

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAIO OLIVEIRA VENTURA

CARACTERIZAÇÃO DA PORÇÃO O-ANTÍGENO DO LIPOPOLISSACARÍDEO
PRODUZIDO POR *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

CURITIBA

2024

CAIO OLIVEIRA VENTURA

CARACTERIZAÇÃO DA PORÇÃO O-ANTÍGENO DO LIPOPOLISSACARÍDEO
PRODUZIDO POR *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica) ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ventura, Caio Oliveira

Caracterização da porção O-antígeno do lipopolissacarídeo produzido por *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 / Caio Oliveira Ventura. – Curitiba, 2024.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato.

1. Lipopolissacarídeos. 2. *Herbaspirillum*. 3. Nitrogênio - Fixação. I. Serrato, Rodrigo Vassoler, 1979-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-
GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) – 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **CAIO OLIVEIRA VENTURA** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DA PORÇÃO O-ANTÍGENO DO LIPOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR *Herbaspirillum seropedicae* SMR1**, sob orientação do Prof. Dr. RODRIGO VASSOLER SERRATO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Junho de 2024.

Assinatura Eletrônica

18/06/2024 19:22:50.0

RODRIGO VASSOLER SERRATO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

19/06/2024 08:20:07.0

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

14/08/2024 17:33:33.0

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR)

Dedico este trabalho à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe que, de sua própria forma, sempre apoiou meus planos e fez de tudo para que dessem certo. Você é minha maior inspiração e toda minha educação é fruto total e direto dos teus esforços. Não há gratidão que pague, a dívida será eterna.

Ao meu pai por me proporcionar ensinamentos singulares que o meio acadêmico provavelmente nunca terá.

Ao meu avô pelos ensinamentos que vieram a mim de forma implícita durante nossa peculiar convivência, entre eles, a despreocupação com a vida.

Ao médico e pai, Ariel Scafuri, o qual tive o prazer de conhecer e que, mesmo em nossa breve convivência, ajudou a consolidar em mim o significado de compromisso com pessoas e tarefas. Além disso, me fez perceber, através do amor a sua família, o real significado de viver o presente em cada detalhe.

A Nayde por absolutamente tudo, o seu apoio foi fundamental para a finalização dessa fase. Sem você aqui, não haveria trabalho e provavelmente, em algum grau, não haveria eu.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato, pela oportunidade, pelos ensinamentos e, acima de tudo, pela paciência.

Ao Prof. Dr. Diogo Bazan Ducatti pelas correções do projeto e pertinentes questionamentos e considerações durante o seminário.

Aos amigos do Grupo de Carboidratos, Philippe, Wellington, Leo, Dib, Giu, Eli e a todos os outros não citados aqui (vocês vão ter que me desculpar, é gente demais), mas deixo um agradecimento especial para Kevin, Yara, Hayanna e Antônio, vocês foram parte significativa disso tudo. A todos, meus sinceros agradecimentos pelo apoio e pelos momentos compartilhados.

Agradeço aos Técnicos do Departamento de Bioquímica envolvidos de alguma forma em etapas deste trabalho.

A mim mesmo, sim, por não desistir, por perguntar quando não sabia, por questionar quando não entendia, por pedir ajuda quando não conseguia, por buscar melhorar quando percebia não ser suficiente.

Agradeço aos professores da Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) pelos ensinamentos transmitidos, à Coordenação e Secretaria pela dedicação ao Programa.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro, e à Universidade Federal do Paraná por toda a estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

“There are no miracle people. It happens, they get interested in this thing and they learn all this stuff, but they’re just people.”

Richard Feynman

RESUMO

As projeções de crescimento populacional nas próximas décadas fomentam um debate acerca da incapacidade de atender às necessidades alimentares crescentes. O aumento na produção de alimentos, muitas vezes, é resultado do uso excessivo de fertilizantes químicos, o que pode causar danos ambientais significativos. Uma alternativa aos fertilizantes químicos nitrogenados é a fixação biológica de nitrogênio. Esse processo é essencial para o desenvolvimento das plantas, dependendo de uma colonização eficiente por parte das bactérias. Durante todas as etapas desse processo, a comunicação entre a bactéria e o hospedeiro é mediada por diversas biomoléculas, sendo os lipopolissacarídeos (LPS) uma delas. Os LPS, que possuem uma estrutura complexa, são encontrados exclusivamente em bactérias gram-negativas. Esses glicoconjugados são constituídos por três regiões estruturalmente distintas: o lipídeo-A, o núcleo oligossacarídico e o O-antígeno, sendo esta porção a que apresenta a maior variabilidade estrutural em sua composição e a mais importante no processo de interação com a planta. Portanto, a elucidação da estrutura do O-antígeno é fundamental para compreender melhor o processo de interação entre bactérias e plantas. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a estrutura fina da porção O-antígeno do LPS produzido pela estirpe SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae*. Para isso, foram extraídos os LPS da estirpe bacteriana a partir da fração fenólica, indicando que se tratam de LPS do tipo *semirough*, estruturas intermediárias do LPS com menor grau de polimerização da porção O-antígeno. Para a elucidação da estrutura do LPS, foi realizada a análise de composição monossacarídica por GLC, que apresentou unidades de Ara, Man, Gal e Glc. Análises químicas e espectroscópicas da porção O-antígeno, isolada por meio de hidrólise branda dos LPS de *H. seropedicae* SmR1, mostraram que a composição monossacarídica desta molécula é formada majoritariamente por Gal, Ara, Man, Rha, contrapondo os resultados anteriormente descritos na literatura. Foram também revelados sinais na região de prótons do grupamento acetil, sugerindo a presença de grupos N-acetil, indicando a presença de GlcNAc ou GalNAc sendo este corroborados uma vez que a Gal apresentou elevada quantidade na composição monossacarídica. Também foi possível notar sinais relacionados à presença de um grupamento CH₃ referente a um desoxiaçúcar – possivelmente Rha, devido a sua presença na análise de composição monossacarídica. As análises de espectrometria por MALDI-TOF da porção O-antígeno mostraram diversos picos de razão massa carga com diferenças de 306 m/z. A derivatização do O-antígeno da estirpe SmR1 de *H. seropedicae*, para gerar alditois acetato parcialmente metilados (PMAA), evidenciou a presença de Gal e Rha, sendo os principais derivados observados 3,4,6-Me₃-Gal (37,46%), 2,3,4-Me₃-Gal (31,15%), 2,3,4,6-Me₄-Gal (26,04%) e 2,3-Me₂-Rha (5,34%).

Palavras-chave: Lipopolissacarídeo; *Herbaspirillum seropedicae*; Fixação Biológica de Nitrogênio; interação Planta-Bactéria.

ABSTRACT

Projections of population growth in the coming decades fuel a debate about the inability to meet the growing food needs. The increase in food production is often the result of the excessive use of chemical fertilizers, which can cause significant environmental damage. An alternative to chemical nitrogen fertilizers is biological nitrogen fixation. This process is essential for plant development, depending on efficient colonization by bacteria. During all stages of this process, communication between the bacterium and the host is mediated by various biomolecules, with lipopolysaccharides (LPS) being one of them. LPS, which have a complex structure, are exclusively found in Gram-negative bacteria. These glycoconjugates consist of three structurally distinct regions: lipid A, the core oligosaccharide, and the O-antigen, with the latter being the most structurally variable in its composition and the most important in the process of interaction with the plant. Therefore, elucidating the structure of the O-antigen is essential to better understand the interaction process between bacteria and plants. The present work aimed to characterize the fine structure of the O-antigen portion of the LPS produced by the SmR1 strain of *Herbaspirillum seropedicae*. For this purpose, the LPS were extracted from the bacterial strain using the phenolic fraction, indicating that they are *semi-rough* type LPS, intermediate LPS structures with a lower degree of polymerization of the O-antigen portion. To elucidate the structure of the LPS, monosaccharide composition analysis was performed by GLC, which showed the presence of Ara, Man, Gal, and Glc units. Chemical and spectroscopic analyses of the O-antigen portion, isolated by mild hydrolysis of the LPS from *H. seropedicae* SmR1, revealed that the monosaccharide composition of this molecule is predominantly formed by Gal, Ara, Man, and Rha, contradicting previously described literature findings. Signals in the proton region of the acetyl group were also observed, suggesting the presence of N-acetyl groups, indicating the presence of GlcNAc or GalNAc, corroborated by the high amount of Gal in the monosaccharide composition. Additionally, signals related to the presence of a CH₃ group, corresponding to a deoxysugar—possibly Rha due to its presence in the monosaccharide composition analysis—were noted. MALDI-TOF spectrometry analyses of the O-antigen portion showed several mass-to-charge ratio peaks with differences of 306 m/z. Derivatization of the O-antigen of the SmR1 strain of *H. seropedicae* to generate partially methylated alditol acetates (PMAA) revealed the presence of Gal and Rha, with the main derivatives observed being 3,4,6-Me₃-Gal (37.46%), 2,3,4-Me₃-Gal (31.15%), 2,3,4,6-Me₄-Gal (26.04%), and 2,3-Me₂-Rha (5.34%).

Keywords: Lipopolysaccharide; *Herbaspirillum seropedicae*; Biological Nitrogen Fixation; Plant-Bacteria Interaction

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS DE <i>H. seropedicae</i> CULTIVADAS EM ÁGAR NUTRIENTE.....	23
FIGURA 02 – COLONIZAÇÃO DA PLANTA POR <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	25
FIGURA 03 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.....	26
FIGURA 04 – ESQUEMA DAS ESTRUTURAS DOS DIFERENTES INTERMEDIÁRIOS DE LPS PRESENTES NA MEMBRANA EXTERNA.....	28
FIGURA 05 – ESQUEMA DA HIDRÓLISE BRANDA DOS LPS.....	36
FIGURA 06 – SDS-PAGE 15% DS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS EXTRAÇÃO EM PEQUENA ESCALA DOS LPS DA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. Seropedicae</i>	39
FIGURA 07 – REAÇÃO DA DIFENILAMINA PARA VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA NAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS.....	41
FIGURA 08 – SDS-PAGE 15% DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA DOS LPS DA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. Seropedicae</i>	42
FIGURA 09 – CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DOS MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NA PORÇÃO O-ANTÍGENO ISOLADA DE <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	45
FIGURA 10 – ESPECTRO DE CORRELAÇÃO QUÂNTICA HETERONUCLEAR ÚNICA (HSQC) DA PORÇÃO O-ANTÍGENO ISOLADA DO LPS DE <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	49
FIGURA 11 – ESPECTRO DE MALDI-TOF DA FRAÇÃO FENÓLICA CONTENDO LPS DE <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	51
FIGURA 12 – ESPECTRO DE MALDI-TOF DA PORÇÃO O-ANTÍGENO DE <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – PESO SECO DAS FRAÇÕES AQUOSA E FENÓLICA OBTIDAS APÓS EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA DO LPS DA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. Seropedicae</i>	40
TABELA 02 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO FENÓLICA CONTENDO OS LPS DA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. Seropedicae</i>	43
TABELA 03 – PESO SECO DAS PORÇÕES O-ANTÍGENO E LIPÍDEO-A OBTIDAS APÓS HIDRÓLISE BRANDA DO LPS DA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. Seropedicae</i>	44
TABELA 04 – PESO SECO DAS PORÇÕES O-ANTÍGENO E LIPÍDEO-A OBTIDAS APÓS HIDRÓLISE BRANDA DO LPS DA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. Seropedica</i>	46
TABELA 05 – DERIVADOS ALDITOL ACETATO PARCIALMENTE METILADOS (PMAA) DA PORÇÃO O-ANTÍGENO DOS LPS EXTRAÍDOS DA ESTIRPE SmR1 DE <i>H. Seropedicae</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

α – Alfa;

β – Beta;

δ – Delta (Deslocamento Químico);

AA – Alditol Acetato;

Ac₂O – Anidrido Acético;

APS – Persulfato de Amônio;

Ara – Arabnose;

ATP – Adenosina Trifosfato;

BPCV – Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal;

CCD – Cromatografia de Camada Delgada;

CPS – Polissacarídeos Capsulares;

D – Série Estereoquímica D;

D.O.600 – Densidade Óptica em 600 nanômetros;

D₂O – Óxido de Deutério;

Da – Dalton;

e⁻ – Elétron;

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;

EPS – Exopolissacarídeo;

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio;

f- Furanosídico;

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio;

Fuc – Fucose;

Gal – Galactose;

GalNAc – N-acetilgalactosamina;

GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas;

GLC – *Gas-liquid Chromatography*;

Glc – Glucose;

GlcN – Glucosamina;

GlcNAc – N-Acetilglucosamina;

HB – Hidrólise Branda;

Hep – Heptose;

HSQC – Correlação Quântica Heteronuclear Única;
Imp/RlpB – Transportadores que deslocam LPS;
kDa – Quilodalton;
Kdo – Ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico;
L – Série Estereoquímica L;
LCO – lipoquitoligossacarídeo;
LPS – Lipopolissacarídeo;
LptA – Proteína Periplasmática;
LptB/YrbK – Proteínas auxiliaadoras no direcionamento da molécula de LPS;
 m/z – Massa/carga;
MALDI-TOF – *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*;
Man – Manose;
MsbA – Proteína transmembranar para o deslocamento do lipídeo-A;
MWCO – Molecular Weight Cut-Off;
NFb – Meio de Cultivo;
Nod – Fatores de nodulação;
 p – Piranosídico;
PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos;
pH – Potencial Hidrogeniônico;
PMAA – Alditol Acetato Parcialmente Metilado;
ppm – Partes por Milhão;
R – *Rough*;
Rt – Tempo de Retenção;
rfbB – Gene Relacionado à Biossíntese de Rha;
rfbC – Gene Relacionado à Biossíntese de Rha;
Rha – Ramnose;
Rib – Ribose;
RMN – Ressonância Magnética Nuclear;
RNA – Ácido Ribonucleico;
RNase – Ribonuclease;
rpm – Rotações por Minuto;
S – *Smooth*;
SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*;
SR – *Semirough*;

SSP – Sistemas de Secreção de Proteínas;

t – Terminal;

TEMED – tetrametiletilenodamina;

TFA – Ácido Trifluoroacético;

TRIS – Aminometilidenotrimetanol;

UDP – Uridina Difosfato;

Und – Ácido Graxo Undecaprenil;

WaaJ – LPS glicose transferase;

Waal – LPS O-antígeno ligase;

WaaQ – LPS heptose II transferase;

WaaP – LPS heptose I quinase;

WaaU – LPS heptose transferase;

WaaY – LPS heptose II quinase;

Wza – LPS translocase;

Wzx – O-antígeno flipase;

Wzy – O-antígeno polimerase;

YerA – Yersiniose.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivo Geral.....	17
1.2.2 Objetivos Específicos.	17
1.3 JUSTIFICATIVA.	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)	19
2.1.1 Diazotrofos Associativos	20
2.2 GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> spp	21
2.2.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	22
2.3 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA.	23
2.4 LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS).....	25
2.4.1 Estrutura dos LPS	25
2.4.2 Biossíntese dos LPS	28
2.4.3 LPS em Diazotrofos.	29
2.4.4 LPS na Interação Planta-Bactéria	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	32
3.2 MEIO DE CULTURA.	32
3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	32
3.4 EXTRAÇÃO DOS LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS).....	33
3.4.1 Extração em Pequena Escala.	33
3.4.2 Extração em Larga Escala.	33
3.5 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS LPS POR SDS-PAGE	34
3.6 ANÁLISES QUÍMICAS E ESTRUTURAIS	34
3.6.1 Determinação de Carboidratos Totais.....	34
3.6.2 Determinação de Proteínas Totais.	35
3.6.3 Determinação da presença de DNA.....	35
3.6.4 Hidrólise Branda dos LPS.....	35
3.6.5 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	36
3.6.6 Derivados Alditol Acetato (AA).....	36
3.6.7 Derivados Alditol Acetato Parcialmente Metilados (PMAA).	37

3.6.8	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	38
3.6.9	Espectrometria de Massas por MALDI-TOF.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1	EXTRAÇÃO EM PEQUENA ESCALA.....	39
4.2	EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA.....	40
4.3	ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO POR SDS-PAGE.....	42
4.4	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS LPS DE <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	43
4.5	OBTENÇÃO DA PORÇÃO O-ANTÍGENO DOS LPS DE <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	44
4.6	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PORÇÃO O-ANTÍGENO ISOLADA DOS LPS DE <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	45
5	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A dependência da agricultura em relação aos fertilizantes químicos é preocupante devido aos riscos associados ao seu uso, tais como a eutrofização do solo e contaminação das águas subterrâneas, bem como a emissão de gases de efeito estufa (CHIEN *et al.*, 2011; DUNGAIT *et al.*, 2012; MARKS *et al.*, 2013). Uma alternativa promissora para aumentar a eficiência de produção, ao mesmo tempo em que se reduz a quantidade de fertilizantes químicos aplicados em ambientes agrícolas, é o uso de inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Essas bactérias compõem um grupo de microrganismos capazes de estimular o crescimento e o desenvolvimento das plantas (HUNGRIA *et al.*, 2010). Elas atuam suprindo diretamente a demanda vegetal por nutrientes através de mecanismos de promoção do crescimento, além de aumentar a resistência e tolerância das plantas contra estresses bióticos e abióticos (HUNGRIA *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2013). As BPCV foram encontradas em associação com uma grande variedade de espécies vegetais, abrangendo uma vasta gama de gêneros, incluindo *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (HUNGRIA *et al.*, 2010)

Os lipopolissacarídeos (LPS), moléculas presentes exclusivamente na superfície celular de bactérias Gram-negativas, desempenham um papel crucial na interação entre estes microorganismos e plantas (SERRATO, 2014). As cadeias polissacarídicas que fazem parte da composição dos LPS possuem estruturas variáveis e projetam-se a partir da membrana externa da bactéria para o meio, constituindo a superfície molecular que realiza o primeiro contato destes microorganismos com o hospedeiro (KANNENBERG *et al.*, 1998). Os LPS consistem em uma porção oligossacarídica e uma porção polissacarídica, respectivamente nomeadas de núcleo e O-antígeno, que são ancorados à membrana externa da bactéria por uma porção hidrofóbica chamada lipídeo-A (ZÄHRINGER *et al.*, 1999). O O-antígeno, região mais externa do LPS, apresenta a maior variabilidade estrutural entre as regiões do LPS, com modificações nas suas unidades oligossacarídicas repetitivas, sendo essa porção considerada a mais importante nos LPS durante o processo de interação planta-bactéria, tornando fundamental sua elucidação estrutural para um melhor entendimento deste processo (ERRIDGE *et al.*, 2002).

