

Desenvolvimento de biossensor para detecção de bioagentes de interesse em DQBRN

Nadja Fernanda Gonzaga Serrano¹, Ivan Perazzoli¹, Eduardo Migon², Julio Zukerman-Schpector¹, Igeez Caracelli¹, Bruno Thomazini³, Fernando Manoel Araújo-Moreira¹

¹ Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos/SP – Brasil

² Instituto Meira Mattos, Escola de Comando e Estado-Maior do Exército, Rio de Janeiro/RJ – Brasil

³ Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Bauru/SP – Brasil

Resumo – A rápida e segura identificação e classificação de microrganismos (bactérias, fungos, etc) não é uma tarefa simples. O uso de métodos ópticos, a exemplo da técnica de fluorescência, tem como vantagem ser de custo financeiro bem acessível quando comparado com outras técnicas – como PCR (*Polimerase Chain Reaction*) –, obtenção dos resultados em poucos segundos, nenhuma ou pequena preparação da amostra, e não há geração de resíduos químicos. Neste projeto aplicamos o fenômeno da fluorescência na construção de um dispositivo que permita avaliar a presença de microrganismos de interesse em diversas áreas, entre elas a de defesa química, biológica, radiológica e nuclear (DQBRN). Especificamente buscou-se a detecção de patógenos que podem ser usados como biarmas. Foram detectados com sucesso diversos microrganismos de letalidade baixa (classe C/CDC) e média (classe B/CDC). Ainda, no procedimento do uso deste dispositivo é incluída a ação de um peptídeo antimicrobiano (PAM) com o intuito de usá-lo como bioreceptor.

Palavras-Chave – Biossensor, DQBRN, biodefesa.

I. INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão presentes amplamente na natureza e no meio ambiente inclusive no trato intestinal de animais e dos seres humanos. Muitos desses organismos possuem funções essenciais tanto natureza quanto aos seres humanos, dentre as quais podemos citar a biodegradação de compostos tóxicos, a fermentação que dá origem a inúmeros produtos e os probióticos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Estima-se que, em média, uma pessoa possua 150 tipos de bactérias no corpo, tanto exógenas quanto endógenas, sendo *Candida albicans* o patógeno com maior sucesso no corpo humano [1].

Embora muitas espécies de microrganismos sejam benéficas e desempenhem papéis essenciais à vida e à saúde humana, muitas outras são responsáveis por inúmeras doenças e causam a morte de milhares de pessoas. Anualmente, estima-se que mais de dois milhões de pessoas desenvolvam infecções graves e 23 mil venham a óbito, só nos Estados Unidos. As chamadas bactérias super-resistentes (bactérias multi-droga resistentes – MDR) são as grandes responsáveis por esse grande número de mortes, causadas por infecções, cada vez mais crescente. A resistência aos antibióticos ocorre quando as bactérias mudam a resposta ou criam mecanismos que bloqueiam a ação dos antibióticos usados para tratar as infecções. As infecções causadas por esse tipo de bactéria são muito mais difíceis de serem tratadas, o que aumenta os custos médicos e a taxa de mortalidade [2].

Os métodos convencionais de detecção dos microrganismos baseiam-se na identificação biológica e bioquímica

