

17. Ciência, Tecnologia e Inovação

Aplicação da técnica de fluorescência para avaliação de microrganismos visando a construção de biossensores

Perazzoli, Ivan, L., O.; Serrano, Nadja F., G.; Araújo-Moreira, Fernando, M.;
ivanperazzoli@hotmail.com; nadjaserrano@gmail.com; faraujo@df.ufscar.br;

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Federal de São Carlos

Resumo

A identificação rápida e precisa de microrganismos constitui-se em etapa primordial e de extrema importância no diagnóstico de patologias, controle de qualidade na indústria de alimentos e agricultura. Desta forma, é necessário o desenvolvimento de um método que seja rápido, eficaz e de baixo custo. O uso da técnica de fluorescência tem como vantagens: (a) ser de baixo custo quando comparado com outras técnicas não fotônicas; (b) permitir a obtenção dos resultados em poucos segundos; (c) realizar as medidas *in situ*; (d) nenhuma ou pequena preparação de amostra é necessária e (e) não há geração de resíduos químicos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi aplicar a fluorescência para avaliação de microrganismos e, em especial, a ação do peptídeo antimicrobiano (PAM) polycerradin, com intuito de utilizá-lo como bioreceptor na confecção de biossensor. Os espectros de fluorescência para avaliação dos microrganismos puros e sob ação do PAM foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu, RF-5301PC, com comprimento de onda de excitação fixo em 280 nm e um intervalo de detecção de 290-550 nm. Após crescimento em ágar, as suspensões microbianas foram preparadas em solução salina conforme orientações do CLSI. O PAM polycerradin foi solubilizado em água destilada esterilizada em uma concentração de 10 mg/mL. Para análise instrumental, foram depositados em uma cubeta 3 ml da suspensão microbiana e 0,5 ml do PAM (espectros foram obtidos em triplicata). A partir da análise dos espectros de emissão foi realizado um estudo comparativo entre a amostra microbiana antes e após a adição do PAM, tendo sido verificado que a intensidade de emissão para diversos microrganismos diminuiu em até 100 vezes após a adição do composto antimicrobiano.

Palavras chave: Fluorescência, Biossensor, Microrganismos, PAMs.

Introdução

Os microrganismos são as menores formas de vida e constituem, coletivamente, a maior massa de matéria viva na terra. Na ausência dos microrganismos, outras formas de vida jamais teriam surgido e não poderiam ser mantidas até hoje. Microrganismos são capazes de realizar processos químicos que são necessários a outros organismos, além de conceber importantes relações com outros seres vivos, sendo algumas harmônicas e outras desarmônicas, podendo então representar uma ameaça para a saúde humana (Madigan, Michael T., Martinko, John M., Dunlap, Paul V., Clark, 2010). Bactérias, fungos e outros microrganismos estão presentes em toda a natureza e meio ambiente. Alimentos, água e o ar possuem muitas espécies de fungos e bactérias. De fato, um número crescente de bactérias patogênicas foram identificadas nos alimentos, no ar, em legumes e sucos, dentre as quais se inclui a *E. coli* em produtos como carne moída, e *Salmonella* sp. em frango, ovos e derivados a base de maionese (Ammor, 2007; Mason et al., 2003).

De acordo com Ferreira (2016) a cada ano, cerca de 14% dos pacientes internados no Brasil contraem algum tipo de infecção hospitalar e cerca de 100 mil morrem em virtude delas. (Ferreira, 2016; Oliveira, Santos, Sobrinho, & Aragão,

2017). Considerando-se processos patológicos associados a eventos diarreicos, vários agentes etiológicos podem estar envolvidos tais como vírus, bactérias e parasitas. Nos países em desenvolvimento, os agentes bacterianos são os mais comumente envolvidos, enquanto que os virais são os mais relevantes em países industrializados. Dados mostram que no Brasil ocorrem mais de 600 mil internações/ano decorrentes de diarreia aguda, com aproximadamente oito mil óbitos (Alonso, 2001; Ministério da Saúde, 2008; WHO, 2002). Ainda que algumas doenças infecciosas possam ser controladas, os microrganismos patogênicos ainda hoje representam um fator de ameaça para a saúde humana (Madigan, Michael T., Martinko, John M., Dunlap, Paul V., Clark, 2010).