Embora os LPS estejam relacionados ao processo de infecção e colonização dos hospedeiros vegetais, existem mecanismos neste processo que são pouco compreendidos e por isso carecem de mais investigação (BALSANELLI, 2013; SERRATO, 2014).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a estrutura fina da porção O-antígeno do LPS produzido pela estirpe SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Cultivar estirpe bacteriana SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae* em meio NFb-Malato líquido;
- Coletar as células do cultivo celular por centrifugação em quantidade significativa;
- Extrair os LPS da superfície celular utilizando fenol 45% a quente;
- Purificar os LPS utilizando centrifugação e diálise;
- Determinar o padrão de bandas dos LPS por SDS-PAGE e coloração com nitrato de prata;
- Isolar e purificar a porção O-antígeno dos LPS extraídos através de hidrólise branda com ácido acético 1%;
- Determinar a estrutura da porção O-antígeno utilizando métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos.

1.3 JUSTIFICATIVA

O fenômeno de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é vital para a agricultura e para a segurança alimentar, sendo observado tanto em processos simbióticos quanto na associação de bactérias diazotróficas com as plantas. A interação desses diazotrofos com seus hospedeiros é complexa e dependente de uma íntima comunicação molecular entre a planta e a bactéria. Os LPS, componentes fundamentais da parede celular de bactérias Gram-negativas, desempenham papéis específicos em cada estágio do processo simbiótico, um fenômeno já amplamente estudado em bactérias da família Rhizobiaceae.

Por outro lado, os diazotrofos associativos endofíticos, como algumas espécies do gênero *Herbaspirillum*, diferem dos diazotrofos simbióticos por não formarem estruturas especializadas nas plantas, como os nódulos. Em vez disso, a fixação de nitrogênio ocorre dentro dos tecidos vegetais, evidenciando uma interação ainda não totalmente compreendida

entre estas bactérias e suas plantas hospedeiras. Especula-se que os LPS bacterianos, principalmente sua porção glicídica, desempenhem um papel fundamental nesse processo, embora os mecanismos exatos de comunicação planta-bactéria ainda estejam por ser elucidados.

Nesse contexto, torna-se necessário investigar e caracterizar os LPS de bactérias como *H. seropedicae*. Uma vez que essas bactérias diazotróficas associativas são capazes de promover o crescimento das plantas com elevado interesse econômico, possuem relevância agrônômica significativa. A compreensão mais aprofundada da interação entre essas bactérias e as plantas hospedeiras, incluindo o papel dos LPS, não só enriquecerá o conhecimento sobre a comunicação planta-bactéria, mas também pode fornecer *insights* para melhorar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio e, conseqüentemente, a produção agrícola.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com exceção da água, o nitrogênio é amplamente reconhecido como o elemento mais limitante para o desenvolvimento vegetal em seu habitat natural (FRANCO; DÖBEREINER, 1994). Dado que muitos solos são deficientes em nitrogênio, fósforo e/ou ferro, comprometendo assim o desenvolvimento da vegetação, agricultores têm observado suas plantações tornando-se cada vez mais dependentes do uso de fertilizantes químicos compostos de nitrogênio e fósforo para contornar esse quadro. No entanto, além de onerosa, a produção de fertilizantes químicos consome fontes não renováveis de energia, como petróleo e gás natural, uma vez que estas são utilizadas em sua produção (GLICK, 2012; HOSEINZADE *et al.*, 2016 *apud* MIRANSARI; MACKENZIE, 2010, 2011, 2012). Além disso, o aumento na utilização de fertilizantes causa sérios problemas ambientais uma vez que pode afetar o acúmulo de metais pesados no solo e na planta. As plantas absorvem os fertilizantes através do solo, entrando assim na cadeia alimentar. Somado a isso, a fertilização pode levar à poluição da água, do solo e do ar (SAVCI, 2012). Diante desse quadro, seriam vantajosos meios biológicos eficientes capazes de fornecer às plantas nitrogênio e fósforo, ainda que de forma parcial, para substituir os fertilizantes químicos que são utilizados atualmente (GLICK, 2012).

2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)

Apesar da abundância de nitrogênio molecular ou dinitrogênio (N_2) na atmosfera terrestre, compreendendo cerca de 80% de sua composição, a maioria dos organismos enfrenta dificuldades em sua assimilação e utilização metabólica. É necessário que o nitrogênio esteja presente em formas mais reduzidas, como o amônio (NH_4^+), para ser empregado na biossíntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos nitrogenados (SERRATO, 2008).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) constitui o processo pelo qual o dinitrogênio atmosférico inerte é convertido em amônia (NH_3) biologicamente assimilável pelos organismos. Este fenômeno ocorre naturalmente por meio de um grupo seletivo de procariotos que, por via enzimática, transformam o dinitrogênio em amônia (SIMPSON; BURRIS, 1984). As bactérias fixadoras de nitrogênio, também conhecidas como diazotróficas, representam a principal rota de incorporação de nitrogênio no ecossistema, um elemento que é continuamente reciclado, retornando à atmosfera por intermédio de

outros organismos decompositores de matéria orgânica no solo. Estimativas indicam que são fixadas por ano de 139 a 175 milhões de toneladas de nitrogênio, por meio do processo de fixação biológica, em que as associações simbióticas representam de 25 a 30% (35 a 44 milhões de toneladas de N₂) e as pastagens permanentes representam os outros 30% (45 milhões de toneladas de N₂) (PAUL, 2000).

As bactérias fixadoras de nitrogênio são geralmente categorizadas em três grupos distintos: (i) os diazotrofos de vida livre, responsáveis pela fixação do N₂ para seu próprio metabolismo, (ii) os diazotrofos associativos, os quais contribuem para o crescimento de plantas sem a formação de estruturas especializadas, e (iii) os diazotrofos simbióticos, que estabelecem uma relação simbiótica próxima com a planta hospedeira, formando estruturas conhecidas como nódulos, onde ocorre a conversão do N₂ em NH₃ (EVANS; BURRIS, 1992). Dentro dessas categorias, muitas espécies são heterotróficas - requerendo uma fonte externa de carbono reduzido, o qual é indiretamente dependente da energia luminosa, e frequentemente exigindo uma simbiose com um hospedeiro eucariótico - ou são de vida livre, competindo com outros microrganismos por matéria orgânica disponível no ambiente. Por outro lado, existem diazotrofos autotróficos, capazes de reduzir o CO₂ na presença de luz (SPRENT; SPRENT, 1990). Dentre os diversos grupos de procariotos que realizam a fixação de nitrogênio, destacam-se algumas espécies amplamente estudadas, como *Rhodospirillum rubrum* (fotossintética), *Clostridium* spp. (anaeróbica), *Azotobacter* spp. e *Derxia* spp. (ambas aeróbicas), *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus* spp. e *Burkholderia* spp. (microaeróbicas), além de representantes das cianobactérias e actinomicetos (*Frankia* spp.) (STACEY *et al.*, 1992). Adicionalmente, cabe destacar diazotrofos dos gêneros *Beijerinckia* (DÖBEREINER, 1961), *Klebsiella* (LADHA *et al.*, 1983), *Pseudomonas* (BARRAQUIO *et al.*, 1983), *Campylobacter* (McCLUNG; PATRIQUIN, 1980), *Enterobacter* (HAAHTELA *et al.*, 1981) e *Paenibacillus* (ASH *et al.*, 1993).

2.1.1 Diazotrofos Associativos

Algumas das bactérias que fazem parte dos diazotrofos associativos podem também ser denominadas de diazotrofos endofíticos por colonizar o interior das plantas (DÖBEREINER *et al.*, 1988). Essas bactérias também podem colonizar a região da

rizosfera, e a superfície (epifíticas) de tecidos vegetais (BODDEY *et al.*, 2003; FRANCHE *et al.*, 2009). Devido a isso, desde 1990, houve um crescente interesse em utilizar diazotróficos endofíticos dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Serratia* e *Herbaspirillum* como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (MONTEIRO *et al.*, 2012).

Gluconacetobacter diazotrophicus, por exemplo, é uma bactéria diazotrófica encontrada colonizando, os tecidos internos de plantas como a cana-de-açúcar (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988), batata-doce, abacaxi (BALDANI; BALDANI, 2005) e arroz (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2007). Além da capacidade de fixar N₂ em associação com plantas de cana-de-açúcar, foi demonstrado que essa bactéria possui outras características fisiológicas, como produção de fitohormônios (SEVILLA *et al.*, 2001 *apud* MENESES *et al.*, 2011), solubilização de fosfato e zinco, e controle de fitopatógenos (SARAVANAN *et al.*, 2007 *apud* MENESES *et al.*, 2011).

Outros organismos capazes de colonizar as raízes, exercendo efeitos benéficos nas plantas, pertencem ao gênero *Azospirillum* (OKON, 1985). Esse é um dos gêneros mais estudados de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas atualmente (CASSÁN, 2016). Essas bactérias fixadoras de nitrogênio foram trazidas à atenção por Dobereiner e colaboradores em 1974. São organismos que colonizam principalmente gramíneas forrageiras e cereais, sendo facilmente isoladas da rizosfera (OKON, 1985). Esses organismos são capazes de colonizar mais de cem espécies de plantas, melhorando significativamente seu crescimento, desenvolvimento (BASHAN; De-BASHAN, 2010). Em geral a melhora do crescimento é evidente na maioria dos casos de inoculação, mas o efeito na produção nem sempre é economicamente vantajoso (DÍAZ-ZORITA; FERNÁNDEZ-CANIGIA, 2009) fator que tem impulsionado a pesquisa em direção a mecanismos alternativos (CASSÁN, 2016).

2.2 GÊNERO *Herbaspirillum* spp.

O gênero, *Herbaspirillum*, foi criado devido às descobertas de Baldani *et al.* (1986) e Falk *et al.* (1986) que, após análises de DNA, permitiram a reclassificação da espécie *Herbaspirillum seropedicae*, anteriormente inserida no gênero *Azospirillum* devido ao seu padrão de crescimento, sendo agora inserida no gênero *Herbaspirillum* (BALDANI *et al.*, 1996; SCHMID *et al.*, 2006).

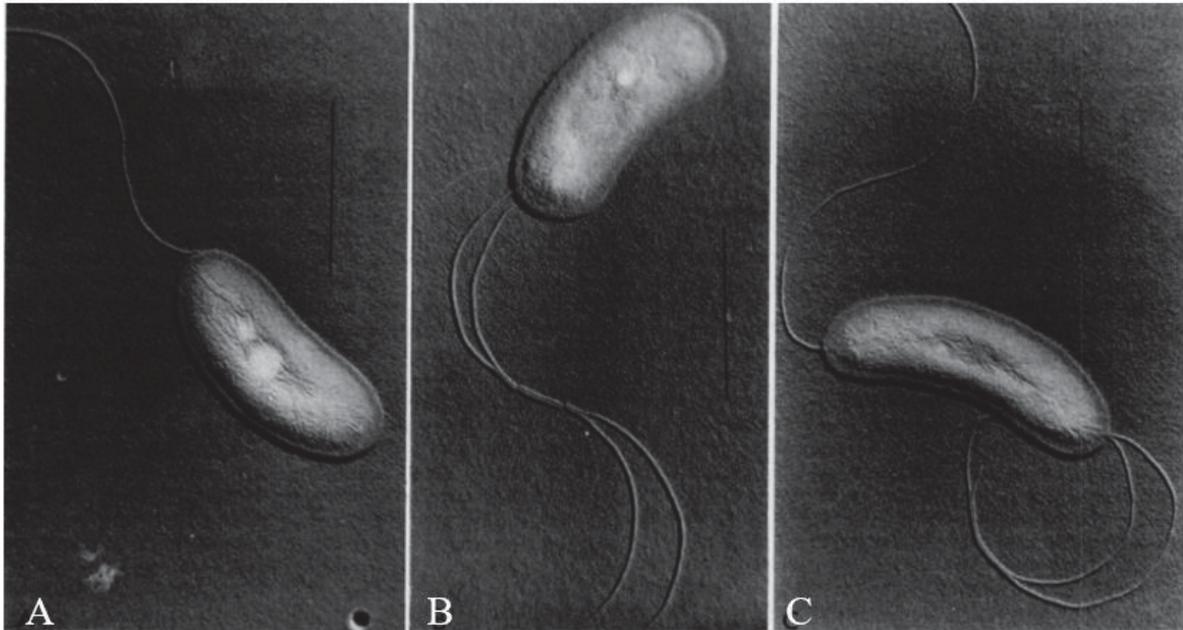
Trata-se então de um grupo de microrganismos pertencente à classe das β -proteobactérias que exibe características distintas. Estas bactérias gram-negativas apresentam uma notável habilidade para fixar nitrogênio atmosférico em condições microaeróbicas e seu habitat ideal é encontrado em temperaturas entre 30°C e 34°C, particularmente em meios contendo ácidos orgânicos como fonte de carbono, como malato, piruvato e fumarato (BALDANI *et al.*, 1986).

Desde a identificação pioneira de *Herbaspirillum seropedicae* por Baldani e colaboradores em 1986, uma série de outras espécies foram descobertas. Entre elas estão *H. rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, em 1996); *H. frisingense* (KIRCHHOF *et al.*, 2001); *H. lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2003); *H. huttiense* subespécie *Huttiense* (DING; YOKOTA, 2004); *H. chlorophenicum* (IM *et al.*, 2004); *H. hiltneri* (ROTHBALLER *et al.*, 2006); *H. rhizosphaerae* (JUNG *et al.*, 2007); *H. huttiense* subspécies *putei*, *H. autotrophicum* and *H. aquaticum* (DOBRTSA *et al.*, 2009); *H. canariense*, *H. aurantiacum*, and *H. soli* (CARRO *et al.*, 2012); *H. massiliense* (LAGIER *et al.*, 2012), *H. psychrotolerans* (BAJERSKI *et al.* 2013) e *H. piri* (XU *et al.*, 2018).

2.2.1 *Herbaspirillum seropedicae*

O *H. seropedicae* é um diazotrofo endofítico pertencente ao grupo das β -proteobactérias (BATISTA *et al.*, 2013). Inicialmente tendo sido isolado de raízes de milho, sorgo e arroz, exibindo semelhantes capacidades de fixação de nitrogênio. As células do *H. seropedicae*, originárias de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil, onde a espécie foi primeiramente descoberta, apresentam uma forma vibrióide, eventualmente helicoidal, e demonstram alta motilidade quando expostas ao oxigênio. Apresentam-se geralmente equipadas com dois flagelos polares, ocasionalmente entre um e três, posicionados em um ou ambos os polos celulares (FIGURA 1). As células do *H. seropedicae* excedem as dimensões típicas observadas para o gênero *Herbaspirillum* e seu crescimento dependente de N₂ é ótimo a 34°C, não ocorrendo a temperaturas de 22°C e 38°C (BALDANI *et al.*, 1986).

FIGURA 1 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS DE *H. seropedicae* CULTIVADAS EM ÁGAR NUTRIENTE.



(A, B e C) Um, dois e três flagelos em um ou ambos os polos, respectivamente. Barras = 1 μm .

FONTE: Baldani *et al.* (1986).

As cepas mais bem estudadas são a cepa SmR1 de *H. seropedicae*, um mutante espontâneo da cepa Z78 que teve seu genoma sequenciado por Pedrosa *et al.* (2011), e a cepa tipo Z67 (MONTEIRO *et al.*, 2012). O *H. seropedicae* SmR1 é uma bactéria aeróbica que possui uma cadeia respiratória ramificada composta por diferentes tipos de oxidases terminais, o que pode permitir que as bactérias explorem flexibilidade respiratória e sobrevivam em condições microaeróbicas (BATISTA, *et al.*, 2013).

Investigações mostraram que *H. seropedicae* fornece nitrogênio fixado à planta associada, aumentando assim a produtividade de seus grãos (PEDROSA *et al.*, 2011). Avaliações prévias demonstraram que plantas de arroz inoculadas com a estirpe Z67 apresentaram um aumento de até 50% no peso seco da planta, além de um considerável aumento no teor de nitrogênio nos grãos (BALDANI *et al.*, 1996).