específicas. Embora esses métodos sejam sensíveis, baratos e forneçam informações quantitativas e qualitativas com relação à natureza do microrganismo, eles são altamente restritos no quesito tempo de ensaio, pois demandam um período relativamente grande para processamento e análise, bem como precisam de um preparo inicial usualmente longo quando necessária a detecção de patógenos em baixas concentrações. Alguns métodos padrões levam até sete dias para obtenção de resultados e se baseiam na habilidade das bactérias de formarem colônias visíveis [3]. Outros métodos de detecção se baseiam em técnicas moleculares, as quais envolvem o uso da PCR, diminuindo o tempo necessário para identificação de dias para algumas horas. A análise por PCR é altamente específica e consegue identificar inclusive microrganismos que não são identificados por meio de cultura convencional. As técnicas moleculares estão sendo utilizadas com maior frequência nos últimos tempos, possibilitando diagnósticos mais precisos e em um curto prazo de tempo. Embora a análise por PCR seja específica, com custos reduzidos e seja possível a obtenção de resultados em até 24h, alguns fatores devem ser considerados na utilização dessa técnica para detecção de patógenos, como, por exemplo, o alto custo tecnológico, a necessidade de aprovação e regulamentos e a padronização das instruções. Diante disso, seria de grande importância a possibilidade de utilização de técnicas de detecção que sejam tão eficientes e específicas quanto a PCR, mas com detecção praticamente em tempo real, o que permitiria uma redução ainda maior dos custos dos processos envolvidos [3]. O emprego de biossensores ópticos utilizando peptídeos como elemento de reconhecimento para detecção de bactérias tem sido motivo de atenção em estudo recentes. Porém, algumas limitações têm sido encontradas, como por exemplo, a detecção somente de fragmentos celulares de bactérias e a não abrangência na detecção, onde somente uma espécie de bactéria pode ser detectada [3,4]. Atualmente, vários estudos têm sido realizados na busca por novas ferramentas de detecção que permitam a obtenção dos resultados em um tempo ainda mais curto mantendo a mesma qualidade dos dados obtidos nos métodos tradicionais [5]. Além da necessidade e de monitoramento dos processos industriais, a fim de se evitar contaminações na linha de produção, e das perdas causadas por contaminação de microrganismos nas lavouras, outro fator importante para o desenvolvimento de sensores de rápida detecção tem sido o crescimento no número de bactérias super-resistentes, que tem atingido níveis críticos no mundo todo devido ao surgimento de novos mecanismos de resistência e o rápido espalhamento dessas bactérias, o que tem dificultado o tratamento dessas infecções. Quando infecções não podem ser tratadas com antibióticos comuns,

existe a necessidade do uso de medicamentos mais sofisticados e mais caros, causando um fardo econômico para a sociedade [2]. Recentemente, no Brasil, foi encontrada pela primeira vez em cepas de *E. coli*, um gene que causa resistência a uma classe de antibióticos utilizados no tratamento de infecções por bactérias superresistentes. Essa aparição pode contribuir para o surgimento de bactérias totalmente resistentes aos antibióticos. Esse aumento no número de bactérias super-resistentes tem provocado um custo anual entre 100-300 milhões de dólares nos Estados Unidos [2,3,4].

Por outro lado, o número de novos antibióticos descobertos tem diminuído a cada ano. A Fig. 1 apresenta o contraste entre o crescente número de bactérias super-resistentes e o decrescente número de novos antibióticos nos últimos anos.

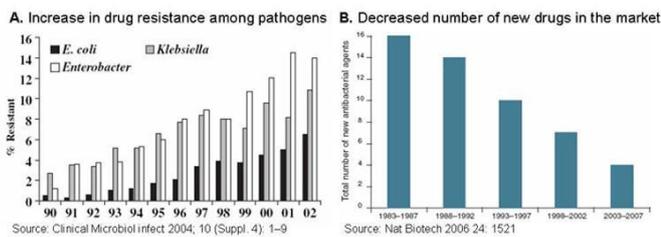


Fig. 1. Aumento no número de bactérias super-resistentes (gráfico à esquerda) versus redução no desenvolvimento de novas drogas (gráfico à direita). (A) Crescimento da resistência à antibióticos de cepas de *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* [6]. (B) Número de novos antibióticos aprovados pela FDA entre 1983 e 2007 [7].

II. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

A. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

Os peptídeos são compostos biológicos formados pela ligação entre dois ou mais aminoácidos através de ligações peptídicas. Esses compostos são produzidos por todos os tipos de organismos vivos e podem apresentar ação antimicrobiana contra uma vasta quantidade de microrganismos como bactérias, fungos e vírus. Além disso, podem ser utilizados, inclusive, no tratamento de câncer. A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais tem aumentado a uma taxa muito maior que o desenvolvimento de novos antibióticos. Com isso, cresce, cada vez mais, o interesse por peptídeos antimicrobianos. Os peptídeos são moléculas relativamente pequenas (de 6 a 100 aminoácidos) e possuem variados pesos, sequências e estruturas. Eles possuem características únicas, diferentes dos antibióticos tradicionais, dentre as quais podemos citar: (a) o mecanismo de resistência dos microrganismos aos peptídeos não é tão bem desenvolvido, se comparado com o mecanismo de resistência aos antibióticos tradicionais; (b) muitos antibióticos agem lentamente, enquanto os peptídeos podem matar os patógenos muito rapidamente; (c) possuem um amplo espectro de atividade contra uma grande variedade de microrganismos, dentre eles, os fungos e bactérias.

Os peptídeos antimicrobianos curtos (com menos de 18 resíduos de aminoácidos) possuem vantagens para o desenvolvimento de agentes terapêuticos por possuírem baixa antigenicidade e baixo custo de síntese [4].

