0,005 mg/mL com DEA NONOate 0,025 mg/mL.



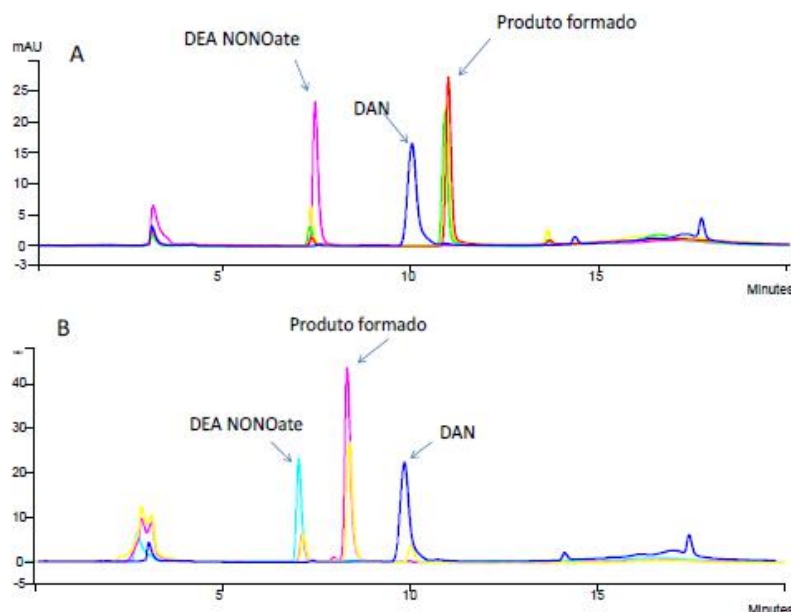
Aumento da concentração de DEA NONOate.

A Figura 2 apresenta os cromatogramas obtidos para a reação de DAN com DEA NONOate em meio ácido (Figura 2A) e em meio de cultura NFbHP-lactato na presença de KNO_3 (Figura 2B). No cromatograma apresentado na Figura 2A observa-se o pico do DEA NONOate em 7,5 min, do DAN em 10,2 min e o pico do produto formado em 11 min. Este resultado mostra a formação do complexo (NAT, Figura 2A) pela reação do DAN com DEA NONOate.

Comparando os cromatogramas observa-se que o produto formado em meio de cultura apresenta um pico com tempo de retenção de 8,5 minutos (Figura 2B), diferente do cromatograma da reação em meio ácido que o produto formado apresenta um pico com tempo de retenção de 11 min. A caracterização deste produto formado em meio de cultura e a análise de padrões fornecerá a estrutura e o

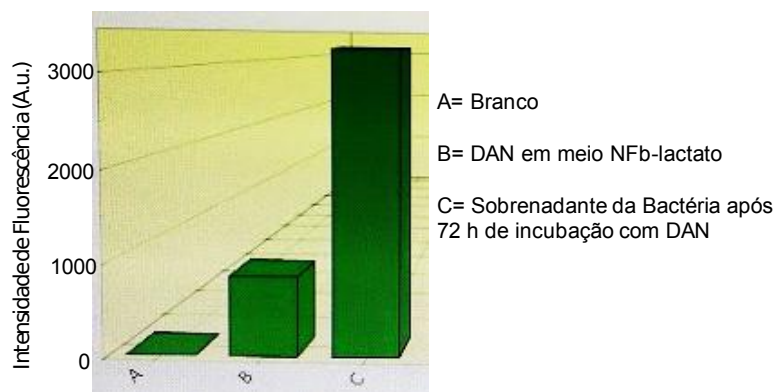
mecanismo de reação do captador com NO, visto que este produto também possui fluorescência, a captação pode estar ocorrendo por outro mecanismo.

Figura 2- Cromatograma obtido para a reação de DEA NONOate com DAN em (A) meio ácido (B) meio NFbHP-lactato com KNO_3 .



Os resultados qualitativos de fluorescência confirmaram a formação do complexo fluorescente pela reação de NO com DAN após a incubação com a bactéria HM053. A figura 3 mostra um gráfico da análise de fluorescência, onde foram observados que a espécie HM053, apresentou um maior índice de fluorescência após 72h de incubação com DAN.

Figura 3- Dados de Fluorescência obtidos para o sobrenadante da estirpe de bactérias HM053 após 72h de incubação com DAN.



Considerações Finais

O método utilizado pode ser promissor, sendo que ainda é preciso ser melhor desenvolvido. O desenvolvimento desse método para análise de NO produzido por bactérias é de fundamental importância visto que NO tem um papel importante na fisiologia da bactéria, o que ajudará a entender melhor os mecanismos que induzem mudanças morfológicas e fisiológicas das raízes promovendo o crescimento vegetal.

Agradecimentos

Aos programas de pós-graduação: Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde (CAPS) e Ciências Moleculares – UEG/Campos Henrique Santillo. Ao suporte financeiro PNPd/CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e CNPq. LpBIOS, Redoxoma-USP.

Referências

- BASHAN, Y., HOLGUIN, G., DE-BASHAN, L. E., Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can. J. Microbiol., v. 50, p. 521-577, 2004.
- BRAKER, G.; TIEDJE, J. M., Nitric Oxide Reductase (*norB*) Genes from Pure Cultures and Environmental Samples, Appl. Environ. Microbiol., v. 69, n. 6, p. 3476–3483, 2003.
- DAVIES, K. M.; WINK, D. A.; SAAVEDRA, J. E.; KEEFER, L. K., Chemistry of the Diazeniumdiolates. 2. Kinetics and Mechanism of Dissociation to Nitric Oxide in Aqueous Solution, J. Am. Chem. Soc., 123, 2001, 5473-5481.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., Clarendon Press, Oxford.



LAMATTINA, L. et al. The Versatility of an Extensive Signal Molecule. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54, n. 1, p. 109–136, 2003.

MILES, A. M.; WINK, D. A.; COOK, J. C.; GRISHAM, M.B. [Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy](#). *Methods Enzymol.*, v. 268, p. 105-20, 1996.

NAGANO T. [Practical methods for detection of nitric oxide](#). *Luminescence*, v. 14, p. 283-90, 1999.

PAGNUSSAT, G. et al. Nitric Oxide Is Required for Root Organogenesis. *Plant Physiology*, v. 129, n. 3, p. 954–956, 2002.

SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y., Chapter 7 Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. *Adv. Bot. Res.* v. 51, p. 283–320, 2009.

WADA, M.; MORINAKA, C.; IKENAGA, T.; KORUDA, N.; NAKASHIMA, K., A Simple HPLC-Fluorescence Detection of Nitric Oxide in Cultivated Plant Cells by *in situ* Derivatization with 2,3-Diaminonaphthalene, *Anal. Sci.* v. 18, p. 631-634, 2002.