Preliminarmente, dados foram obtidos acerca de alguns dos principais tipos de microrganismos patogênicos que causam grande impacto nas áreas de: i) Saúde: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Candida albicans*; ii) Agricultura: *Fusarium subglutinans* e *Colletotrichum gloeosporioides* (Nascimento, 2015; Serrano, 2014; Thomazini, 2016).

Bactérias são naturalmente resistentes a alguns agentes antimicrobianos devido a diversos mecanismos tais como bomba de

eflujo, alteración en permeabilidad de membrana, mutación cromossômica que altera el sitio de ligación del fármaco, y por transformación de un gen, que hace a la bacteria capaz de producir una enzima que destruye o inactiva el fármaco (Burton, Gwendoly R. W., Engelkirk, 2005). Debido a estos factores de virulencia, se vuelve cada vez más difícil el uso de fármacos contra patógenos, ya que en algunos casos no hay agente antimicrobiano con potencial de supresión de la cepa patogénica.

Las bacterias poseen varios cromóforos que absorben y emiten en el largo del espectro ultravioleta y visible del espectro electromagnético. La región espectral ultravioleta es generalmente dominada por la fluorescencia del aminoácido aromático Triptófano. En el visible e infrarrojo cercano, la emisión está asociada a las coenzimas, tales como nicotinamida adenina dinucleótido NADH, flavinas, carotenoides o también clorofilas pueden ser verificadas (Seaver, Roselle, Pinto, & Eversole, 1998). En general longitudes de onda de excitación menores proveen mayor energía y, por lo tanto, son capaces de producir fluorescencia en más tipos de materiales (Ammor, 2007).

El uso del péptido antimicrobiano (PAM) polycerradin es fundamental en este trabajo para verificar/confirmar la existencia de microorganismos o grupos de microorganismos presentes en la muestra analizada a través de su rápida acción

antimicrobiana y de su papel como biomarcador utilizando la técnica de espectroscopia de fluorescencia (Serrano, 2014).

Actualmente, con el uso de métodos moleculares para identificación de microorganismos, hay mayor confiabilidad en los resultados además de ser eficaces en la mayoría de los casos. No obstante, como en toda técnica, tiene sus desventajas, ya que el método molecular emplea reactivos, tiempo intensivo y un técnico altamente calificado. Procedimientos basados en procesos bioquímicos, fisiológicos y criterios morfológicos son frecuentemente laboriosos, demorados y requieren un gran número de reactivos (Serrano, 2014; Sohn, Himmelsbach, Barton, & Fedorka-Cray, 2009).

Una de las principales ventajas de las técnicas de fotoluminiscencia es el bajo costo cuando comparado con otras técnicas no fotónicas, rapidez en la obtención de resultados, no genera residuos, alta sensibilidad, simple o ningún procesamiento de las muestras es necesario y puede ser aplicado en muestras sólidas, líquidas y gaseosas.

Para un mejor entendimiento y control de las enfermedades causadas por microorganismos patógenos, así como el control de la calidad microbiológica en alimentos, se necesitan estudios para mejorar y desarrollar técnicas de identificación de estos microorganismos. A partir de este contexto, con la técnica de

fluorescência empregada neste trabalho, será possível desenvolver posteriormente um sistema de biossensor portátil para detecção de microrganismos patogênicos utilizando o PAM polycerradin como bioreceptor.

Objetivos

Empregar o fenômeno de fluorescência para avaliação de microrganismos (bactérias e fungos) puros e sob a ação do PAM *polycerradin*.