Sua atividade bactericida se dá por diversos mecanismos. Basicamente, os peptídeos se ligam à membrana celular, levando à ruptura da mesma e à consequente morte celular. Esse mecanismo depende de diversos fatores tais como sequência de aminoácidos, composição da membrana e concentração de peptídeos. Estudos indicam que mudanças na camada externa da membrana celular de fungos pode influenciar a habilidade dos peptídeos antimicrobianos de interagir com a parede celular [8].

Os peptídeos também podem causar um aumento na permeabilidade da parede celular. Isso, por si só, não causa a morte celular. Por esse motivo, estudos que tem investigado a relação entre a permeabilidade da membrana bacteriana e a morte celular tem demonstrado que tal morte pode ocorrer sem a ruptura da parede celular, o que sugere que os peptídeos antimicrobianos (PAMs) podem interagir com alvos intramoleculares [5]. Os PAMs possuem uma ampla atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral e imunomodulatória [5]. Eles podem ser agrupados de acordo com suas características estruturais da seguinte forma: os que possuem alta concentração de determinado aminoácido; os que possuem ponte dissulfeto intramoleculares; e os que possuem uma estrutura de α -hélice com uma região anfifílica.

Em um estudo desenvolvido por Referência [9], foi isolado o primeiro peptídeo de fungo com poder bactericida contra uma variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Esse peptídeo, chamado AcAMP, possui estabilidade a temperatura e pH, além de apresentar um grande espectro de ação contra bactérias e fungos. Dessa forma, eles são excelentes candidatos para aplicação como conservante alimentar e no controle biológico de doenças de plantas. Alguns lipopeptídeos apresentam características que conferem a esses compostos propriedades surfactantes. Estudos demonstram a potencial aplicação de lipopeptídeos na recuperação de águas contaminadas por compostos orgânicos derivados do benzeno, oriundos de vazamentos de tanques de estocagem em postos de combustíveis. Esses vazamentos causam a contaminação de águas subterrâneas causando um importante impacto na saúde humana [10].

Lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis* possuem alta atividade antifúngica e podem ser usados para o controle de fungos e bactérias patogênicas [5,10].

Um estudo procurou investigar o mecanismo de ação do lipopeptídeo *Paenibacterin* contra *E. coli* e *S. aureus*. *Paenibacterin* é um lipopeptídeo bacteriano catiônico que possui atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo bactérias super-resistentes. Os peptídeos antimicrobianos catiônicos são carregados positivamente e possuem propriedades anfifílicas, ou seja, possuem uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica. Esse lipopeptídeo interage com as membranas lipídicas por interações hidrofóbicas e pode interferir em diversas funções celulares, através dos danos que causa na membrana celular, uma vez que a membrana íntegra é essencial para a vida bacteriana. Outros peptídeos catiônicos naturais, ou mesmo peptídeos catiônicos sintéticos, são fortes candidatos para tratamento de uma série de infecções causadas por patógenos.

As bactérias e fungos produzem peptídeos não ribossômicos (PNRs) que possuem uma gama extremamente

ampla de atividades biológicas, sintetizados por enzimas chamadas sintetases. Apesar de ambos os mecanismos de produção de peptídeos (ribossômicos e não-ribossômicos) apresentarem suas vantagens, os não-ribossômicos apresentam uma maior diversidade estrutural. Os peptídeos não-ribossômicos representam uma classe de compostos naturais que apresentam um grande potencial biotecnológico devido à sua biossíntese e aplicações [8].

Estudo realizado por Serrano em 2014 [11] conseguiu isolar, pela primeira vez, um lipopeptídeo, chamado *Polycerradin*, produzido por *P. polymyxa RNC-D*. No mesmo estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana do lipopeptídeo *Polycerradin* contra um grande número de microrganismos, dentre eles *E. coli*, *Candida albicans* e *S. aureus*, confirmando o potencial bactericida desse composto contra uma enorme gama de microrganismos, abrangendo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Estes resultados indicam o potencial desta molécula para aplicações biotecnológicas, tais como construções de sensores e biossensores para detecção de microrganismos e dispositivos para combate às infecções causadas inclusive por armas biológicas.