2.3 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Segundo Brencic e Winans (2005) já é uma realidade amplamente reconhecida que praticamente todas as plantas estabelecem relações íntimas com microrganismos. As bactérias, por exemplo, podem colonizar as superfícies das plantas, um fenômeno denominado colonização epifítica, ou penetrar nos tecidos vegetais, conhecido como

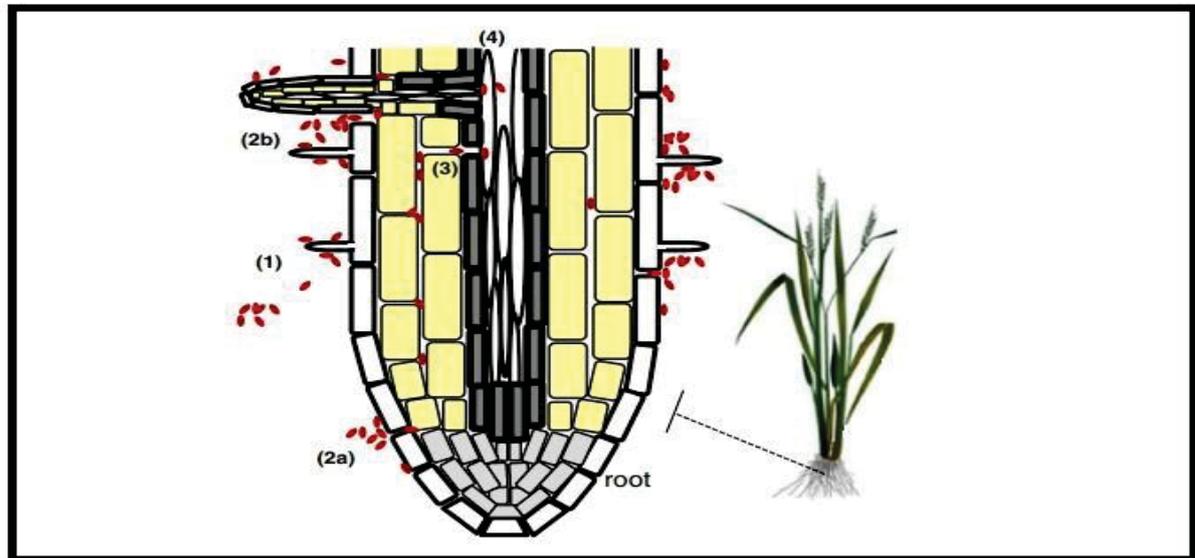
colonização endofítica. Nesse tipo de relação, as bactérias vivem de modo latente ou ativo, colonizando tecidos específicos ou a planta toda (QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997).

A eficácia do estímulo ao crescimento das plantas e à fixação de nitrogênio dentro da planta depende, entretanto, de uma colonização eficaz. No entanto, os mecanismos relacionados à colonização pelo endófito associativo ainda não são totalmente compreendidos, possivelmente devido à dispersão da bactéria por toda a planta (BALSANELLI, 2013). Na comparação com outras formas de colonização, como a simbiose entre rizóbios e leguminosas, nas quais as bactérias residem em nódulos especializados nas raízes das plantas, observa-se uma diferenciação marcante. Essa interação começa com a quimiotaxia das bactérias em direção às raízes da planta, desencadeada pela presença de flavonoides na rizosfera. Os flavonoides, por sua vez, estimulam a expressão dos fatores de nodulação (Nod) pelas bactérias, resultando na liberação de lipoquitooligossacarídeos (LCO), macromoléculas reconhecidas pelos receptores proteicos presentes nas plantas, desencadeando alterações celulares nas raízes em contato com as bactérias e iniciando a formação do cordão de infecção (LIMPENS *et al.*, 2003). Após a internalização dos rizóbios, ocorre a formação do simbiossomo, em que as bactérias se diferenciam em bacteroides dedicados à fixação de nitrogênio. Durante todo esse processo de colonização, a comunicação entre a bactéria e o hospedeiro depende de uma variedade de biomoléculas, incluindo exopolissacarídeos (EPS), polissacarídeos capsulares (CPS), sistemas de secreção de proteínas (SSP) e lipopolissacarídeos (LPS) (BROUGHTON *et al.*, 2006).

Segundo Quadt-Hallman *et al.* (1997), algumas bactérias endofíticas adentram a epiderme radicular através de enzimas hidrolíticas como celulases e pectinases. Porém, no caso de *H. seropedicae*, a bactéria também pode se aproveitar das reentrâncias e descontinuidades presentes na epiderme radicular (FIGURA 2) para adentrar os tecidos da planta, sendo esse processo provavelmente mais comum, uma vez que o solo contém partículas que podem causar feridas como resultado de fricção com a superfície das raízes (GYANESHWAR *et al.*, 2002 *apud* MONTEIRO *et al.*, 2012). No entanto, para que esse processo de colonização ocorra, a bactéria precisa primeiro superar os mecanismos de defesa impostos pela planta (QUISPTEL, 1992; SANTI *et al.*, 2013). Esse processo envolve vários estágios, incluindo a percepção da planta pelo microrganismo, a quimiotaxia em direção à raiz, a aderência e a colonização da superfície do vegetal. Um exemplo concreto desse processo é a adesão e colonização das raízes de milho pelo *Azospirillum brasilenses*,

que requer a presença do flagelo, da biossíntese de lipopolissacarídeos e dos polissacarídeos fibrilares, além da secreção de exopolissacarídeos (BURDMAN *et al.*, 2000).

FIGURA 2 – COLONIZAÇÃO DA PLANTA POR *Herbaspirillum seropedicae*.



Associação de *H. seropedicae* (pontos vermelhos) com plantas hospedeiras em condições laboratoriais: Quimiotaxia das bactérias para a raiz da planta e fixação na superfície das raízes, preferencialmente na zona de pelos radiculares (1). Algumas bactérias penetram através de discontinuidades da epiderme, como a zona de alongação (2a). Outras bactérias penetram por fissuras nas raízes (2b). Ocupação dos espaços intercelulares das raízes, juntamente com a colonização do aerênquima (em arroz) e do xilema (3). Algumas bactérias movem-se das raízes para as partes aéreas através do xilema (4).

FONTE: Adaptado de Monteiro *et al.* (2012).

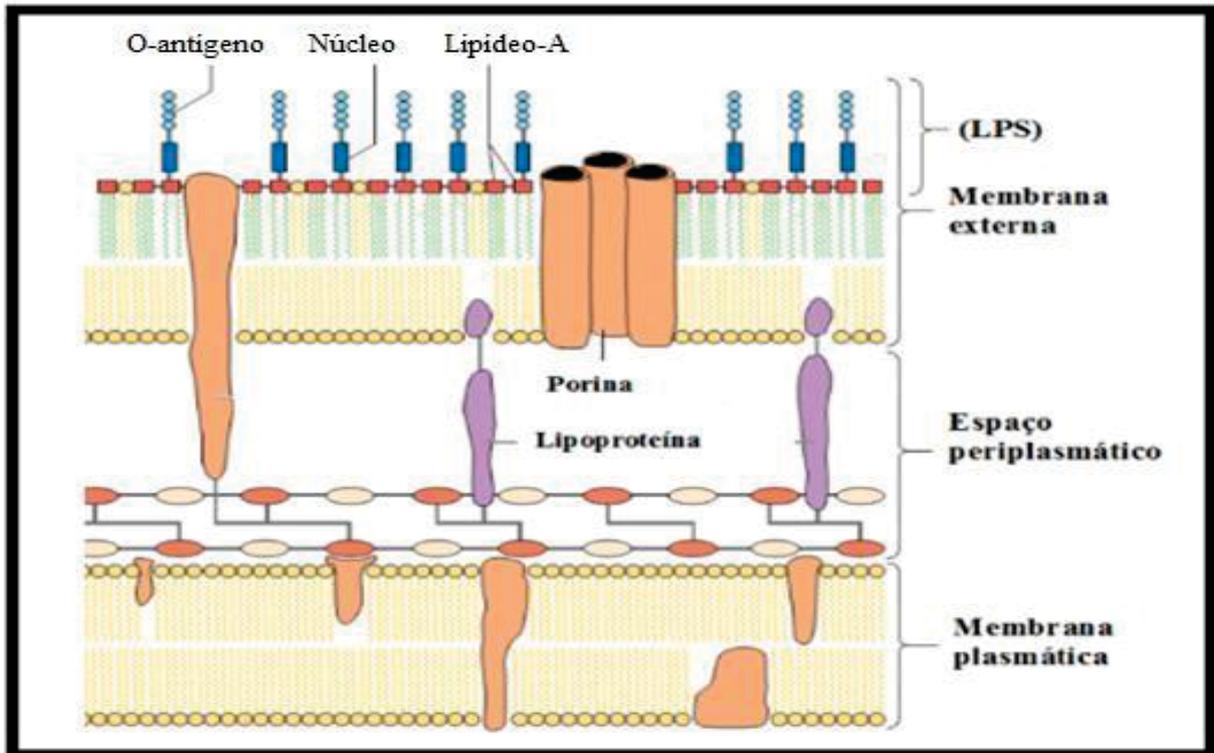
2.4 LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS)

2.4.1 Estrutura dos LPS

De acordo com Collins e Ferrier (1995), os LPS são moléculas de estrutura extremamente complexa encontradas exclusivamente na camada externa da membrana externa das bactérias Gram-negativas. Esses glicoconjugados são formados por três regiões estruturalmente e geneticamente distintas (FIGURA 3): a porção chamada de lipídeo-A, o núcleo oligossacarídico e a porção externa ou O-antígeno (FUX *et al.*, 2023; SERRATO, 2014; SUTHERLAND, 1985). Essas moléculas de LPS têm o poder de remodelar a membrana externa, criando uma barreira eficaz que impede a passagem de moléculas pequenas e hidrofóbicas, as quais, de outra forma, poderiam atravessar as camadas lipídicas e afetar as bactérias Gram-negativas, sendo essa capacidade uma resistência natural a diversos compostos antimicrobianos. Além disso, os LPS desempenham um papel essencial

na interação entre as bactérias e seus hospedeiros (BALSANELLI, 2013; BERTANI; RUIZ, 2018; FUX *et al.*, 2023).

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.



FONTE: Adaptado de Kayser *et al.* (2004).

Segundo Bertani e Ruiz (2018), embora a estrutura geral do LPS seja consistentemente observada, sua composição pode variar consideravelmente entre diferentes espécies e cepas bacterianas. Da mesma forma, o lipídeo-A, embora mantenha sua estrutura básica bem conservada dentro de uma mesma espécie, pode ser sujeito a alterações reguladas em resposta às condições ambientais.

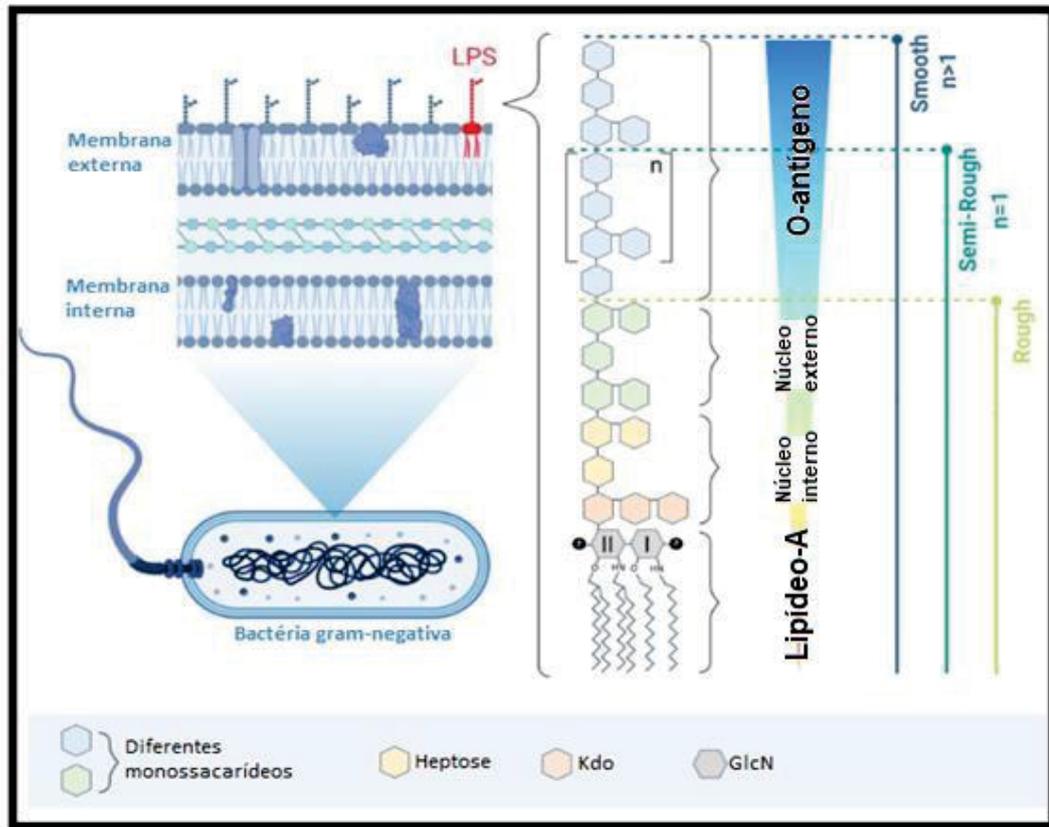
O lipídeo-A é formado por dímeros de 2-amino-2-deoxi-D-Glucose (GlcN) ligados entre si por ligações do tipo β -(1→6) e fosforilados nas posições 1' e 4', além de apresentarem substituições por ácidos graxos de cadeia longa nas demais posições (ZÄHRINGER *et al.*, 1999). Essas moléculas têm um papel estrutural de suma importância, uma vez que atuam ancorando a estrutura do LPS à membrana externa da bactéria (RIETSCHER *et al.*, 1994). Isso é possível devido à ligação presente entre o lipídeo-A e o núcleo oligossacarídico, que depende da presença de duas moléculas de ácido 3-deoxi-D-mano- oct-2-ulosônico (Kdo), as quais se ligam ao carbono-6 livre de uma das GlcN (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

O núcleo, por sua vez, é uma região que possui certo grau de variabilidade estrutural quanto a sua composição, podendo ser dividido em núcleo interno, ligado ao lipídeo-A pelas moléculas de Kdo, juntamente à presença de algumas heptoses (ZÄHRINGER *et al.*, 1999) e núcleo externo, composto por hexoses piranosídicas, sendo comum a presença de glucose (Glc), galactose (Gal) e N-acetilglucosamina (GlcNAc) (RAETZ, 1990).

Por fim, a porção O-antígeno corresponde a uma porção com variabilidade interespecífica, responsável pelo reconhecimento das células vegetais e animais e consequente virulência de diversos gêneros bacterianos existentes (CHIANG; MEKALANOS, 1999; McPHERSON *et al.*, 1994). Normalmente a porção O-antígeno é formada por unidades repetidas de oligossacarídeos, na qual diferentes níveis de polimerização produzem cadeias com diferentes massas moleculares. Esse processo confere o padrão de bandas, visualizadas na análise por eletroforese (ERRIDGE *et al.* 2002). De acordo com Lüderitz *et al.* (1971), essas cadeias de polissacarídeos podem apresentar variações em sua composição, bem como em sua posição, sua estereoquímica e na presença ou ausência de substitutos não glicídicos. Esses aspectos tornam complexa a identificação dessas cadeias, o que consequentemente dificulta a determinação de suas estruturas finas.

Em uma mesma cultura bacteriana, é possível encontrar diversas estruturas intermediárias do polissacarídeo maduro, o que torna análises como RMN mais complexas devido à sobreposição de sinais e à dificuldade de atribuição precisa dos picos, causada pela presença de açúcares incomuns, muitas unidades repetitivas, e isômeros possíveis na estrutura do core e do O-antígeno. Em alguns casos, os LPS podem ser categorizados com base na presença ou ausência do O-antígeno em sua estrutura (FIGURA 4). Quando a capacidade da bactéria em produzir o LPS completo é comprometida, isso resulta em um mutante rugoso (*rough*), que geralmente se manifesta através de colônias bacterianas com uma aparência enrugada ou deformada, devido à ausência da porção O-antígeno no LPS. Por outro lado, os mutantes lisos (*smooth*) são capazes de sintetizar a estrutura completa do LPS, incluindo o O-antígeno característico. Mutantes semirrugosos (*semirough*) são aqueles que produzem estruturas intermediárias do LPS, com a maior parte do O-antígeno ligado ao núcleo da molécula, mas com algumas deficiências estruturais e modificações em suas propriedades biológicas (ASPINALL, 1970; FUX *et al.*, 2023).

FIGURA 4 – ESQUEMA DAS ESTRUTURAS DOS DIFERENTES INTERMEDIÁRIOS DE LPS PRESENTES NA MEMBRANA EXTERNA.



O LPS, destacado em vermelho, está ancorado na membrana externa das bactérias gram-negativas. Os tipos de LPS *smooth*, *semirough*, *rough* são definidos pelo comprimento do O-antígeno e da região do núcleo. Diferentes grupos de açúcares são mostrados em azul e verde; heptose em amarelo; ácido 3-deoxi- D-manno-octulosônico (Kdo) em laranja; e glucosamina (I e II) em cinza.

FONTE: Adaptado de Fux *et al.* (2023).

2.4.2 Biossíntese dos LPS

A biossíntese do LPS tem início com a porção do lipídeo-A e se dá pela ligação de dois ácidos graxos à UDP-GlcN. Essa molécula, denominada de lipídeo-X, é condensada com um segundo lipídeo-X, formando a estrutura básica do lipídeo-A. As duas GlcN ligadas β-(1→6) são N-substituídas por ácidos graxos e O-ligadas ao primeiro monossacarídeo o qual compõe o núcleo interno, geralmente um Kdo (RAETZ *et al.*, 1990). A estrutura básica do lipídeo-A, formada na parte interna da membrana interna, é então invertida, passando para o espaço periplasmático da membrana interna, processo que ocorre por meio da ação da proteína transmembranar MsbA (RAETZ *et al.*, 2007).

Em *E. coli* K-12, por exemplo, a síntese do oligossacarídeo central começa com a adição sequencial dos primeiros dois grupos Kdo às glucosaminas do lipídeo-A, seguida pela extensão do núcleo interno com dois resíduos de heptose. Posteriormente, os últimos três passos

que completam a síntese do núcleo interno devem ser catalisados pelas enzimas WaaP, WaaQ e WaaY. A síntese do núcleo externo começa com a adição de uma Glc ao segundo resíduo de heptose, seguida pela adição de glicose e galactose via ação enzimática. O resíduo de glicose final é adicionado pela enzima WaaJ, e a adição do último resíduo de Hep é mediada pela WaaU. Esse último resíduo de Hep atua como o receptor do O-antígeno, após a translocação do lipídeo-A ligado ao núcleo para a parte externa da membrana interna (BERTANI; RUIZ, 2018). A reação inicial da biossíntese da porção O-antígeno envolve uma ligação éster de uma GlcNAc ou uma GalNAc ao ácido graxo undecaprenil-PP. Essa molécula serve de suporte inicial para a ligação de NTP-açúcares por glucosiltransferases ancoradas na face citosólica da membrana interna. Após formação de uma unidade oligossacarídica ligada ao Und-PP, a molécula é translocada para o espaço periplasmático da membrana interna com o auxílio da proteína Wzx. As unidades oligossacarídicas do O-antígeno são polimerizadas pela proteína Wzy e o produto é transferido ao lipídeo-A ligado ao oligossacarídeo central pela proteína Waal para formar o LPS completo (VALVANO, 2003; RAETZ *et al.*, 2007).

A proteína periplasmática LptA, juntamente com as proteínas YrbK e LptB, atuam no direcionamento da molécula de LPS para o transportador Imp/RlpB, que desloca o LPS para a face externa da membrana externa (RAETZ *et al.*, 2007). No caso de *H. seropedicae*, a exposição final do LPS completo à membrana externa é mediada pela proteína exportadora Wza, embora o mecanismo exato envolvido nesse processo ainda não seja completamente compreendido (BALSANELLI *et al.*, 2015).

2.4.3 LPS em Diazótrofos

Como já relatado em trabalhos de Hellriegel (1888), as estruturas de LPS em bactérias fixadoras de nitrogênio são melhor descritas para espécies pertencentes à família Rhizobiaceae. Isso se deve ao fato de que os estudos sobre bactérias diazotróficas começaram com microrganismos capazes de formar estruturas especializadas, como os nódulos, para a fixação de nitrogênio. Os LPS, ancorados na membrana externa dessas bactérias, medeiam o contato direto do diazotrofo com as células hospedeiras e são extremamente variáveis entre as espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, havendo evidências de que os mecanismos de infecção estão intimamente relacionados com sua estrutura (SERRATO, 2014).

A maioria dos lipídeos-A presentes nas Rhizobiaceae, a exemplo de *R. etli*, são acilados com ácidos graxos, como o ácido 27-hidroxiocacosanóico (C-27-OH) (KANNENBERG *et al.*, 1998). O núcleo interno, por sua vez, é formado por um

octassacarídeo ramificado complexo, contendo unidades de Kdo, GalA, Man e Gal. A porção do núcleo externo, que faz a ligação com o O-antígeno, consiste em unidades de N-acetilquinosamina (QuiNAc), Man e Fuc (FORSBERG *et al.*, 1998).

A presença de unidades de ramnose (Rha) na estrutura dos O-antígenos é um traço comum entre várias espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio. *R. trifolii*, por exemplo, apresenta um pentassacarídeo repetitivo como estrutura principal de seu O-antígeno, que é formado por três unidades de Rha, além de N-acetilmanosamina (ManNAc) e GlcNAc (WANG; HOLLINGSWORTH, 1994). No caso da γ -proteobactéria *Pseudomonas syringae*, a estrutura do O-antígeno é formada por um polímero linear de β -(1 \rightarrow 2)-L-Rha (FEDONENKO *et al.*, 2002). Os diazotrofos endofíticos do gênero *Azospirillum* também apresentam grandes quantidades de Rha na estrutura dos O-antígenos (FEDONENKO *et al.*, 2002).

Diazotrofos da classe das β -proteobactérias apresentam grande variabilidade de estruturas descritas e, em alguns casos, são encontradas unidades monossacarídicas raras. Um exemplo é a presença de unidades de yersiniose (YerA) na estrutura do O-antígeno produzido por *Burkholderia brasiliensis* (MATTOS *et al.*, 2005).

Os LPS produzidos por diferentes estirpes de *Herbaspirillum* foram analisados por Serrato *et al.* (2010), mostrando que os LPS produzidos por *H. seropedicae* SmR1 são diferentes na composição de monossacarídeos e ácidos graxos quando comparados a outras estirpes. Posteriormente, a porção lipídeo-A do LPS isolado da estirpe SmR1 foi caracterizada como uma estrutura composta por duas unidades de GlcN β -(1 \rightarrow 6) ligadas e fosforiladas com 4-desoxi-4-amino-arabinose (4NAra) (SERRATO *et al.*, 2012).

2.4.4 LPS na Interação Planta-Bactéria

Durante a infecção de hospedeiros vegetais, os LPS desempenham um papel duplo: por um lado, promovem a virulência bacteriana, mas, por outro, expõem as bactérias ao sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, a capacidade das bactérias de remodelar dinamicamente as estruturas do LPS permite ajustar finamente as propriedades da membrana externa, adaptando-se rapidamente a ambientes diversos e frequentemente hostis, como os encontrados nos tecidos do hospedeiro (KUTSCHERA; RANF, 2019). Enquanto as folhas geralmente enfrentam estresses abióticos na superfície, as bactérias precisam lidar com as respostas de defesa das plantas após invadir o tecido (YU *et al.*, 2013). Compreender as variações na estrutura do LPS é importante, uma vez que a composição e o tamanho do O-

antígeno podem ser indicadores do potencial de virulência. As bactérias fitopatogênicas que não possuem O-antígeno são consideradas menos capazes dentro e sobre a planta hospedeira e, portanto, menos virulentas. Essas características frequentemente diferem dentro de uma mesma estirpe bacteriana (LEROUGE; VANDERLEYDEN, 2002). Estudos demonstraram que mutantes deficientes na porção O-antígeno, como os de *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella fastidiosa*, são menos virulentos e mais sensíveis a espécies reativas de oxigênio (EROs), comumente produzidas pelas plantas como mecanismo de defesa (BERRY *et al.*, 2009; CLIFFORD; RAPICAVOLI, 2013; PETROCELLI *et al.*, 2012). Isso resulta em maior lise celular desses mutantes, aumentando a liberação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e induzindo respostas de defesa mais robustas nas plantas durante a infecção (RAPICAVOLI *et al.*, 2018).

A perda de O-antígeno também resulta na redução da motilidade e alteração na adesão à superfície e na estrutura do biofilme, provavelmente devido à alteração da polaridade da superfície celular bacteriana (BARAK *et al.*, 2007; BERRY *et al.*, 2009; CLIFFORD; RAPICAVOLI, 2013; PETROCELLI *et al.*, 2012). Outro estudo, conduzido por Balsanelli *et al.* (2010), mostrou que quando genes relacionados à biossíntese de Rha foram eliminados em *H. seropedicae* SmR1, foram observadas alterações na estrutura do LPS dos mutantes *rfbB*- e *rfbC*-, carecendo da porção O-antígeno, sendo o principal efeito observado para os mutantes, a capacidade reduzida de colonizar os tecidos internos das raízes do milho.

Outro estudo de Balsanelli *et al.* (2013) concentrou-se na interação de *H. seropedicae* com a superfície das raízes de milho, demonstrando que a fixação eficiente requer a presença do O-antígeno do LPS. Observou-se que o número de bactérias da linhagem selvagem ligadas às raízes de milho era aproximadamente 100 vezes maior do que nas linhagens mutantes sem o O-antígeno. Não se considerou um papel significativo das proteínas da membrana externa bacteriana nesse processo de ligação, pois bactérias tratadas com Proteinase K ainda aderiram normalmente às raízes. No entanto, quando as raízes foram tratadas com Proteinase K, a ligação das bactérias da linhagem selvagem diminuiu para níveis semelhantes aos das mutantes sem a porção O-antígeno. Esses resultados sugerem que o O-antígeno do LPS de *H. seropedicae* desempenha um papel importante na etapa de ligação durante a colonização, ancorando a bactéria às plantas por meio de lectinas.

Até o momento, conclui-se que a porção O-antígeno, dentro da estrutura total do LPS, destaca-se como crucial no processo de adesão ao hospedeiro, podendo, essa região, sofrer alterações em sua produção e estrutura em resposta ao contato com o hospedeiro, às influências ambientais e às variações nas condições de cultivo em laboratório.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

No presente trabalho foi utilizada a estirpe SmR1 da bactéria *H. seropedicae*, microorganismo diazotrófico proveniente da coleção de culturas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), cedidas pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (NFN – UFPR). Os estoques de células foram realizados em meio NFb-malato semissólido à temperatura ambiente.

3.2 MEIO DE CULTURA

A estirpe SmR1 de *H. seropedicae* foi crescida em meio NFb líquido (PEDROSA e YATES, 1984), utilizando malato como fonte de carbono e contendo: MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L), NaCl (0,1 g/L), CaCl₂ (20 mg/L), FeSO₄.7H₂O (20 mg/L), biotina (100 µg/L), Na₂MoO₄.2H₂O (2,0 mg/L), MnSO₄.H₂O (2,4 mg/L), H₃BO₃ (2,8 mg/L), CuSO₄.5H₂O (8,0 mg/L), ZnSO₄.7H₂O (240 µg/L), K₂HPO₄ (17,8 g/L), KH₂PO₄ (159,5 g/L) e NH₄Cl (20 mM) como fonte de nitrogênio. O pH foi ajustado para 6,5. O meio foi esterilizado em autoclave, sendo os sais de fosfatos e de cloreto de amônio autoclavados separadamente e adicionados ao restante do meio antes da inoculação.

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O preparo dos pré-inóculos foi realizado utilizando frascos de 5 mL contendo 2 mL de meio de cultura inoculados com 5 µL da suspensão de células estocadas em meio semissólido e 5 µL de Sm⁸⁰ (estreptomocina 80 µg/mL). Os cultivos foram realizados durante 24h a 30 °C em shaker (120 rpm). Para o cultivo em larga escala foram utilizados frascos erlenmeyer de 2,0 L de capacidade, contendo 0,5 L de meio de cultura e inoculados com o pré-inóculo fresco crescido até uma densidade óptica em 600 nm (D.O.₆₀₀) de 0,8. A D.O.₆₀₀ inicial de todos os cultivos foi padronizada em 0,05. Após 24h do crescimento de *H. seropedicae* SmR1, as células foram separadas por centrifugação (10 min, 6.000 x g) e coletadas. Em seguida, repetidas lavagens das células com solução salina (NaCl 0,9%) foram realizadas, a fim de remover EPS e CPS (VELICHKO *et al.*, 2018). Por fim, as células foram liofilizadas.

3.4 EXTRAÇÃO DOS LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS)

3.4.1 Extração em Pequena Escala

A extração em pequena escala dos LPS produzidos pela estirpe SmR1 foi realizada a partir da adaptação do protocolo de microextração de Davis e Goldberg (2012) para que se obtivessem os LPS para análise do perfil eletroforético. Para isso, foram utilizados 1 mg de células secas provenientes do cultivo na presença de Sm⁸⁰ e 1 mg de células secas provenientes de um cultivo na ausência de Sm⁸⁰. As células secas foram suspensas em 200 µL de tampão de lise (1M Tris pH 6,8; 4% β-mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,005% bromofenol azul), em conformidade com Broughton *et al.* (2006), aquecidas a 100 °C por 15 min e resfriadas por igual espaço de tempo. Em seguida, foram adicionados 5 µL de RNase (10 mg/mL) seguida de incubação a 37 °C por 30 min, posteriormente 10 µL de Proteinase K (10 mg/mL) foi adicionada à solução, seguida de incubação a 59 °C por 3 h. Após a incubação, foram adicionados 200 µL de fenol 90% e a solução foi mantida a 65 °C por 15 min com agitações vigorosas a cada 5 min. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de éter etílico e a solução foi agitada. Por fim, a solução foi centrifugada (10 min, 10.000 x g), permitindo a obtenção de duas fases, uma fase orgânica e transparente, que foi extraída, e uma fase aquosa e azulada contendo os LPS. A esta foram adicionados 200 µL de tampão de amostra (120mM Tris pH 6,8; 3% SDS; 9% β-mercaptoetanol; 30% glicerol; 0,03% bromofenol azul) para que as análises eletroforéticas fossem realizadas.

3.4.2 Extração em Larga Escala

A extração com maior quantidade de células foi realizada para a obtenção de quantidade suficiente de LPS para realização das análises eletroforéticas, químicas e estruturais. Para isso, 10 g de células secas do cultivo na presença de Sm⁸⁰ foram suspensas em água deionizada (50 mg/mL) e aquecidas a 65 °C. Posteriormente, o mesmo volume de fenol 90%, pré-aquecido a 65 °C, foi adicionado. A solução foi mantida a 65 °C sob agitação por 20 min e posteriormente resfriada em banho de gelo por 10 min (WESTPHAL; JANN, 1965). Após a centrifugação (15 min, 6.000 x g), a fase aquosa foi removida, enquanto a fase fenólica foi extraída novamente com nova adição de água (200 mL) sob as mesmas condições. As frações aquosa e fenólica foram então dialisadas em membranas de 3.5 kDa (MWCO). O material dialisado resultante de ambas as frações foi centrifugado (15 min,

6.000 x g) para a remoção de materiais insolúveis e o material solúvel foi liofilizado para posterior análise (RIDLEY *et al.*, 2000).

3.5 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS LPS POR SDS-PAGE

Para a análise do perfil eletroforético dos LPS extraídos, foi montado um gel separador de poliacrilamida 15% contendo 2,5 mL de água destilada, 2,5 mL de TrisHCl (pH 8,8; 1,5 M), 5 mL de uma solução de acrilamida (30% p/v), 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) (10%), 50 µL de persulfato de amônio (APS) (10%) e 10 µL de tetrametiletenodiamina (TEMED).

O gel de empilhamento foi montado na concentração final de 4,3% de poliacrilamida e contendo 3 mL de água destilada, 1,3 mL de TrisHCl (pH 6,8; 0,5 M), 750 µL de uma solução de acrilamida (30% p/v), 50 µL de SDS (10%), 25 µL de APS (10%) e 20 µL de TEMED.

De uma solução estoque das frações contendo LPS (10 mg/mL), obtidas da extração em larga escala, foram retirados 100 µL para serem solubilizados em 900 µL de tampão de amostra, em conformidade com Broughton *et al.* (2006).

Após a corrida, o gel foi imediatamente imerso em 100 mL de solução fixadora (40% etanol e 5% ácido acético) *overnight* seguido de oxidação em 100 mL de solução de periodato de sódio (0,7% p/v) por 10 min e, posteriormente, submetido à extensiva lavagem com água destilada (5 vezes de 20 min) para a remoção completa do periodato. O gel foi então imerso em solução de nitrato de prata (0,6% p/v) por 10 min, sob agitação, enxaguado com água destilada e revelado com solução reveladora (10,0 mg ácido cítrico e 125 µL de formaldeído). A reação foi interrompida após 2-5 min com solução de ácido acético 5%, seguido por dois enxágues com água destilada (TSAI; FRASCH, 1982).

3.6 ANÁLISES QUÍMICAS E ESTRUTURAIIS

3.6.1 Determinação de Carboidratos Totais

A quantificação de carboidratos foi realizada através do método do PhOH:H₂SO₄ (DUBOIS *et al.*, 1956). Para isso, alíquotas de 0,5 mL de cada uma das frações (de um estoque a 0,5 mg/mL) foram transferidas para tubos de ensaio e foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado (94-96%). As soluções de calibração foram

preparadas com glucose em água destilada (5 a 250 µg/mL). Após reação, a absorvância das amostras foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 490 nm.

3.6.2 Determinação de Proteínas Totais

A quantificação de proteínas em cada amostra foi realizada conforme Bradford (1976). Para isso, alíquotas de 100 µL de cada uma das frações (5 mg/mL) foram tratadas com 100 µL de NaOH 0,2 M e incubadas a 37 ° C por 2 h. Na sequência, 30 µL dessa solução foram transferidos para uma placa de 96 poços e foram adicionados 170 µL do reativo Coomassie Blue G-250. As soluções de calibração foram preparadas com albumina bovina sérica em água destilada (2,5 a 100 µg/mL). Os valores das absorvâncias foram obtidos por espectrofotometria em comprimento de onda de 595 nm.