Materiais e Métodos

A coleção microbiana utilizada neste estudo foi estocada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em vials contendo solução de glicerol 15% (v/v). As cepas foram repicadas em placas de ágar TSA (*tryptcase soy agar*), e incubadas por 24h, mantidas a 37°C . Colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo solução salina 0,85%, e a densidade ótica (D.O.) em $\lambda = 600\text{ nm}$ da suspensão celular foi ajustada em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/ml para as bactérias e $1,0 \times 10^5$ UFC/ml para a *C. albicans*, conforme as normas CLSI (2011). Após ajuste da DO, as amostras foram mantidas a 0°C a fim de minimizar o crescimento dos microrganismos até o curso do experimento. O processo de obtenção do PAM polycerradin a partir do caldo de fermentação de *P. polymyxa* RNC-D, está descrito por Serrano (2014). O PAM utilizado nas medidas foi solubilizado em água Milli-Q em uma

concentração de 10 mg/mL . Para aquisição dos espectros de fluorescência foi utilizado um espectrofluorímetro (Shimadzu, RF-5301PC) cujo tempo de resposta foi ajustado em 0,02 segundos. Para análise, foram depositados 3 ml das soluções contendo microrganismos em uma cubeta de quartzo. Com o propósito de otimizar a análise dos dados, foi realizado a correção do background e tratamento utilizando uma rotina aplicada no Matlab (R2015 - 8.5.0.197613).

Para avaliação da emissão de fluorescência dos microrganismos e do PAM foram geradas na primeira etapa as matrizes de excitação-emissão (MEE). As MEE foram criadas com passos de 10 nm entre 260-380 nm e 20 nm entre 380-460 para excitação. Os espectros de emissão foram coletados entre 260-500 nm com resolução de 1 nm. Os espectros tiveram o background corrigido pela solução salina e removido a emissão do laser para cada espectro.

Na segunda parte foi avaliado cada microrganismo sob a ação do PAM. Os espectros foram coletados em triplicata de 290-550 nm com resolução de 1 nm e com comprimento de onda de excitação fixo em 280 nm. Em seguida foram calculadas as médias e os respectivos desvios padrão. Primeiramente foram realizadas medidas contendo apenas a solução de microrganismo e em seguida com a adição de 0,5 ml da solução de PAM. Em seguida o PAM foi adicionado e

os respectivos espectros foram coletados em tempos de 0 min, 5 min e 20 min. Os espectros contendo emissão do microrganismo e PAM foram corrigidos pelo background da solução de PAM puro, a fim de manter apenas o sinal de fluorescência do microrganismo.

Resultados e Discussão

Na primeira parte deste trabalho, a influência do comprimento de onda de excitação foi avaliada. A partir das MEE da Figura 1, foi possível observar que para *E. coli* (a), *C. albicans* (b) e PAM (c) houve maior intensidade de emissão com excitação em 280 nm. Além dos microrganismos mencionados acima, foram avaliados *S. aureus*, *S. sonnei* e *B. cereus*, os quais apresentaram mesmo comportamento, ou seja, apresentaram maior intensidade de fluorescência com excitação em 280 nm. As bandas de emissões da amostra do ELP são características dos aminoácidos com cadeias aromáticas na sua composição.