B. Espectroscopia de Fotoluminescência

A luminescência é o fenômeno de emissão de fótons (energia eletromagnética) na região ultravioleta, visível ou infravermelho, do espectro eletromagnético, a partir de espécies eletronicamente excitadas. Em 1888, o físico e historiador científico Eilhardt Wiedemann, utilizou pela primeira vez a palavra *luminescenz* para descrever todos os fenômenos envolvendo a luz e que não estão relacionados com o aumento da temperatura. A luminescência é um processo que gera luz fria, ou seja, não ocorre o aumento de temperatura, enquanto no processo de incandescência ocorre o aumento da temperatura, e a luz gerada é denominada luz quente. A fluorescência e a fosforescência são casos particulares do fenômeno de luminescência. Isso ocorre quando um fóton é absorvido por determinado material, fazendo com que as moléculas fiquem em um estado eletronicamente excitado. A possível posterior emissão de fótons e conseqüente desexcitação é chamada de fotoluminescência e é apenas um dos efeitos possíveis para a interação entre a luz e a matéria.

Os compostos luminescentes podem ser classificados da seguinte maneira: (a) compostos orgânicos: hidrocarbonetos aromáticos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno, perilo, etc.), fluoresceína, rodamina, cumarina, oxazinas, polienos, difenilpolienos, aminoácidos (triptofano, tirosina, fenilalanina), etc.; (b) compostos inorgânicos: íon urânio, íons lantanídeos, vidros dopados (com Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag), cristais (ZnS, CdS, ZnSe, CdSe), etc.; (c) compostos organometálicos.

A fotoluminescência consiste na emissão de radiação por uma molécula durante a passagem do estado de excitação para o estado de equilíbrio. Primeiramente, o elétron se encontra em um nível de energia, chamado *E1*, onde o elétron se encontra eletronicamente estável. Com a emissão de radiação sobre o material, um fóton fornece energia e o

elétron passa do nível *E1* para o nível *E2*, ultrapassando a banda de energia proibida (*gap*), indo ocupar um espaço na banda de valência. Quando o elétron se encontra em um nível excitado, é possível que ele retorne ao nível de equilíbrio espontaneamente, perdendo energia e liberando um fóton. Esse processo é denominado de emissão espontânea. Nesse caso, o fóton emitido possui fase e direção aleatórias e não tem nenhuma relação com o que ocorreu antes da excitação.

Outra possibilidade é a de fornecer mais um fóton para o material com a mesma energia que separa os níveis *E1* e *E2*. Nesse caso, o fóton faz com que o elétron que se encontra excitado passe do nível *E2* para o nível *E1* emitindo mais um fóton com a mesma fase e direção do fóton incidente. Assim, as intensidades dos fótons são somadas causando uma amplificação da luz emitida. Esse é o princípio utilizado na fabricação de lasers.

C. Espectroscopia de Fotoluminescência – Fenômeno Físico

Antes de a molécula ser excitada, os elétrons que estão no estado fundamental ocupam alguns dos orbitais moleculares, como por exemplo, os orbitais σ , π ou η , sendo o último orbital ocupado, chamado de HOMO (*orbital molecular ocupado de maior energia*). Quando ocorre a excitação da molécula e conseqüente absorção de energia, os elétrons são transferidos para um dos orbitais σ^* , π^* , onde, o primeiro a ser preenchido forma o LUMO (*orbital desocupado de menor energia*) [12].

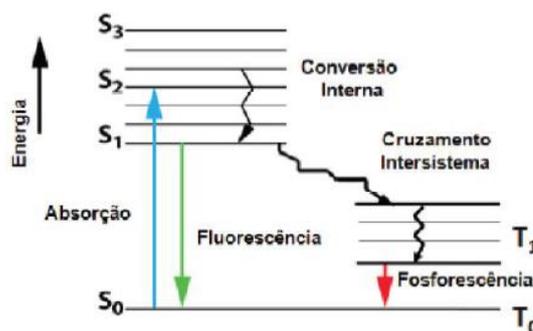


Fig. 2. Diagrama de Jablonski.

Átomos ou moléculas podem emitir luz quando os elétrons que se encontram no estado excitado decaem radiativamente ao estado fundamental. No diagrama de Jablonski (Fig. 2) podem-se visualizar os possíveis processos envolvidos: absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento inter-sistema, fosforescência e fluorescência atrasada. É importante notar que a absorção é um processo bastante rápido (10-15 s) em relação aos outros processos, pois não há deslocamento do núcleo de acordo com o princípio de Franck-Condon. A maioria das moléculas se encontra no nível fundamental S_0 na temperatura ambiente. A absorção de um fóton nesse nível pode levar as moléculas para um dos níveis vibracionais de S_1 , S_2 . Após a absorção, existem diversos processos de decaimento radioativo e não radioativo possíveis [13]:

➤ *Conversão Interna*: trata-se de um processo de decaimento não-radiativo entre dois estados eletrônicos de

mesma multiplicidade de spin. Em sólidos, este processo é seguido por uma relaxação vibracional para um nível vibracional de menor energia do que no estado eletrônico final.

➤ **Fluorescência:** trata-se da emissão de fótons originada pelo decaimento de $S1 \rightarrow S0$. A emissão de fluorescência ocorre a partir de $S1$ e não depende do comprimento da onda de excitação (considerando que somente existe uma espécie no estado fundamental). A energia entre $S0$ e $S1$ é geralmente a mesma para a absorção e para a fluorescência. No entanto, o espectro de fluorescência localiza-se em comprimentos de onda maiores (com energia mais baixa) em relação ao espectro de absorção, devido a perda de energia no estado excitado (relaxação vibracional). De acordo com a regra de Stokes, o comprimento da onda de emissão de fluorescência deve ser sempre maior que o da absorção. Entretanto, na maioria dos casos, o espectro de absorção se sobrepõe parcialmente ao espectro de fluorescência, ou seja, uma fração de luz é emitida em comprimento de onda menor que a luz absorvida parecendo estar em contradição com o princípio da conservação da energia. Isso pode ser explicado pelo fato de que em temperatura ambiente, uma pequena fração de moléculas está num nível vibracional maior que o nível tanto no estado fundamental como no estado excitado. Essa violação da lei de Stokes desaparece a baixas temperaturas.

➤ **Cruzamento Inter-sistema CIS:** é uma transição proibida, não-radiativa entre dois níveis vibracionais de mesma energia, que pertencem a estados eletrônicos de multiplicidades diferentes ($S1 \rightarrow T1$). Por exemplo, uma molécula excitada no nível vibracional 0 do estado $S1$ pode mover-se para o nível vibracional isoenergético do estado tripleto T ; então a relaxação vibracional leva-a para o nível vibracional mais baixo de $T1$. Nesse caso, a molécula pode se desativar a partir do estado tripleto ($T1$) por meio de processo não radioativo ou por meio de fosforescência.

➤ **Fosforescência:** corresponde ao decaimento de um estado excitado tripleto ($T1$) para um estado de menor energia ($S0$), a qual é proibida por regra de spin, mas pode ser observada devido ao acoplamento spin-órbita. Durante esse processo, que é mais curto em relação à fluorescência, ocorrem numerosas colisões entre moléculas que favorecem o cruzamento inter-sistema e a relaxação vibracional em $S0$. A Fig. 3 representa a diferença dos estados excitados da fluorescência e fosforescência.

Cada tipo de interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, possui características únicas e cada espectro de emissão fornece informações distintas sobre a mesma molécula.



Fig. 3. Diferença dos estados excitados nos fenômenos de fluorescência e fosforescência.

D. Fotoluminescência em Microrganismos

Uma das principais características das técnicas de espectroscopia em relação às outras técnicas de caracterização de materiais é o seu caráter não destrutivo. Isso permite que organismos sejam estudados sem que ocorra a morte celular. Além disso, a fotoluminescência pode fornecer informações e características do microambiente ao redor da molécula excitada devido à interação dessa molécula com o seu entorno imediato. Devido certas características tais como alta sensibilidade, especificidade da emissão de radiação característica do microentorno/microambiente e capacidade de fornecer informação em tempo real, a fotoluminescência se apresenta como uma técnica promissora para utilização em sistemas biológicos, como, por exemplo, na detecção de microrganismos [13,14].

Várias técnicas de detecção de bactérias patogênicas envolvendo luz tem sido motivo de estudos há muito tempo. Essas técnicas envolvem: guia de onda dielétrica monomodo, ressonância plasmônica de superfície, elipsometria, o espelho ressonante e interferômetro.

III. CONSTRUÇÃO DO PROTÓTIPO DE BIOSSENSOR

Podemos descrever o biossensor construído [14,15] (Fig. 4) como um dispositivo onde o microrganismo é estimulado através de luz de um determinado comprimento de onda (neste caso, luz azul, de $\lambda \sim 400\text{nm}$) usando como fonte a luz de um laser ou de um LED. Em seguida, o microrganismo emite luz através do processo de fotoluminescência num outro comprimento de onda (neste caso, luz vermelha, de $\lambda \sim 750\text{nm}$), e, posteriormente, essa luz é filtrada opticamente e detectada num dispositivo LDR.

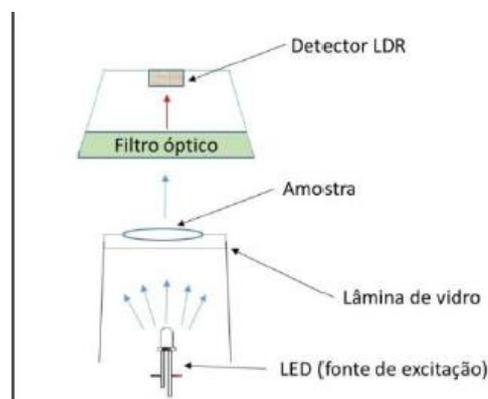


Fig. 4. Descrição esquemática do protótipo do biossensor construído na etapa acadêmica mostrando seus componentes principais. O sensor é composto basicamente por uma fonte de excitação (LED), um filtro óptico e um resistor dependente de luz (LDR), utilizado como detector. Como fonte de excitação, além do LED azul monocromático exibido nesta figura também foram testados mais dois tipos de dispositivos facilmente encontrados no mercado: Módulo LED RoHS 5050-3LED e laser azul [9,12].

O biossensor é composto basicamente por materiais de fácil aquisição no mercado, quais sejam: uma fonte de excitação (LED), um filtro óptico e um resistor dependente de luz (LDR), utilizado como detector. Além desses componentes, existe ainda um conjunto de componentes eletrônicos

formando o circuito que permite o correto funcionamento do biossensor. A Fig. 5 mostra esquematicamente o circuito eletrônico utilizado.

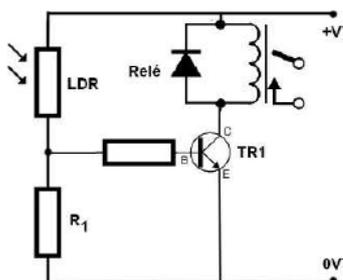


Fig. 5. Esquema do circuito eletrônico de controle do biossensor

A luz de excitação (LED azul) incide sobre a amostra contendo os microrganismos. Essa luz excita a amostra que emite luz na região do vermelho ($\lambda=700-750$ nm). O filtro permite somente a passagem de luz na região do vermelho, filtrando todos os outros comprimentos de onda. Assim, o detector LDR, localizado após o filtro, consegue detectar a luz vermelha que passou pelo filtro.

Na montagem do biossensor foi utilizado o filtro passa faixa (passa-banda) BP660 MidOptic. Esse filtro permite a passagem de luz entre $\lambda=680-720$ nm (faixa do vermelho), conforme demonstrado no *datasheet* disponibilizado no site do vendedor (Fig. 6).

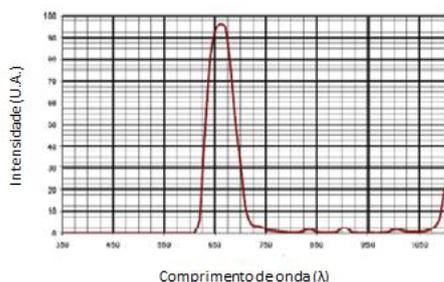


Fig. 6. Perfil de transmissão do filtro passa-faixa utilizado na montagem do dispositivo. A transmissão de luz pelo filtro ocorre somente entre 720 nm [15].

O detector (LDR) utilizado é similar ao das utilizadas para acendimento de luz ambiente na luz natural.

IV. RESULTADOS OBTIDOS

Os microrganismos analisados foram bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 29212 e ATCC 1578, e os fungos *Candida albicans* ATCC 10231 *Colletotrichum gloeosporioides* AB01 *Fusarium subglutinans* ABX01. As cepas encontravam-se criopreservadas, e para reativação utilizou-se um volume de 10 μ l de cultivo de cada microrganismo que foi plaqueado em meios de cultivo

seletivos ágar sal manitol (*S. aureus*), ágar Enterococcus (*E. faecalis*), eosina azul de metileno (*E. coli*), ágar S-S (*S. sonnei*) e ágar Sabouraud (*C. albicans*). As placas foram incubadas a 37°C/24 h e após o período de incubação, colônias típicas dos microrganismos foram repicadas em placas de ágar TSA (*tryptcase soy agar*), e incubadas novamente sob as mesmas condições. Colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo solução salina 0,85% e a densidade óptica ($\lambda = 600$ nm) da suspensão celular foi ajustada até atingir a concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/ml para bactérias e $1,0 \times 10^5$ UFC/ml (para os fungos) [16].

Na Fig. 7 são exibidos os espectros de emissão de todos os microrganismos já estudados neste projeto. Eles servem como resultados preliminares e são mostrados já normalizados em relação ao valor do primeiro pico. Pode perceber que todos os microrganismos estudados apresentam um pico estreito em $\lambda \sim 550$ nm e um segundo pico largo que em alguns microrganismos está localizado em torno de $\lambda \sim 700$ nm (curvas vermelha, verde e azul) e, em outros, está localizado em torno de $\lambda \sim 750$ nm.

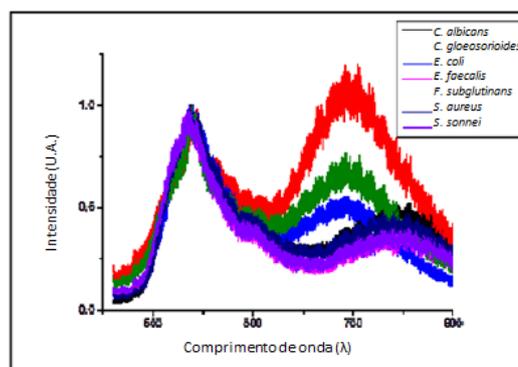


Fig. 7. Espectros de emissão de fotoluminescência dos sete microrganismos estudados preliminarmente já normalizados em relação ao valor do primeiro pico. Todos os microrganismos apresentam um pico estreito em $\lambda \sim 550$ nm e um segundo pico largo que em alguns microrganismos está localizado em torno de verde e azul) e, em outros, está localizado em torno de $\lambda \sim 750$ nm [11, 14, 15].

Após a adição do peptídeo (ELP), os espectros de emissão apresentam apenas um pico, como pode ser visto na Fig. 8 onde são apresentados os espectros de emissão originais de todos os microrganismos contendo ELP. A Fig. 9 apresenta os espectros de emissão de todos os microrganismos + ELP, normalizados em relação ao pico estreito ($\lambda \sim 550$ nm), ficando ainda mais evidente que, após a adição do ELP, as curvas são idênticas independentemente do microrganismo. O aparecimento do segundo pico no espectro de emissão de fotoluminescência e a sua supressão pela aplicação do ELP é a essência do biossensor objeto deste projeto.

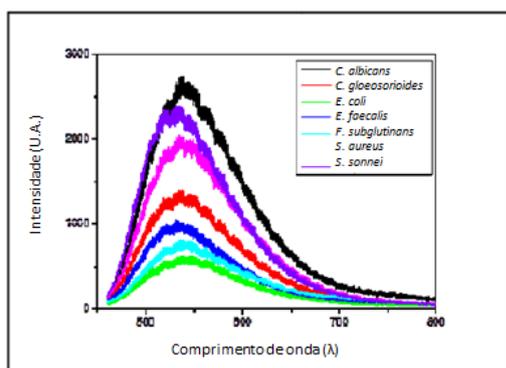


Fig. 8. Espectros de emissão de fotoluminescência de todos os microrganismos (conforme legenda) após a adição do peptídeo evidenciando a supressão do pico em $\lambda \sim 700\text{nm}$ e $\lambda \sim 750\text{nm}$ por conta do efeito antibacteriano do ELP [11, 14, 15].

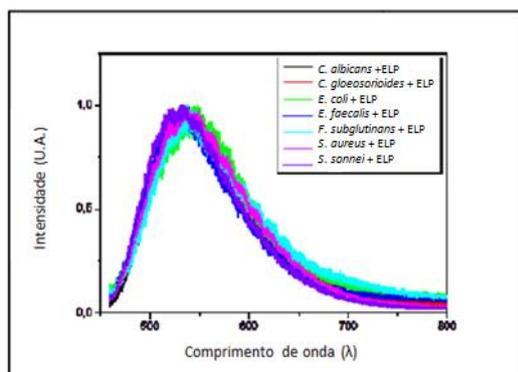


Fig. 9. Espectros de emissão de fotoluminescência de todos os microrganismos (conforme legenda) após a adição do ELP, para dados normalizados em relação ao valor máximo de emissão em torno de $\lambda \sim 550\text{nm}$; esse pico é comum a todos os microrganismos, assim como a supressão do pico à direita. Todas as curvas são equivalentes após a adição do ELP [11, 14, 15].