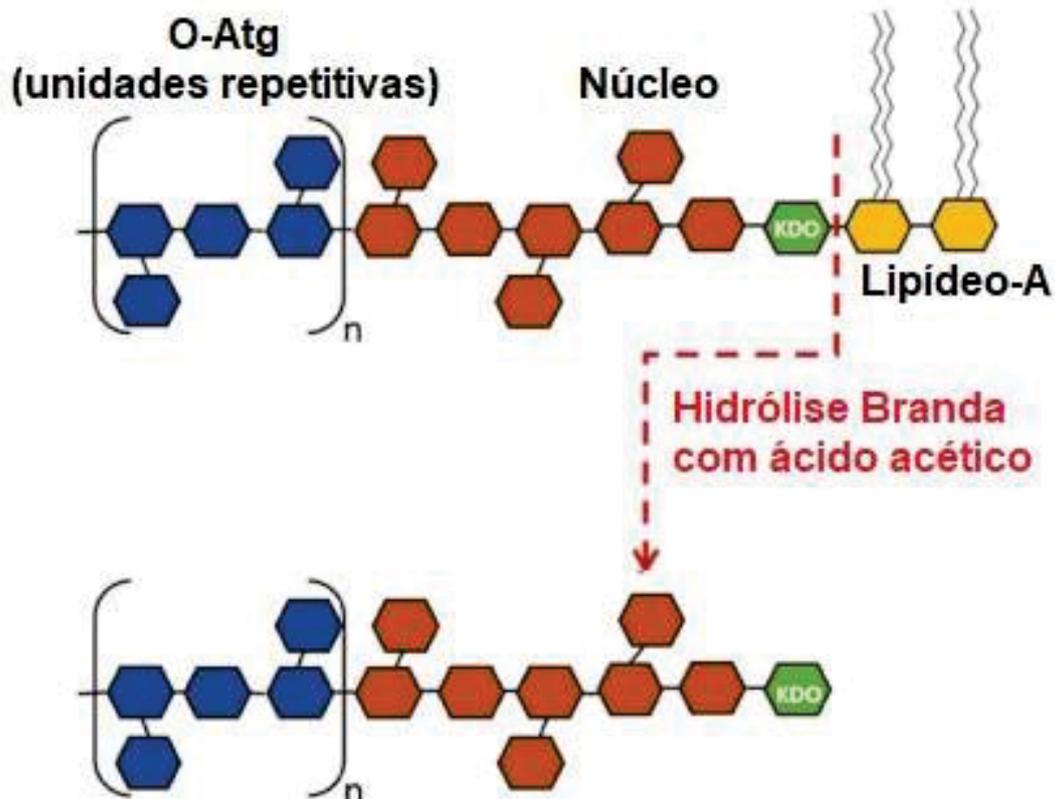
3.6.3 Determinação da presença de DNA

A presença de DNA nas amostras foi observada indiretamente por meio da reação da difenilamina (PLUMMER, 1978). Para isso, 0,5 mL (10 mg/mL) de cada uma das frações foram misturados a 1,5 mL do reativo de difenilamina (1,0 g difenilamina em 100 mL ácido acético glacial e 2,75 mL ácido sulfúrico concentrado). Em seguida, os tubos contendo cada uma das frações foram aquecidos em banho-maria fervente por 10 min. Ao fim da reação, os resultados foram observados e comparados visualmente.

3.6.4 Hidrólise Branda dos LPS

Para obtenção da porção O-antígeno, foi realizada hidrólise branda dos LPS encontrados na fração fenólica. Durante esse processo, a ligação lábil entre o Kdo, encontrado no núcleo interno, e o lipídeo-A é rompida (FIGURA 5), liberando o O-antígeno ligado aos açúcares que compõem o núcleo (FUREVI *et al.*, 2022; MICOLI *et al.*, 2013). Para isso, 50 mg de LPS foram dissolvidos em 1 mL de água deionizada e sonicados. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de ácido acético 2% e a solução foi mantida a 100 °C sob agitação até que um precipitado fosse formado. O material foi resfriado em banho de gelo por 10 min e centrifugado (20 min, 6.000 x g) (LÜDERITZ *et al.*, 1971). A fração solúvel contendo os oligossacarídeos da porção O-antígeno e o material precipitado contendo a fração lipídeo-A dos LPS foram liofilizados para posteriores análises estruturais.

FIGURA 5 – ESQUEMA DA HIDRÓLISE BRANDA DOS LPS.



FONTE: Adaptado de Pfeifer e Hill (2021).

3.6.5 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A análise cromatográfica em camada delgada foi realizada em placa de alumínio utilizando sílica (SiO_2) como fase estacionária. A fase móvel consistiu em uma mistura de acetato de etila, 1-propanol, ácido acético e água, na proporção de 4:2:2:1 (v/v/v/v) (HOUGH; JONES, 1962). O objetivo do experimento foi avaliar a eficiência da hidrólise da porção O-antígeno e identificar qualitativamente sua composição monossacarídica. Soluções padrão de diferentes monossacarídeos, com concentração de 1,0 mg/mL, foram utilizadas como referência. Após a aplicação e secagem das amostras nas placas, estas foram reveladas com uma solução de orcinol (2,5 g/L) e etanol contendo 5% de H_2SO_4 , sendo posteriormente aquecidas a 100 °C por 5 min para visualização das bandas.

3.6.6 Derivados Alditol Acetato (AA)

Para a análise da composição monossacarídica, 2 mg de material contendo a porção O-antígeno foram hidrolisados com 1 mL de TFA 2 M a 100 °C por 8 h, seguido de redução com NaBH_4 em excesso por 12 h. A solução foi lavada repetidas vezes com metanol,

seguida de evaporação com fluxo de ar e posterior liofilização. Ac₂O-piridina (1:1, v/v) foi adicionado à amostra, que foi então mantida à temperatura ambiente por 12 h. A reação foi interrompida em banho de gelo. Os derivados alditol acetato resultantes foram extraídos com a adição de 1 mL de CHCl₃ e após repetidas lavagens com solução de sulfato de cobre 5%. O extrato clorofórmico contendo os derivados alditol acetato foi recuperado e evaporado até a secura para posterior análise por *Gas-liquid Chromatography* (GLC) (WOLFROM; THOMPSON, 1963a; WOLFROM; THOMPSON, 1963b).

3.6.7 Derivados Alditol Acetato Parcialmente Metilados (PMAA)

A determinação das ligações glicosídicas presentes na porção O-antígeno foi realizada a partir da formação dos derivados alditol acetato parcialmente per-*O*-metilados (PMAAs). Para isso, 5 mg da fração contendo os O-antígenos liofilizados foram solubilizados em 1 mL de dimetil sulfoxido (DMSO), contendo NaOH pulverizado anidro em excesso, e deixado sob agitação por 12 h. Adições de 0,2 mL de iodeto de metila (CH₃I) foram realizadas a cada 5 min, o material foi agitado em vórtex nos intervalos entre cada adição, até um volume final de 1 mL (CIUCANU; KEREK, 1984). O material foi deixado por 12 h à temperatura ambiente, em seguida, foi suspenso em 3 volumes de água, neutralizado com gotas de ácido acético glacial e adicionado de CHCl₃. Os oligossacarídeos da porção O-antígeno totalmente per-*O*-metilados foram extraídos da mistura com CHCl₃. Após a secura do material, os LPS per-*O*-metilados foram hidrolisados com 1 mL de ácido fórmico 45% a 100 °C por 16 h e em seguida com 1 mL de TFA 2 M, sendo mantidos a 100 °C por 8 h (MILHORINI, 2022). Após a secura, o material foi submetido aos processos de redução (i), realizada com NaBD₄ (boroidreto de sódio deuterado), neutralização (ii), realizada com AcOH (Ácido acético) e acetilação (iii), realizada com Ac₂O-piridina (1:1, v/v) e mantida à temperatura ambiente por 12 h. A reação foi interrompida em banho de gelo. Os derivados alditol acetato resultantes foram extraídos com CHCl₃ após repetidas lavagens com solução de sulfato de cobre 5%. O extrato clorofórmico foi evaporado até a secura. Os derivados PMAA foram analisados por GC-MS segundo o tempo de retenção e perfil de fragmentação (SASSAKI *et al.*, 2005).

3.6.8 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas utilizando um espectrômetro Bruker *Avance* 400 MHz. Cada amostra foi solubilizada em D₂O 99,9% e liofilizada para a troca dos prótons intercambiáveis por deutério. Para a análise, o material foi solubilizado em 500 µL de D₂O e colocado em tubos de RMN (5 mm de diâmetro interno). As análises monodirecionais e bidirecionais foram realizadas a 50 °C sendo utilizado o sinal de *-CH3* do padrão interno de acetona em δ 2,22 (¹H) e δ 30,2 (¹³C). Experimentos unidimensionais de ¹H foram realizados com amplitude espectral de 8 kHz. Experimentos de correlação heteronuclear ¹H/¹³C (HSQC) foram realizados com amplitude espectral de 2,25 e 13,9 kHz para ¹H e ¹³C, respectivamente, e dataset (t1 x t2) de 128 x 512 pontos com 8 scans. Após aquisição, os dados foram processados utilizando o software *NMR TopSpin* (Bruker), versão 3.7.0.

3.6.9 Espectrometria de Massas por MALDI-TOF

As análises de espectrometria foram realizadas a partir da mistura de 1 µL de amostra com 1 µL de matriz contendo acetonitrila (100 µL), água deionizada (92 µL), TFA 5% (8 µL) e HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) ou DHB (ácido 2,5-diidroxibenzóico), homogeneizada em um agitador vórtex, centrifugada por 5 min em 10³ rpm e aplicada sobre uma placa de MALDI até cristalizar (GERHARDT *et al.*, 2020). Os espectros foram adquiridos usando um espectrômetro de MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight*) em modo negativo linear e reflexivo e modo positivo linear e reflexivo. Os espectros de massa obtidos (m/z) foram analisados utilizando software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO EM PEQUENA ESCALA

Foram realizadas as extrações dos LPS em pequena escala de dois cultivos de células, sendo o primeiro na presença de Sm^{80} e outro na ausência de Sm^{80} visando verificar a influência de tal antibiótico na estrutura dos LPS. Com o objetivo de verificar a presença e o perfil dos LPS produzidos pela estirpe SmR1 em ambos os cultivos, o material extraído, contendo os LPS, foi submetido a uma análise por SDS-PAGE e, por fim, visualizado por oxidação com periodato e coloração com nitrato de prata (FIGURA 6) (TSAI: FRASCH, 1982).

FIGURA 6 – SDS-PAGE 15% DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS MICROEXTRAÇÃO DOS LPS DA ESTIRPE SMR1 DE *H. seropedicae*.



LPS de *H. seropedicae* SmR1 com e sem adição de Sm^{80} . Também presentes padrões de LPS de *E. coli* O55:B5, *E. coli* K-235, *E. coli* 0127 B8, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enterica*. Coloração com AgNO_3 .

FONTE: o autor.

A análise do perfil eletroforético por SDS-PAGE revelou que os cultivos de células bacterianas na presença e na ausência do antibiótico Sm^{80} apresentaram perfis bastante

semelhantes. Isso sugere que o antibiótico não interfere na biossíntese nem na estrutura final do LPS obtido. Essa observação é consistente com o fato de que, mesmo sob diferentes condições de cultivo, os genes envolvidos na síntese do LPS foram expressos. Além disso, embora alguns genes relacionados à modificação do LPS tenham sido superexpressos em algumas células, essa regulação não parece afetar drasticamente a estrutura do LPS (PANKIEVICZ *et al.*, 2016), como evidenciado pelo perfil eletroforético semelhante. Isso sugere uma robustez na via de biossíntese do LPS que mantém sua estrutura fundamental mesmo na presença de modificações na expressão gênica ou em resposta ao antibiótico Sm⁸⁰.

4.2 EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA

Uma vez verificada a presença dos LPS, bem como o perfil apresentado por eles, o conteúdo de células restante (10 g) foi submetido a uma extração em larga escala, de acordo com Westphal e Jann (1965), para obtenção de LPS em quantidade suficiente que permitisse a realização das análises espectrométricas. A TABELA 1 apresenta os rendimentos das frações obtidas após diálise em membranas de 3.5 kDa e liofilização do material extraído.

TABELA 1 – PESO SECO DAS FRAÇÕES AQUOSA E FENÓLICA OBTIDAS APÓS EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALADO LPS DA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.

Fração	Recuperação (mg)	Rendimento (%)^a	Carboidratos totais (%)^b	Proteínas totais (%)^c
Aquosa	211,1	2,1	19,5	0,25
Fenólica	128,8	1,3	16,63	1,39

^a Rendimento percentual, relativo ao peso de células secas utilizadas na extração.

^b Percentual de carboidratos, relativo ao peso das frações secas.

^c Percentual de proteínas, relativo ao peso das frações secas.

FONTE: elaborada pelo autor.

Segundo Collins e Ferrier (1995), os LPS representam cerca de 1% do peso seco total da bactéria. Sendo assim, ao utilizar 10 g de células, era esperado obter aproximadamente 100 mg de LPS. Contudo, ao utilizar 10 g de células secas, foram obtidos 128,8 mg (1,3%) de LPS que estavam presentes na fração fenólica, como visto na TABELA 1.

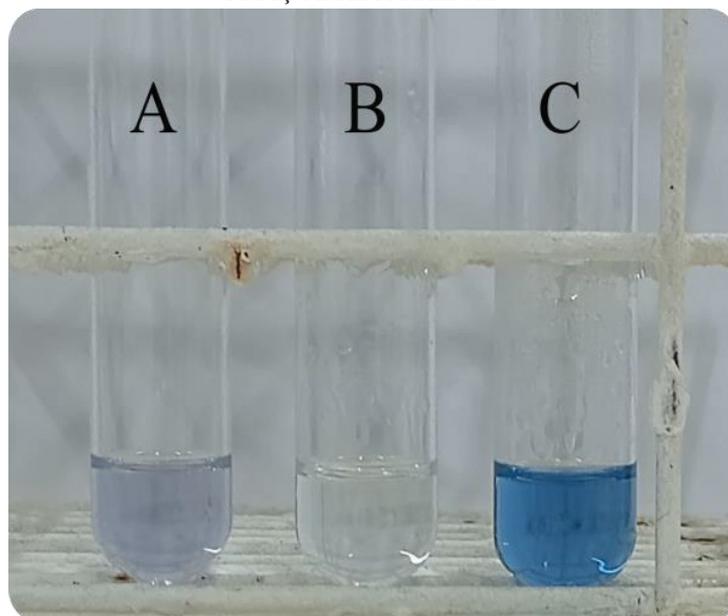
Segundo De Castro *et al.* (2010), os rendimentos de LPS podem variar de 0,1% a 6%, sendo valores superiores a esse, possivelmente, relacionados a grandes quantidades de contaminantes. O método de extração desenvolvido por Westphal e Jann (1965), utilizado aqui,

apesar de apresentar um alto rendimento na extração de LPS, também pode resultar na co-extração de alguns destes contaminantes, como ácidos nucleicos e proteínas, devido ao rompimento das células durante o processo.

A fim de investigar a presença desses possíveis contaminantes, foi realizada a quantificação de proteínas conforme Bradford (1976). Os resultados, presentes na TABELA 1, revelaram baixas quantidades tanto na fração fenólica (1,39%) quanto na fração aquosa (0,25%), indicando baixa contaminação por proteínas.

Também foi realizada a quantificação de carboidratos das frações aquosa e fenólica obtidas, conforme Dubois *et al.* (1956). Os resultados, presentes na TABELA 1 revelaram baixas quantidades tanto na fração fenólica (13,63%) quanto na fração aquosa (19,5%). Foi levantada a possibilidade de que os carboidratos presentes na fração aquosa pudessem estar associados a presença de exopolissacarídeos (EPS) e/ou DNA residual advindos do processo de extração em larga escala, uma vez que tal processo leva ao rompimento da parede e da membrana celular, permitindo o extravasamento do conteúdo celular. Dessa forma, com objetivo de identificar a presença de DNA, ambas as frações também foram submetidas à reação da difenilamina. Na FIGURA 7, é possível verificar de forma qualitativa esse resultado.

FIGURA 7 – REAÇÃO DA DIFENILAMINA PARA VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA NAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS.



Fração fenólica (A), Branco (B) e Fração aquosa (C).

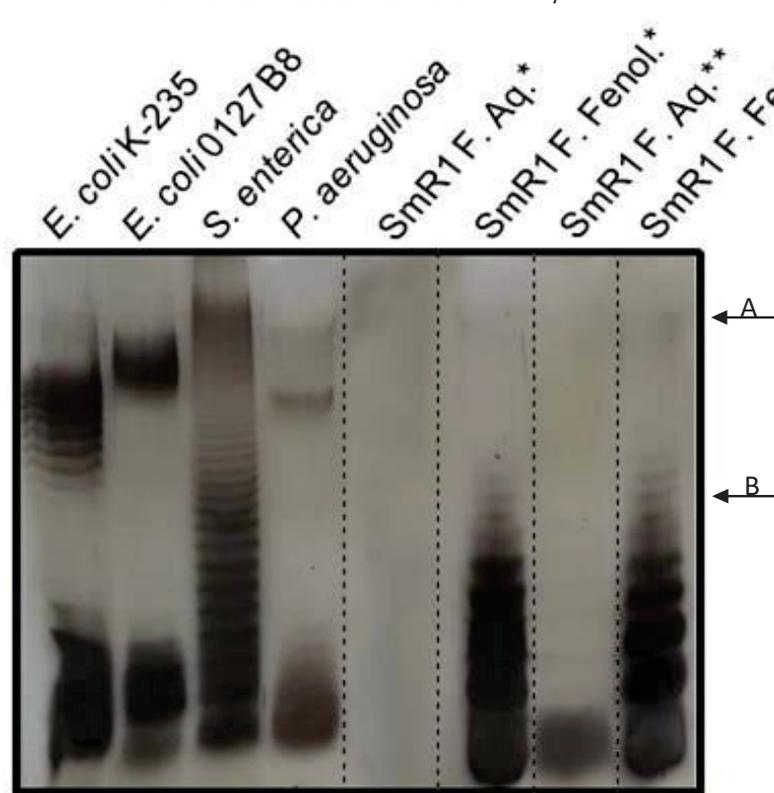
FONTE: o autor.

É possível notar que o tubo A, contendo a fração fenólica, teve baixa reação pelo método, o que pode ser percebido por uma coloração azul menos intensa quando comparado ao tubo C, contendo a fração aquosa. Essa diferença era esperada, uma vez que o DNA, devido à sua natureza polar, é muito solúvel em água e pouco solúvel em fenol. Em última análise, esse resultado valida a hipótese de que parte dos carboidratos identificados anteriormente na fração aquosa estariam relacionados à presença de DNA residual.

4.3 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO POR SDS-PAGE

Para verificar a presença de LPS, as frações aquosa e fenólica, obtidas da extração em larga escala, foram submetidas à análise por SDS-PAGE. A FIGURA 8 exibe o perfil eletroforético de tais frações.

FIGURA 8 – SDS-PAGE 15% DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA DOS LPS DA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.



Fração Aquosa e Fração Fenólica de *H. seropedicae* SmR1. Também presentes padrões de LPS de *E. coli* K-235, *E. coli* 0127 B8, *Salmonella enterica* e *Pseudomonas aeruginosa*. Coloração com AgNO_3 .

. A: bandas com maiores graus de polimerização. B: bandas com menores graus de polimerização.

* Volume utilizado: 4 μL

**Volume utilizado: 8 μL

FONTE: o autor

Como visto anteriormente, embora o rendimento da fração aquosa obtida na extração tenha sido maior, essa fração não apresentou um perfil de bandas característico de LPS, ou seja, ausência do padrão típico em forma de escada conhecido como *ladder-like* que representa as moléculas de LPS – que possuem diferentes números de repetições da unidade O-antígeno (PALVA; MÄKELÄ, 1980; GOLDMAN; LEIVE, 1980). Em contrapartida, a fração fenólica exibiu um perfil de bandas característico de LPS, sugerindo que o LPS extraído esteja presente nesta fração. Além disso, o perfil de bandas típico de LPS presente na fração fenólica, embora com baixa definição, foi observado na região superior do gel (FIGURA 8 - A), o que é associado a um perfil de LPS com maiores graus de polimerização, indicando a presença de LPS do tipo *smooth*. Por outro lado, a região inferior do gel apresentou uma maior concentração de LPS com menores graus de polimerização, refletindo perfis de menor massa molecular (FIGURA 8 – B), possivelmente LPS do tipo *semirough*, majoritariamente.

4.4 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS LPS DE *H. seropedicae* SmR1

Uma vez que a fração fenólica apresentou um perfil característico de LPS, além de baixa contaminação por proteínas e DNA, sua composição monossacarídica foi determinada após a derivatização para formação de acetato de alditois. A TABELA 2 apresenta a composição dos açúcares neutros obtidos para a fração fenólica após análise por GLC.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO FENÓLICA CONTENDO OS LPS DA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.

Derivados AA*	Rt (min)	%**
Ara	5,1	25,2
Man	9,1	3,0
Gal	9,9	64,3
Glc	10,4	7,5

* Derivados alditol acetato obtidos após hidrólise, redução e acetilação.

** Valores mostrados em % relativo à área dos sinais encontrados no cromatograma de GLC.

FONTE: elaborada pelo autor.

A fração fenólica apresentou elevada quantidade de Gal em sua composição (64,3%), seguida de Ara (25,2%), Glc (7,5%) e Man (3%). Os resultados obtidos aqui divergem dos anteriormente obtidos por Serrato (2008), uma vez que o autor apresentou dados de composição monossacarídica para a fração fenólica de *H. seropedicae* SmR1 não indicando quaisquer quantidades relativas à presença de Gal nem a presença de Ara, mas apresentando quantidades significativas de Rha, monossacarídeo não presente na composição monossacarídica aqui realizada.

4.5 OBTENÇÃO DA PORÇÃO O-ANTÍGENO DOS LPS DE *H. seropedicae* SmR1

Para que fosse obtida a porção O-antígeno, o LPS foi submetido à hidrólise branda. Esse processo ocasiona a perda da porção lipídica da molécula, permitindo uma consequente melhora na solubilidade do polissacarídeo em D₂O, fator necessário para efetivas análises posteriores (FUREVI, 2022). A porção O-antígeno resultante foi recuperada na forma de um material solúvel após centrifugação, removendo assim a porção do lipídeo-A. Posteriormente ambas as porções foram liofilizadas. A TABELA 3 apresenta o rendimento de cada fração obtida após a hidrólise branda.

TABELA 3 – PESO SECO DAS PORÇÕES O-ANTÍGENO E LIPÍDEO-A OBTIDAS APÓS HIDRÓLISE BRANDA DO LPS DA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.

Fração após HB	Recuperação (mg)	Rendimento (%)
O-antígeno	35,2	56,8
Lipídeo-A	26,8	43,2

*Rendimento percentual, relativo ao peso de fração fenólica seca utilizada.

FONTE: elaborada pelo autor.

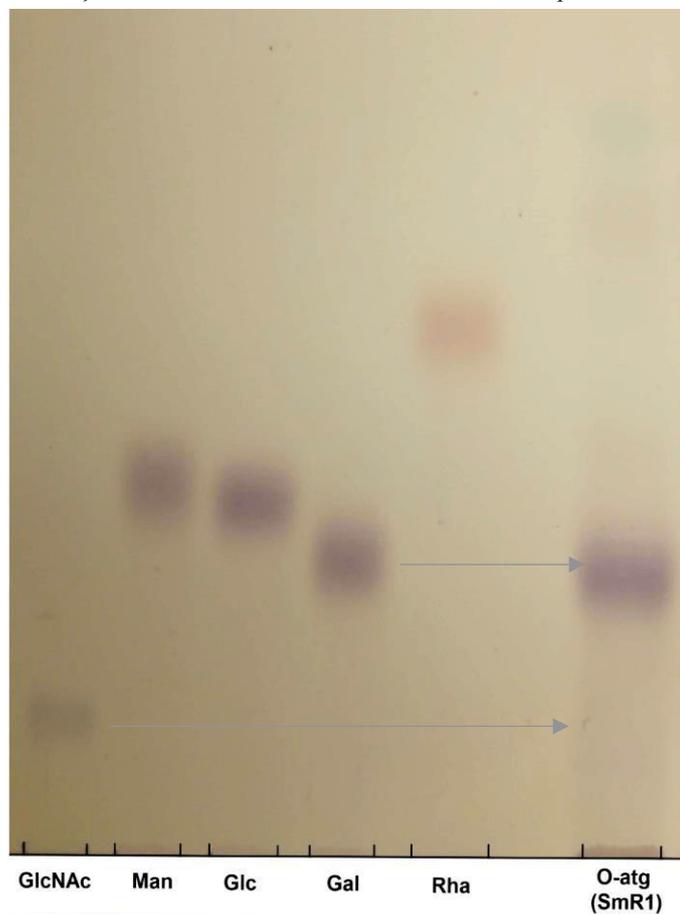
Os resultados de rendimento revelaram diferenças entre o O-antígeno e o lipídeo-A após o processo de hidrólise branda, uma vez que foi observada uma quantidade maior de material presente na porção O-antígeno (35,2 mg), que representa cerca de 57% do peso obtido, em comparação com a porção do lipídeo-A (26,8 mg). Essa relação pode variar, uma vez que a cadeia polissacarídica pode sofrer variações em seu tamanho durante o processo de biossíntese do LPS levando a diferentes graus de polimerização (PALVA; MÄKELÄ, 1980).

4.6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PORÇÃO O-ANTÍGENO ISOLADA DOS LPS DE *H. seropedicae* SmR1

A porção O-antígeno, previamente hidrolisada, foi analisada por meio de uma cromatografia de camada delgada (FIGURA 9), a fim de observar a sua composição monossacarídica.

Após esse processo, foi possível perceber a presença dos monossacarídeos, sendo a Gal o principal componente. Também foi possível perceber, com baixa nitidez, a presença de monossacarídeos aminados, possivelmente GlcNAc.

FIGURA 9 – CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DOS MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NA PORÇÃO O-ANTÍGENO ISOLADA DE *H. seropedicae* SmR1.



Fase estacionária: sílica (SiO_2). Fase móvel: acetato de etila:1-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v/v/v) (HOUGH e JONES, 1962). Revelador: orcinol - ácido sulfúrico 5% em etanol a 100 °C.

FONTE: o autor.

A fim de confirmar a presença desses monossacarídeos, a porção O-antígeno foi submetida à avaliação de sua composição. A TABELA 4 apresenta a composição monossacarídica da porção O-antígeno, obtida através dos derivados alditol acetato.

A composição monossacarídica da porção O-antígeno confirmou a presença majoritária de Gal (59,3%). Esses dados corroboram os resultados obtidos pela cromatografia de camada delgada e apontam para a presença de Rha (6,2%) na estrutura da porção O-antígeno isolada da estirpe SmR1 de *H. seropedicae*. Como exposto anteriormente, a presença de unidades de Rha na estrutura do O-antígeno é uma característica comum entre diversas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio. A composição monossacarídica mostrou também a presença de Fuc (1,3%), Glc (1,9%), Man (10,0%) e Ara (21,3%).

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA PORÇÃO O-ANTÍGENO ISOLADA DO LPS DE *H. seropedicae* SmR1.

Derivados AA*	Rt (min)	%**
Rha	5,1	6,2
Fuc	5,2	1,3
Ara	5,4	21,3
Man	10,0	10,0
Gal	10,3	59,3
Glc	10,8	1,9

*Derivados Alditol Acetato obtidos após hidrólise, redução e acetilação.

**Valores mostrados em % relativo à área dos sinais encontrados no cromatogramade GLC.

FONTE: elaborada pelo autor.

Após a hidrólise branda, seria esperada a presença de traços de GlcNAc na composição monossacarídica da porção O-antígeno, uma vez que, além de já ter sido mencionada como parte de sua composição (BALSANELLI, 2013), esse monossacarídeo é comumente presente na região do núcleo, que por sua vez, permanece ligada ao O-antígeno (MICOLI *et al.*, 2013). Todavia, não foi possível confirmar a presença de GlcNAc, monossacarídeo que havia sido notado na cromatografia de camada delgada. A ausência de GlcNAc na composição monossacarídica também é contrastante com resultados obtidos por Serrato (2008), que mostrou que a porção O-antígeno possui 28,5% de GlcNAc em sua composição. É possível que a ausência de GlcNAc tenha relação com método utilizado, através dos derivados alditol acetato, uma vez que revela apenas unidades neutras. Adicionalmente, a sensibilidade do método de detecção utilizado pode ter desfavorecido a detecção de GlcNAc, especialmente se

presente em concentrações mais baixas, como evidenciado pela baixa nitidez da banda relacionada à presença de de GlcNAc na cromatografia de camada delgada.

A determinação das ligações glicosídicas presentes entre as unidades monossacarídicas que formam a porção O-antígeno do LPS de *H. seropedicae* SmR1 foi realizada a partir da formação dos derivados alditol acetato parcialmente metilados (PMAA). Os resultados foram avaliados com base no tempo de retenção e perfil de fragmentação dos padrões e estão compilados na TABELA 5.

TABELA 5 – DERIVADOS ALDITOL ACETATO PARCIALMENTE METILADOS (PMAA) DA PORÇÃO O-ANTÍGENODOS LPS EXTRAÍDOS DA ESTIRPE SmR1 DE *H. seropedicae*.

Derivados PMAA*	Rt (min)	Ligação Glicosídica	(%)
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	24,989	t-Galp-(1→	26,04
2,3-Me ₂ -Rha	28,076	→4)-Rhap-(1→	5,34
3,4,6-Me ₃ -Gal	29,028	→2)-Galp-(1→	37,46
2,3,4-Me ₃ -Gal	31,320	→6)-Galp-(1→	31,15

*Derivados identificados em maior quantidade.

FONTE: elaborada pelo autor.

Nos derivados PMAA observados para a porção O-antígeno dos LPS extraídos da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* (TABELA 5), nota-se principalmente a presença de 3,4,6-Me₃-Gal (37,46%), 2,3,4-Me₃-Gal (31,15%), 2,3,4,6-Me₄-Gal (26,04%) e 2,3-Me₂-Rha (5,34%).

Com base nos resultados dos derivados PMAA e na observação da presença de galactopirranose terminal (t-Galp), é plausível considerar que o polissacarídeo em questão seja composto majoritariamente de galactose e de estrutura ramificada, embora não tenha sido possível identificar onde essas ramificações estariam ocorrendo.

Além disso, houve discrepância entre os resultados dos derivados PMAA e as proporções observadas na composição monossacarídica da mesma amostra. Isso pode ser explicado devido à pequena quantidade material disponível utilizada durante o processo e per-O-metilação ou, ainda, indicar que tal processo não foi totalmente eficiente. Portanto, se faz necessário realizar novas análises para confirmação dos dados observados.

A amostra contendo o O-antígeno isolado também foi submetida à análise por RMN dos núcleos de hidrogênio (¹H) e carbono (¹³C). A FIGURA 10 mostra o espectro de

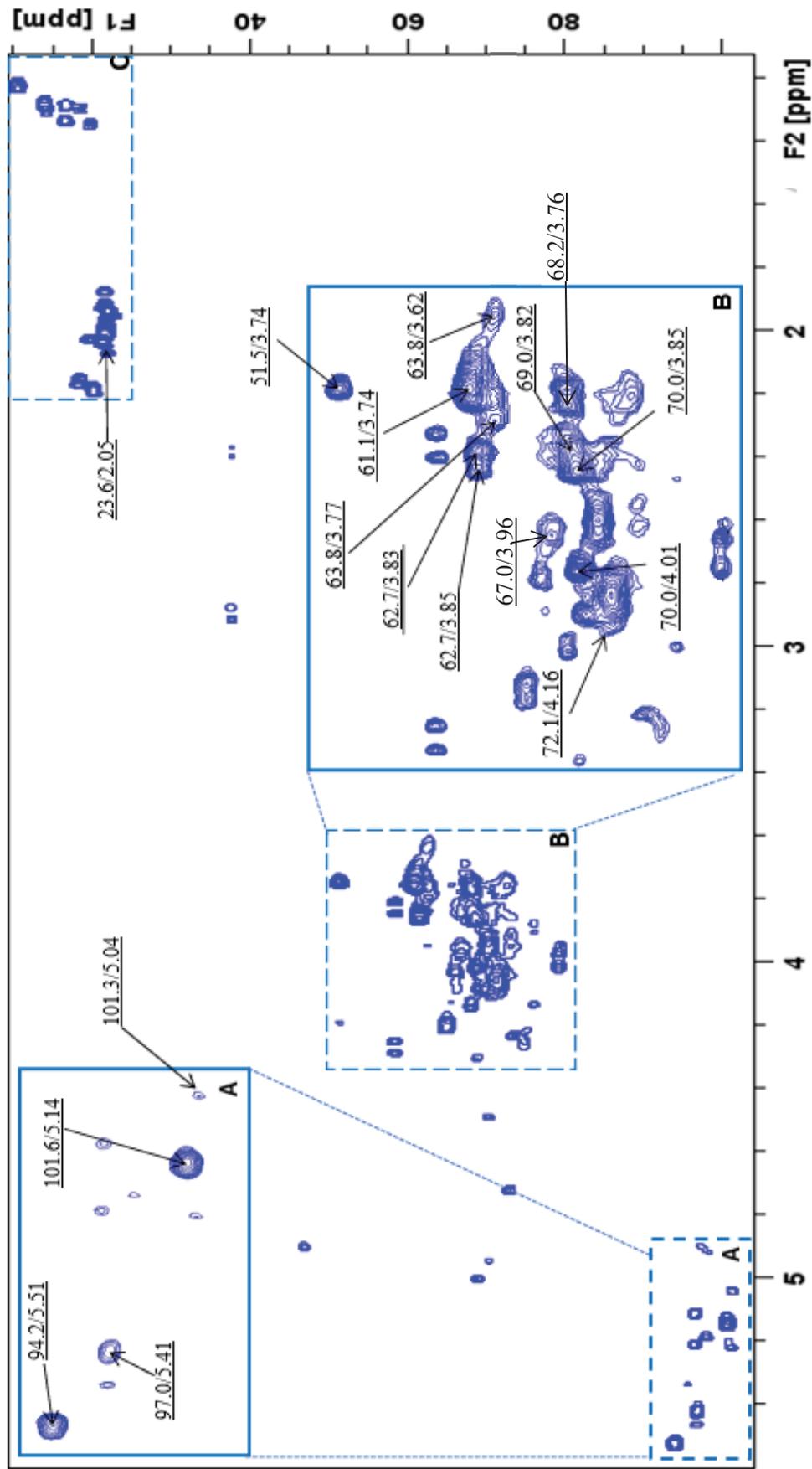
correlação quântica heteronuclear única (HSQC) da porção O-antígeno isolada de *H. seropedicae* SmR1.

Na região anomérica, foram observados três sinais principais de correlação próton/carbono, o primeiro em $\delta_{H/C}$ 5,51/94,28 e o segundo em $\delta_{H/C}$ 5,41/97,0, provavelmente associados a ligações glicosídicas na configuração anomérica α . Já o terceiro sinal, em $\delta_{H/C}$ 5,14/101,68, está associado a uma ligação glicosídica na configuração anomérica do tipo β . Ao redor desse sinal, foi possível notar a presença de outros sinais de menor intensidade não identificados.