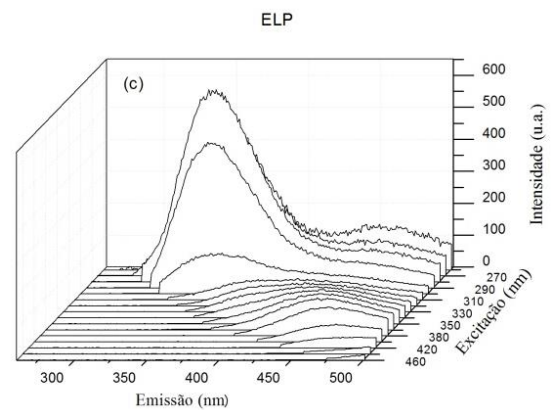
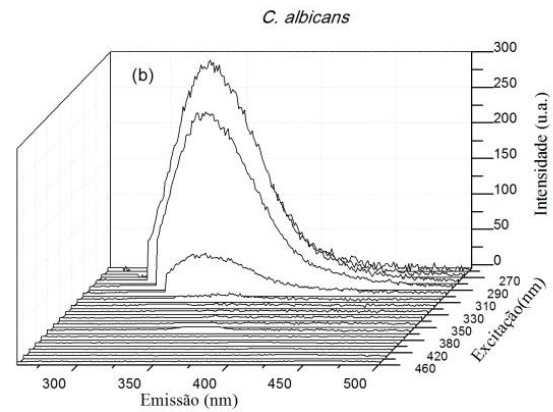
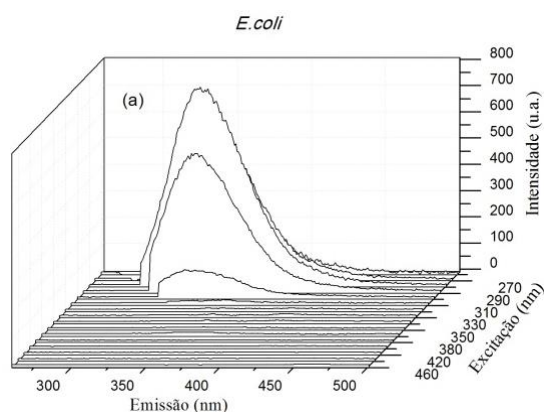


Figura 1: MEE para *E. coli* (a), *C. albicans* (b) e ELP (c).

Segundo Seveaver (1998) a banda de emissão com máxima intensidade próxima de 330 nm se refere à emissão do aminoácido aromático Triptófano, que está presente em altas concentrações nos microrganismos. Outros cromóforos tais como NADH e flavinas estão presentes em menores concentrações, portanto a emissão de fluorescência é limitada a esta fonte de excitação. Para que seja possível identificar cromóforos presente em microrganismos com concentrações baixas, é necessário utilizar lasers devido a sua alta irradiância.

A partir da avaliação do comprimento de onda de excitação mais favorável para atingir maior intensidade de fluorescência dos microrganismos, a segunda etapa foi

avaliar a ação do PAM. A Figura 2 representa um gráfico de barras com as intensidades máximas de emissão para os microrganismos, nos quais foram avaliados antes e após a adição do ELP. A intensidade máxima da banda de emissão encontrada foi em 330 nm.

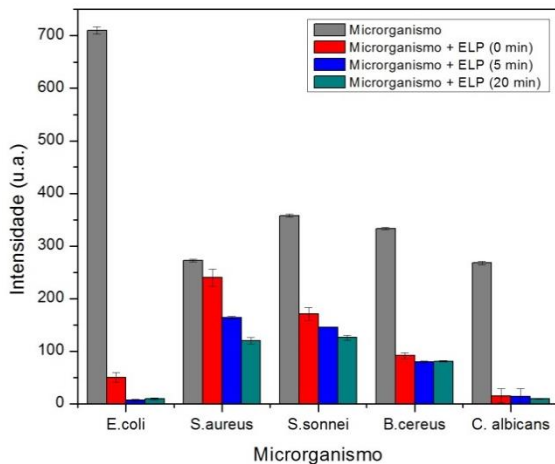


Figura 2: Gráfico de barras representando a intensidade máxima de emissão em 330 nm dos microrganismos com excitação em 280 nm antes e após a adição do PAM para diferentes tempos de aquisição dos espectros.

Foi possível observar através da técnica de fluorescência a ação antimicrobiana instantânea do PAM em solução de fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Alguns fatores que influenciaram os dados espectroscópicos obtidos com a variação de tempo foram a variação de temperatura, o crescimento dos microrganismos e a precipitação do PAM (devido a sua alta concentração e densidade). Outras amostras de microrganismos serão estudadas em trabalhos futuros para verificar a ação do PAM.

Todo o conhecimento gerado neste trabalho, nas áreas de fluorescência, microbiologia e PAMs, são de

fundamental importância para futuros avanços da comunidade científica, com aplicação na área da saúde e também do ponto de vista biotecnológico.

