

ESTUDO DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS POR FTIR/ATR

Taís Tavares e Silva¹; Antonio Carlos Fávero Caires²

Estudante do Curso de Medicina; e-mail: taistavares@bol.com.br¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: caires@umc.br²

Área do Conhecimento: Espectroscopia

Palavras-chave: Tuberculose; Mycobacterium tuberculosis; FTIR/ATR; Medicina diagnóstica

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que atinge a muitos anos a população mundial. Entre 2000 e 2020, 1 bilhão de pessoas serão infectadas, 200 milhões irão adoecer e 35 milhões morrerão se não for melhorado o controle. Segundo a Organização Mundial de Saúde, 80% dos casos novos (8,7 milhões) estão distribuídos em 22 países do mundo, sendo uma doença que atinge predominantemente países subdesenvolvidos. O Brasil ocupa o 15º lugar e a distribuição dessa patologia é de acordo com as condições sociais das diferentes classes sociais.

Os métodos convencionais para testar a sensibilidade aos tuberculostáticos são: teste de sensibilidade em meio de Lowenstein-Jensen (4 a 8 semanas), Sistema BACTEC, MGIT (Tubo Indicador de Crescimento de Micobactéria), MB/Bact (7 a 10 dias) são demorados, exceto quando se utilizam o método com bacteriófago, E-test e Citometria de Fluxo. Existem técnicas moleculares baseadas em PCR, dentre elas o Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP), a análise de PCR Heteroduplex, ensaios com sondas de DNA (INNO-LIPA), o seqüenciamento de DNA e outras que representam variantes da PCR. Dessa forma, diante das dificuldades apresentadas, neste trabalho propusemos uma forma rápida e segura de diagnóstico da tuberculose, pela técnica de FTIR.

OBJETIVOS

Os *Mycobacilum Tuberculosis* são aeróbios obrigatórios e obtêm energia a partir da oxidação de compostos de carbono, então quanto mais CO₂ maior o crescimento, eles se duplicam em 18 horas. Os bacilos são resistentes ao ressecamento e sobrevivem por longos períodos em escarro seco. Possui uma **Estrutura antigênica** localizada na parede celular, composta de **Lipídios** que são ricas em lipídios contendo ácidos micólicos, ceras e fosfatídios. Os lipídios estão ligados a proteínas e polissacarídios e são responsáveis pela álcool-ácido-resistência. O objetivo do projeto foi identificar “FINGERPRINTS” (“impressões digitais”) de lipídios específicos presentes no *M. tuberculosis* que permitiriam de uma forma rápida e barata o diagnóstico da doença. A análise foi pela coleta de escarros de pacientes tuberculosos de onde se obteve uma solução, por metodologia que foi descrita, extratos lipídicos que foram devidamente analisados pela técnica de FTIR/ATR. Como padrão de escarros que não contenham o *M. tuberculosis*, de igual forma foram utilizadas amostras de pacientes asmáticos. Em longo prazo, o sucesso do projeto poderá permitir no futuro o desenvolvimento de equipamentos portáteis de

identificação da doença trazendo uma inovação tecnológica significativa para a área da medicina diagnóstica.

METODOLOGIA

1. Coleta de Material Biológico

Essas amostras foram coletadas no Sanatorinho, em São Paulo, respeitando todas as normas do Comitê de Ética. Foram utilizados frasco de vidro padronizados, com tampa rosqueada e fornecidos pela Unidade, não havendo riscos de abertura dos mesmos. As amostras foram colhidas de pacientes suspeitos de tuberculose sintomático respiratório – aquele que apresentava tosse há mais de três semanas. Foram colhidas 3 amostras de cada paciente que foram submetidas a meios de cultura para crescimento. As amostras foram coletadas pela manhã, quando o paciente costuma apresentar uma maior expectoração, após acordar e realizar higiene oral, sendo encaminhada para exame de pesquisa direta de bacilo ácido-álcool resistente (BAAR) através de coloração específica. Nos pacientes que não conseguiram espontaneamente produzir escarro, o mesmo foi induzido através de inalação de solução salina hipertônica. Foram feitas culturas como método de identificação de infecção por micobactéria onde foram necessárias três a quatro semanas para a comprovação de positividade de micobactérias. O tempo médio para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* foi medido em 10,8 dias quando realizado no sistema automatizado BACTEC 9000 MB e em 28,5 dias quando realizado em cultura para micobactérias em meio sólido. Finalmente os frascos de vidro contendo as culturas, após confirmada a positividade ou negatividade quanto a presença do M.tuberculosis por métodos convencionais, foram autoclavados e trazidos para o CIIB da Universidade de Mogi das Cruzes onde foram analisados pela técnica de FTIR/ATR.

2. Extração componentes biológicos das amostras para análise espectral por FTIR/ATR.

Foram utilizados dois métodos de extração do material biológico a partir do escarro de pacientes. No primeiro utilizamos apenas clorofórmio e no segundo uma mistura de clorofórmio/ Acetona, 50%. Após a adição dos solventes as amostras foram submetidas a um banho de ultrassom por 60 minutos. Após decantação de sólidos e separação das fases, 1,0 mL da fração solúvel foi analisada por FTIR/ATR ou na forma de solução ou na forma de filme seco.

3. Equipamentos

As amostras foram analisadas em um espectrômetro modelo Spectrum-100 da Perkin Elmer pela Técnica de FTIR/ATR. Os espectros foram medidos na faixa de 4000-650 cm^{-1} utilizando-se uma placa de ZnSe, 45.º como elemento óptico de reflexão interna. Utilizou-se uma resolução de 2 cm^{-1} para as análises , após a aquisição de 32 scans..

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os lipídeos definem um conjunto de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos orgânicos, não são caracterizadas por algum grupo funcional comum, e sim pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água. Fazem parte de um grupo conhecido como biomoléculas. Os lipídeos se encontram distribuídos em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e nas células de gordura. A maioria dos lipídeos é derivada ou possui na sua estrutura ácidos graxos. Algumas substâncias classificadas entre os lipídeos possuem intensa atividade biológica; elas incluem algumas das vitaminas e hormônios. Embora os lipídeos sejam uma classe

distinta de biomoléculas, veremos que eles geralmente ocorrem combinados, seja covalentemente ou através de ligações fracas, como membros de outras classes de biomoléculas, para produzir moléculas híbridas tais como glicolipídeos, que contêm tanto carboidratos quanto grupos lipídicos, e lipoproteínas, que contêm tanto lipídeos como proteínas. Em tais biomoléculas, as distintas propriedades químicas e físicas de seus componentes estão combinadas para preencher funções biológicas especializadas. Existem diversos tipos de moléculas diferentes que pertencem à classe dos lipídeos. Embora não apresentem nenhuma característica estrutural comum todas elas possuem muito mais ligações carbono-hidrogênio do que as outras biomoléculas, e a grande maioria possui poucos heteroátomos. Isto faz com que estas moléculas sejam pobres em dipolos localizados (carbono e hidrogênio possuem eletronegatividade semelhante). Uma das leis clássicas da química diz que "o semelhante dissolve o semelhante": daí a razão para estas moléculas serem fracamente solúveis em água ou etanol (solventes polares) e altamente solúveis em solventes orgânicos (geralmente apolares). Ao contrário das demais biomoléculas, os lipídeos não são polímeros, isto é, não são repetições de uma unidade básica. Embora possam apresentar uma estrutura química relativamente simples, as funções dos lipídeos são complexas e diversas, atuando em muitas etapas cruciais do metabolismo e na definição das estruturas celulares. Os lipídeos podem ser separados de uma amostra biológica através de uma técnica conhecida como extração; um solvente orgânico é adicionado a uma solução aquosa da amostra e, com um auxílio de um funil de separação, obtém-se a fase orgânica rica em lipídeos. Com a evaporação do solvente orgânico obtém-se o lipídeo. É desta maneira que, em escala industrial, se obtém o óleo vegetal. Alguns lipídeos têm a habilidade de formar filmes sobre a superfície da água, ou mesmo de formar agregados organizados na solução; estes possuem uma região, na molécula, polar ou iônica, que é facilmente hidratada. Este comportamento é característico dos lipídeos que compõem a membrana celular. Os lipossomos são "microenvelopes" capazes de envolverem moléculas orgânicas e entregarem-nas ao "endereço biológico" correto.

Até o momento trabalhamos com quatro tipos de extratos das amostras biológicas, um extraído com água, outro com clorofórmio, outro com clorofórmio + acetona e outro com acetona+ água conforme metodologia descrita. Desses extratos obtivemos espectros tanto em solução como na forma de filmes secos, conforme metodologia e resultados apresentados. De toda experimentação feita até o momento, conseguimos estabelecer que os componentes biológicos extraídos com clorofórmio e os espectros obtidos na forma de filme seco são os que dão melhores resultados em relação aos nossos propósitos. Também nos permitiu em uma primeira análise encontrar as regiões espectrais de estudo para futuros ensaios.

CONCLUSÕES

È sabido da literatura que fosfolipídeos possuem bandas de absorção características de nas regiões entre $1235-1200\text{ cm}^{-1}$ e entre $1100- 1000\text{ cm}^{-1}$, devidas a seus grupos fosfatos orgânicos. Entretanto, embora haja similaridade espectral na região do infravermelho com respeito aos grupos fosfatos presentes nos fosfolipídeos, os fosfoliglicolipídeos presentes no *Mycobacterium tuberculosis*, devido sua natureza complexa e devido ao seu alto teor de carboidratos, são bem menos definidos, quando comparados a outros fosfolipídeos de baixo peso molecular.

No Espectro Vibracional de filme seco obtido por evaporação de clorofórmio, mostra regiões espectrais ($1353,3\text{ cm}^{-1} - 996,7\text{ cm}^{-1}$) ampliadas das amostras positivas do

Mycobacterium comparadas com amostras negativas, são notadas na amostra positiva uma banda de absorção em 1165 cm^{-1} e outra em 1092 cm^{-1} que podem ser atribuídas a uma combinação de grupos fosfatos covalentes associados em “*overlap*” à absorções de estiramento de grupos C–O de carboidratos. Pode ser observado na mesma figura um modo normal de estiramento C=O em 1736 cm^{-1} característico de um grupo éster. A forma e posição dessa banda que ocorre frequentemente em fosfolipídeos entre 1750 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} , varia de posição de acordo com o grau de hidrogenação das moléculas e com seu grau de complexidade.

A presença de uma banda fraca de absorção em 1652 cm^{-1} , no Espectro Vibracional de filme seco obtido por evaporação de clorofórmio, a qual é característica de grupos –CONH–, sugerindo a presença de pequenas quantidades de peptídeos na amostra contendo o *Mycobacterium tuberculosis*.

A alta quantidade de carboidratos presentes pode ser notada nos Espectros Vibracionais das amostras contendo *Mycobacterium Tuberculosis* em solução de clorofórmio, que mostra espectros vibracionais em solução de clorofórmio. Este fato é notado pela banda larga de absorção em 3365 cm^{-1} que estão bastante deslocadas em relação às frequências vibracionais das amostras negativas, apresentadas nos Espectros Vibracionais das amostras não contendo *Mycobacterium Tuberculosis* em Solução de clorofórmio, cuja frequência correspondente está centrada em 3350 cm^{-1} . Em ambos os casos esses modos normais de vibração são característicos de grupos -OH de carboidratos.

Neste momento estamos estudando, para a conclusão de nossos trabalhos, as integrais de áreas relativas às regiões entre: $1146\text{--}1170\text{ cm}^{-1}$, $1063\text{--}1088\text{ cm}^{-1}$ e $3439\text{--}3443\text{ cm}^{-1}$. Estes estudos nos darão parâmetros mais precisos para a consolidação dos “*fingerprints*” encontrados, especialmente para as regiões de vibração de combinação de grupos fosfatos covalentes associados em “*overlap*” à absorções de estiramento de grupos C–O de carboidratos, típicos de estruturas presentes no *M. Tuberculosis*. Uma primeira análise que realizamos mostra expressiva variação dessas áreas entre amostras positivas e negativas, sendo muito maiores nas positivas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SPINDOLA DE MIRANDA S.; KRITSKI, A.L.; FILLIOL, I.; MABILAT, C.; PANTEIX, G.; DROUET, E. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Brazil and France. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 247-250, 2001.

TANIGUCHI, H.; ARAMAKI, H.; NIKAIDI, Y.; MIZUGUCHI, Y.; NAKAMURA, M.; KOGA, T.; YOSHIDA, S. Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 144, p. 103-108, 1996.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; LOWRIE, D.; COLE, S.; COLSTON, M.J.; MATTER, L.; SCHOPFER, K.; BODMER, T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, v. 341, p. 647-650, 1993.