Na região do anel, também é possível observar os demais sinais (C2/H2 a C5/H5) respectivamente associados aos sinais $\delta_{H/C}$ 3,8/69,04, $\delta_{H/C}$ 3,85/70,01, $\delta_{H/C}$ 4,0/70,07 e $\delta_{H/C}$ 4,16/72,16 de resíduos de Gal, possivelmente um terminal (FUVERI, 2020). Já o sinal $\delta_{H/C}$ 3,74/61,14, está localizado logo acima dessa região, em um intervalo de δ_H 3,7 - 3,88 e δ_C 61 - 65, onde também estão localizados outros sinais que não foram deslocados, indicando a presença de ligações C6/H6 livres. É possível que, a presença de tais ligações livres é atribuída às unidades de Gal, uma vez que a análise por GC evidenciou um percentual significativo desse monossacarídeo. Acima dessa região, foi observado outro sinal em $\delta_{H/C}$ 3,74/51,51, indicando a presença de um açúcar aminado, possivelmente uma glucosamina (GlcN). Foi possível ainda assinalar sinais referentes a alguns carbonos de unidades de um monossacarídeo diferente, possivelmente colitose, uma deoxi-hexose que faz parte da estrutura de certos lipopolissacarídeos (LPS) (WU *et. al.*, 2015). Os sinais atribuídos à colitose foram observados em $\delta_{H/C}$ 5,04/101,3 (C1/H1), $\delta_{H/C}$ 3,96/67,0 (C2/H2), $\delta_{H/C}$ 3,76/68,2 (C4/H4), caracterizando assim os sinais esperados para essa unidade no espectro de RMN (VELICHKO *et. al.*, 2020).

A análise HSQC da porção O-antígeno também revelou sinais na região de prótons do grupamento acetil. Em aproximadamente δ_H 2,1 - 2,2, foi possível ver sinais sugerindo a presença de grupamentos *O*-acetil, com carbonos correspondentes localizados no intervalo de δ_C 18 - 20. Próximo a essa região, também foram notados outros sinais, sendo um deles, δ_H 2,05, possivelmente associado a grupos *N*-acetil, indicando que GlcNAc (LIU, 2011) ou GalNAc (FUREVI, 2020) está presente na composição da porção O-antígeno. Por fim, em um intervalo de δ_H 1,2 - 1,35 e δ_C 12 - 18,2, foi localizado o grupamento CH₃ referente a um desoxiaçúcar, possivelmente Rha, devido a sua presença na análise de composição.

FIGURA 10 – ESPECTRO DE CORRELAÇÃO QUÂNTICA HETERONUCLEAR ÚNICA (HSQC) DA PORÇÃO O-ANTÍGENO ISOLADA DO LPS DE *H. seropedicae* SmR1.



Calibração do espectro com padrão interno de acetona em 2,22 ppm (^1H) e 30,20 ppm (^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm.

Fonte: o autor.

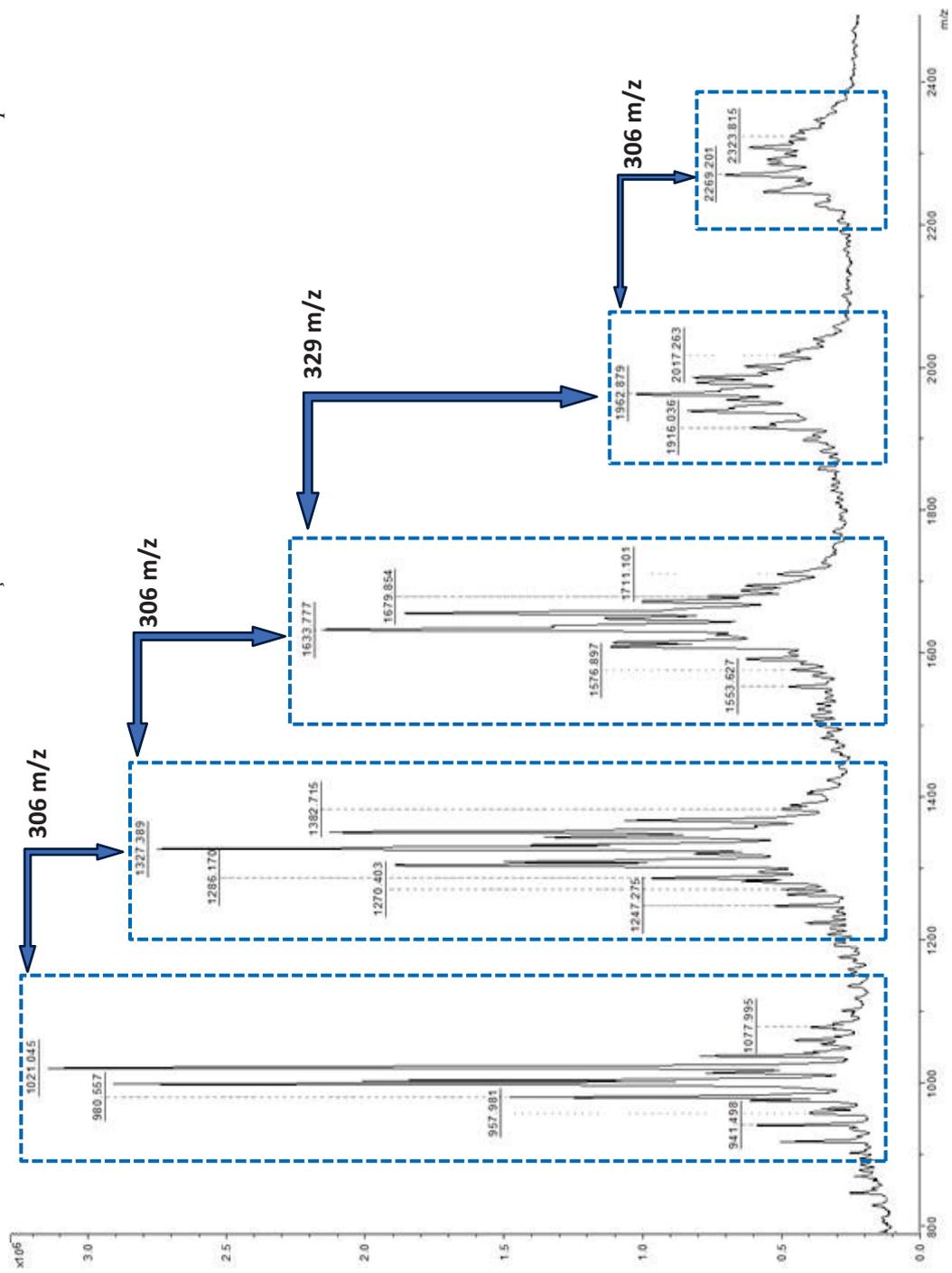
Foram realizadas análises de espectrometria de massa da fração fenólica, contendo os LPS, e da porção O-antígeno, isolada após a hidrólise branda, a fim de obter informações estruturais complementares. Para isso, as amostras foram submetidas a análises de MALDI-TOF.

Na fração fenólica contendo os LPS de *H. seropedicae* SmR1 (FIGURA 11), foi possível observar a presença de *clusters* entre os quais foram encontrados picos de razão massa carga com diferenças correspondentes a 306 e 329 m/z. A porção O-antígeno (FIGURA 12) também apresentou intervalos de sinais de 306 m/z entre seus *clusters*. Uma vez que a porção O-antígeno é parte componente do LPS, era esperado que intervalos de razão massa carga (m/z) semelhantes estivessem presentes em ambas as amostras.

Cada cluster possui relação direta com os diferentes graus de polimerização do LPS, sendo os clusters maiores referentes aos maiores graus de polimerização do LPS e *clusters* menores relacionados aos menores graus de polimerização do LPS. As diferenças encontradas entre os picos de razão massa carga dos diversos *clusters* apresentaram valores de 306 m/z, valor associado a algum possível substituinte como uma Pentose ligada a uma Pentose-O-Ac (306 m/z). Uma vez que a Arabnose foi um monossacarídeo encontrado em alta concentração na composição monossacarídica, é possível propor que o substituinte em questão seja formado uma Arabnose ligada a uma Arabnose-O-Ac. Por fim, dentro de cada *cluster* de sinais, também foi possível observar intervalos de 16, 18, 22 e 23 m/z entre os íons (ver insertos na FIGURA 12).

Segundo Wang *et al.* (2022), a técnica convencional de análise de glicanos por MALDI-TOF enfrenta desafios significativos devido à baixa eficiência de ionização dessas moléculas em comparação com biomoléculas mais comumente analisadas, como proteínas e peptídeos. O grau de ionização ideal pode não ter sido alcançado por uma série de fatores, podendo ter relação com a concentração disponível da amostra, sendo esse um fator comprometedor da sensibilidade do método. Adicionalmente, as características intrínsecas dos glicanos, como sua estrutura e composição química, podem tornar sua ionização mais desafiadora.

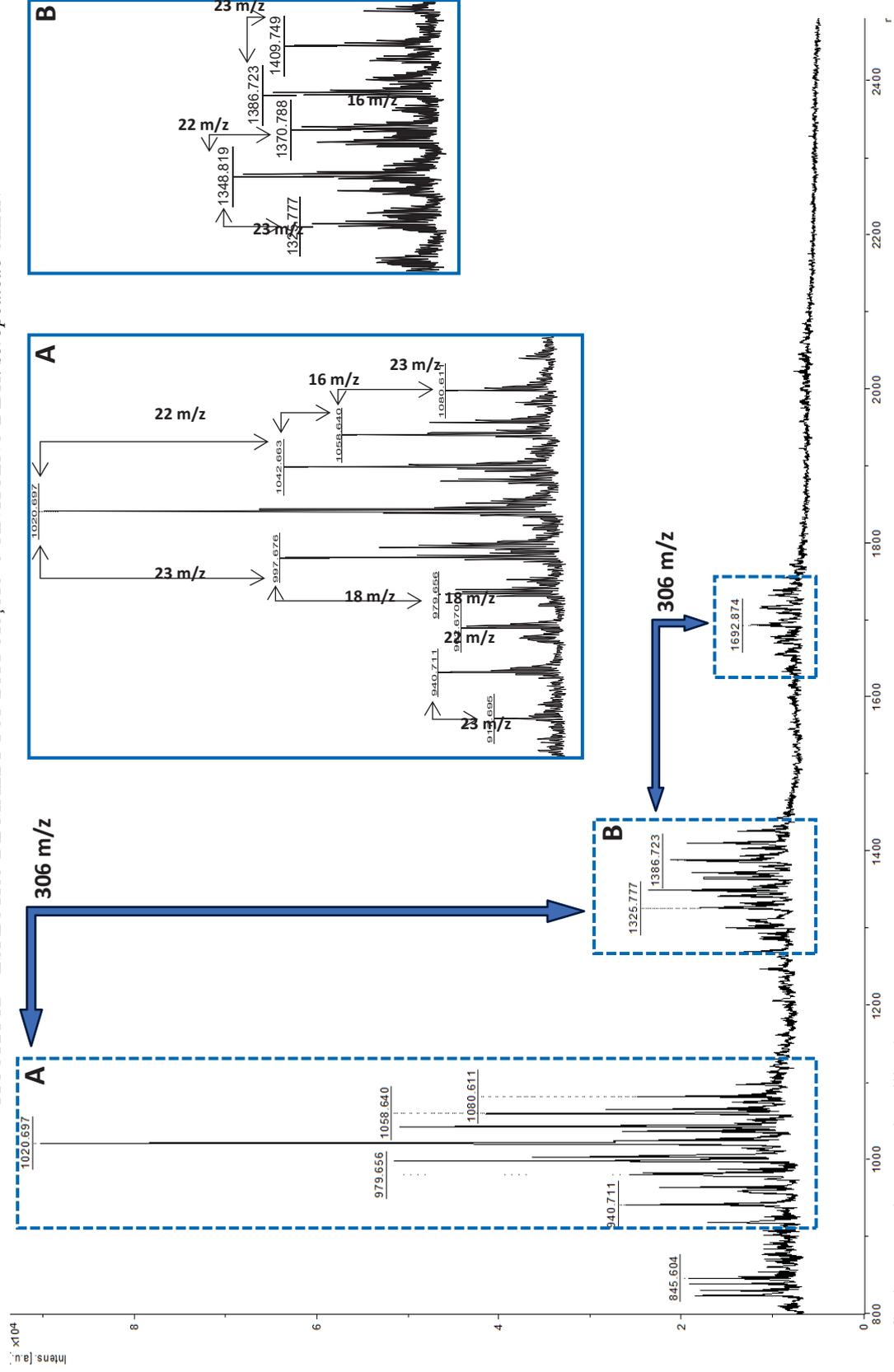
FIGURA 11 – ESPECTRO DE MALDI-TOF DA FRAÇÃO FENÓLICA CONTENDO LPS DE *H. seropedicae* SmR1.



Modo: Linear Negativo. Matriz utilizada: DHB.

FONTE: o autor

FIGURA 12 – ESPECTRO DE MALDI-TOF DA PORÇÃO O-ANTÍGENO DE *H. seropedicae* SmR1.



Modo: Reflexivo Negativo. Matriz utilizada: DHB.

FONTE: o autor

5 CONCLUSÕES

- As frações aquosa e fenólica extraídas apresentaram pouco grau de contaminação por proteínas. Além disso, a fração fenólica, contendo os LPS, apresentou menor grau de contaminação por DNA;
- Os LPS extraídos por meio do método envolvendo fenol e água foram encontrados na fração fenólica, indicando que esses LPS são do tipo *semirough*, uma vez que apresentam um menor grau de polimerização da porção O-antígeno;
- A composição monossacarídica observada para os LPS extraídos de *H. Seropedicae* SmR1 apresentou derivados aditol acetato referentes às unidades de Ara, Man, Gal e Glc;
- O processo de separação das porções O-antígeno e lipídeo-A dos LPS, realizado por meio da hidrólise branda, permitiu revelar que o rendimento entre essas duas porções foi próximo, corroborando um menor grau de polimerização da porção O-antígeno;
- A Cromatografia de Camada Delgada da porção O-antígeno apontou a presença dos monossacarídeos Gal e GlcNAc;
- A composição monossacarídica observada para a porção O-antígeno de *H. seropedicae* SmR1 se mostrou parcialmente diferente da composição do LPS, apresentando derivados alditol acetato referentes às unidades de Gal, Ara, Man, Rha, Glc e Fuc;
- Os cromatogramas dos derivados PMAA obtidos da porção O-antígeno apontaram para a presença de Gal e Rha, sendo os principais derivados observados 3,4,6-Me₃-Gal, 2,3,4-Me₃-Gal, 2,3,4,6-Me₄-Gal e 2,3-Me₂-Rha;
- As análises de RMN da porção O-antígeno do LPS produzido por *H. seropedicae* SmR1 apresentaram sinais que corroboram a presença de Rha, bem como sinais relacionados à presença de Gal e GlcNAc ou GalNAc;
- Os resultados de análises espectrométricas envolvendo MALDI-TOF apresentaram intervalos de 306 m/z para o LPS e para a porção O-antígeno, porém não foi determinada a molécula à qual esses sinais são atribuídos.

REFERÊNCIAS

- ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 19, p. 253-260, 1993.
- ASPINALL, G. O. Other carbohydrate containing macromolecules. In: Polysaccharides, Ed. G.O. ASPINALL, Pergamon Press, p. 223, 1970.
- BAJERSKI, F.; GANZERT, L.; MANGELSDORF, K.; LIPSKI, A.; HANS-JURGEN, B.; PADUR, L.; WAGNER, D. *Herbaspirillum psychrotolerans* sp. nov., a member of the family Oxalobacteraceae from a glacier forefield. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.63, p. 3197–3203, 2013.
- BALDANI, J. I.; AND BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, a mild pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov., and classification of a group of clinical isolates (EFgroup 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802–810, 1996.
- BALSANELLI, E. Caracterização de fatores moleculares envolvidos na interação de *Herbaspirillum seropedicae* com gramíneas. **Tese de doutorado** (Ciências - Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 174p., 2013.
- BALSANELLI, E.; SERRATO, R. V.; BAURA, V. A.; SASSAKI, G. L.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. *Herbaspirillum seropedicae* *rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. **Environ. Microbiology**, v. 12, p. 2233–2244, 2010.
- BALSANELLI, E. SERRATO, R. V.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A. Role of *Herbaspirillum seropedicae* LPS in Plant Colonization. **Biological Nitrogen Fixation**, p. 949–954, 14 jul. 2015.
- BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; PANKIEVICZ, V. C.; DE BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343-2356, 2016.
- BARAK, J. D.; JAHN, C. E.; GIBSON, D. L.; CHARKOWSKI, A. O. The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 20 n. 9, p. 1083–1091, 2007.

- BARRAQUIO, W. L.; LADHA, J. K.; WATANABE, I. Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 867-873, 1983.
- BASHAN, Y.; De-BASHAN, L. E. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. **Elsevier eBooks**, p. 77–136, 1 jan. 2010.
- BATISTA, M. B.; SFEIR, M. Z. T.; FAORO, H.; WASSEM, R.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; DIXON, R.; MONTEIRO, R. A. The *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 Fnr orthologs controls the cytochrome composition of the electron transport chain. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, 2 set. 2013.
- BERRY, M. C.; MCGHEE, G. C.; ZHAO, Youfu; SUNDIN, G. W. Effect of a waaL mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora*. **FEMS microbiology letters**, v. 291 n. 1, p. 80–87, 2009.
- BERTANI, B.; RUIZ, N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 8 fev. 2018.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, maio 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 155-194, 2005.
- BROUGHTON, W. J.; HANIN, M.; RELIC, B.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMSEK, S. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O-antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. **J. Bacteriology**, p. 3654–3663, 2006.
- BURDMAN, S.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 26, p. 91–110, 2000.
- CARRO, C.; RIVAS, R.; LEÓN-BARRIOS, M.; GONZÁLEZ-TIRANTE, M.; VELÁZQUEZ, M.; VALVERDE, A. *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov., and *Herbaspirillum soli* sp. nov., isolated from volcanic mountain soil, and emended description of the genus. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 62, p. 1300-1306, 2012.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, dez. 2016.
- CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogenfixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHIANG S. L. & MEKALANOS J. J. *Rfb* mutations in *Vibrio cholerae* do not affect surface production of toxin-coregulated pili but still inhibit intestinal colonization. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 976–980, 1999.

CHIEN, S. H.; PROCHNOW, L. I.; TU, S. e SNYDER, C. S. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 89, p. 229-255, 2011.

CIUCANU, J.; KEREK, F. Simple and Rapid Method for the Permethylation of Carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209–217, 1984.

CLIFFORD, J. C.; RAPICAVOLI, J. N. & Roper, M. C. A Rhamnose-Rich O-Antigen Mediates Adhesion, Virulence, and Host Colonization for the Xylem-Limited Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 26 n. 6, p. 676–685, 2013.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products, p. 463-524, 1995.

DAVIS, JR., M. R.; GOLDBERG, J. B. Purification and Visualization of Lipopolysaccharide from Gram-negative Bacteria by Hot Aqueous-phenol Extraction. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, 28 maio 2012.

DE CASTRO, C.; PARRILLI, M; HOLST, O.; MOLINARO, A. Microbe-Associated Molecular Patterns in Innate Immunity. **Methods in Enzymology**, p. 89–115, 01 jan. 2010.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNÁNDEZ-CANIGIA, M. V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 3–11, jan. 2009.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 54, p. 2223-2230, 2004.

DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugarcane. **Plant and Soil**, v. 15, p. 211-216, 1961.

DÖBEREINER, J.; REIS, V. M.; LAZARINI, A. C. New N₂ fixing bacteria in association with cereals and suga-cane. In: **Nitrogen fixation: hundred years after**. Ed. H. BOTHE, F. J. DE BRUIJN, W. E. NEWTON. Stuttgart, Fischer, p. 717-722, 1988.

DOBRIŤSA, A. P.; REDDY, M. C. S.; SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 60, p. 1418-1426, 2010.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350- 356, 1956.

DUNGAIT, J. A.; CARDENAS, L. M.; BLACKWELL, M. S. A.; WU, L.; WITHERS, P. J. A.; CHADWICK, D. R.; BOL, R.; MURRAY, P. J.; MACDONALD, A. J.; WHITMORE, A. P.; GOULDING, K. W. T. Advances in the understanding of nutrient dynamics and management in UK agriculture. **Science of the Total Environment**, v. 434, p. 39-50, 2012.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I. R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microb. Infect.**, v. 4, p. 837–851, 2002.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, p. 1-42, 1992.

FALK, E. C.; JOHNSON, J. L.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J.; KRIEG, N. R. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 36:85, 1986.

FEDONENKO, Y. P.; ZATONSKY, G. V.; KONNOVA, S. A.; ZDOROVENKO, E. L.; IGNATOV, V. V. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolisaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 869-872, 2002.

FORSBERG, L. S.; CARLSON, R. W. The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* strains CE358 and CE359. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 2747-2757, 1998

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, p. 35-59, ago. 2009.

FRANCO, A. A.; DOBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, p. 68-74, 1994.

FUREVI, A.; STÄHLE, J.; MUHEIM, C.; GKOTZIS, S.; UDEKWU, K. I.; DALEY, D. O.; WIDMALM, G. Structural Analysis of the O-antigen Polysaccharide from *Escherichia coli* o188. v. 498, p. 108051–108051, 1 dez. 2020.

FUREVI, A. Structural and Conformational Analysis of Bacterial Polysaccharides using NMR Spectroscopy. **Tese de Doutorado (Química Orgânica)** - Departamento de Química Orgânica, Universidade de Estocolmo. Estocolmo, 82p., 2022.

FUX, A. C.; MELO, C. C.; MICHELINI, S.; SWARTZWELTER, B. J.; NEUSCH, A.; ITALIANI, P.; HIMLY, M. Heterogeneity of Lipopolysaccharide as Source of Variability in Bioassays and LPS-Binding Proteins as Remedy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 8395–8395, 7 maio 2023.

GERHARDT, M. et al. The Protein-Protein Interaction Network Reveals a Novel Role of the Signal Transduction Protein PII in the Control of c-di-GMP Homeostasis in *Azospirillum brasilense*. **MSystems**, v. 5, n. 6, 22 dez. 2020.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, p. 1–15, 2012.

GOLDMAN, R. D.; LEIVE, L. Heterogeneity of Antigenic-Side-Chain Length in Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111 and *Salmonella typhimurium* LT2. **European Journal of Biochemistry**, v. 107, n. 1, p. 145–153, 1 jun. 1980.

HAAHTELA, K.; WARTIOVAARA, T.; SUNDMAN, V.; SKUJINŠ, J. Root-associated N₂-fixation (acetylene reduction) by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold climate spodosols. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 4, p. 203-206, 1981.

HELLRIEGEL, H.; WILFARTH, H. Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. **Beilageheft zu der Ztschr. Ver. Rübenzucker-Industrie Deutschen Reichs**. 1888.

HOSEINZADE, H.; ARDAKANI, M. R.; SHAHDI, A.; RAHMANI, H. A.; NOORMOHAMMADI, G.; MIRANSARI, M. Rice (*Oryza sativa* L.) nutrient management using mycorrhizal fungi and endophytic *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 6, p. 1385–1394, jun. 2016.

HOUGH, L.; JONES, K. N. Chromatography on Paper. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (org.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York and London: Academic Press, v. 1, p. 21-31, 1962.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

IM, W. T.; BAE, H. S.; YOKOTA, A.; LEE, S. T. *Herbaspirillum chlorophenicum* sp. nov., 4-chlorophenol-degrading bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 54, p. 851–855, 2004.

JUNG, S. Y.; LEE, M. H.; OH, T. K.; YOON, J. H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2284–2288, 2007.

KANNENBERG, E. L.; REUHS, B. L.; FORSBERG, L. S.; CARLSON, R. W. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structure, biosynthesis and functions. In: **The Rhizobiaceae**. Ed. H.P. SPAINK; A. KONDOROSI; P.J.J. HOOYKAAS. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, p. 154, 1998.

KAYSER, F. H.; BIENZ, K. A.; ECKERT, J.; ZINKERNAGEL, R. M. Medical Microbiology. [s.l.] **Georg Thieme Verlag**, 2004.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 51, p. 157-168, 2001.

KUTSCHERA, A.; RANF, S. The multifaceted functions of lipopolysaccharide in plant-bacteria interactions. **Biochimie**, v. 159, p. 93–98, abr 2019.

- LADHA, J. K.; BARRAQUIO, W. L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 1301-1308, 1983.
- LAGIER, J. C.; GIMENEZ, G.; ROBERT, C.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. E. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Herbaspirillum massiliense* sp. **Standards in Genomic Sciences**, v. 7, p. 200-209, 2012.
- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERELEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 298-300, 2000.
- LEROUGE, I.; VANDERELEYDEN, J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 17-47, mar. 2002.
- LIMPENS, E.; FRANKEN, C.; SMIT, P.; WILLEMSE, J.; GEURTS, R. LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. **Science**, v. 302, p. 630-633, 2003.
- LIU, F. C.; SU, C. R.; WU, T. Y.; SU, S. G.; YANG, H. L.; LIN, J. H. Y.; WU, T. S. Efficient ¹H-NMR Quantitation and Investigation of N-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and N,N'-Diacetylchitobiose (GlcNAc)₂ from Chitin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 5828-5843, 9 set. 2011.
- LÜDERITZ, O.; WESTPHAL, O.; STAUBE, A. M.; NIKAIDO, H. Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides. In: Microbial Toxins, Ed. G. WEINBAUM, S. KADIS, S.J. ALI. **Academic Press**, New York, v. 4, capítulo 4, p. 145-233, 1971.
- PALVA, E. T.; MÄKELÄ, P. H. Lipopolysaccharide Heterogeneity in *Salmonella typhimurium* Analyzed by Sodium Dodecyl Sulfate/Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **European Journal of Biochemistry**, v. 107, n. 1, p. 137-143, 1 jun. 1980.
- MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, v. 3, n° 21, 2013.
- MATTOS, K. A.; TODESCHINI, A. R.; HEISE, N.; JONES, C.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇAPREVIATO, L. Nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia brasiliensis* produces a novel yersiniose A-containing O-polysaccharide. **Glycobiology**, v. 15, p. 313-321, 2005.
- McCLUNG, C. R.; PATRIQUIN, D. G. Isolation of a nitrogen fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel. **Can. J. Microbiol.**, v. 26, p. 881-886, 1980.
- McPHERSON, D. F.; MANNING, P. A.; MORONA, G. Characterization of the dtdp-rhamnose biosynthetic genes encoded in the rfb locus of *Shigella flexneri*. **Molecular Microbiology**, v. 11, p. 281-292, 1994.
- MENESES, C.H.; M ROUWS, L.F.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J. I. Exopolysaccharide Production Is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by

the Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Mol Plant-Microbe Interact**, p. 1448–1458, 2011.

MICOLI, F.; RONDINI, S; GAVINI, M.; PISONI, I.; LANZILAO, L.; COLUCCI, A. M.; GIANNELLI, C.; PIPPI, F.; SOLLAI, L.; PINTO, V.; BERTI, F.; MACLENNAN, C. A.; MARTIN, L. B.; SAUL, A. A scalable method for O-antigen purification applied to various *Salmonella* serovars. 434(1), p. 136–145, 1 mar. 2013.

MILHORINI, S. S. Caracterização estrutural, atividade biológica e propriedades reológicas de polissacarídeos isolados de agaricomícetos. **Tese de Doutorado** (Ciências-Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 197p., 2022.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C.; SCHMIDT, M. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; PANKIEVICZ, V. C. S.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175–196, 4 fev. 2012.

MUTHUKUMARASAMY, U. G.; KANG, K. D.; PARK, W. T.; JEON, C. Y.; PARK, Y. S.; CHO, S. W.; KWON, J.; SONG, D. H.; REVATHI, G. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, p. 981-991, 2007.

OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 9, p. 223–228, set. 1985.

VÂNIA C. S. PANKIEVICZ et al. RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 589–603, 22 jan. 2016.

PAUL, E. A. Towards the year (2000): directions for future nitrogen research Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems. **CAB International Wallingford**, United Kingdom. p. 417-425, 2000.

PEDROSA, F. O. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 5, 12 maio 2011.

PEDROSA, F. O.; YATES, G. M. Regulation of Nitrogen Fixation (Nif) Genes of *Azospirillum brasiliense* by Nifa and Nifc (GlnG) Type Genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, p. 95-101, 1984.

PEOPLES, M. B.; CRASWELL, E. T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 141 n. 1, p. 13-39, 1992.

PETROCELLI, S.; TONDO, M. L.; DAURELIO, L. D.; ORELLANO, E. G. Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri lipopolysaccharide affect the basal response and the virulence process during citrus canker. **PloS one**, v. 7 n. 7, 2012.

- PFEIFER, B.; HILL, A. Vaccine Delivery Technology: Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**. Nova York: Humana press, 2021.
- PINTO, J. V. E. Caracterização e Identificação de Bactérias Diazotróficas Associativas Originadas de Área de Mineração de Ferro. **Dissertação de Mestrado** (Ciência do Solo) - Departamento de Processos Bioquímicos do Solo – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 59 p., 2017.
- PLUMMER, D. T. An introduction to practical biochemistry. 2^a ed. London: McGraw-Hill, p. 362, 1978.
- QUADT-HALLMAN, A.; KLOEPPER, J. W.; BENHAMOU, N. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 577-582, 1997.
- QUISPEL, A. A search for signals in endophytic microorganisms. In: **Molecular Signals in Plant-Microbe Communications**, p. 471-490, 1992.
- RAETZ, C. R. H. Biochemistry of endotoxins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 59, p. 129-170, 1990.
- RAETZ, C. R. H.; REYNOLDS, C. M.; TRENT, M. S.; BISHOP, R. E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 412-427, 2007.
- RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Rev. of Biochem.**, v. 71, p. 635-700, 2002.
- RAPICAVOLI, J.N. BLANCO-ULATE, B.; MUSZYŃSKI, A.; FIGUEROA-BALDERAS, Rosa.; MORALES-CRUZ, A.; AZADI, P; DOBRUCHOWSKA, J. M.; CASTRO, C.; CANTU, D.; ROPER, M. C. Lipopolysaccharide O-antigen delays plant innate immune recognition of *Xylella fastidiosa*. **Nature communications**, v. 9 n. 1, 2018.
- RIDLEY, B. L. Plant cell wall and bacterial cell surface polysaccharides in plant-microbe interactions: the role of oligogalacturonides and lipopolysaccharides. **Tese de Doutorado**, University of Georgia, Athens, GA, USA, 2000.
- RIETSCHER, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F. U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZÄHRINGER, U.; SEYDEL, U. D. I. & PADOVA, F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **Fases J.**, v. 8 n. 2, p. 217-225, 1994.
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, p. 1341–1348, 2006.
- SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, p. 743-767, 2013.
- SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC–MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 731-739, 2005.

- SAVCI, S. An agricultural pollutant: chemical fertilizer. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 3, n. 1, p. 73, 2012.
- SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. The Genus *Herbaspirillum*. **The Prokaryotes**, p. 141–150, 2006.
- SERRATO, R. V.; BALSANELLI, E.; SASSAKI, G. L.; CARLSON, R. W.; MUSZYNSKI, A.; MONTEIRO, R. A. Structural analysis of *Herbaspirillum seropedicae* lipid-A and of two mutants defective to colonize maize roots. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 51, 385–391, 2012.
- SERRATO, R. V. Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas. **Tese de Doutorado (Ciências-Bioquímica)** - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 143p., 2008.
- SERRATO, R. V. Lipopolysaccharides in diazotrophic bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, 3 set. 2014.
- SERRATO, R. V.; SASSAKI G. L.; CRUZ, L. M.; CARLSON, R. W.; MUSZYNSKI, A.; MONTEIRO, R. A. Chemical composition of lipopolysaccharides isolated from various endophytic nitrogen-fixing bacteria of the genus *Herbaspirillum*. **Can. J. Microbiol.**, v. 56, p. 342–347, 2010.
- SIMPSON, F. B.; BURRIS, R. H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**. Washington DC, v. 224, p. 1095-1096, 1984.
- SINGH, R. K.; MALIK, N.; SINGH, S. Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). **Bioscience.**, v. 5, p. 8-14, 2013.
- SPRENT, J. I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms, Pure and Applied Aspects. London: Chapman and Hall, 2ed., 1990.
- STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall, 943p., 1992.
- SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 243-270, 1985.
- TSAI, C. M.; FRASCH, C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 115–119, jan. 1982.
- VALVANO, M. A. Export of O-specific lipopolysaccharide. **Front. Biosc.**, v. 8, p. 452-471, 2003.
- VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.-M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

- VELICHKO, N. S. et al. Structural and genetic characterization of the colitose-containing O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Herbaspirillum frisingense* GSF30T. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 891–897, 1 out. 2020.
- VELICHKO, N. S.; SURKINA, A. K.; FEDONENKO, Y. Structural Peculiarities and Biological Properties of the Lipopolysaccharide from *Herbaspirillum seropedicae* Z78. **Microbiology**, v. 87, n. 5, p. 635–641, set. 2018.
- WANG, J.; ZHAO, J.; NIE, S.; XIE, M.; LI, S. Rapid profiling strategy for oligosaccharides and polysaccharides by MALDI TOF mass spectrometry. **Food Hydrocolloids**, v. 124, p. 107–237, mar. 2022.
- WANG, Y.; HOLLINGSWORTH, R. I. The structure of the O-antigenic chain of the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii* 4s, **Carbohydr. Res.**, v. 260, p. 305–317, 1994.
- WESTPHAL, O.; JANN, K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. **Meth. Carbo. Chem.**, v. 5, p. 83–91, 1965.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Meth. Carbo. Chem.**, v. 2, p. 211–215, 1963b.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Meth. Carbo. Chem.**, v. 2, p. 65–67, 1963a.
- WU, Z. et al. Biochemical characterization of an α 1,2-colitosyltransferase from *Escherichia coli* O55:H7. **Glycobiology**, v. 26, n. 5, p. 493–500, 23 dez. 2015.
- XU, G.; CHANG, J.; XUE, H.; GUO, M.; CHUN-GEN, P.; LI, Y. *Herbaspirillum piri* sp. nov., isolated from bark of a pear tree. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 68, p. 3652–3656, 2018.
- YU, X.; LUND, S. P.; SCOTT, R. A.; GREENWALD, J. W.; RECORDS, A. H.; NETTLETON, D.; LINDOW, S. E.; GROSS, D. C.; BEATTIE, G. A. Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110 n. 5, p. 425–434, 2013.
- ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; RIETSCHER, E. T. Endotoxin in Health and Disease In: Endotoxins. Ed. H. BRADE; S.M. OPAL; S.N. VOGEL; D.C. MORRISON. **Marcel Dekker, Inc.** p. 93–114, 1999.