V. CONCLUSÕES

Atualmente, vários estudos têm sido realizados para desenvolvimento de sensores e biossensores ópticos para detecção de microrganismos patogênicos. A busca por novas ferramentas se deve à necessidade de métodos mais rápidos de detecção de patógenos visando, assim, a tomada de decisão imediata quanto à terapêutica a ser aplicada. A técnica de luminescência se mostrou eficiente na detecção dos microrganismos estudados. Foi possível verificar ainda que os microrganismos emitem luminescência em diferentes comprimentos de onda. Nos microrganismos estudados as emissões foram em $\lambda = 700\text{ nm}$ e $\lambda = 750\text{ nm}$. Os fungos *F. subglutinans*, *C. gloeosporioides* e a bactéria Gram-negativa *E. coli* apresentaram luminescência em $\lambda = 700\text{ nm}$, enquanto a bactéria Gram-negativa *S. sonnei*, fungo *C. albicans* e as bactérias Gram-positivas *E. faecalis* e *S. aureus* apresentaram luminescência em $\lambda = 750\text{ nm}$. Embora ainda não seja possível a determinação específica do microrganismo presente na amostra através dessa técnica, existe a possibilidade de determinar o conjunto de possíveis microrganismos de acordo com a faixa de emissão de luminescência. A obtenção do

espectro de luminescência de outros microrganismos futuramente possibilitará distribuí-los em grupos, de acordo com a faixa de emissão. Outro fator importante é a utilização do peptídeo *Polycerradin* no sistema de detecção. Anteriormente ficou comprovada a ação antimicrobiana desse peptídeo contra uma vasta gama de microrganismos. A ausência de luminescência na amostra após a adição do peptídeo é a chave para confirmação da presença de microrganismos na amostra. Este método de detecção de microrganismos é um grande avanço do ponto de vista biotecnológico com potencial de aplicação na saúde, agricultura, industrial e com potencial transbordamento para a área de Defesa Nacional e Segurança Pública, com possibilidade de emprego, especificamente, na área de Biosegurança.

REFERÊNCIAS

- [1] R.A. Calderone, Candida and Candidiasis. In Emerging Infectious Diseases, vol. 8, Ed M.E. Brandt, ASM Press, 2002, p. 358-367.
- [2] World Health Organization. Report on antimicrobial resistance. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Acesso em 14/05/2018.
- [3] P. Leonard et al., Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. Enzyme and Microbial Technology. 32: 3-13, 2003.
- [4] E. Tenenbaum e E. Segal. Optical biosensors for bacteria detection by a peptidomimetic antimicrobial compound. Analyst, 140, 7726-7733, 2015.
- [5] B. Valeur. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Germany: Wiley-VCH, 2001, ISBN 3-527-29919-X.
- [6] D.M. Livermore. The need for new antibiotics. Clinical Microbiology and Infection, vol 10, suppl 4, p. 1-9, 2004.
- [7] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks 2006. Nature Biotechnology, vol. 24, 1521 (2006).
- [8] A. Giuliani, G. Pirri, S.F. Nicoletto. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. Central European Journal of Biology, vol. 2, p. 1-33, 2007.
- [9] Hajji M, Jellouli K, Hmidet N, Balti R, Sellami-Kamoun A, Nasri M. (2010) A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization. J Ind Microbiol Biotechnol, 37(8): 805-13.
- [10] M. Harris, H.M. Mora-Montes, N.A.R. Gow, P.J. Coote, Loss of mannosylphosphate from *Candida albicans* cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. Microbiology, vol. 155, n. 4, p. 1058-1070, 2009.
- [11] Serrano, N. F. G. (2014). Produção de compostos antimicrobianos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D: otimização das condições de cultivo, purificação e caracterização dos bioprodutos. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 2014.
- [12] D. Harvey, Modern Analytical Chemistry. 1ª ed., Boston: McGraw-Hill, 2000.
- [13] A.G. Rodrigues e J.C. Galzerani. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades, Revista Brasileira de Ensino de Física, vol. 34, n. 4, p. 4309, 2012.
- [14] N.F.G.Serrano, B.da S. Thomazini, A.G. Rodrigues, F.M Araújo-Moreira. Biosensor óptico para detecção de microrganismos. Patente depositada junto ao INPI, 2018.
- [15] B. da S. Thomazini, Desenvolvimento de sensor óptico para detecção de microrganismos patogênicos. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 2016.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement. M100-S21. Wayne. 2011