Conclusões

A técnica empregada mostrou ser eficiente, Após a adição do PAM ocorreu uma diminuição de até 100 vezes na intensidade de emissão dos microrganismos, o que significa que o PAM apresentou um grande potencial na inibição dos microrganismos, o qual foi detectável pela técnica de fluorescência. A partir dos resultados obtidos, será possível construir um biossensor de custo relativamente baixo, a partir da ação do PAM polycerradin utilizando a técnica de fluorescência.

Referências

- Alonso, M. (2001). Gastroenteritis por rotavirus / Gastroenteritis caused by rotavirus. *Arch. Argent. Pediatr*, 99(6), 483–484.
- Ammor, M. S. (2007). Recent advances in the use of intrinsic fluorescence for bacterial identification and characterization. *Journal of Fluorescence*, 17(5), 455–459. <https://doi.org/10.1007/s10895-007-0180-6>
- Burton, Gwendoly R. W., Engelkirk, P. G. (2005). Diversidade dos Microrganismos. In *Microbiologia para as Ciências da Saúde* (p. 96).

- Ferreira, V. M. (2016). Perfil de dispensação de antibióticos nos ambientes ambulatorial e hospitalar em Montes Claros. *Revista Unimontes Científica*.
- Madigan, Michael T., Martinko, John M., Dunlap, Paul V., Clark, D. P. (2010). Micro-organismos e Microbiologia. In *Microbiologia de Brock* (12th ed., p. 3).
- Mason, H. Y., Lloyd, C., Dice, M., Sinclair, R., Ellis, W., & Powers, L. (2003). Taxonomic identification of microorganisms by capture and intrinsic fluorescence detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(5–6), 521–527. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00010-1)
- Ministério da Saúde. (2008). Surto de doença diarreica aguda em Anápolis, Goiás. *Secretaria de Vigilância Em Saúde*, 16, 1–3. Retrieved from <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/junho/25/Ano08-n16-surto-diarreia-aguda-go-completo.pdf>
- Nascimento, I. S. (2015). *Propriedades espectroscópicas da ação antimicrobiana do peptídeo polycerradin*. Universidade Federal de São Carlos.
- Oliveira, R. W., Santos, M. R., Sobrinho, G. K. M., & Aragão, N. V. B. T. (2017). Importância da Enfermagem na Antibioticoterapia do Paciente Portador de Infecções por Bactérias Multirresistentes: uma Revisão Integrativa. *Congresso Internacional de Enfermagem*, 1(1), 1–4. Retrieved from <https://eventos.set.edu.br/index.php/cie/article/view/5751/2181>
- Seaver, M., Roselle, D. C., Pinto, J. F., & Eversole, J. D. (1998). Absolute Emission Spectra from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Vegetative Cells in Solution. *Applied Optics*, 37(22), 5344–5347. <https://doi.org/10.1364/AO.37.005344>
- Serrano, N. F. G. (2014). *Produção de compostos antimicrobianos por Paenibacillus polymyxa RNC-D: otimização das condições de cultivo, purificação e caracterização dos bioprodutos*. Universidade Federal de São Carlos.
- Sohn, M., Himmelsbach, D. S., Barton, F. E. I., & Fedorka-Cray, P. J. (2009). Fluorescence Spectroscopy for Rapid Detection and Classification of Bacterial Pathogens. *Applied Spectroscopy*, 63(11), 1251–1255. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301879021#.VzvUeNLX9F4.mendeley>
- Thomazini, B. da S. (2016). *Desenvolvimento de sensor óptico para detecção de microrganismos patogênicos*. Universidade Federal de São Carlos.
- WHO. (2002). Generic protocols for (i)

hospital-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis in children and (ii) a community-based survey on utilization of health care services, (i).
<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001381>

Agradecimientos

Agradecemos ao Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) da UFSCar por fornecer o espectrofluorímetro e auxílio.

Financiamento

Agradecemos às agencias FAPESP e CAPES pelo apoio científico e financeiro. Agradecemos também à UFSCar, por meio da Secretaria Geral de Relações Internacionais (SRInter) e pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec).