



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Isabella Sampaio do Nascimento

**Propriedades espectroscópicas da ação antimicrobiana do
peptídeo *polycerradin***

São Carlos

2015

Isabella Sampaio do Nascimento

Propriedades espectroscópicas da ação antimicrobiana do peptídeo *polycerradin*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Física.

Área de concentração: Física da matéria condensada

Orientador: Prof. Dr. Fernando M. Araujo-Moreira

São Carlos

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

N244pe

Nascimento, Isabella Sampaio do.
Propriedades espectroscópicas da ação antimicrobiana
do peptídeo *polycerradin* / Isabella Sampaio do Nascimento.
-- São Carlos : UFSCar, 2015.
71 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

1. Física. 2. Espalhamento (Física). 3. Fotoluminescência.
4. Microrganismos. 5. Raman, Espectroscopia de. 6.
Tratamento antimicrobiano - infecções e infestações. I.
Título.

CDD: 530 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Física

Folha de Aprovação

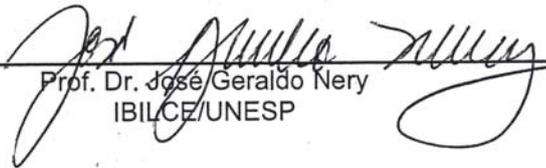
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Isabella Sampaio do Nascimento, realizada em 03/02/2015:



Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo Moreira
UFSCar



Prof. Dr. Ariano de Giovanni Rodrigues
UFSCar



Prof. Dr. José Geraldo Nery
IBILCE/UNESP

À minha mãe Rosemary, por todo apoio, amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha mãe Rosemary e ao meu padrasto Alfredo por me apoiarem em todos os momentos de minha vida e, sobretudo, por serem responsáveis pela minha formação pessoal. O amor e a força de vocês são imprescindíveis para que eu continue nessa longa caminhada.

Meus sinceros agradecimentos ao prof. Dr. José Geraldo Nery e a todo grupo LACET por serem responsáveis pela minha base científica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo-Moreira pela oportunidade a mim oferecida e pelo valioso conhecimento passado durante esses dois anos.

À Dra. Nadja F. G. Serrano pela colaboração fundamental para a execução deste projeto.

Aos professores, funcionários e alunos do departamento de Física da UFSCar, em especial, à Mariana, Pedro e Flávia por não só me auxiliarem nas questões científicas, mas também pela amizade construída.

Agradeço aos meus amigos, Leilane, Isabella, Gabriela, Levy, Felipe e Iago por terem tornado os meus dias em São Carlos mais felizes. A amizade e o companheirismo de vocês foram essenciais.

À Letícia Amorim pelo auxílio dado na escrita deste trabalho.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Ao grupo de semicondutores do Departamento de Física - UFSCar por terem disponibilizado, generosamente, os equipamentos necessários para a execução deste trabalho.

À minha família por todo apoio e torcida. Amo vocês.

“A física é muito mais do que a mera resolução de equações e interpretação de dados. Até arrisco dizer que existe poesia na física, que a física é uma expressão profundamente humana da nossa reverência à beleza da natureza.”

Marcelo Gleiser

RESUMO

A espectroscopia é uma técnica baseada na interação luz-matéria, que propicia a determinação de informações sobre a composição e a estrutura de moléculas. Por esse motivo, é utilizada em diversos campos da ciência, dentre eles, a biologia. Existem diversos tipos de espectroscopia, baseados em fenômenos físicos distintos, no entanto, neste trabalho, são abordados apenas dois tipos: Raman e de fotoluminescência. A espectroscopia Raman consiste na análise do espalhamento inelástico da radiação ao incidir sobre uma molécula. A interação luz-matéria, neste caso, resulta em uma alteração na energia vibracional molecular. Por outro lado, a espectroscopia de fotoluminescência analisa a radiação emitida por moléculas decorrente de transições eletrônicas, induzidas pela absorção de um fóton. O presente estudo aborda a aplicação de ambas as técnicas na problemática de combate a micro-organismos patogênicos. Alguns fungos e bactérias são causadores de doenças graves e, portanto, o aprimoramento da eficiência na identificação e combate à esses micro-organismos é de grande interesse para a saúde pública. Este trabalho visou a aplicação das espectroscopias Raman e de fotoluminescência para a identificação de três micro-organismos patogênicos e de alterações nos espectros emitidos por eles, ao se adicionar um agente antimicrobiano. Foi utilizado neste estudo um novo peptídeo com ação antifúngica e antibiótica, denominado de *polycerradin*, com atividade biológica comprovada por testes de difusão em ágar. Os espectros obtidos através da técnica de espalhamento Raman não foram conclusivos, uma vez que houve emissão de fotoluminescência concomitantemente. No entanto, os espectros de fotoluminescência mostraram uma significativa diminuição na intensidade do pico em 695 nm quando o extrato lipopeptídico (ELP) foi adicionado, para os três micro-organismos estudados. Estes resultados demonstram, portanto, a grande potencialidade da aplicação de espectroscopia de fotoluminescência, não só para a identificação dos micro-organismos, como também para a determinação da inibição e/ou morte dos mesmos ao se adicionar um agente antimicrobiano. Como perspectiva futura, objetivamos o desenvolvimento de um biossensor, baseado na técnica de fotoluminescência, a fim de se utilizar na identificação e no monitoramento de micro-organismos, podendo ser aplicado nas áreas médica, alimentícia, sanitária, dentre outras.

Palavras-chave: espectroscopia Raman, espectroscopia de fotoluminescência, micro-organismos patogênicos, peptídeo *polycerradin*.

ABSTRACT

The spectroscopy is a technique based on light-matter interaction, which provides information about the composition and structure of molecules. For this reason, it is used in various fields of science, including the biology. There are various types of spectroscopy, based on different physical phenomena, however, in this article, we had addressed only two types: Raman and photoluminescence. Raman spectroscopy consists in the analysis of the inelastic scattering of radiation by focusing on a molecule. The light-matter interaction in this case results in a molecular vibrational energy change. On the other hand, the photoluminescence spectroscopy analyzes the radiation emitted by molecules due to electronic transitions induced by absorption of a photon. This study addresses the application of both techniques in the problem of combating pathogenic microorganisms. Some fungi and bacteria are causative of serious diseases and, therefore, the enhancement of efficiency in identifying and combating these microorganisms is of great interest to public health. This work aimed the application of Raman spectroscopy and photoluminescence to the identification of three pathogenic microorganisms and changes in the spectra emitted by them by adding an antimicrobial agent. In this study a novel peptide with antifungal and antibiotic action was used, called *polycerradin*, with biological activity demonstrated by agar diffusion tests. The spectra obtained by the Raman scattering technique were not conclusive, since there was photoluminescence emission concomitantly. However, the photoluminescence spectra showed a significant decrease in peak intensity at 695 nm when the ELP was added, for all three microorganisms studied. These results demonstrate, therefore, the great potential application of photoluminescence spectroscopy not only for the identification of microorganisms as well as for determination of the inhibition and/or killing of the same by adding an antimicrobial agent. As a future prospect, we aim to develop a biosensor based on photoluminescence technique, to be used in the identification and monitoring of micro-organisms. This biosensor could be applied in various areas such as medical, food industry, sanitary, among others.

Keywords: Raman spectroscopy, photoluminescence spectroscopy, pathogenic microorganisms, peptide *polycerradin*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Espectro eletromagnético	15
Figura 2 - Principais interações luz-matéria.....	17
Figura 3 - Vibrações do tipo estiramento: (a) simétrico e (b) antissimétrico.....	18
Figura 4 – Vibrações do tipo deformação angular: (a) tesoura, (b) rotação, (c) balanço e (d) torção. O sinal positivo (+) indica movimento acima do plano e o sinal negativo (-) indica movimento abaixo do plano	19
Figura 5 – Tipos de espalhamento da luz.....	21
Figura 6 – Modelo de um espectrômetro Raman dispersivo.....	23
Figura 7 – Estados eletrônicos moleculares	28
Figura 8 – Processos responsáveis pela emissão de fotoluminescência	29
Figura 9 – Bandas de energia de semicondutores.....	30
Figura 10 – Transição eletrônica entre as bandas de energia de um semicondutor.....	30
Figura 11 – Processo de fotoluminescência em semicondutores	31
Figura 12 – Esquema simplificado de um experimento de fotoluminescência	32
Figura 13 – Diferença na parede celular entre bactérias gram-negativas e gram-positivas.....	34
Figura 14 - Aparato experimental utilizado para a obtenção dos espectros.....	40
Figura 15 – Lâmina contendo a amostra colocada no microscópio confocal	41
Figura 16 – Feixe proveniente do laser de argônio: a-) ao passar pelo monocromador	41
Figura 17 - Espectro de fotoluminescência, para dados não normalizados, do extrato lipopeptídico (ELP).....	43
Figura 18 – Espectro de fotoluminescência do fungo <i>C. albicans</i> , para dados não normalizados.....	44
Figura 19 - Espectro de fotoluminescência do fungo <i>C. albicans</i> logo após a adição do ELP, para dados não normalizados.....	45

Figura 20- Espectro de fotoluminescência do fungo <i>C. albicans</i> após quinze minutos da adição do ELP, para dados não normalizados.	45
Figura 21 – Espectros de fotoluminescência do fungo <i>C. albicans</i> sobrepostos, para dados não normalizados. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.	46
Figura 22- Espectros de fotoluminescência do fungo <i>C. albicans</i> sobrepostos, para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.....	46
Figura 23 – Espectro de fotoluminescência da amostra contendo apenas a bactéria <i>E. coli</i> , para dados não normalizados.	48
Figura 24 – Espectro de fotoluminescência da bactéria <i>E. coli</i> logo após a adição do ELP, para dados não normalizados.	48
Figura 25 – Espectro de fotoluminescência da bactéria <i>E. coli</i> após quinze minutos da adição do ELP, para dados não normalizados	49
Figura 26 – Espectros de fotoluminescência da bactéria <i>E. coli</i> sobrepostos, para dados não normalizados. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.	49
Figura 27 - Espectros de fotoluminescência do fungo <i>E. coli</i> sobrepostos, para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.....	50
Figura 28 – Espectro de fotoluminescência da amostra contendo apenas a bactéria <i>S. aureus</i> , para dados não normalizados.	51
Figura 29 - Espectro de fotoluminescência da bactéria <i>S. aureus</i> logo após a adição do ELP, para dados não normalizados.	52
Figura 30 – Espectro de fotoluminescência da bactéria <i>S. aureus</i> após quinze minutos da adição do ELP, para dados não normalizados.	52
Figura 31 - Espectros de fotoluminescência da bactéria <i>S. aureus</i> sobrepostos, para dados não normalizados. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.	53

Figura 32 - Espectros de fotoluminescência da <i>S. aureus</i> sobrepostos, para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.....	53
Figura 33 - Sobreposição dos espectros de fotoluminescência dos micro-organismos puros, para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa.	55
Figura 34 – Sobreposição dos espectros de fotoluminescência dos micro-organismos com a adição de ELP, para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa.	55
Figura 35 – Sobreposição dos espectros de fotoluminescência dos micro-organismos após quinze minutos da adição de ELP para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa.....	56
Figura 36 – Espectro de espalhamento Raman para o fungo <i>Candida albicans</i> puro, para dados não normalizados.	57
Figura 37 - Espectro de espalhamento Raman para o fungo <i>Candida albicans</i> com a adição de ELP, para dados não normalizados.	57
Figura 38 – Espectro de espalhamento Raman para o fungo <i>Candida albicans</i> após quinze minutos da adição de ELP, para dados não normalizados.	58
Figura 39 – Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman para o fungo <i>Candida albicans</i> , para dados não normalizados.....	58
Figura 40 - Espectro de espalhamento Raman para a bactéria <i>E. coli</i> pura, para dados não normalizados.	59
Figura 41 - Espectro de espalhamento Raman para a bactéria <i>E. coli</i> com a adição de ELP, para dados não normalizados.....	60
Figura 42 - Espectro de espalhamento Raman para a bactéria <i>E. coli</i> após quinze minutos da adição de ELP, para dados não normalizados.	60
Figura 43 – Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman da bactéria <i>E. coli</i> , para dados não normalizados.....	61
Figura 44 - Espectro de espalhamento Raman para a bactéria <i>S. aureus</i> pura, para dados não normalizados.	62

Figura 45- Espectro de espalhamento Raman para a bactéria <i>S. aureus</i> pura, para dados não normalizados.	62
Figura 46- Espectro de espalhamento Raman para a bactéria <i>S. aureus</i> após quinze minutos da adição de ELP, para dados não normalizados.	63
Figura 47- Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman da bactéria <i>S. aureus</i> , para dados não normalizados.....	63
Figura 48 – Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman dos micro-organismos puros, para dados não normalizados.	64
Figura 49- Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman dos micro-organismos com adição de ELP, para dados não normalizados.....	65
Figura 50- Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman dos micro-organismos após quinze minutos da adição de ELP, para dados não normalizados.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de luminescência	26
Tabela 2 – Informações fornecidas por sondas fluorescentes em sistemas biológicos..	33
Tabela 3 - Análise da razão entre as intensidades dos picos para os espectros do fungo <i>C. albicans</i> , considerando os dados não normalizados.....	47
Tabela 4 - Análise da razão entre as intensidades dos picos para os espectros da bactéria	50
Tabela 5 - Análise da razão entre as intensidades dos picos para os espectros da bactéria	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Radiação eletromagnética.....	15
2.2 Aproximação de Born-Oppenheimer	16
2.3 Interação Luz-matéria.....	16
2.4 Vibração molecular	17
2.4.1 Modos normais de vibração	17
2.4.2 Espectros vibracionais	19
2.5 Espectroscopia Raman	20
2.5.1 Contexto histórico e efeito Raman	20
2.5.2 Polarizabilidade	21
2.5.3 Técnicas e instrumentação	23
2.5.4 Aplicações.....	24
2.6 Espectroscopia de fotoluminescência.....	25
2.6.1 Contexto histórico e fenômeno de luminescência	25
2.6.2 Fotoluminescência	27
2.6.3 Instrumentação	31
2.6.4 Aplicações.....	32
2.7 Micro-organismos	33
2.7.1 Bactérias.....	34
2.7.2 Fungos.....	36
2.8 Modo de ação dos compostos antimicrobianos	36
2.9 Agente antimicrobiano - peptídeo <i>polycerradin</i>	37
3 EXPERIMENTAL	38

3.1	Preparação das amostras.....	38
3.2	Instrumentação espectroscópica.....	39
3.3	Medidas dos espectros.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Espectros de fotoluminescência	43
4.2	Espectros de espalhamento Raman	56
5	CONCLUSÕES	66
6	PERSPECTIVAS	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

Muitos micro-organismos exibem comportamento patogênico, causando doenças graves como tuberculose, cólera e meningite. O combate a eles é, portanto, um problema de saúde pública e enfrenta diversos desafios como a necessidade de desenvolvimento de um método de diagnóstico mais rápido e preciso, de novos agentes antimicrobianos, visto que algumas bactérias tem se tornado resistentes aos já existentes, e do acompanhamento da ação deles sobre os micro-organismos, a fim de verificar a sua eficiência.

Este trabalho visa solucionar alguns desses desafios, utilizando as técnicas de espectroscopia de fotoluminescência e de espalhamento Raman para avaliar possíveis alterações nas propriedades espectroscópicas dos micro-organismos, quando um novo agente antimicrobiano, o peptídeo *polycerradin*, é adicionado aos mesmos. Desta maneira, seria possível o desenvolvimento de um biossensor que identificasse o micro-organismo, através dos espectros emitidos por ele, e determinasse a porcentagem de inibição e/ou morte do mesmo, ao se adicionar um agente antimicrobiano, com base nas alterações observadas no espectro. O desenvolvimento de um biossensor que atuasse desta forma implicaria na obtenção de um tratamento mais eficiente para doenças causadas por micro-organismos patogênicos, refletindo em redução de custos na saúde pública e melhoria na qualidade de vida da população.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Radiação eletromagnética

A energia eletromagnética é produzida pela oscilação dos campos elétrico e magnético, se propagando na forma de radiação. A energia transportada pelas ondas eletromagnéticas é quantizada em pacotes concentrados, denominados fótons, sendo descrita em termos de duas propriedades fundamentais: comprimento de onda (λ) e frequência (ν). As relações entre essas grandezas são dadas nas seguintes equações:

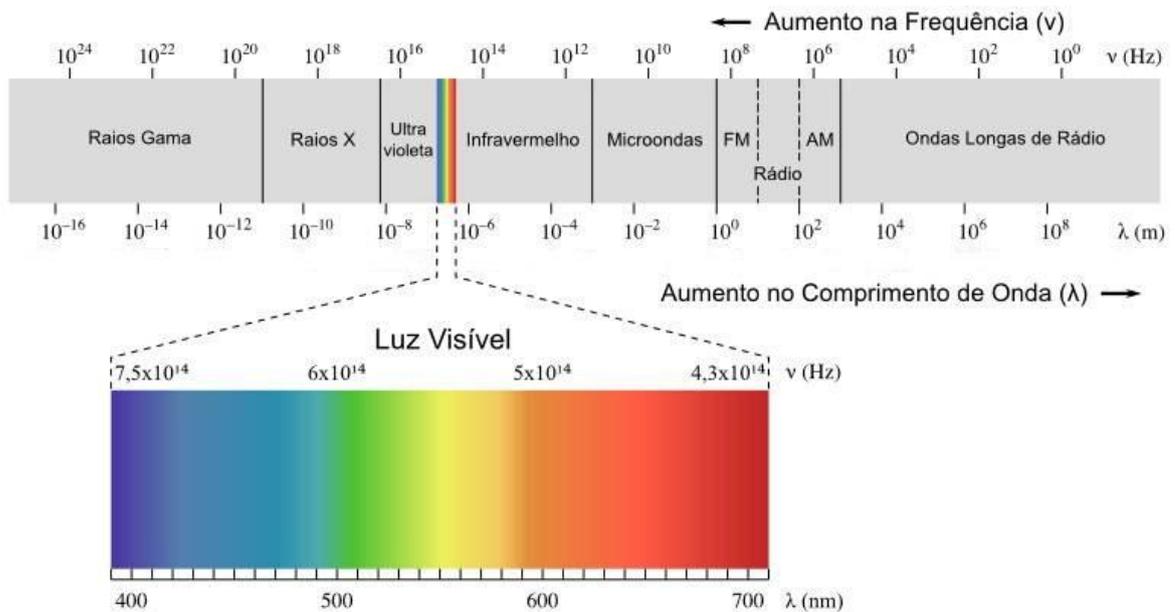
$$E = h\nu \quad (1)$$

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (2)$$

onde h é a constante de Planck e c é a velocidade da luz no vácuo¹.

A radiação eletromagnética é classificada em uma determinada região de acordo com seu comprimento de onda. O conjunto dessas regiões é denominado espectro eletromagnético (figura 1).

Figura 1- Espectro eletromagnético



Fonte: Adaptado de Luz, tecnologia e arte².

2.2 Aproximação de Born-Oppenheimer

A energia total de uma molécula é a soma entre a contribuição energética, advinda de interações intramoleculares, e os diferentes tipos de movimento que a molécula executa. As principais formas de energia de uma molécula são: translacional, vibracional, rotacional e eletrônica.

A energia rotacional se deve ao movimento de rotação da molécula, em torno do eixo que passa no seu centro de gravidade, e à radiação necessária para induzir transições entre seus níveis está na faixa de micro-ondas. O movimento da molécula como um todo origina a energia translacional, enquanto que o deslocamento dos átomos, que compõem a molécula, em torno da posição de equilíbrio deles origina a energia vibracional, cujas transições entre seus níveis são excitadas por radiações na faixa próxima ao infravermelho. Por fim, a energia eletrônica advém do movimento dos elétrons presentes nos átomos e a radiação de excitação para induzir transições entre seus níveis ocorre na região da luz visível e ultravioleta³.

A aproximação de Born-Oppenheimer consiste em desacoplar as energias eletrônicas das nucleares, ou seja, considerá-las independentes umas das outras, fundamentando-se no fato de que a massa dos elétrons é muito menor que a massa do núcleo e, portanto, que a configuração eletrônica se adapta mais facilmente à configuração nuclear⁴.

Além disso, uma vez que o movimento translacional não sofre influência dos outros movimentos executados pela molécula, e que as energias vibracionais são muito maiores em magnitude do que as energias rotacionais, esses três tipos de energia podem ser considerados separadamente, facilitando a análise individual de cada um deles³.

2.3 Interação Luz-matéria

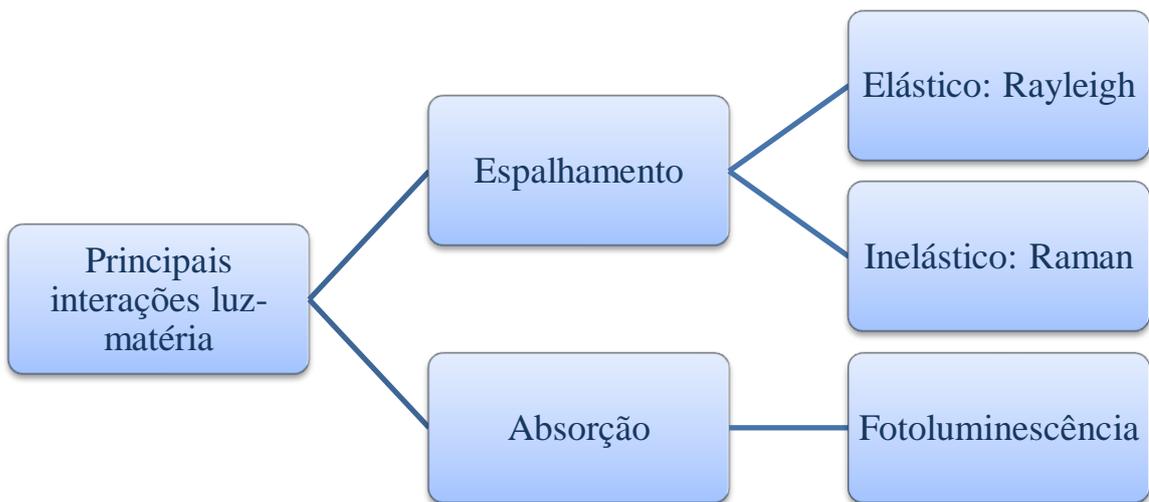
A incidência de radiação eletromagnética sobre moléculas pode resultar na ocorrência de diversos fenômenos físicos. Em geral, quando a radiação está na faixa de luz visível, a interação com a molécula pode ocorrer por dois processos fundamentais: o de absorção do fóton e o de espalhamento dele.⁵

O processo de absorção do fóton consiste na transição da molécula de um estado eletrônico menos energético para um estado mais energético (estado excitado). Quando a molécula retorna para o seu estado inicial, há a liberação do excesso de energia, podendo ser com a emissão de um fóton, processo denominado fotoluminescência, ou na forma de calor.⁶

No espalhamento, a radiação incidente em uma determinada direção pode ser desviada para outra direção. Esse processo é dividido em duas classes: a do espalhamento elástico, em que a radiação espalhada possui o mesmo comprimento de onda da radiação incidente (Rayleigh), e a do espalhamento inelástico, em que há uma variação no comprimento de onda entre a radiação incidente e a espalhada, cujo tipo principal é conhecido como espalhamento Raman⁵. Essas interações estão resumidas na figura 2.

Cada tipo de interação entre a radiação e a matéria (moléculas) possui características únicas e, por esse motivo, seus respectivos espectros fornecem informações distintas sobre as moléculas. Foram desenvolvidas técnicas, fundamentadas em fenômenos físicos diferentes, a fim de se analisar a especificidade de cada uma dessas interações. Nesse estudo, restringiremos a nossa abordagem às técnicas de espectroscopia Raman, baseada na energia vibracional molecular, e na espectroscopia de fotoluminescência, baseada na energia eletrônica das moléculas.

Figura 2- Principais interações luz-matéria



2.4 Vibração molecular

2.4.1 Modos normais de vibração

Cada átomo possui três graus de liberdade, uma vez que eles podem se movimentar nas direções x , y e z . Em uma molécula com N átomos, existem $3N$ eixos de movimento, sendo que três deles são rotacionais e outros três são translacionais. Portanto, cada molécula

possui $3N-6$ graus de liberdade no movimento vibracional, com exceção às moléculas lineares que possuem $3N-5$ modos de vibração⁷.

A pequena amplitude das vibrações moleculares bem como o fato da força de restauração que age sobre os átomos ser proporcional ao deslocamento deles em relação a sua posição de equilíbrio faz com que o movimento harmônico simples seja uma boa aproximação para o movimento vibracional executado pelas moléculas.

De acordo com a teoria quântica para o oscilador harmônico, a energia vibracional molecular só pode assumir valores discretos, dados pela seguinte equação:

$$E_v = \hbar\omega \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad (3)$$

onde ω é a frequência de oscilação e v é o número quântico vibracional³.

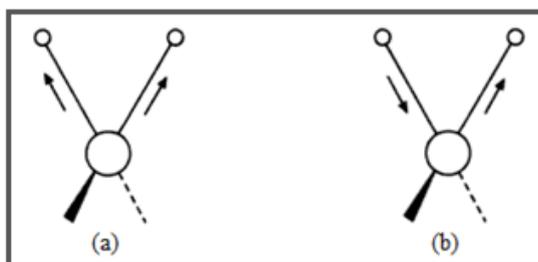
A discretização das energias implica na restrição das transições permitidas entre níveis vibracionais, de maneira que a regra de seleção para essas transições é dada por:

$$\Delta v = \pm 1 \quad (4)$$

É denominado modo normal de vibração a configuração em que todos os átomos na molécula vibram com a mesma frequência e passam pela posição de equilíbrio simultaneamente⁴. Cada um deles possui uma frequência de vibração única e uma estrutura de vibração que pode ser classificada em dois grupos fundamentais: estiramento (*stretching*) e deformação angular (*bending*)^{8,9}.

O estiramento é caracterizado pela variação do comprimento da ligação, podendo ocorrer de duas formas: simétrica e assimétrica. No estiramento simétrico, os átomos se movimentam na mesma direção em relação ao átomo central (figura 3a). Já no estiramento assimétrico, o movimento dos átomos ocorre em direções opostas (figura 3b)^{8,9}.

Figura 3 - Vibrações do tipo estiramento: (a) simétrico e (b) antissimétrico.



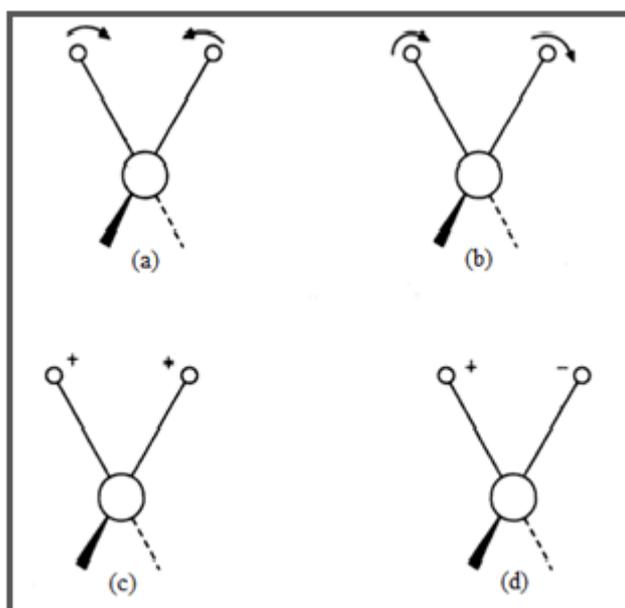
Fonte: Adaptado de Yadav⁸.

As vibrações do tipo deformação angular ocorrem com a variação do ângulo entre duas ligações e são classificadas em quatro grupos: tesoura (*scissoring*), rotação (*rocking*), balanço (*wagging*) e torção (*twisting*).

Nos modos de vibração dos tipos tesoura e rotação, a variação angular ocorre no mesmo plano das ligações, sendo que no modelo de tesoura, os átomos se aproximam uns dos outros (figura 4a), movimentando-se em direções opostas. Já no modelo de rotação, o movimento dos átomos ocorre na mesma direção (figura 4b)^{8,9}.

Por outro lado, as vibrações do tipo balanço e torção são caracterizadas pelo movimento perpendicular dos átomos em relação ao plano das ligações. No tipo balanço, os átomos se movimentam simultaneamente para cima e para baixo do plano (figura 4c), enquanto que no tipo torção, um átomo se movimenta para cima do plano no mesmo momento em que outro átomo se movimenta para baixo dele (figura 4d).

Figura 4 – Vibrações do tipo deformação angular: (a) tesoura, (b) rotação, (c) balanço e (d) torção. O sinal positivo (+) indica movimento acima do plano e o sinal negativo (-) indica movimento abaixo do plano



Fonte: Adaptado de Yadav⁸.

2.4.2 Espectros vibracionais

Cada molécula apresenta um espectro vibracional único, que contém bandas características resultantes de toda a complexidade encontrada na molécula. A partir de uma

análise refinada desses espectros, é possível determinar os grupos químicos e o modo normal de vibração da molécula bem como o arranjo e a simetria dela³.

2.5 Espectroscopia Raman

2.5.1 Contexto histórico e efeito Raman

Assim como tantas outras grandes descobertas na ciência, o interesse pelo estudo nessa área, até a efetiva descoberta do efeito Raman foi impulsionado por grandes descobertas anteriores. Em 1921, Albert Einstein ganhou o prêmio Nobel em física pela descoberta do efeito fotoelétrico, que consiste na emissão de elétrons de um material quando o mesmo é submetido a incidência de uma radiação eletromagnética. Em seguida, no ano de 1923, o físico estadunidense chamado Arthur Holly Compton observou a mudança no comprimento de onda de um fóton de raios-X quando este colidia com elétrons livres de um material, nomeado como efeito Compton¹⁰.

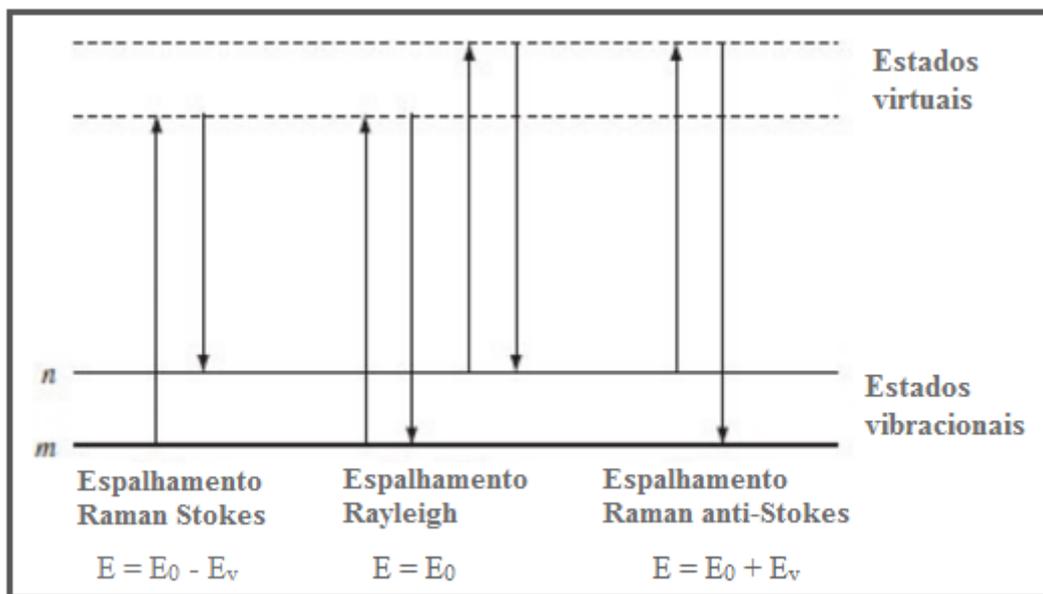
Foi nesse cenário que, após cinco anos da descoberta de Compton, o físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman e seu estudante Kariamanikam Srinivasa Krishnan observaram o fenômeno do espalhamento inelástico da luz visível, que ficou conhecido como efeito Raman¹¹. No caso do efeito Compton, a interação inelástica entre os raios-X e a matéria se deve à troca de uma certa quantidade de *momentum*, enquanto que no efeito Raman a troca de energia depende da existência de níveis vibracionais moleculares adequados. De fato, estudos subsequentes mostraram que no espalhamento Raman, ao incidir sobre a molécula, a luz distorce a nuvem eletrônica dela, polarizando-a. Então, é originado um estado de curta duração, denominado estado virtual, visto que ele não corresponde a um autoestado da molécula, que devido a sua instabilidade reemite rapidamente o fóton absorvido.

Se a radiação incide no momento em que a molécula está em sua posição de equilíbrio, onde a polarizabilidade é constante, não há troca de energia entre o fóton e a molécula, de maneira que o fóton espalhado tem energia igual ao do fóton incidente e, neste caso, o espalhamento é denominado de Rayleigh¹².

Por outro lado, se a radiação incide quando a molécula está deslocada de sua posição de equilíbrio, por exemplo, durante os movimentos de rotação e vibração, a polarizabilidade não é mais constante, uma vez que durante esses movimentos a nuvem eletrônica da molécula

é alterada. Neste caso, a interação é acompanhada de troca de energia entre o fóton e a molécula e, portanto, o fóton espalhado terá energia diferente da energia do fóton incidente. Quando o fóton interage com a molécula de maneira a ganhar energia vibracional (E_v) dela, a energia resultante (E) será maior do que a energia do fóton incidente (E_0) e, nesse caso, o espalhamento é conhecido como Raman anti-Stokes. Se a molécula retira energia do fóton, transformando-a em energia vibracional, o fóton resultante terá uma energia menor do que o incidente, e a este processo é dado o nome de espalhamento Raman Stokes (figura 5)^{12,13}.

Figura 5 – Tipos de espalhamento da luz.



Fonte: Adaptado de Smith¹².

2.5.2 Polarizabilidade

Como mencionado anteriormente, a luz incidente sobre a molécula causa a distorção da nuvem eletrônica da mesma. Isso ocorre porque o campo elétrico oscilante da luz induz um momento de dipolo na molécula, que oscila com a mesma frequência dele. Então, o momento de dipolo induzido (μ_{in}) depende linearmente do campo elétrico aplicado (E) e a constante de proporcionalidade entre eles é denominada polarizabilidade (α), que pode ser interpretada como a habilidade de um campo elétrico de induzir um momento de dipolo no átomo ou molécula. A relação descrita acima é representada na seguinte equação¹⁴:

$$\vec{\mu}_{in} = \alpha \vec{E} \quad (5)$$

Entretanto, em moléculas que executam movimento de rotação ou vibração, a polarizabilidade não é constante, visto que a nuvem eletrônica é alterada durante esses movimentos. Para pequenas variações, a polarizabilidade pode ser expandida em série de Taylor, como a seguir:

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial Q} Q + \dots \quad (6)$$

onde α_0 é a polarizabilidade na situação de equilíbrio da molécula, Q é a coordenada em que o movimento ocorre e $\frac{\partial \alpha}{\partial Q}$ é a variação da polarizabilidade com relação a coordenada Q .

Sabendo-se que o campo elétrico e a coordenada Q são funções periódicas dadas por:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos 2\pi\omega t \quad (7)$$

$$\vec{Q} = \vec{Q}_0 \cos 2\pi\nu t \quad (8)$$

com E_0 e ω representando a amplitude e a frequência de oscilação do campo elétrico, respectivamente, e Q_0 e ν representando a amplitude e a frequência de oscilação da coordenada Q , podemos substituí-las na equação (5) de maneira a obter:

$$\vec{\mu}_{in} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos 2\pi\omega t + \frac{\partial \alpha}{\partial Q} (\vec{Q} = \vec{Q}_0 \cos 2\pi\nu t) (\vec{E}_0 \cos 2\pi\omega t) \quad (9)$$

Utilizando a relação trigonométrica dada por:

$$\cos a \cos b = \frac{\cos(a-b) + \cos(a+b)}{2} \quad (10)$$

Obtemos a equação final para o momento de dipolo induzido na molécula:

$$\vec{\mu}_{in} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos 2\pi\omega t + \frac{\partial \alpha}{\partial Q} \frac{1}{2} \vec{Q}_0 \vec{E}_0 [\cos 2\pi(\omega-\nu) + \cos 2\pi(\omega+\nu)] \quad (11)$$

Verifica-se que os três termos da equação (11) referem-se aos três tipos de espalhamento, Rayleigh, Raman Stokes e Raman anti-Stokes, respectivamente, e que concordam com a regra de seleção imposta para transições entre níveis vibracionais (equação 4). Além disso, quando não há variação na polarizabilidade ($\frac{\partial \alpha}{\partial Q} = 0$), os termos que se referem ao espalhamento Raman possuem amplitude igual a zero, concluindo-se que para uma vibração molecular gerar

espalhamento Raman, a vibração deve ser acompanhada de uma mudança na polarizabilidade da molécula⁷.

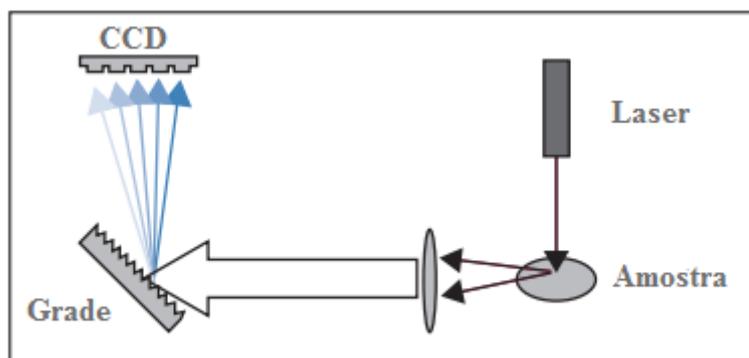
2.5.3 Técnicas e instrumentação

A espectroscopia Raman é uma importante técnica de caracterização que possibilita a análise de materiais de maneira rápida e não-destrutiva, minimizando a necessidade de manipulação das amostras, que implica muitas vezes na obtenção de resultados inequívocos.

Os espectrômetros baseados no espalhamento Raman são constituídos basicamente por um laser como fonte de excitação, um monocromador responsável por selecionar uma faixa de comprimento de onda, um suporte para a amostra e um detector ou sistema de armazenamento. Existem duas tecnologias que são normalmente utilizadas para coletar o espectro Raman: a espectroscopia Raman por transformada de Fourier (FT-Raman) e a espectroscopia Raman dispersiva, utilizada neste trabalho. Cada uma delas possui uma particularidade e é mais adequada para um determinado tipo de análise¹³.

A espectroscopia Raman dispersiva utiliza um laser com radiação na luz visível, como, por exemplo, o laser de argônio ($\lambda = 514,5$ nm). A luz proveniente do laser incide sobre a amostra e é espalhada na forma de luz dispersa, que por sua vez é focada para uma grade de difração (monocromador dispersivo) onde a luz é dividida nos comprimentos de onda que a constituem. Por fim, a radiação é dirigida para um detector do tipo CCD, que possibilita a análise do espectro (figura 6). No entanto, o baixo comprimento de onda desse tipo de laser faz com que os espectros de fotoluminescência, que possuem maior intensidade, sobressaiam aos espectros de espalhamento Raman, impossibilitando a visualização dos mesmos^{13, 15}.

Figura 6 – Modelo de um espectrômetro Raman dispersivo



Fonte: Thermo Fisher Scientific¹⁵.

Além disso, pode ser acoplado ao espectrômetro Raman dispersivo um microscópio óptico a fim de aumentar a resolução espacial para o nível de micrômetro, possibilitando a análise de amostras muito pequenas¹⁵.

2.5.4 Aplicações

Assim como discutido nos itens precedentes, as moléculas apresentam uma espécie de assinatura, que é determinada pelo arranjo dos átomos, os grupos químicos presentes, o modo vibracional, entre outras características. Dessa forma, a espectroscopia Raman atua, de uma maneira geral, no reconhecimento das moléculas e na caracterização delas. Nesse âmbito, as principais aplicações dessa técnica são nos campos da ciência forense, ciência dos materiais, diagnóstico de doenças e microbiologia¹³.

Na ciência forense, a capacidade de se obter uma resolução espacial no nível de micrômetros faz da espectroscopia Raman dispersiva uma técnica de grande potencial para análises de fluídos biológicos, possibilitando uma melhor interpretação de cenas de crimes marcadas com esse tipo de material. Já a espectroscopia FT-Raman é comumente utilizada para a identificação de drogas e explosivos, visto que esses materiais são normalmente contaminados com substâncias que florescem quando excitadas com radiação de luz visível, e uma técnica que elimine a interferência da fluorescência é necessária para poder identificar corretamente essas substâncias¹⁷.

No campo da ciência dos materiais, as medidas de espectro Raman são adequadas para a determinação da composição de materiais arqueológicos, investigação das propriedades físicas de semicondutores e de nanomateriais. Os materiais carbonosos na escala nanométrica podem exibir características físico-químicas distintas, ainda que tenham a mesma composição química, decorrentes de defeitos estruturais como vacâncias¹⁸. A determinação dos defeitos estruturais pode ser obtida através do uso de espectroscopia Raman, permitindo a compreensão das propriedades apresentadas por esses tipos de materiais.

Em diagnóstico, a técnica mencionada possui grande potencialidade para a detecção de patologias, como o câncer e o Alzheimer.

Sabe-se que muitas doenças são correlacionadas com variações em componentes biológicos como proteínas e ácidos nucleicos. Dessa maneira, os picos Raman característicos dessas macromoléculas servem como indicativos para diferenciar tecidos saudáveis de tecidos patológicos. O uso da espectroscopia Raman, para essa finalidade, é vantajosa em relação às

demais técnicas de diagnóstico, por se tratar de uma técnica minimamente invasiva e por propiciar informações mais específicas sobre os componentes biológicos presentes nos tecidos doentes¹⁹.

Na área de microbiologia, técnicas rápidas e precisas de identificação de micro-organismos são imprescindíveis para conter o avanço de doenças infecciosas graves causadas por eles, bem como para a prescrição de tratamentos mais direcionados e eficazes. A espectroscopia Raman tem sido cada vez mais utilizada no reconhecimento desses agentes etiológicos, uma vez que eles apresentam espectros Raman únicos. Além disso, é possível identificar modificações estruturais em bactérias super-resistentes, contribuindo para o desenvolvimento de novos antibióticos^{20, 21}.

2.6 Espectroscopia de fotoluminescência

2.6.1 Contexto histórico e fenômeno de luminescência

A denominação luminescência advém da palavra *lúmen*, do latim, que significa luz e foi introduzida inicialmente como *luminescenz*, pelo físico Eilhardt Wiedemann em 1888, para descrever a emissão de luz que ocorria por meios que não fossem o da excitação térmica⁶.

Emissões de luminescência são responsáveis por diversos fenômenos encontrados na natureza como, por exemplo, a aurora boreal e a luminosidade observada em peixes, vaga-lumes, madeiras e no mar²².

Os primeiros registros sobre o fenômeno de luminescência foram feitos por volta de 1500-1000 a.C. e tratavam sobre a luminosidade dos vaga-lumes.

Em 1565, o físico espanhol Nicolas Monardes relatou a emissão de uma luz azul quando um extrato de madeira, conhecido como *Nephriticum Lignum*, era colocado em água quente (infusão). Em seguida, vários cientistas, como Athanasius Kircher, Robert Boyle, Issac Newton e Robert Hooke, estudaram a luminescência de extratos vegetais em meio aquoso²².

Existe uma ampla diversidade de compostos luminescentes que são agrupados da seguinte maneira⁶:

- Compostos orgânicos: hidrocarbonetos aromáticos (naftaleno, antraceno, fenantreno, etc.), derivados (rodamina, fluoresceína, etc) e alguns aminoácidos (fenilalanina, tirosina e triptofano).
- Compostos inorgânicos: íon uranilo (UO_2^{2+}), íons lantanídeos (Eu^{3+} , Tb^{3+}), vidros dopados (com Nd, Mn, Ce, Cu, Ag, etc..), cristais (ZnS, CdS, ZnSe, etc.), nanotubos de carbono e alguns fulerenos.
- Compostos organometálicos: Complexos com porfirina, rutênio, cobre, etc.

Rigorosamente, a luminescência é definida como a emissão de fótons na faixa de energia que vai desde a região do ultravioleta até a região do infravermelho, por moléculas que se encontram em um estado eletrônico excitado. Existem diferentes tipos de luminescência que são classificados de acordo com a maneira com que a excitação é induzida. A relação deles é apresentada na tabela 1.

Tabela 1– Tipos de luminescência

Fenômeno	Modo de excitação
Fotoluminescência	Absorção de luz
Radioluminescência	Radiação ionizante (Raios-X, α, β, γ)
Catodoluminescência	Raios catódicos (feixe de elétrons)
Eletroluminescência	Campo elétrico
Termoluminescência	Absorção de energia térmica
Quimioluminescência	Reação química (ex: oxidação)
Bioluminescência	Ocorrência de quimioluminescência em organismos vivos
Triboluminescência	Fricção e forças eletrostáticas
Sonoluminescência	Ultrassom

2.6.2 Fotoluminescência

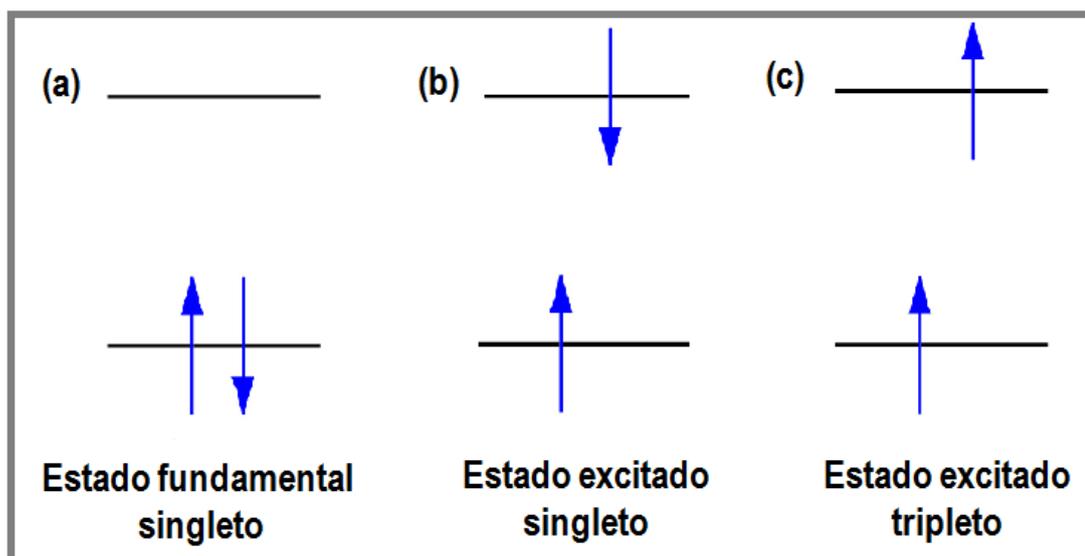
A origem do fenômeno de fotoluminescência foi descoberta pelo físico irlandês George Gabriel Stokes e publicada em 1852 no famoso artigo intitulado “Sobre a refringência da luz”. Nele, Stokes demonstrou que esse fenômeno óptico consistia na emissão de luz decorrente da absorção de um fóton específico e que o comprimento de onda da radiação emitida era sempre maior do que o comprimento de onda da radiação absorvida. Esse princípio ficou conhecido como a lei de Stokes⁶.

Nesse mesmo artigo, Stokes inseriu o termo fluorescência para denominar o fenômeno observado no experimento realizado por ele, em que uma solução de sulfato de quinina emitia luz azul quando a mesma era irradiada com fótons na região do ultravioleta. Esse termo é uma analogia à luminosidade exibida por uma variedade de fluoritas que, no entanto, advém de impurezas contidas nelas e não do fluoreto de cálcio.

A fotoluminescência é dividida em duas categorias, a fluorescência e a fosforescência, de acordo com os estados dos spins dos níveis eletrônicos envolvidos na transição.

O estado fundamental ocupado por um par de elétrons com spins anti-paralelos (emparelhados) é denominado estado singleto. Quando um dos elétrons é promovido a um estado excitado (mais energético), conservando o seu spin, então o estado recebe o nome de estado excitado singleto. Entretanto, quando não há a conservação do spin, ou seja, os elétrons tornam-se desemparelhados, o estado é denominado como estado excitado tripleto⁵. Esses estados estão representados na figura 7.

Figura 7 – Estados eletrônicos moleculares



Fonte: Elaborado pela autora.

A emissão de um fóton decorrente de uma transição entre níveis com spins emparelhados, ou seja, se houver uma transição de um estado excitado singlete para um estado singlete ou entre dois estados excitados singlete, é denominada fluorescência.

A probabilidade de uma transição de fluorescência é muito alta e ocorre rapidamente, visto que o tempo de vida médio do elétron no estado excitado é de 10^{-8} a 10^{-5} s. Entretanto, esse tipo de fotoluminescência decai também de maneira rápida, depois que a fonte de excitação é removida, podendo durar de 10^{-12} a 10^{-9} s²³.

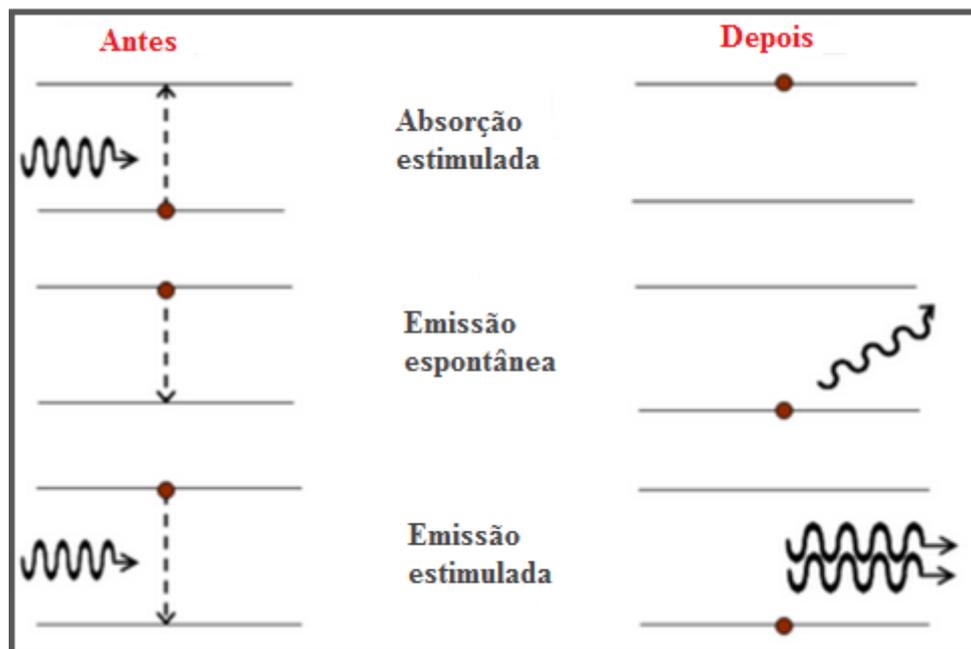
É possível que haja transições entre níveis com estados de spins diferentes, como, por exemplo, de um estado excitado tripleto para um estado singlete. Nesse caso, o fenômeno fotoluminescente recebe o nome de fosforescência.

A fosforescência tem um tempo de vida médio que varia entre 10^{-4} até 10^4 segundos, podendo ser observada por um tempo maior que a fluorescência após a fonte de excitação ter sido removida²⁴.

Em ambos os fenômenos fotoluminescentes mencionados, a emissão de luz decorre da absorção de um fóton que tenha energia igual ao *gap* entre o nível em que o elétron se encontra e um nível de energia superior, de maneira a induzir a transição do elétron para o nível de maior energia. A desexcitação do elétron pode ocorrer de maneira espontânea ou estimulada. No caso da desexcitação espontânea, a transição do elétron, para o nível de menor

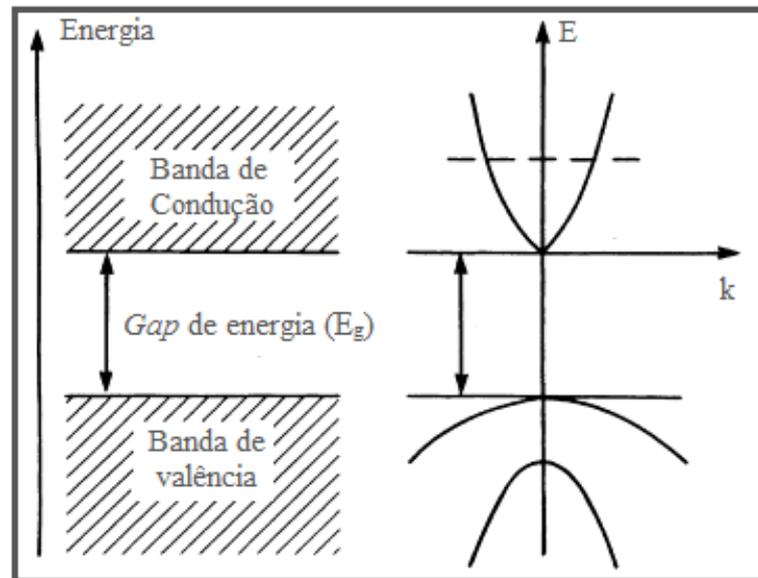
energia, é acompanhada da emissão de um fóton com a mesma energia do fóton incidente, mas não necessariamente na mesma direção. Este é o caso dos fenômenos de fluorescência e fosforescência. Na desexcitação estimulada, um segundo fóton incidente induz a transição do elétron para o nível de menor energia, seguida da emissão de dois fótons que, além de possuírem a mesma energia do fóton incidente, possuem também a mesma direção e mesma fase (figura 8). Este processo é o princípio de funcionamento de lasers, visto que por possuírem a mesma fase, a intensidade dos fótons é somada, amplificando-a^{22,25}.

Figura 8 – Processos responsáveis pela emissão de fotoluminescência



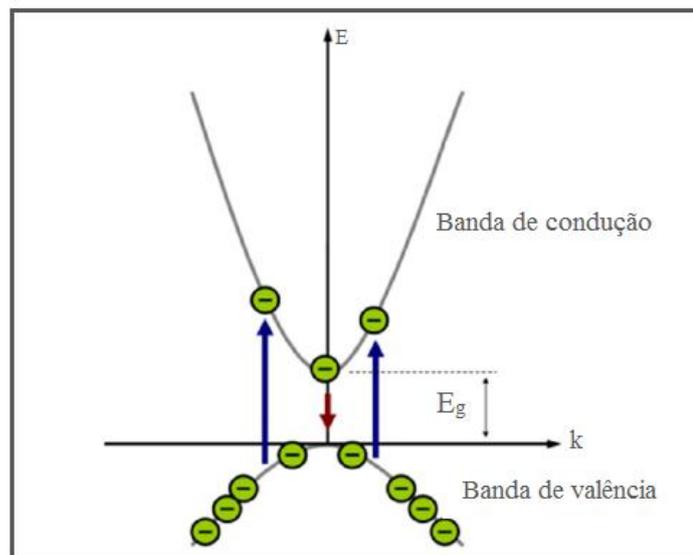
Fonte: Adaptado de *photonicswiki*²⁶.

Em semicondutores, a fotoluminescência acontece de maneira semelhante. Os níveis de energia são constituídos de subníveis muito próximos uns dos outros e, por esse motivo, foram denominados de bandas de energia. A banda de valência é análoga ao estado fundamental (estado singlete), enquanto a banda de condução é equivalente ao estado excitado. A estrutura de bandas é representada na figura 9.

Figura 9 – Bandas de energia de semicondutores

Fonte: Adaptado de Perkowitz²⁵.

A incidência de um fóton com energia igual ou maior ao *gap* de energia entre as bandas induz a transição de um elétron da banda de valência para a banda de condução, deixando um buraco na banda de valência que é também considerado como uma partícula²⁵. O fóton absorvido normalmente possui energia superior ao *gap*, excitando o elétron para um subnível com energia maior do que a energia mínima da banda de condução (figura 10).

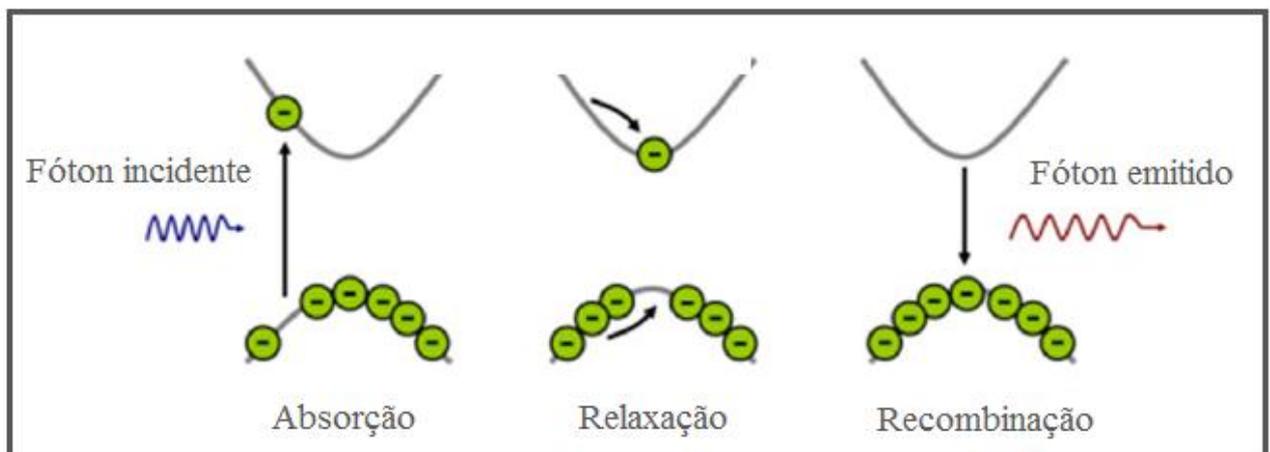
Figura 10– Transição eletrônica entre as bandas de energia de um semicondutor

Fonte: Adaptado de Serrano²⁷.

Em seguida, o semicondutor rearranja-se a fim de minimizar sua energia. Dessa maneira, o buraco na banda de valência se desloca para o nível superior dessa banda enquanto o elétron que foi excitado se desloca para o nível de menor energia da banda de condução por meio da emissão de fônons. Esse processo é denominado relaxação.

Por fim, ocorre a recombinação do par elétron-buraco, através do retorno do elétron para a banda de valência, acompanhada da emissão de um novo fóton com a mesma energia do *gap* entre as bandas^{22,25}. As etapas do processo responsável pela fotoluminescência em semicondutores são apresentadas na figura 11.

Figura 11 – Processo de fotoluminescência em semicondutores



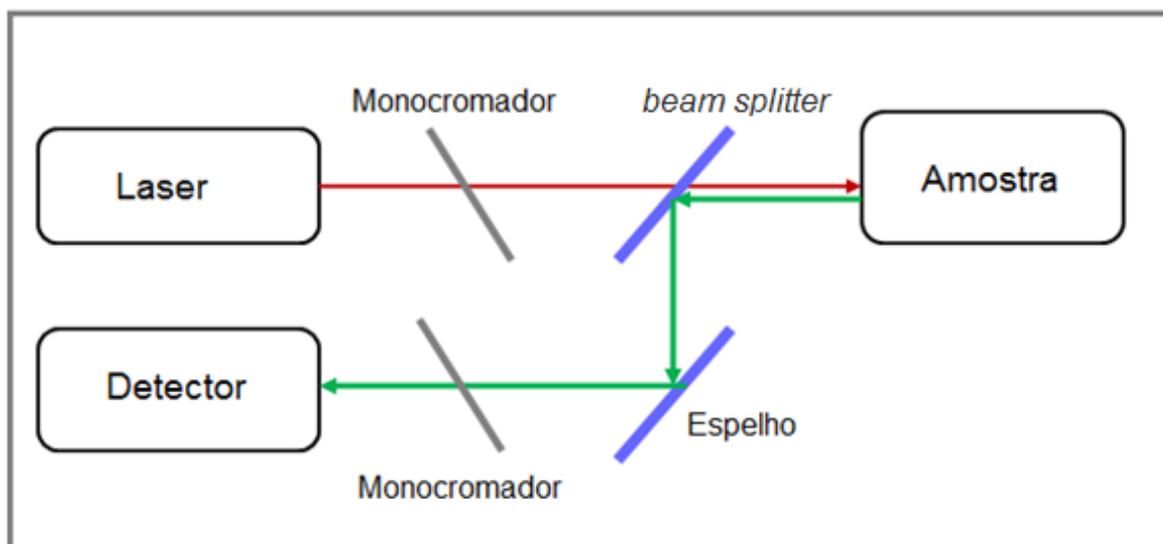
Fonte: Adaptado de Serrano²⁷.

2.6.3 Instrumentação

O aparato experimental necessário para captar espectros de fotoluminescência consiste basicamente de um laser com radiação na região de luz visível como fonte de excitação, monocromadores para selecionar o comprimento de onda adequado tanto da radiação proveniente do laser quanto da emitida pela amostra, um *beam splitter* que atua de maneira a transmitir a radiação de menor comprimento de onda (radiação de excitação) e a refletir a radiação de maior comprimento de onda (radiação emitida pela amostra) e um detector para converter o sinal luminoso em sinal elétrico. O esquema do aparato experimental é apresentado na figura 12.

A distinção entre o experimento de fluorescência e o de fosforescência é feita pelo tempo que se demora para medir o espectro emitido pela amostra após a excitação dela. Uma vez que o tempo de vida do fenômeno de fluorescência é muito menor do que o de fosforescência, um atraso na medida permite que se obtenha apenas a emissão fosforescente.

Figura 12 – Esquema simplificado de um experimento de fotoluminescência



Fonte: Elaborado pela autora

2.6.4 Aplicações

As transições eletrônicas responsáveis pela emissão fotoluminescente são influenciadas por toda a complexidade molecular e, dessa forma, os espectros obtidos a partir desse fenômeno fornecem informações detalhadas sobre o material analisado. A espectroscopia de fluorescência é, portanto, uma ferramenta de análise com potencial de aplicação em diversas áreas. Em semicondutores, por exemplo, essa técnica pode atuar na identificação de impurezas e de defeitos na estrutura cristalina²⁸. No entanto, a principal aplicação dela é no campo da biologia, visto que a fluorescência propicia um conhecimento maior sobre a estrutura e a dinâmica de macromoléculas biológicas. O estudo pode ser feito tanto com moléculas que são autofluorescentes, como a vitamina A e a clorofila, quanto com moléculas que não possuem esse comportamento óptico por meio da utilização de sondas fluorescentes. Essas sondas são constituídas por fluorocromos, grupos funcionais que exibem fluorescência, e por anticorpos, moléculas de glicoproteínas que possuem a capacidade de

reconhecer e se ligar a uma molécula específica. A tabela 2 mostra, resumidamente, o tipo de informação que se pode obter com esse tipo de análise em sistemas biológicos⁶.

Tabela 2 – Informações fornecidas por sondas fluorescentes em sistemas biológicos

Sistema biológico	Informação
Ácidos nucleicos	Flexibilidade; dinâmica de torção; estrutura de hélice; deformação devido a agentes intercalantes.
Células vivas	Atividade enzimática; interações célula-célula e célula-vírus; endocitose, atividade citotóxica.
Membranas biológicas	Potencial de membrana; localização de proteínas; mudanças estruturais; difusão translacional.
Proteínas	Sítio de ligação; transição conformacional; tipo de e de estrutura secundária.

Fonte: Adaptado de Valeur⁶.

Na área de diagnóstico, a espectroscopia de fluorescência tem uma atuação muito importante na detecção e caracterização de tumores malignos²⁹, na identificação de proteínas e peptídeos correlacionados com patologias, por exemplo, o peptídeo beta-amilóide responsável pela doença de Alzheimer³⁰, e no reconhecimento e classificação de micro-organismos patogênicos³¹, que será a aplicação abordada neste trabalho.

2.7 Micro-organismos

Os organismos vivos que são muito pequenos para serem vistos a olho nu, em geral menores que 0,1 mm de diâmetro, são denominados micro-organismos. Essa classe, que não tem valor taxonômico, abrange diferentes reinos: bactérias, vírus, protozoários, fungos e algas unicelulares. A diversidade dos micro-organismos é refletida na diversidade de funções que eles podem desempenhar, sendo elas benéficas ou nocivas para os demais organismos vivos³². Doenças graves como tuberculose, cólera e meningite são causadas por micro-organismos.

Neste trabalho, restringiremos nosso estudo a dois tipos de micro-organismos: bactérias e fungos.

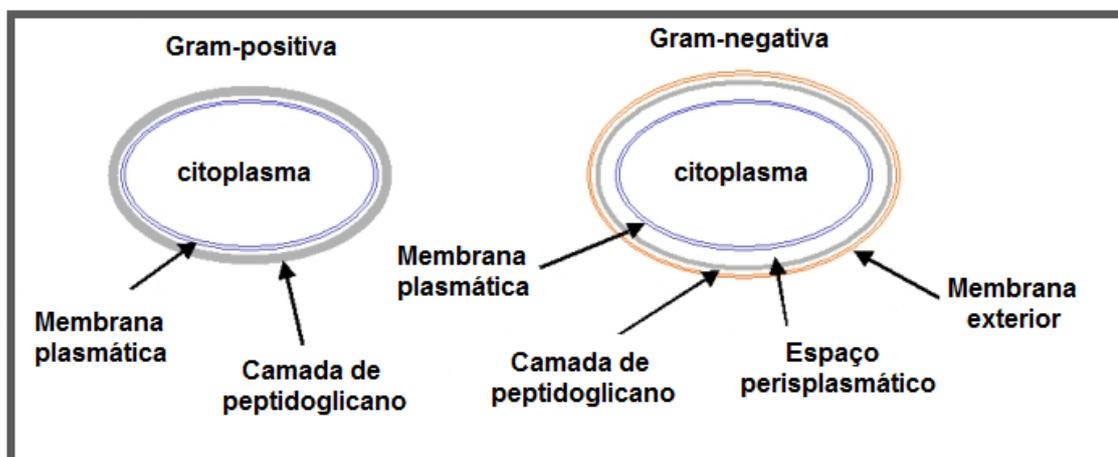
2.7.1 Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares que se reproduzem assexuadamente por divisão binária. Elas possuem parede celular e membrana celular dentro da qual está contido o material citoplasmático (o DNA nesses micro-organismos não é confinado no núcleo).

As bactérias são divididas em dois grupos: as gram-positivas e as gram-negativas. A classificação delas em um desses grupos é feita através de um método de coloração desenvolvido por Christian Gram. As gram-positivas adquirem a coloração roxa quando tratadas com o corante violeta de genciana enquanto as gram-negativas não são capazes de fixá-lo e apresentam coloração vermelha quando tratadas com safranina (corante de contraste). As colorações distintas são resultantes da diferença na estrutura da parede celular entre esses dois grupos.

A parede celular das bactérias gram-positivas é constituída por uma única membrana lipídica, a membrana plasmática, e por uma camada espessa de peptidoglicano, um heteropolissacarídeo que confere rigidez à parede celular. O espaço entre elas é denominado de periplasmático. Já as bactérias gram-negativas possuem uma parede celular formada por duas membranas lipídicas, a plasmática e a exterior, e por uma camada fina de peptidoglicano (figura 13). Dessa forma, existem dois espaços periplasmáticos nessa estrutura celular³³.

Figura 13 – Diferença na parede celular entre bactérias gram-negativas e gram-positivas



Fonte: Adaptado de Blaber³⁴.

Dadas as diferenças entre esses dois grupos de bactérias, dois exemplares relacionados com patologias, um de cada grupo, serão abordados em nossos estudos: a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* e a Gram-positiva *Staphylococcus aureus*.

- ***Escherichia coli* (*E. coli*)**

A *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa e com formato de bacilo. É constituída por flagelos que se dispõem ao redor dela e por adesinas que permitem sua fixação. A *E. coli* é encontrada comumente no intestino grosso de organismos endotérmicos, sendo que, nesse contexto, elas são inofensivas e fazem parte da microbiota normal do intestino.

No entanto, cepas de *E. coli* podem apresentar perfil patogênico quando as linhagens da microbiota intestinal são disseminadas em outros órgãos ou quando outras linhagens, desconhecidas pelo organismo, são ingeridas. A ingestão de água e alimentos contaminados com *E. coli* pode causar infecção urinária, gastroenterite, intoxicação alimentar e meningite.³⁵

Assim, de acordo com fatores de virulência intrínsecos, a *E. coli* pode ser considerada um patógeno de relevada importância.

- ***Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)**

A *S. aureus* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbica facultativa e do grupo dos cocos, uma vez que seu formato é esférico. Ela pode ser encontrada no ar, além de constituir a microbiota da pele e dos tratos respiratório e gastrointestinal. A patogenicidade dessa bactéria é atribuída a toxinas e enzimas produzidas por ela que quando disseminadas em tecidos lesionados, desencadeiam diversas doenças, dentre elas, infecções cutâneas, pneumonia, osteomielite e intoxicação alimentar³⁶.

A *S. aureus* tem sido associada também a graves infecções hospitalares e muitas linhagens tem apresentado resistência aos principais antibióticos, sendo, portanto, um importante problema de saúde pública.

2.7.2 Fungos

O reino Fungi é composto por organismos eucariontes, tais como as leveduras e os bolores, que têm em comum o fato da parede celular apresentar concomitantemente os polissacarídeos quitina e glicano.

As leveduras, como a espécie *Candida albicans* que será abordada em nosso estudo, são organismos unicelulares que se reproduzem assexuadamente por mitose. Esses micro-organismos utilizam como fonte de energia alguns compostos orgânicos como, por exemplo, o carbono, que é obtido a partir de açúcares de hexose, como glucose ou frutose, ou dissacarídeos, como sacarose e maltose³⁷.

Exemplares de leveduras podem ser encontrados na casca e na baga de frutas, bem como nas floras intestinal e cutânea de pessoas. Algumas espécies como a *Saccharomyces cerevisiae* são de grande interesse industrial, pois são fundamentais nos processos de fermentação que possibilitam a obtenção, por exemplo, de cerveja e vinhos. No entanto, algumas leveduras são patológicas e podem causar infecção principalmente em pessoas com baixa imunidade.

- ***Candida albicans* (*C. albicans*)**

A *Candida* é um gênero de fungo que engloba diversas espécies. Algumas delas se comportam como organismos comensais inofensivos na microbiota normal do sistema digestivo humano. No entanto, sob determinadas condições, por exemplo, o tratamento por um longo tempo com antibióticos e/ou sistema imunológico comprometido, esses fungos podem tornar-se patogênicos. A *C. albicans* é a espécie mais patogênica, devido a atributos que ela possui que contribuem para a adesão, invasão e dano celular no organismo hospedeiro. Essa linhagem de *Candida* é causadora de uma doença infecciosa denominada de candidíase, que pode ser oral ou vaginal³⁸.

2.8 Modo de ação dos compostos antimicrobianos

Os compostos que agem nos micro-organismos matando-os ou inibindo-os são denominados de antimicrobianos e podem atuar de maneiras distintas. Os principais modos de ação são:

- **Inibição da síntese da parede celular:** Como dito anteriormente, a parede celular dos micro-organismos é constituída por polissacarídeos, no caso de bactérias, o proteoglicano, e em fungos, a quitina e o glicano. Então, alguns agentes antimicrobianos impedem a síntese completa desses polissacarídeos, de maneira a enfraquecer a parede celular e causar a lise da célula. Como as bactérias gram-positivas possuem uma camada mais espessa de peptidoglicano do que as bactérias gram-negativas, esses antimicrobianos são mais eficazes contra bactérias gram-positivas.
- **Inibição da síntese proteica:** A síntese proteica é um processo essencial para a multiplicação e para a sobrevivência dos micro-organismos. Muitos agentes antimicrobianos se ligam às subunidades dos ribossomos, a fim de alterar o metabolismo celular normal, causando a morte do micro-organismo ou a inibição de seu crescimento e multiplicação.
- **Danos à membrana plasmática:** Alguns antimicrobianos, como os polipeptídicos, alteram a permeabilidade da membrana plasmática, de maneira a induzir a eliminação de substâncias essenciais à célula, por meio dela³⁹.

2.9 Agente antimicrobiano - peptídeo *polycerradin*

São encontrados na rizosfera alguns micro-organismos que são capazes de promover o crescimento de plantas através de hormônios produzidos por eles ou pela supressão de doenças que as acometem, causadas por outros micro-organismos deletérios. Dentre as bactérias benéficas para as plantas, inclui-se a *Paenibacillus polymyxa*.

A *P. polymyxa* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa e formadora de esporos. A ação antimicrobiana apresentada pela *P. polymyxa* SQR-21 foi atribuída a dois tipos de peptídeos produzidos por ela, um que age contra bactérias e outro que age contra fungos e bactérias gram-positivas⁴⁰.

Em estudo previamente realizado constatou-se através de testes de difusão em ágar que *P. polymyxa* RNC-D, isolada do Cerrado da região de São Carlos, produz os compostos peptídicos com ação antimicrobiana, polimixina e peptídeos da família LI-F, já descritos na literatura. Entretanto, *P. polymyxa* RNC-D também produziu dois outros compostos peptídicos inéditos denominados PpRNCD, com atividade específica contra bactérias Gram-negativas, e *polycerradin* que age contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Através de análises de espectrometria de massas concluiu-se que o composto *polycerradin* tem massa molecular de 3376,453 Da²⁷.

A potente atividade antimicrobiana deste novo composto é motivo para a continuidade em seu estudo como uma alternativa para atuar no combate à micro-organismos patogênicos, principalmente aqueles que adquiriram resistência aos antibióticos e antifúngicos já existentes.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Preparação das amostras

- **Preparação extrato lipopeptídico (ELP)**

O processo de obtenção do extrato lipopeptídico (ELP), constituído pelo peptídeo *polycerradin*, é descrito no item 2.3 da referência 27. O ELP foi solubilizado em água destilada esterilizada em uma concentração de 10 mg/mL.

- **Preparação dos inóculos das cepas microbianas**

As cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 29212, e a cepa fúngica *Candida albicans* ATCC 10231, utilizadas nesse estudo, foram obtidas do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Morfologia e Patologia – UFSCar. A fim de reativar as cepas, um volume de 10 µl de cada micro-organismo foi plaqueado nos meios de cultivo seletivos ágar sal manitol (*S. aureus*), eosina azul de metileno (*E. coli*) e ágar Saboraud (*C. albicans*). As placas foram incubadas em 37°C por 24h. Após o período de incubação, colônias típicas dos micro-organismos foram repicadas em placas de ágar TSA (trypticase soy agar), e incubadas 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 que se atingisse a concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/ml (para bactérias) e $1,0 \times 10^5$ UFC/ml (para o fungo), conforme as normas CLSI (2011).

- **Preparação das lâminas**

Foram colocados, inicialmente, 50 μL das suspensões microbianas em lâminas de vidro e, em uma etapa posterior, adicionou-se 20 μL de solução de ELP, homogeneizando com as células dos micro-organismos.

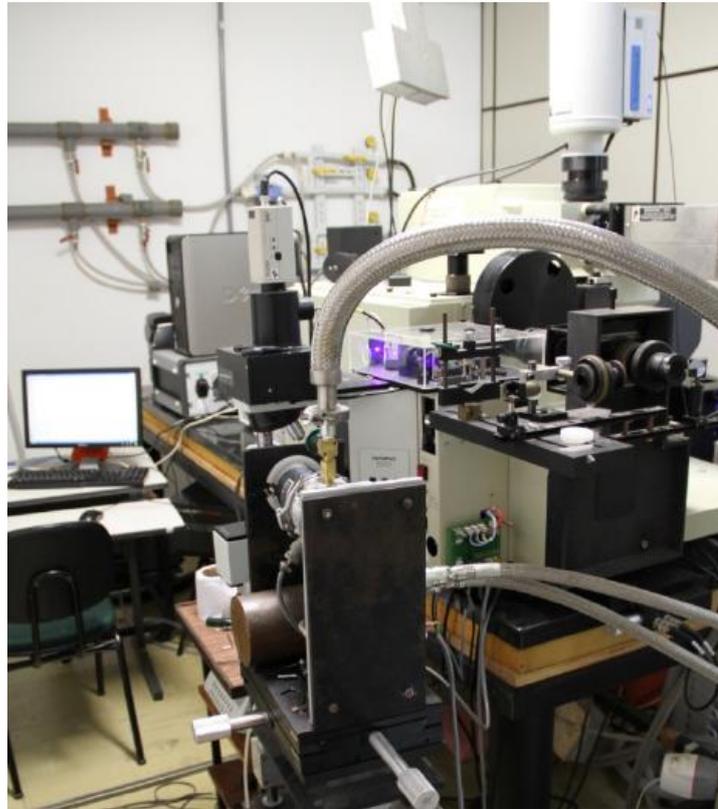
3.2 Instrumentação espectroscópica

Os espectros de espalhamento Raman e de fotoluminescência foram colhidos com um espectrômetro Raman dispersivo, modelo T64000 da marca Jobin Yvon, equipado com um microscópio confocal. O espectrômetro é constituído por três grades de difração, que possibilitou a obtenção de uma resolução espectral da ordem de 10^{-4} nm, e um detector do tipo CCD (*charge coupled device*) refrigerado por nitrogênio líquido.

Como fonte de excitação, utilizou-se um laser de argônio, selecionando a linha espectral $\lambda = 458$ nm para o experimento de fotoluminescência e a linha $\lambda = 514,5$ nm para o experimento de espalhamento Raman. A potência do laser para ambos os experimentos foi de 2,4 mW.

O aparato experimental utilizado para a obtenção dos espectros, pertence ao grupo de Semicondutores do Departamento de Física – UFSCar e é apresentado na figura 14.

Figura 14 - Aparato experimental utilizado para a obtenção dos espectros

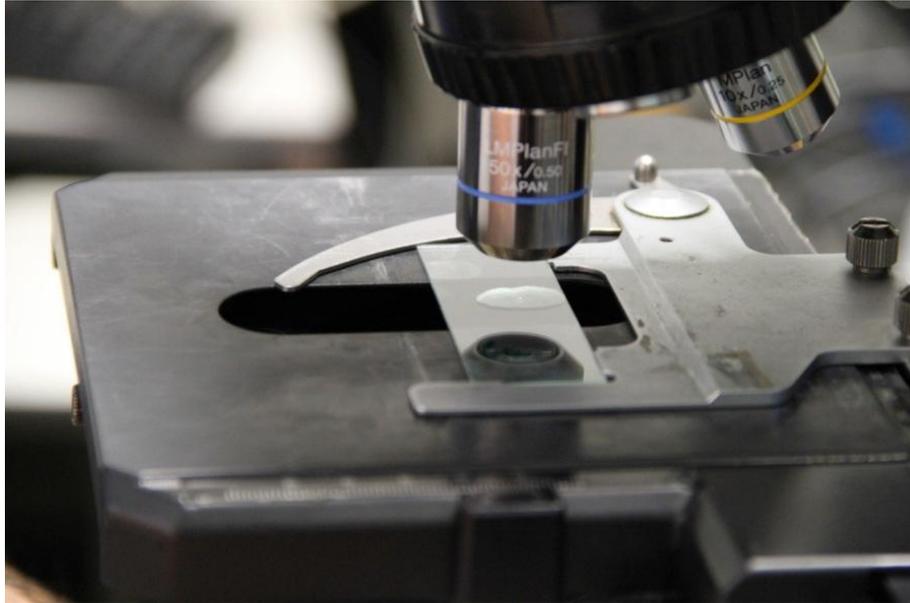


Fonte: Serrano²⁷.

3.3 Medidas dos espectros

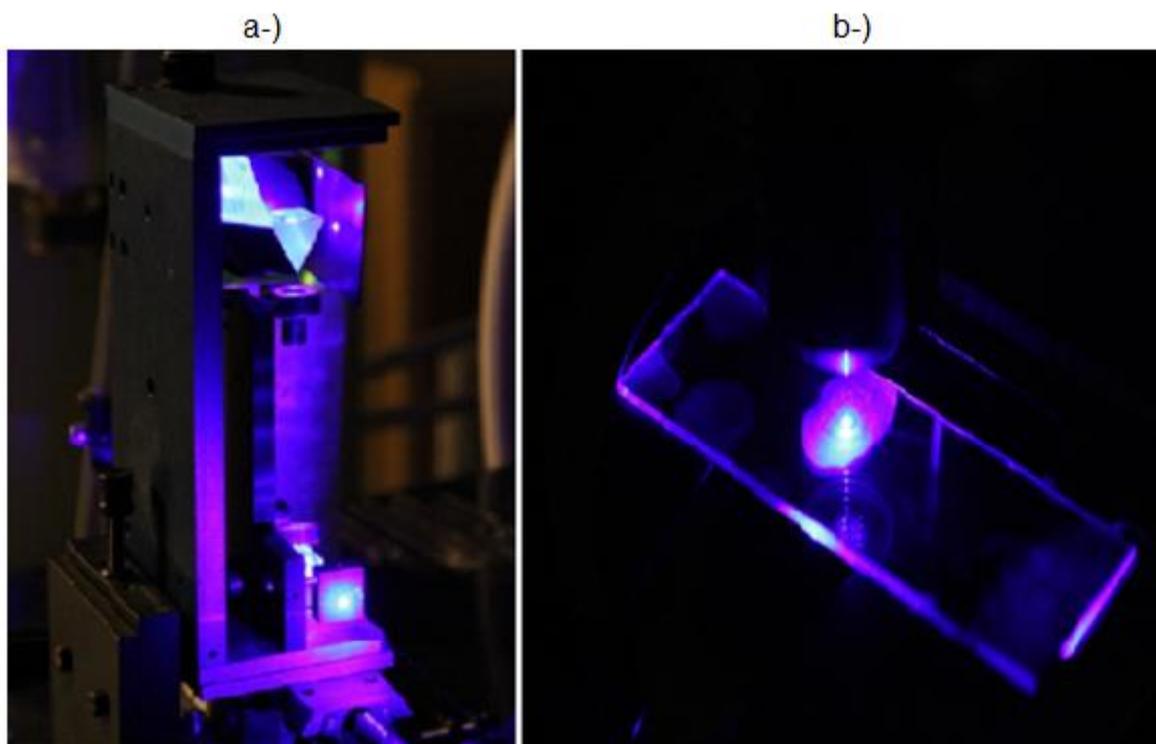
As amostras foram depositadas em uma lâmina de vidro e então, colocadas no microscópio confocal, como mostra a figura 15. Em seguida, inicia-se o processo de excitação da amostra e obtenção do espectro emitido por ela. O feixe de luz gerado pelo laser de argônio passa pelo primeiro monocromador (figura 16a), que seleciona a faixa de comprimento de onda que se tem interesse, e incide sobre a amostra (figura 16b). A radiação fotoluminescente emitida pela amostra passa por um segundo monocromador composto por três grades de difração e então se dirige para o detector.

Figura 15 – Lâmina contendo a amostra colocada no microscópio confocal



Fonte: Serrano²⁷.

Figura 16 – Feixe proveniente do laser de argônio: a-) ao passar pelo monocromador
b-) ao incidir sobre a amostra



Fonte: Serrano²⁷.

Os experimentos de fotoluminescência e espalhamento Raman seguiram o seguinte protocolo:

1ª etapa: Colheu-se o espectro de emissão do micro-organismo contido na lâmina de vidro.

2ª etapa: O extrato lipopeptídico (ELP) foi adicionado à lâmina e homogeneizado com as células do micro-organismo. Então, o espectro de emissão foi colhido imediatamente após a homogeneização dos componentes.

3ª etapa: Após quinze minutos da adição do ELP ao micro-organismo, outro espectro foi colhido. Este tempo foi escolhido baseado em testes preliminares de densidade óptica que mostraram que o antimicrobiano age principalmente nos primeiros quinze minutos, havendo inibição de mais de 70% dos micro-organismos nesta etapa e, portanto, espera-se que a principal alteração nos espectros devido à ação do peptídeo *polycerradin* seja observada também nesta etapa.

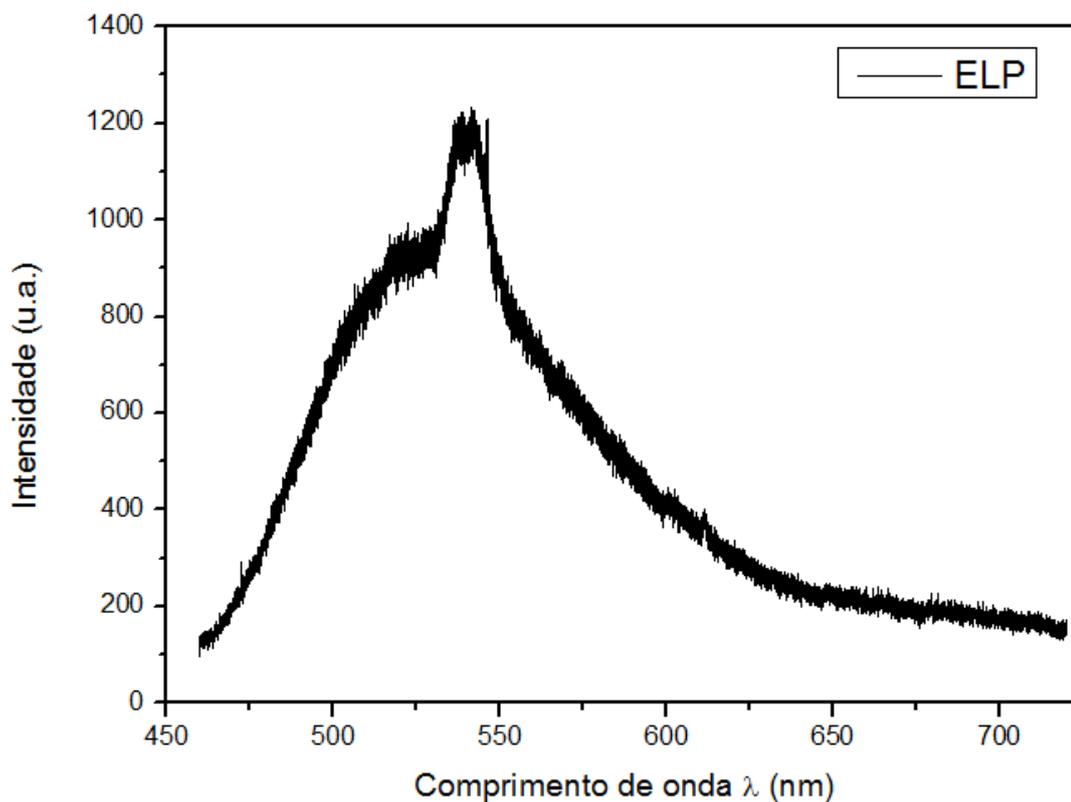
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espectros de fotoluminescência

- **Extrato lipopeptídico (ELP)**

Foi colhido o espectro de fotoluminescência para o extrato lipopeptídico em temperatura ambiente, apresentado na figura 17. É observado um pico largo sobreposto a um pico estreito em torno de $\lambda = 540$ nm.

Figura 17 - Espectro de fotoluminescência, para dados não normalizados, do extrato lipopeptídico (ELP).



- ***Candida albicans* (*C. albicans*)**

Os espectros de fotoluminescência do fungo *C. albicans*, puro, com a adição do ELP e após quinze minutos da adição do ELP, são representados nas figuras 18, 19 e 20, respectivamente. Em todos os espectros, são observados dois picos estreitos sobrepostos a um

pico largo em torno de 540 nm, um pico estreito em 611 nm e um pico largo em 695 nm. Foi medida a razão entre a intensidade do pico em 695 nm e a intensidade do pico em 540 nm, para todos os espectros. A sobreposição dos espectros relativos à *C. albicans* é apresentado nas figuras 21 e 22 para dados não normalizados e normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, respectivamente.

Figura 18 – Espectro de fotoluminescência do fungo *C. albicans*, para dados não normalizados.

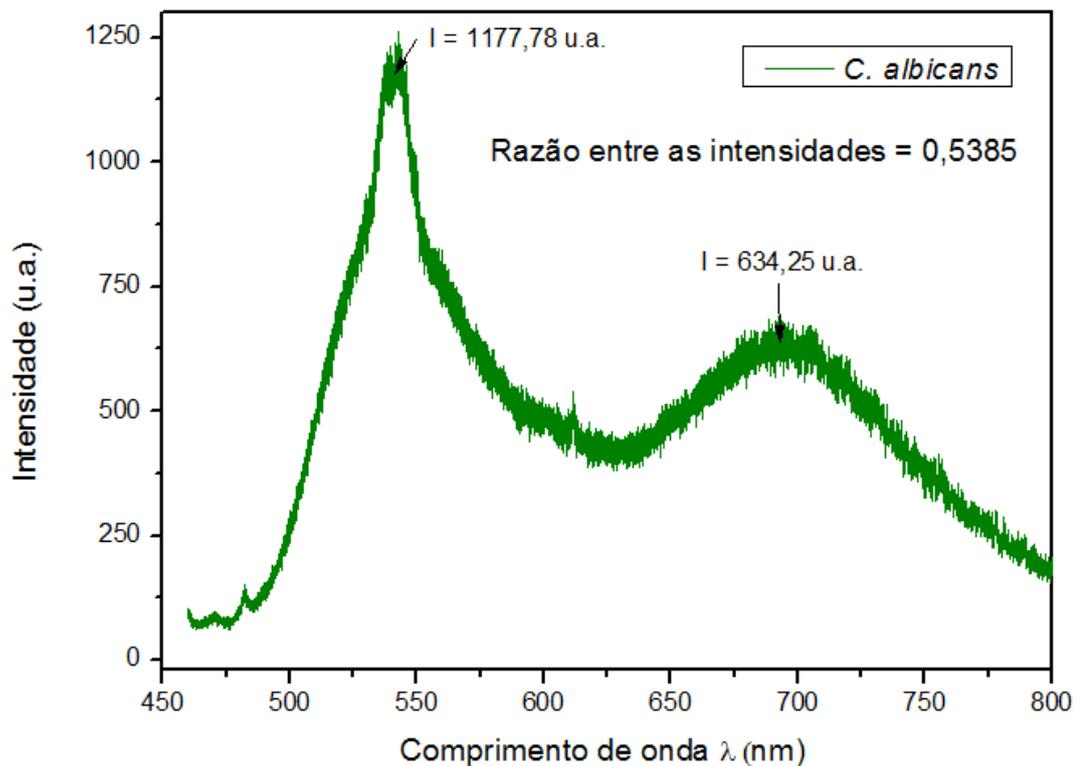


Figura 19 - Espectro de fotoluminescência do fungo *C. albicans* logo após a adição do ELP, para dados não normalizados.

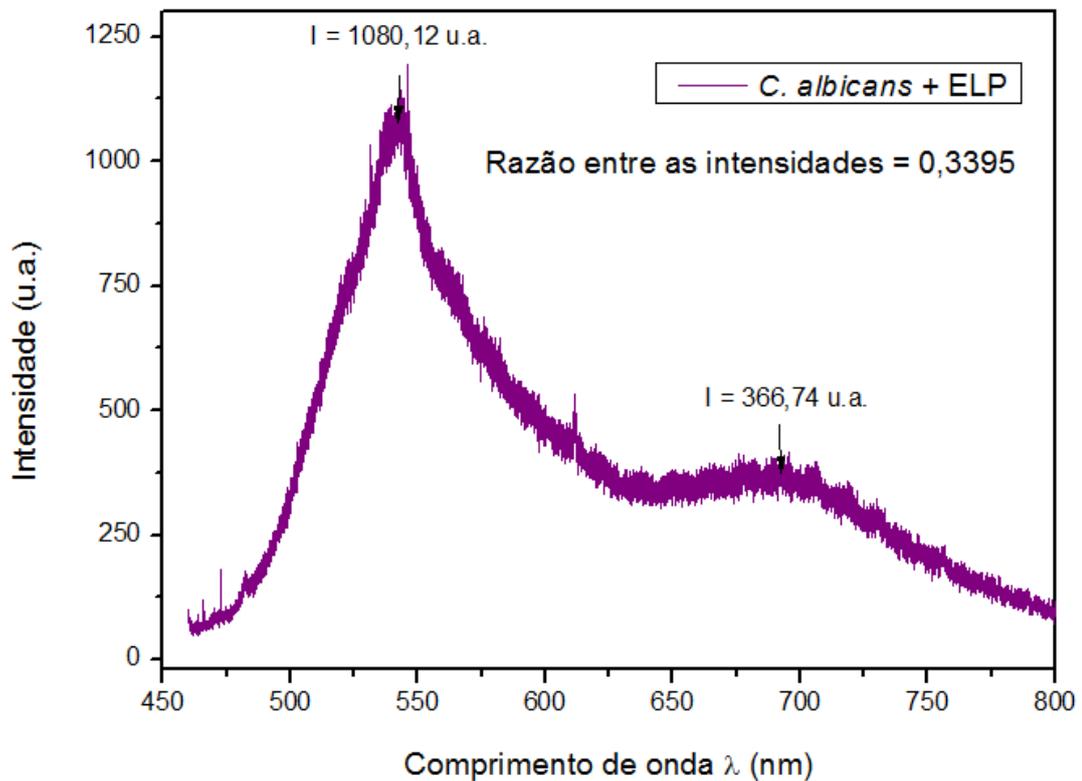


Figura 20- Espectro de fotoluminescência do fungo *C. albicans* após quinze minutos da adição do ELP, para dados não normalizados.

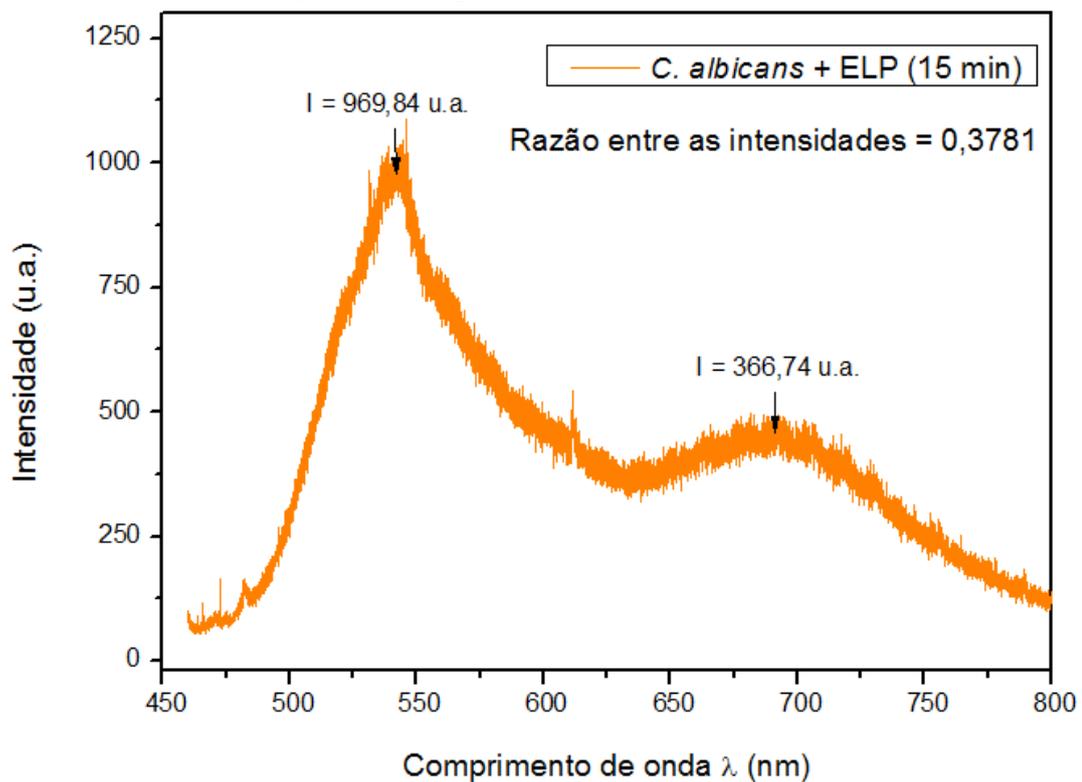


Figura 21 – Espectros de fotoluminescência do fungo *C. albicans* sobrepostos, para dados não normalizados. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.

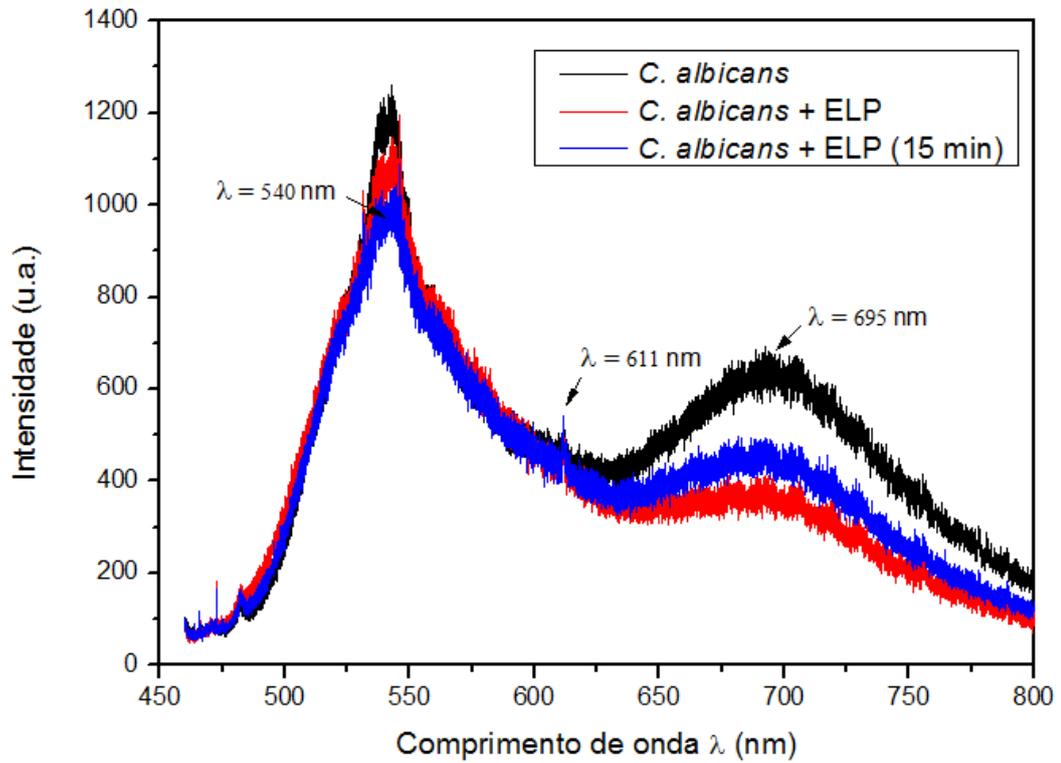
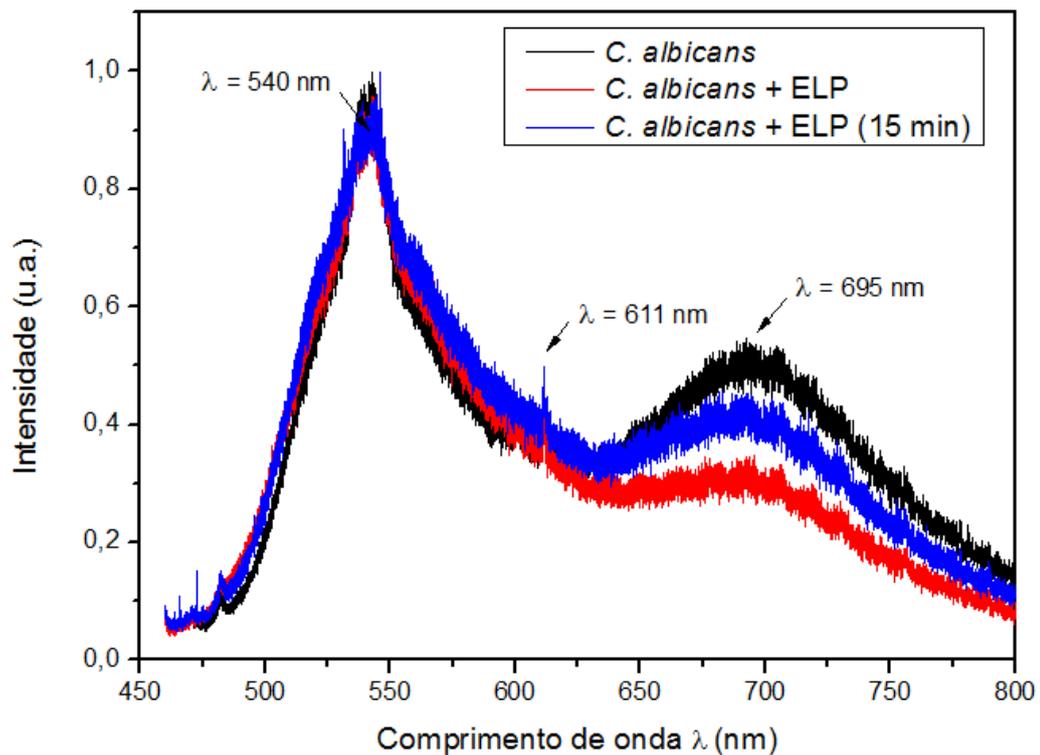


Figura 22- Espectros de fotoluminescência do fungo *C. albicans* sobrepostos, para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.



Nos espectros do fungo *C. albicans*, verifica-se uma diminuição da razão entre as intensidades quando o ELP foi adicionado ao micro-organismo, atribuída principalmente à diminuição da intensidade do pico largo em 695 nm. A razão entre as intensidades, após quinze minutos da adição do ELP, diminuiu 29,8% em comparação com o valor obtido no espectro da *C. albicans* pura (tabela 3).

Tabela 3- Análise da razão entre as intensidades dos picos para os espectros do fungo *C. albicans*, considerando os dados não normalizados.

Amostra	Razão entre as intensidades dos picos
<i>C. albicans</i>	0,5385
<i>C. albicans</i> + ELP	0,3395
<i>C. albicans</i> + ELP (15 min)	0,3781

- ***Escherichia coli (E.coli)***

Os espectros de fotoluminescência das três amostras contendo a bactéria gram-negativa *E. coli*, sendo a primeira somente com a bactéria *pura*, a segunda com a adição de ELP e a terceira após quinze minutos da adição do ELP, são representados nas figuras 23, 24 e 25, respectivamente.

Assim como nos espectros obtidos das amostras contendo a *C. albicans*, são observados em todos os espectros da *E. coli*, dois picos estreitos sobrepostos a um pico largo em torno de 540 nm, um pico estreito em 611 nm e um pico largo em 695 nm. A razão entre a intensidade do pico em 695 nm e a intensidade do pico em 540 nm também foi medida para todos os espectros. A sobreposição dos espectros relativos à *E. coli* é apresentado nas figuras 26 e 27 para dados não normalizados e normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, respectivamente.

Figura 23 – Espectro de fotoluminescência da amostra contendo apenas a bactéria *E. coli*, para dados não normalizados.

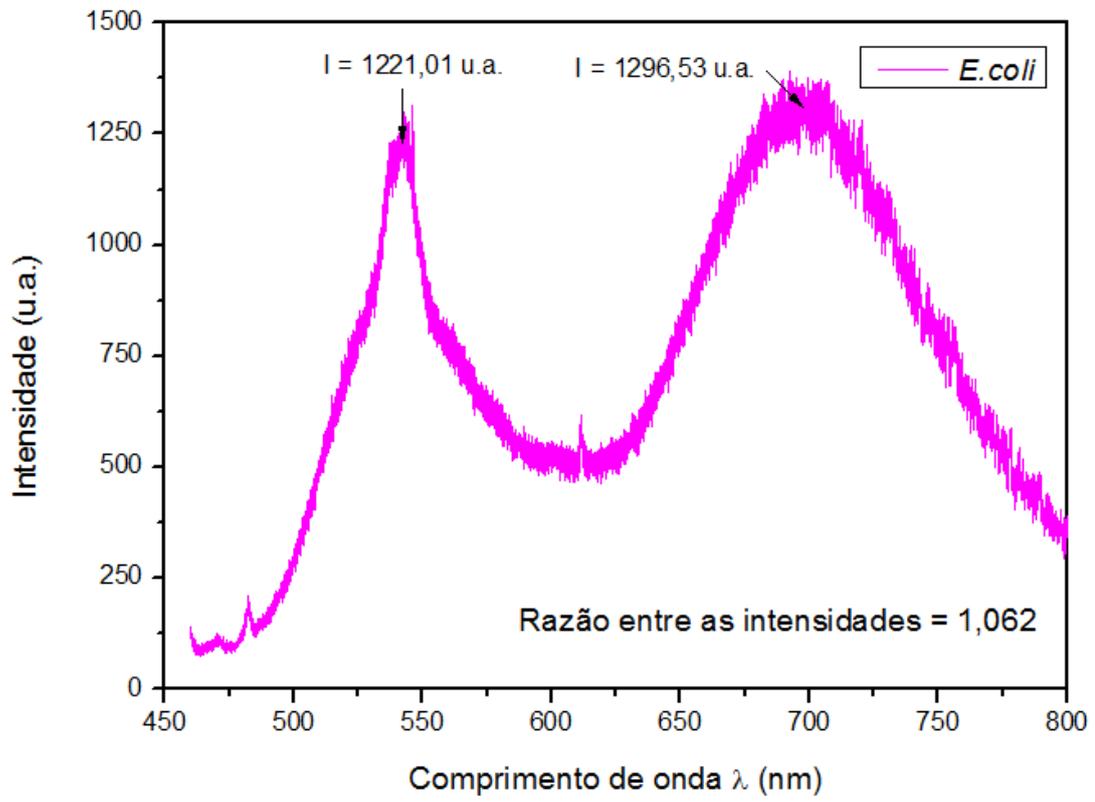


Figura 24 – Espectro de fotoluminescência da bactéria *E. coli* logo após a adição do ELP, para dados não normalizados.

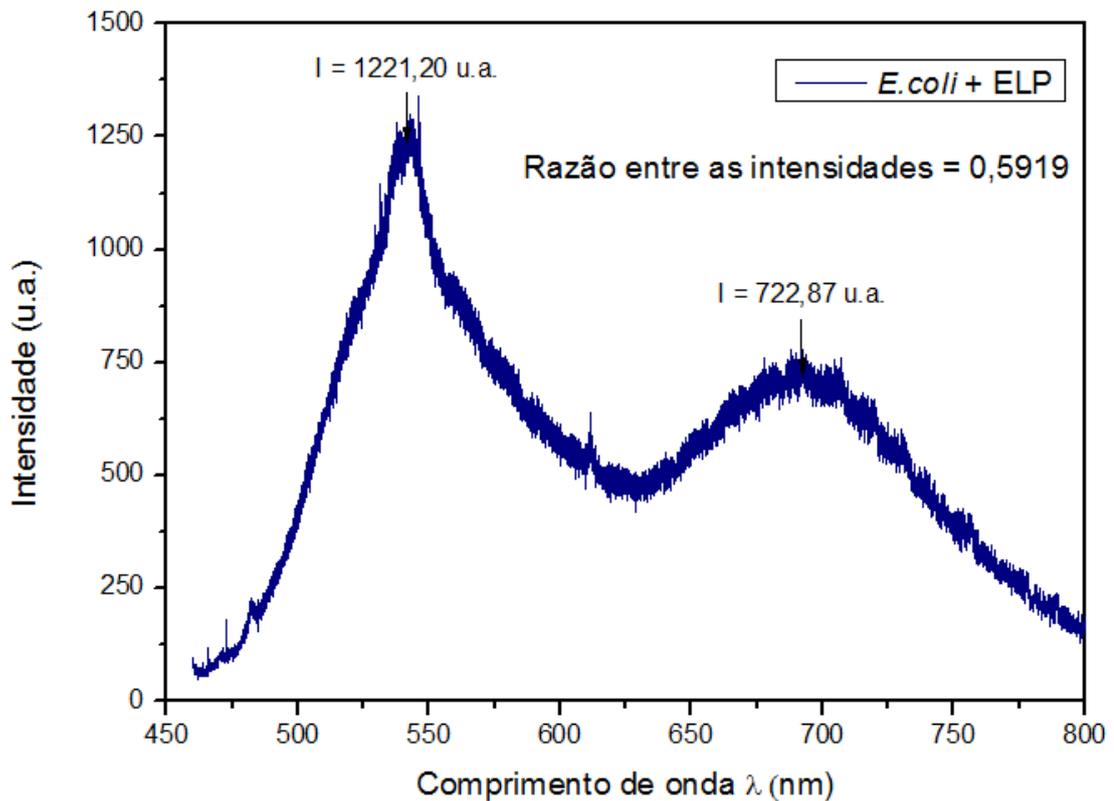


Figura 25 – Espectro de fotoluminescência da bactéria *E. coli* após quinze minutos da adição do ELP, para dados não normalizados

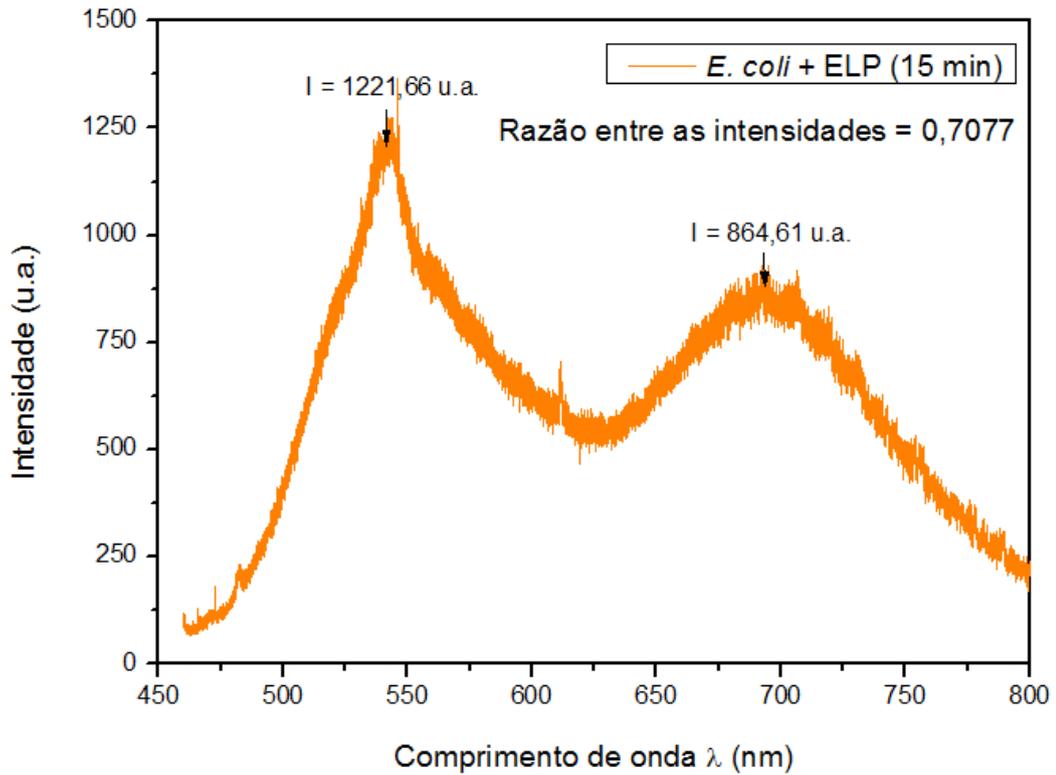


Figura 26 – Espectros de fotoluminescência da bactéria *E. coli* sobrepostos, para dados não normalizados. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.

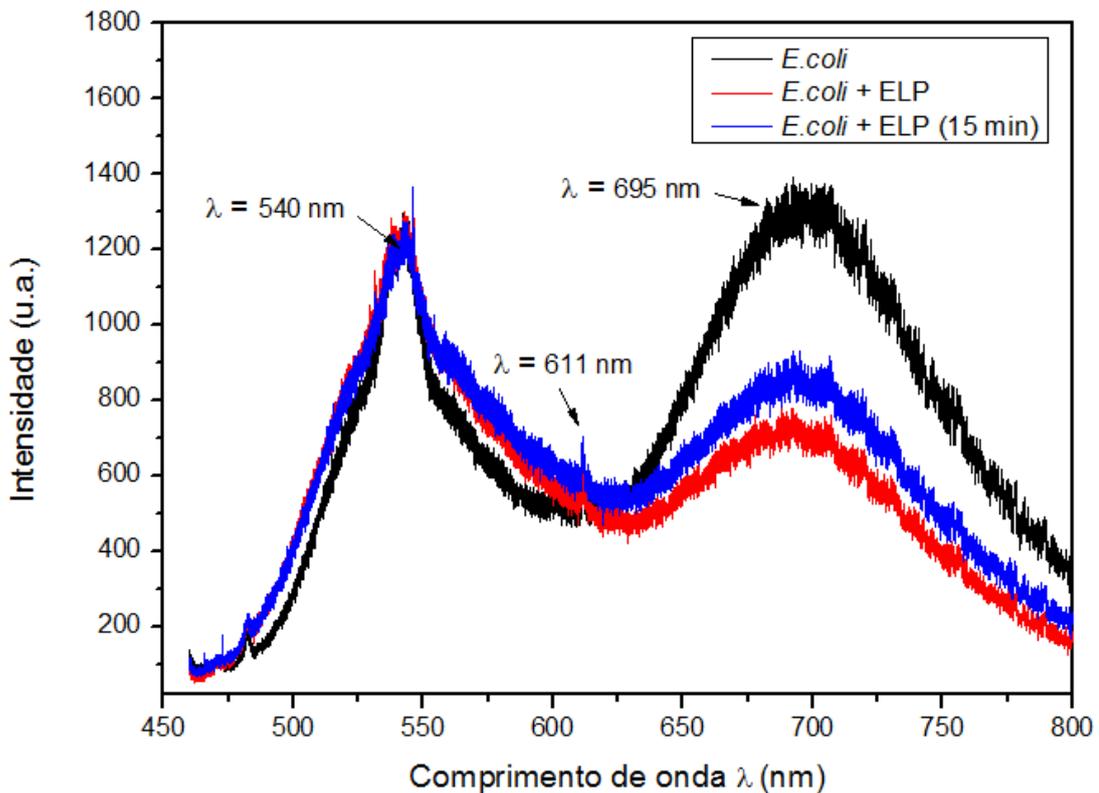
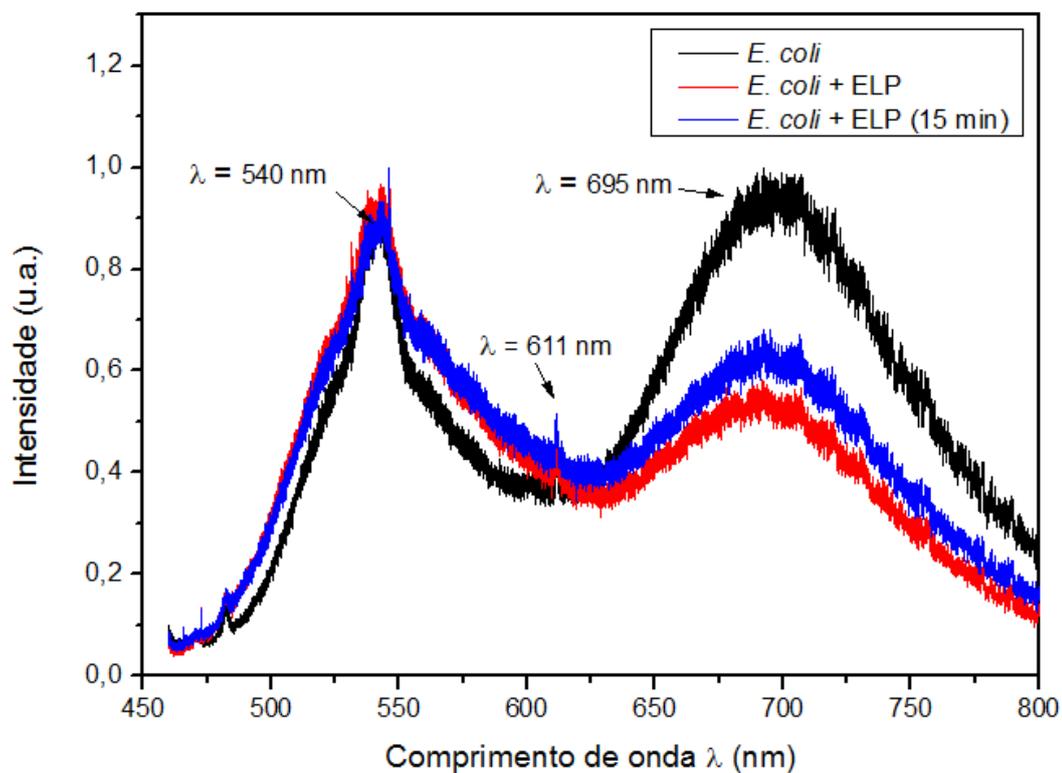


Figura 27 - Espectros de fotoluminescência do fungo *E. coli* sobrepostos, para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.



Nos espectros de fotoluminescência da bactéria *E. coli* também foi observada a diminuição significativa da intensidade do pico largo em 695 nm. A razão entre as intensidades, após quinze minutos da adição do ELP, diminuiu 33,4% em comparação com o valor obtido no espectro da *E. coli* pura (tabela 4).

Tabela 4 - Análise da razão entre as intensidades dos picos para os espectros da bactéria *E. coli*

Amostra	Razão entre as intensidades dos picos
<i>E. coli</i>	1,062
<i>E. coli</i> + ELP	0,5919
<i>E. coli</i> + ELP (15 min)	0,7077

- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Os espectros de fotoluminescência das três amostras contendo a bactéria gram-positiva *S. aureus*, sendo a primeira somente com a bactéria pura, a segunda com a adição de ELP e a terceira após quinze minutos da adição do ELP, são representados nas figuras 28, 29 e 30, respectivamente.

O comportamento exibido nos espectros da *S. aureus* é semelhante aos dos outros micro-organismos discutidos anteriormente, com picos nos mesmos comprimentos de onda. A razão entre a intensidade do pico em 695 nm e a intensidade do pico em 540 nm também foi medida para todos os espectros. A sobreposição dos espectros relativos à *S. aureus* é apresentado nas figuras 31 e 32 para dados não normalizados e normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa, respectivamente.

Figura 28 – Espectro de fotoluminescência da amostra contendo apenas a bactéria *S. aureus*, para dados não normalizados.

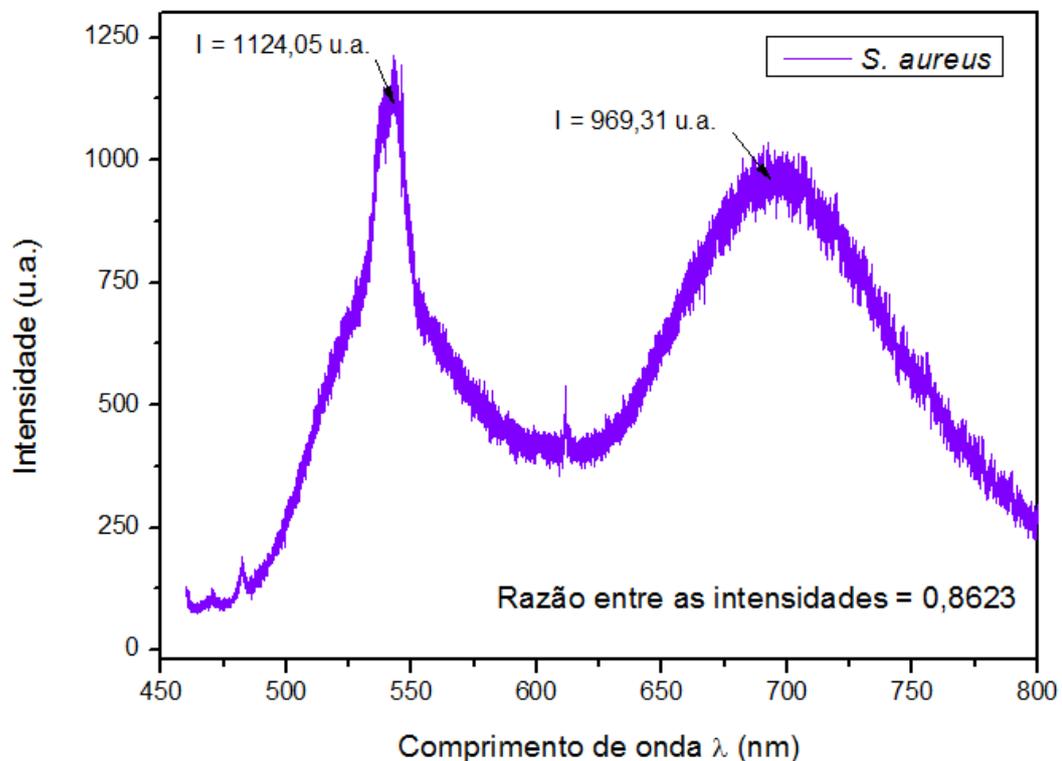


Figura 29 - Espectro de fotoluminescência da bactéria *S. aureus* logo após a adição do ELP, para dados não normalizados.

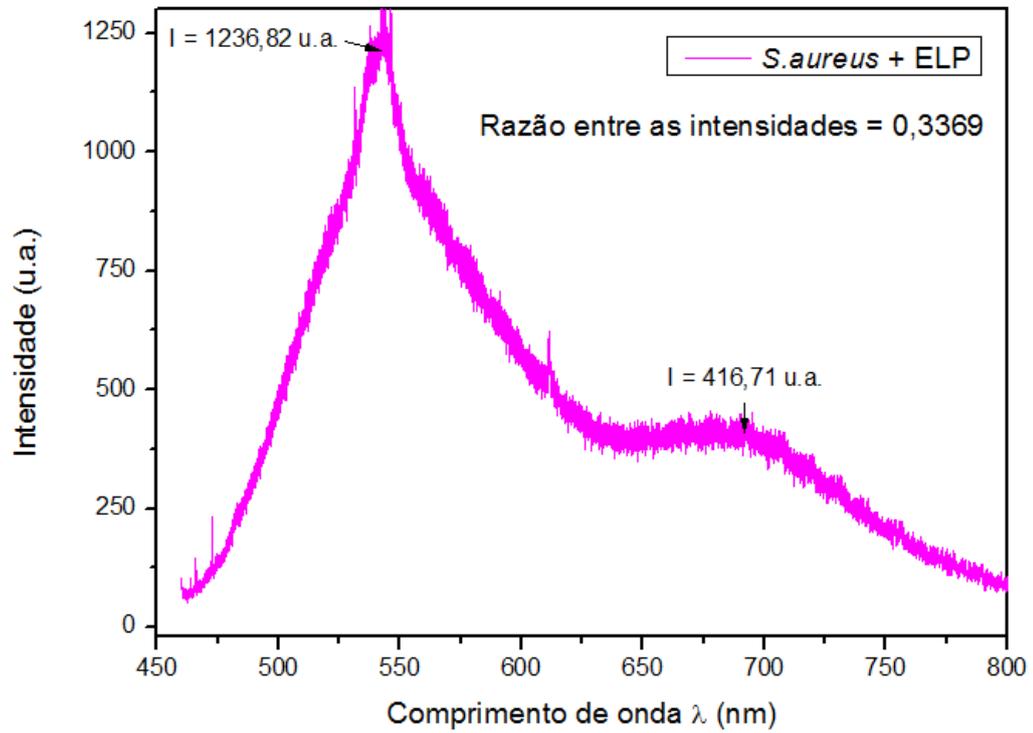


Figura 30 - Espectro de fotoluminescência da bactéria *S. aureus* após quinze minutos da adição do ELP, para dados não normalizados.

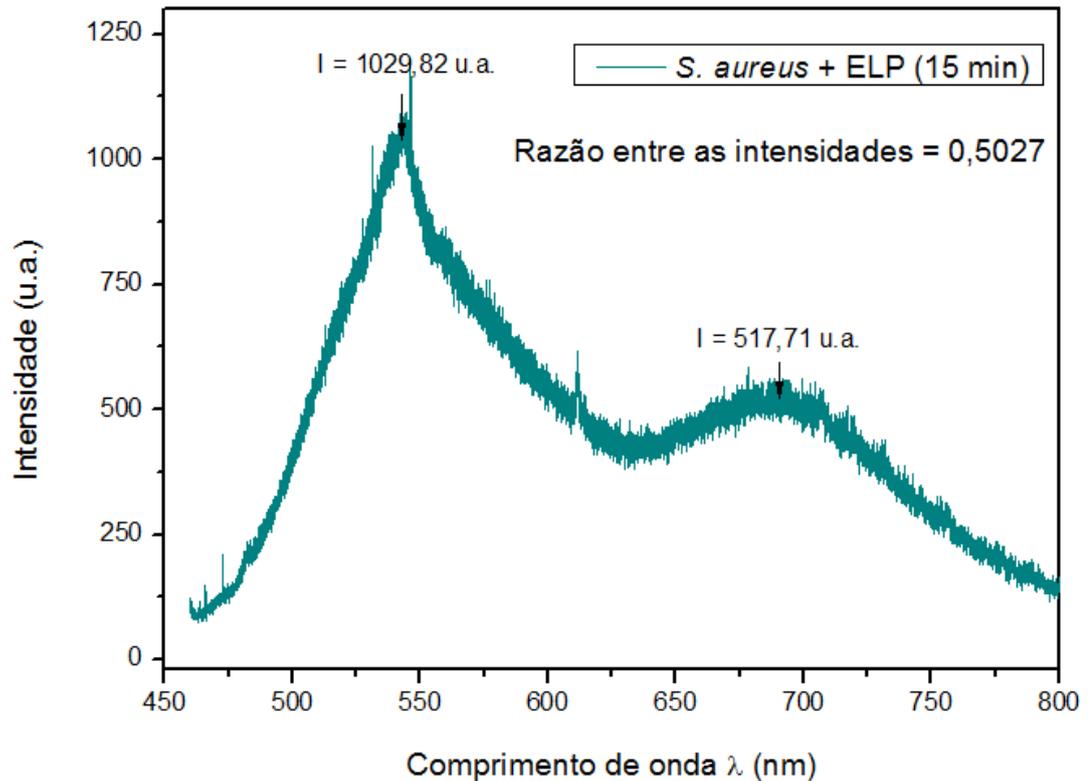


Figura 31 - Espectros de fotoluminescência da bactéria *S. aureus* sobrepostos, para dados não normalizados. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.

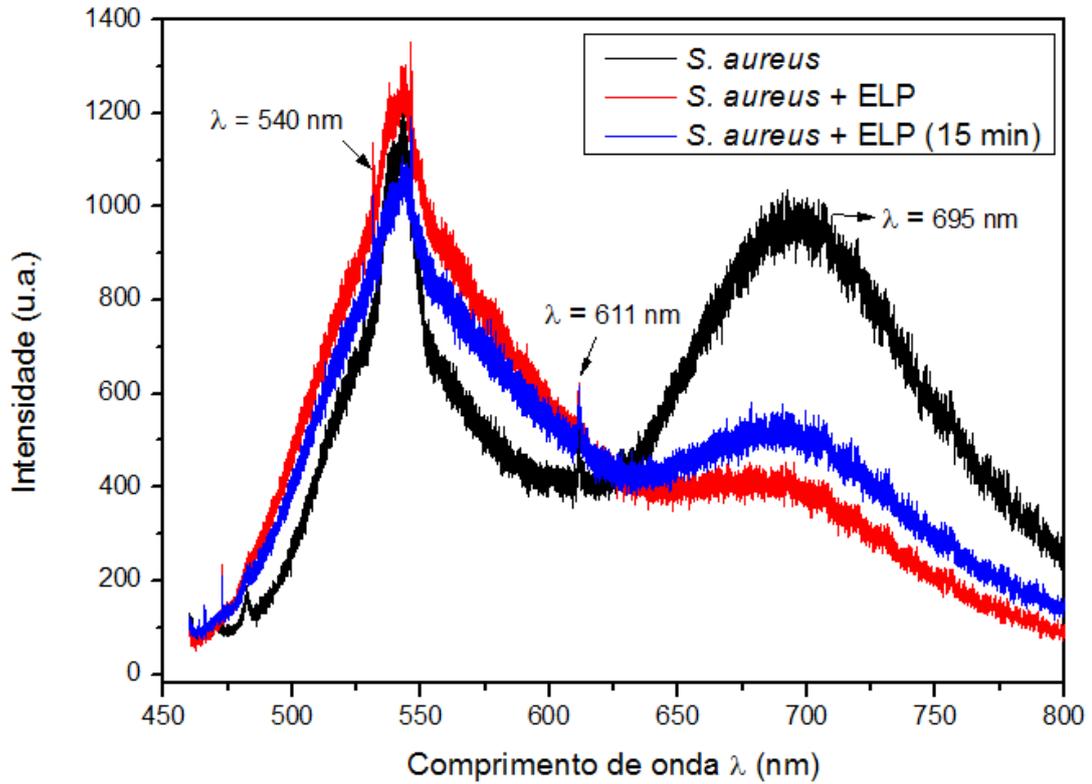
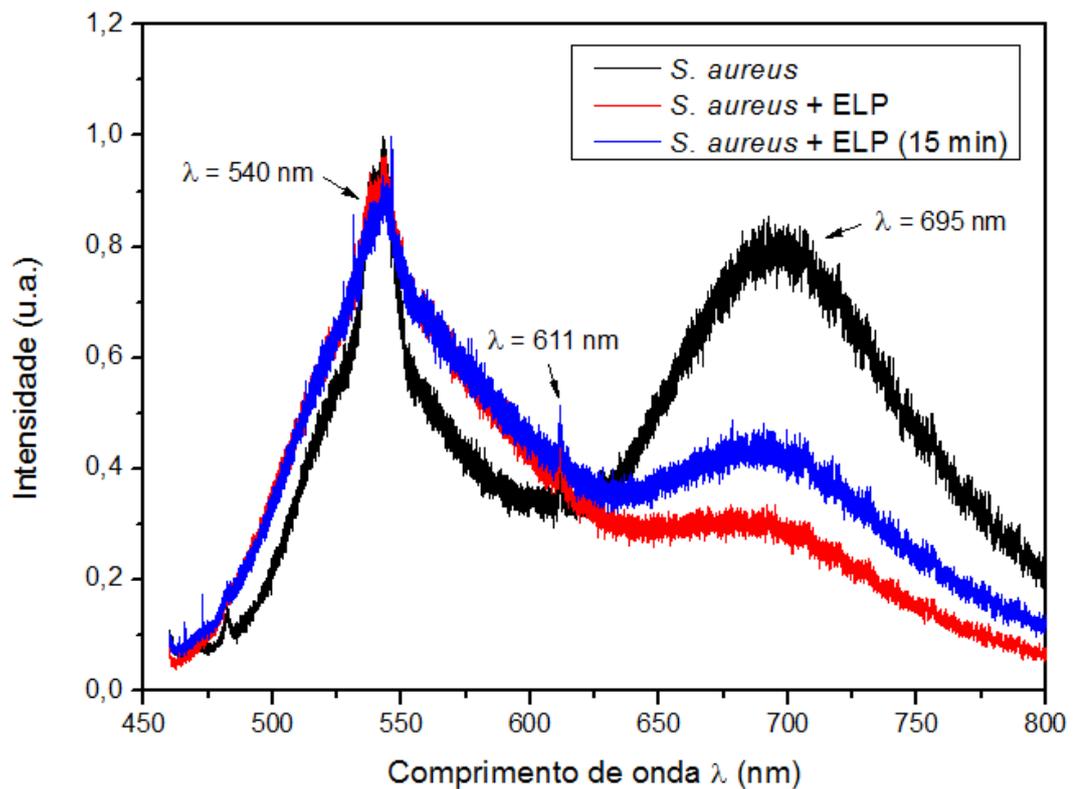


Figura 32 - Espectros de fotoluminescência da *S. aureus* sobrepostos, para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa. Observa-se uma diminuição significativa do pico largo em 695 nm.



A análise dos espectros de fotoluminescência da bactéria *S. aureus* ressalta a significativa diminuição da intensidade do pico em 695 nm quando o ELP é adicionado. A razão entre as intensidades, após quinze minutos da adição do ELP, diminuiu 41,7% em comparação com o valor obtido para a amostra contendo apenas a bactéria pura (tabela 5).

Tabela 5 - Análise da razão entre as intensidades dos picos para os espectros da bactéria *S. aureus*

Amostra	Razão entre as intensidades dos picos
<i>E. coli</i>	0,8623
<i>E. coli</i> + ELP	0,3369
<i>E. coli</i> + ELP (15 min)	0,5027

- **Espectros comparativos de todos os micro-organismos**

A sobreposição dos micro-organismos puros, dos mesmos com a adição de ELP e após quinze minutos da adição de ELP são apresentados nas figuras 33, 34 e 35, respectivamente. Observa-se a presença de picos nos mesmos comprimentos de onda, para as três situações analisadas. Após a adição de ELP, os espectros do fungo *C. albicans* e da bactéria *S. aureus* são muito semelhantes, com as intensidades dos picos aproximadamente iguais. No entanto, mesmo após a adição de ELP, a intensidade do pico em 695 nm do espectro da bactéria *E. coli* permanece superior à intensidade dos outros micro-organismos.

Figura 33 - Sobreposição dos espectros de fotoluminescência dos micro-organismos puros, para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa.

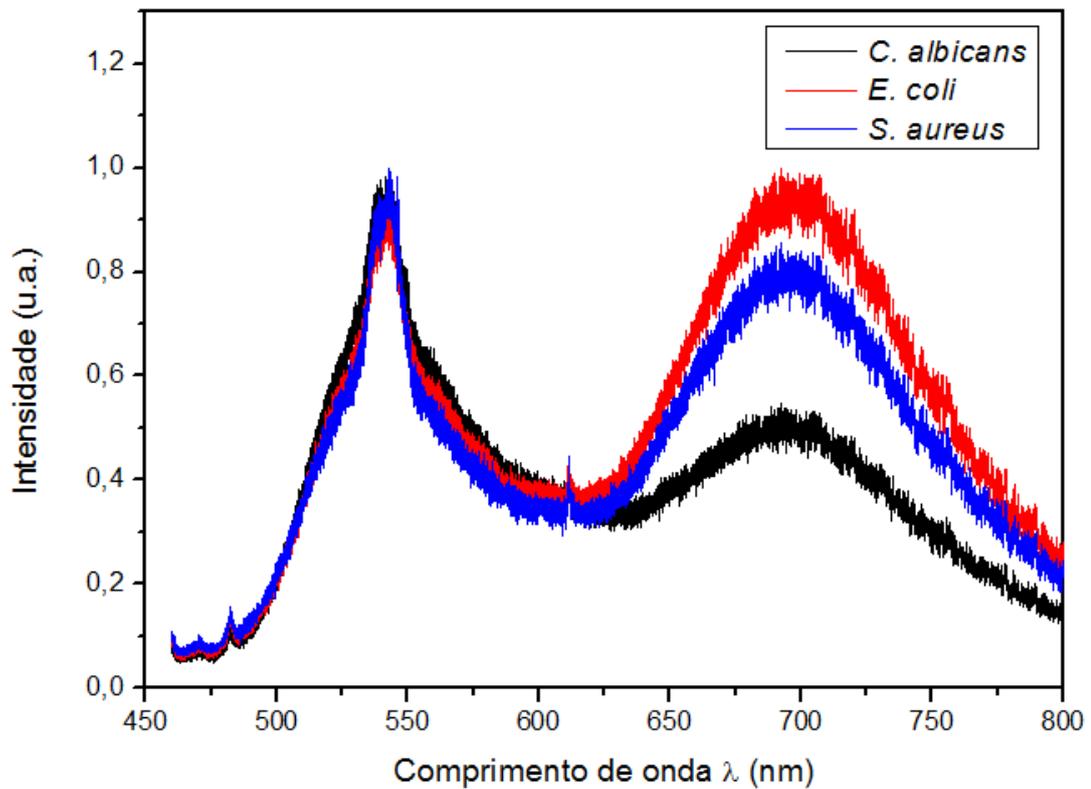


Figura 34 – Sobreposição dos espectros de fotoluminescência dos micro-organismos com a adição de ELP, para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa.

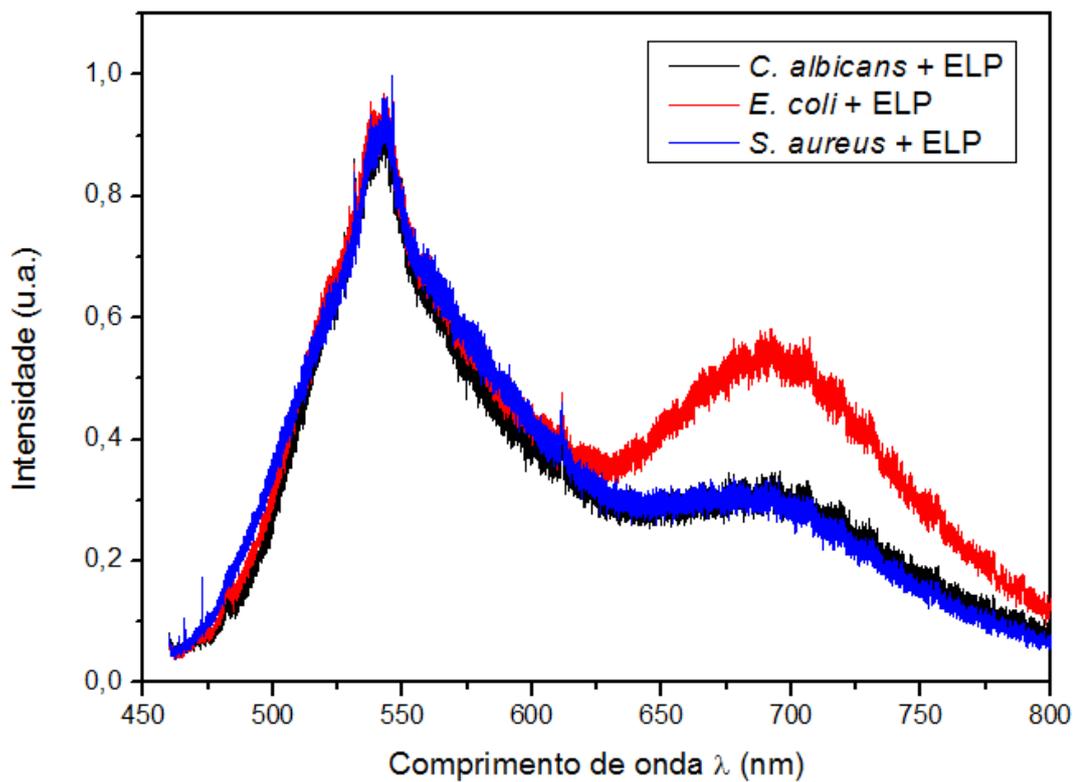
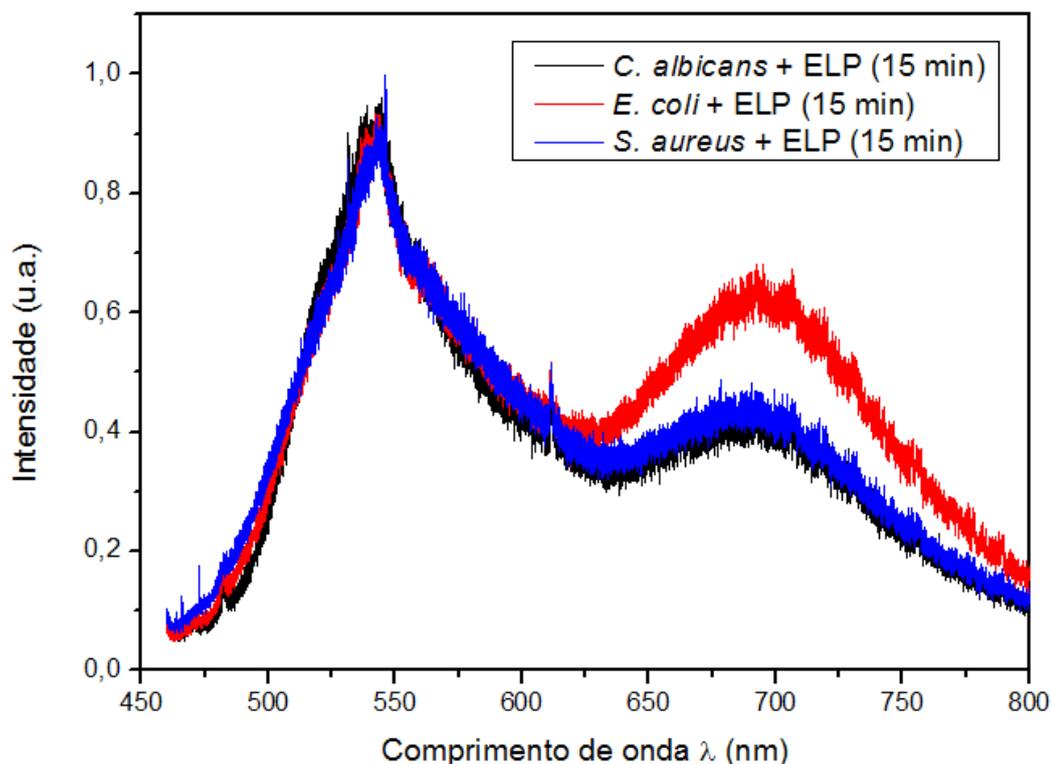


Figura 35 – Sobreposição dos espectros de fotoluminescência dos micro-organismos após quinze minutos da adição de ELP para dados normalizados em relação ao maior valor de intensidade relativa



4.2 Espectros de espalhamento Raman

- *Candida albicans* (*C. albicans*)

Os espectros de espalhamento Raman do fungo *C. albicans*, puro, com a adição do ELP e após quinze minutos da adição do ELP, são representados nas figuras 36, 37 e 38, respectivamente. Em todos os espectros são observados quatro picos estreitos, em 1125, 2105, 2168 e 3084 nm. A sobreposição dos espectros de espalhamento Raman relativos à *C. albicans* é apresentada na figura 39. Observa-se que os espectros Raman ficaram comprometidos pela emissão concomitante de fotoluminescência, ainda que tenhamos usado uma fonte de excitação com baixa energia. Por esse motivo, não é possível inferir qualquer alteração nos picos Raman quando o ELP é adicionado a *C. albicans*.

Figura 36– Espectro de espalhamento Raman para o fungo *Candida albicans* puro, para dados não normalizados.

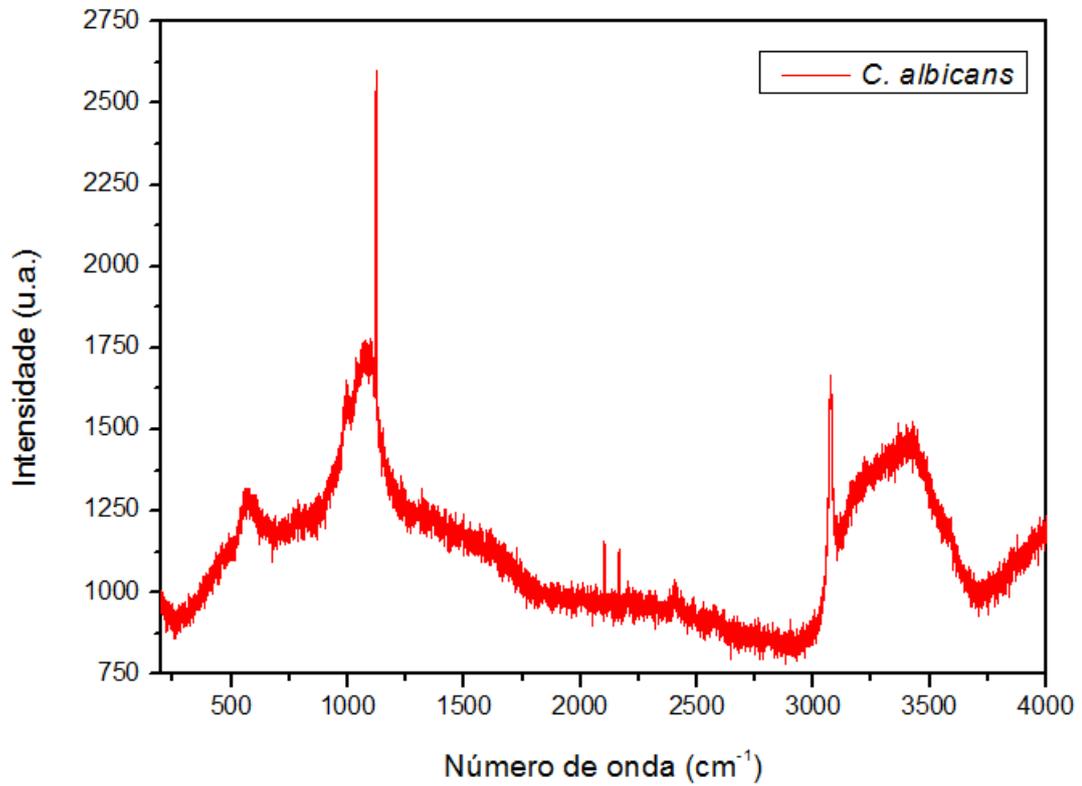


Figura 37- Espectro de espalhamento Raman para o fungo *Candida albicans* com a adição de ELP, para dados não normalizados.

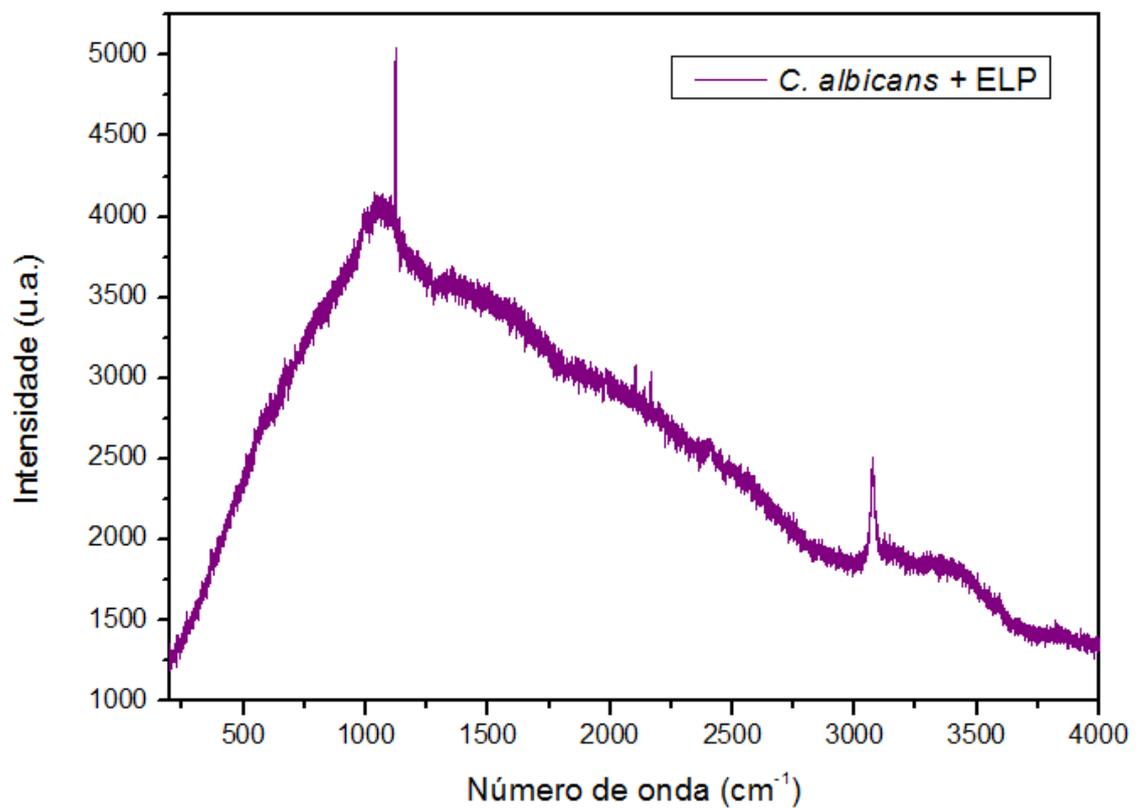


Figura 38– Espectro de espalhamento Raman para o fungo *Candida albicans* após quinze minutos da adição de ELP, para dados não normalizados.

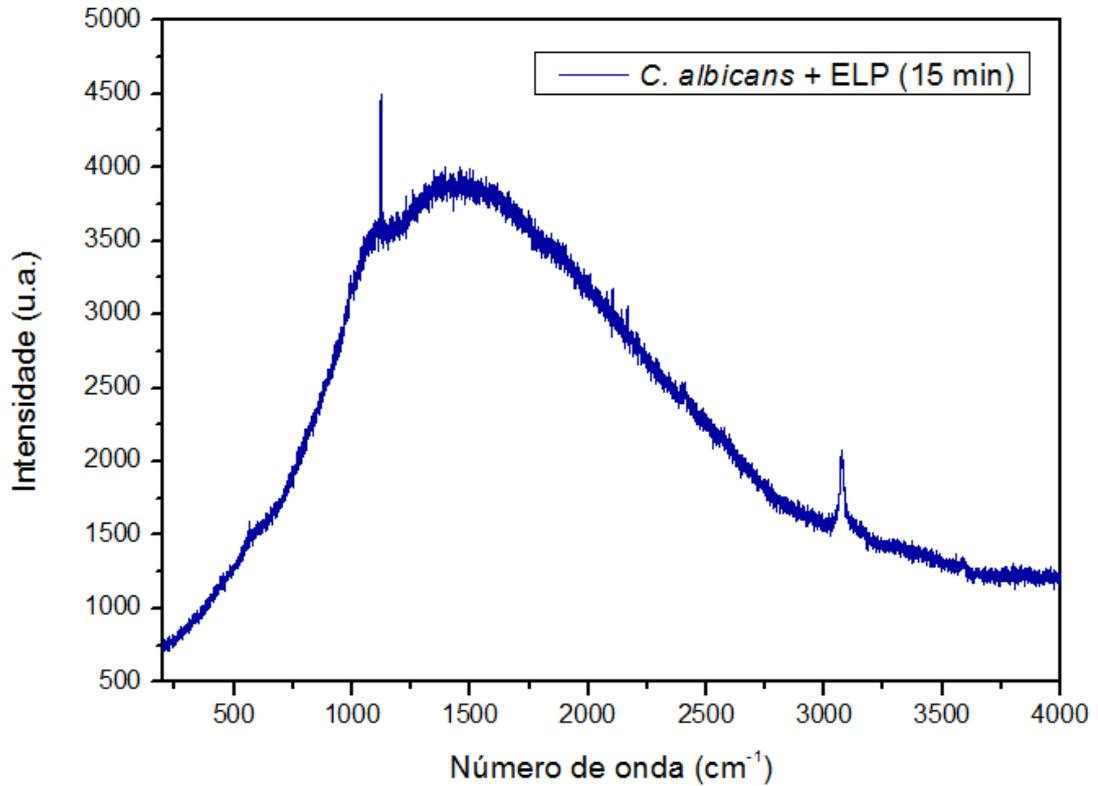
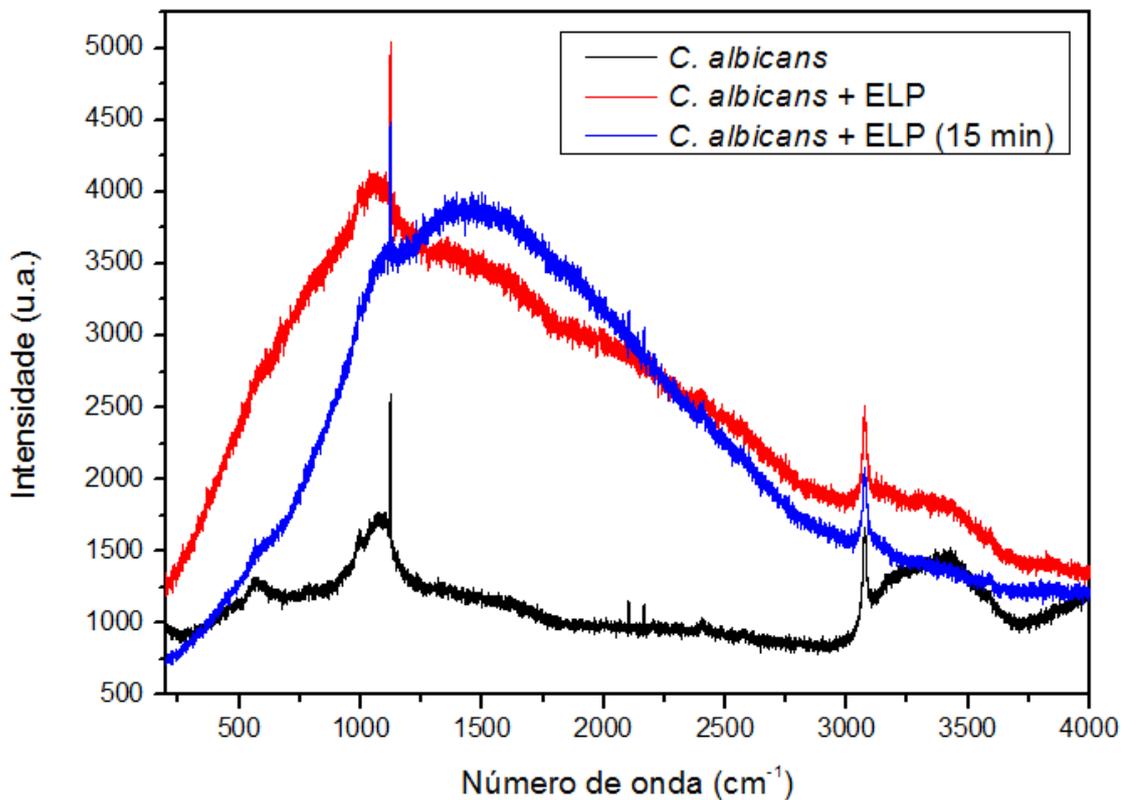


Figura 39– Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman para o fungo *Candida albicans*, para dados não normalizados.



- *Escherichia coli* (*E. coli*)

Os espectros de espalhamento Raman da bactéria *E. coli*, pura, com a adição do ELP e após quinze minutos da adição do ELP, são apresentados nas figuras 40, 41 e 42, respectivamente. Em todos os espectros são observados quatro picos estreitos, em 1125, 2105, 2168 e 3084 nm. A sobreposição dos espectros de espalhamento Raman relativos à *E. coli* é apresentada na figura 43. Observa-se que assim como para o fungo *C. albicans*, os espectros Raman da *E. coli* ficaram comprometidos pela emissão concomitante de fotoluminescência e, da mesma forma, não é possível inferir qualquer alteração nos picos Raman quando o ELP é adicionado.

Figura 40- Espectro de espalhamento Raman para a bactéria *E. coli* pura, para dados não normalizados.

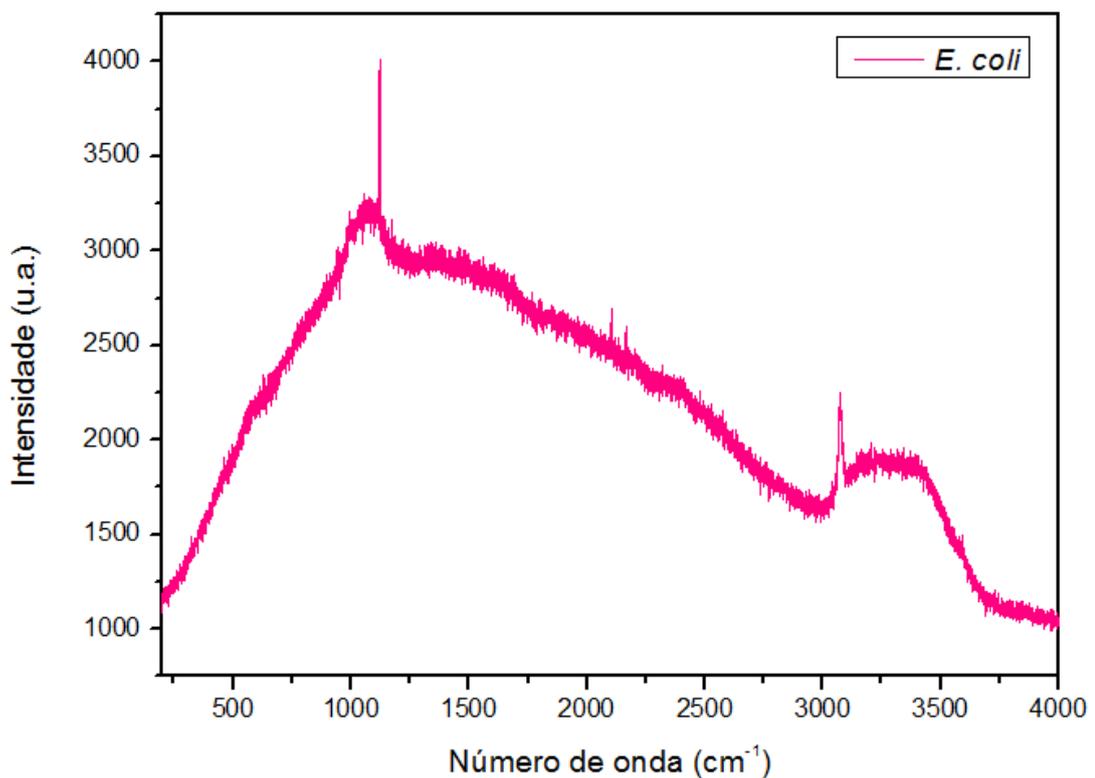


Figura 41- Espectro de espalhamento Raman para a bactéria *E. coli* com a adição de ELP, para dados não normalizados.

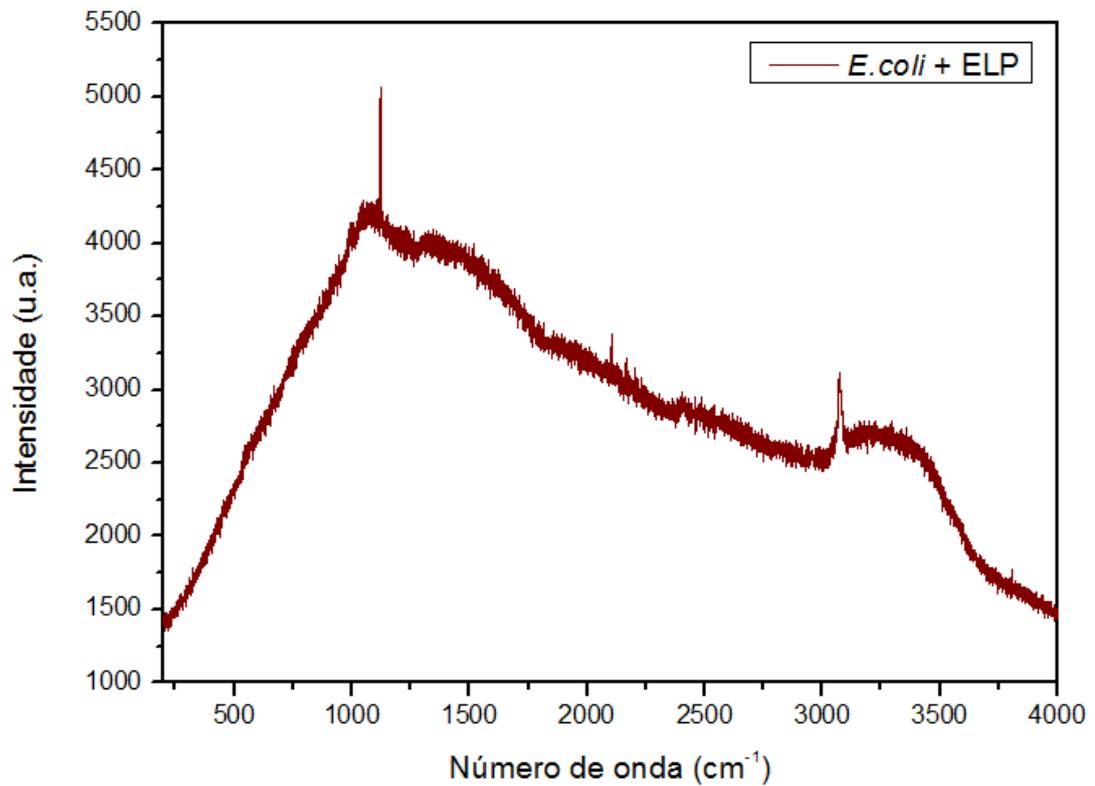


Figura 42- Espectro de espalhamento Raman para a bactéria *E. coli* após quinze minutos da adição de ELP, para dados não normalizados.

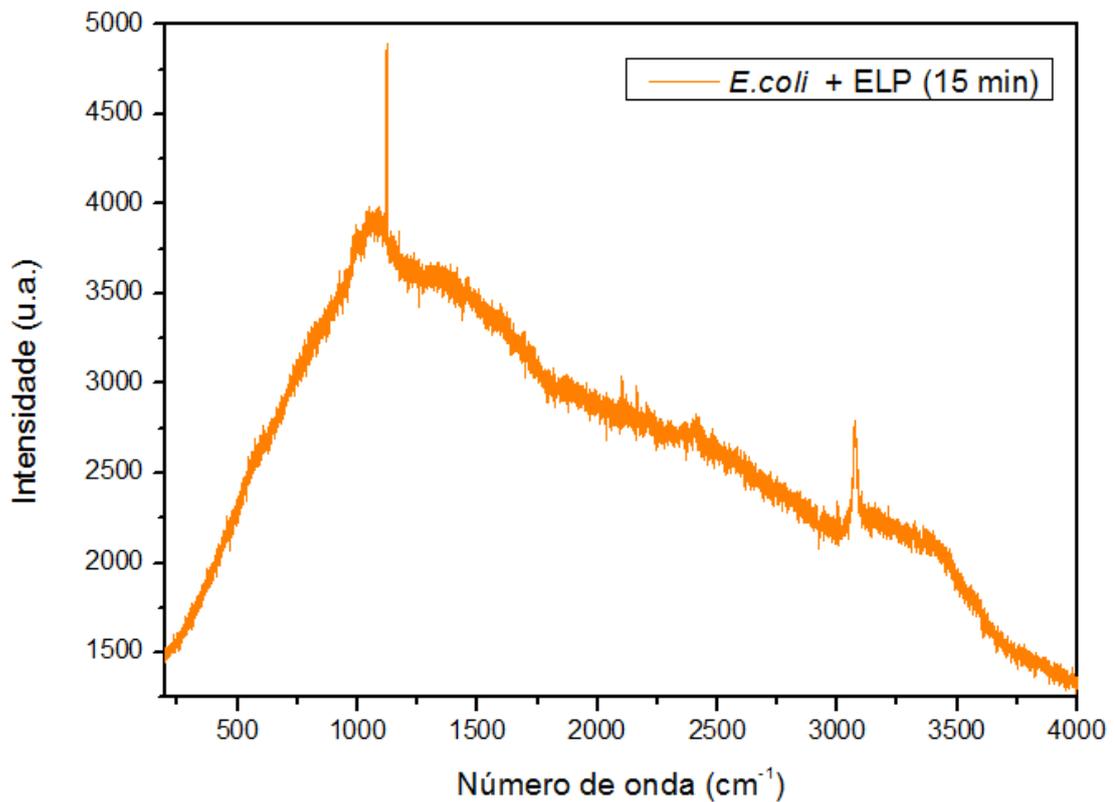
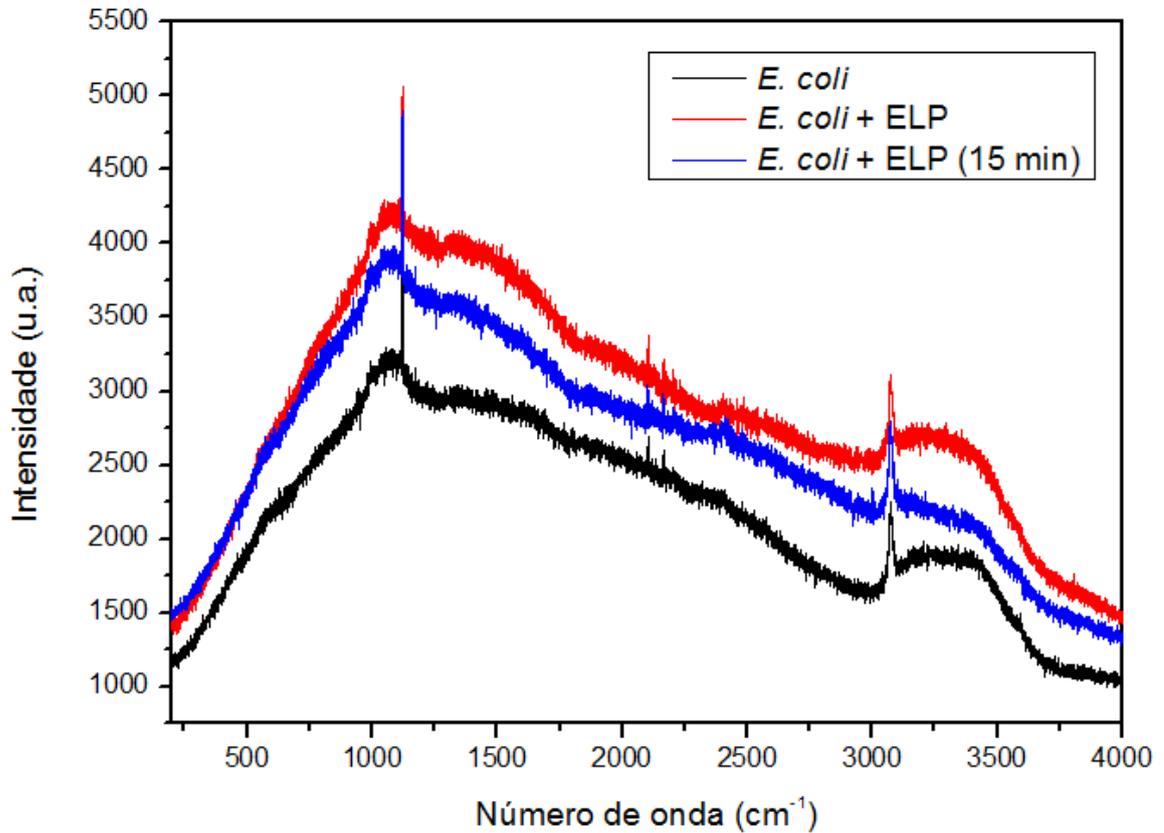


Figura 43– Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman da bactéria *E. coli*, para dados não normalizados



- ***Staphylococcus aureus (S. aureus)***

Os espectros de espalhamento Raman da bactéria *S. aureus*, pura, com a adição do ELP e após quinze minutos da adição do ELP, são apresentados nas figuras 44, 45 e 46, respectivamente. Assim como para os micro-organismos anteriores, são observados nos espectros quatro picos estreitos em 1125, 2105, 2168 e 3084 nm. A sobreposição dos espectros de espalhamento Raman relativos à *S. aureus* é apresentada na figura 47. A emissão concomitante de fotoluminescência também comprometeu os espectros Raman e, por esse motivo, os dados obtidos a partir deles não são conclusivos.

Figura 44- Espectro de espalhamento Raman para a bactéria *S. aureus* pura, para dados não normalizados.

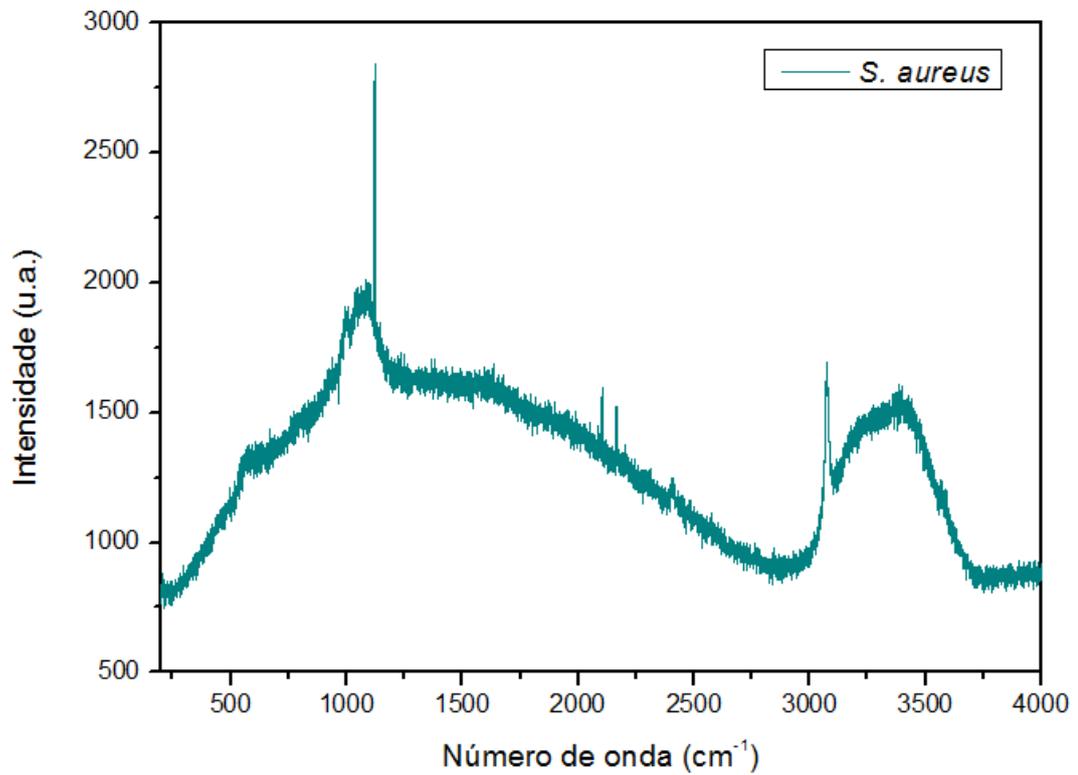


Figura 45- Espectro de espalhamento Raman para a bactéria *S. aureus* pura, para dados não normalizados.

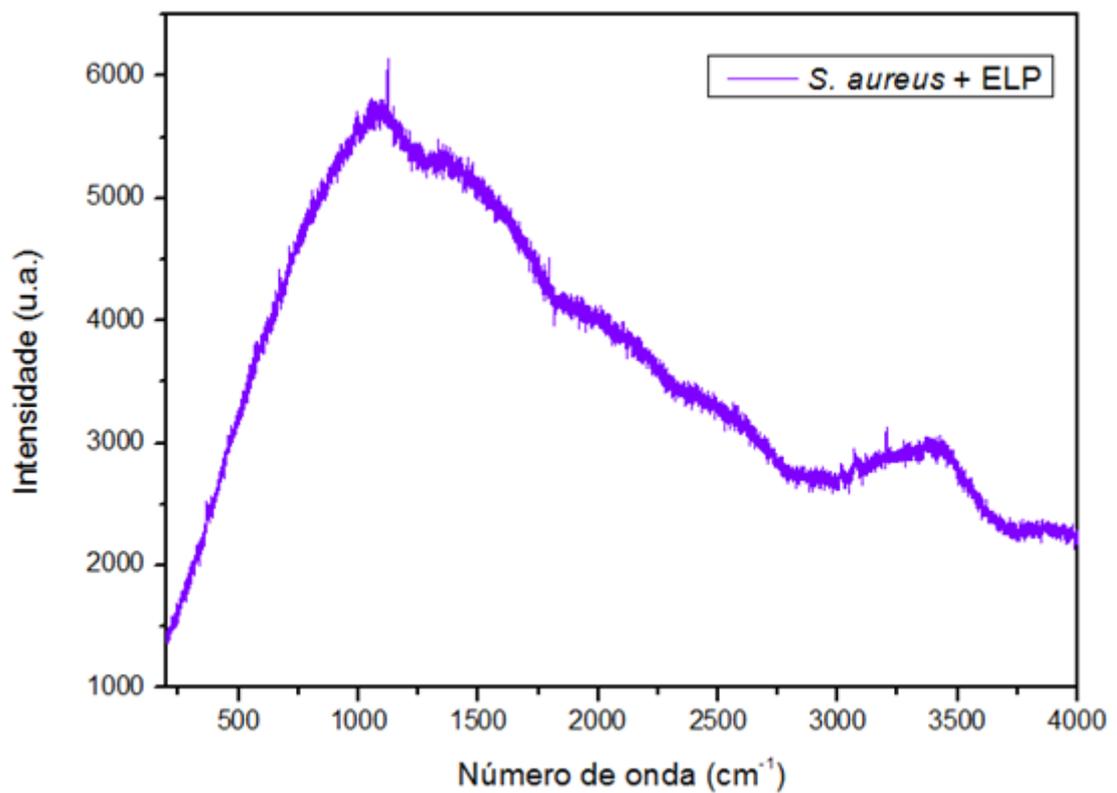


Figura 46- Espectro de espalhamento Raman para a bactéria *S. aureus* após quinze minutos da adição de ELP, para dados não normalizados.

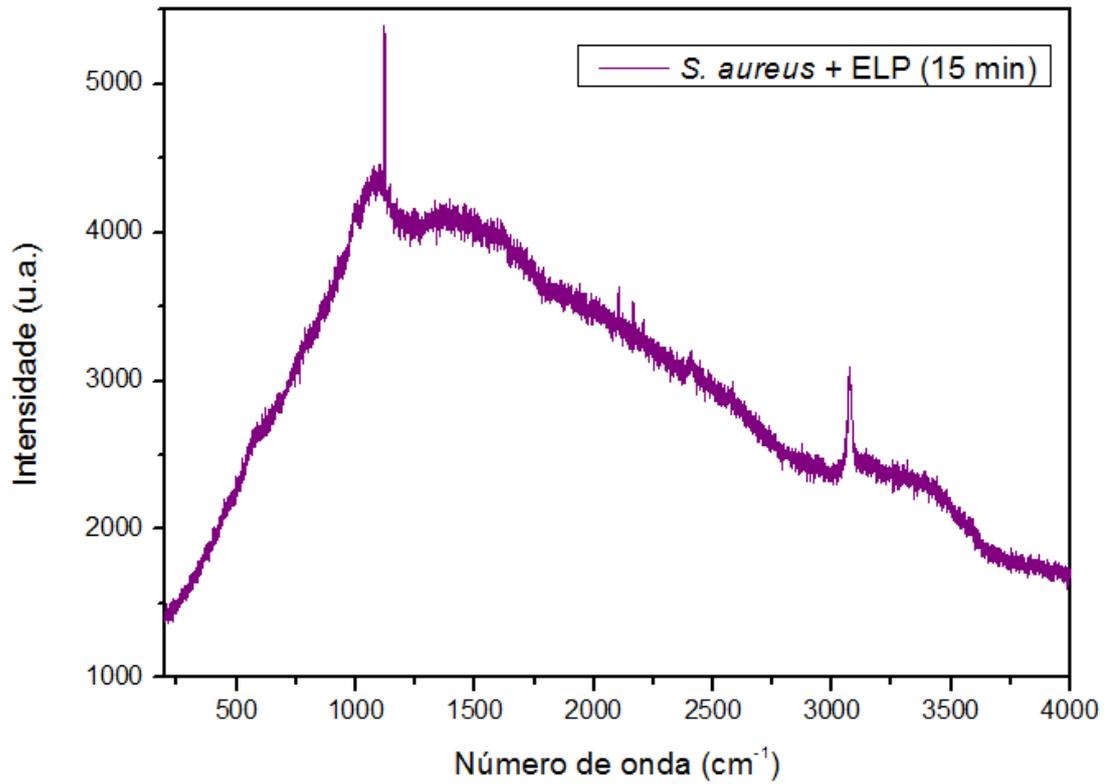
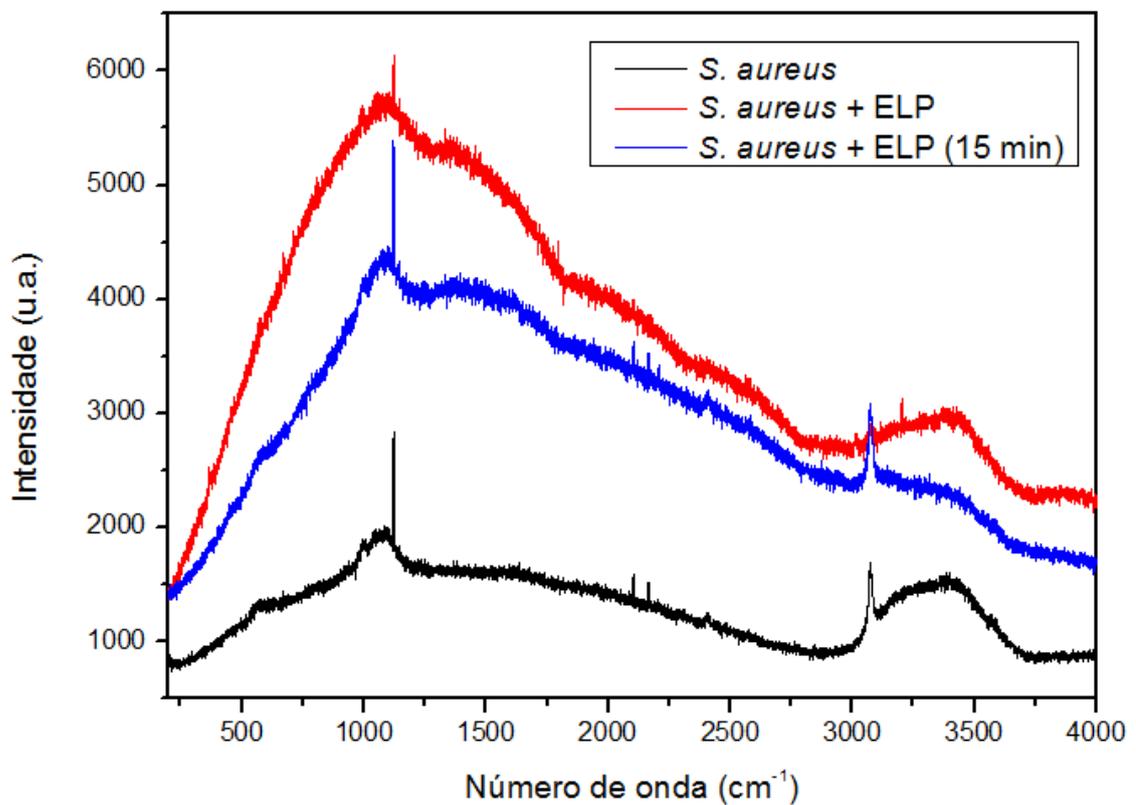


Figura 47- Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman da bactéria *S. aureus*, para dados não normalizados.



- **Espectros comparativos de todos os micro-organismos**

A sobreposição dos espectros de espalhamento Raman dos micro-organismos puros, com a adição de ELP e após quinze minutos da adição de ELP são apresentados nas figuras 48, 49 e 50, respectivamente. Os resultados obtidos não são conclusivos, uma vez que a emissão concomitante de fotoluminescência pode ter omitido outros picos Raman que, por sua vez, podem ser alterados quando o ELP é adicionado ao micro-organismo.

Figura 48 – Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman dos micro-organismos puros, para dados não normalizados.

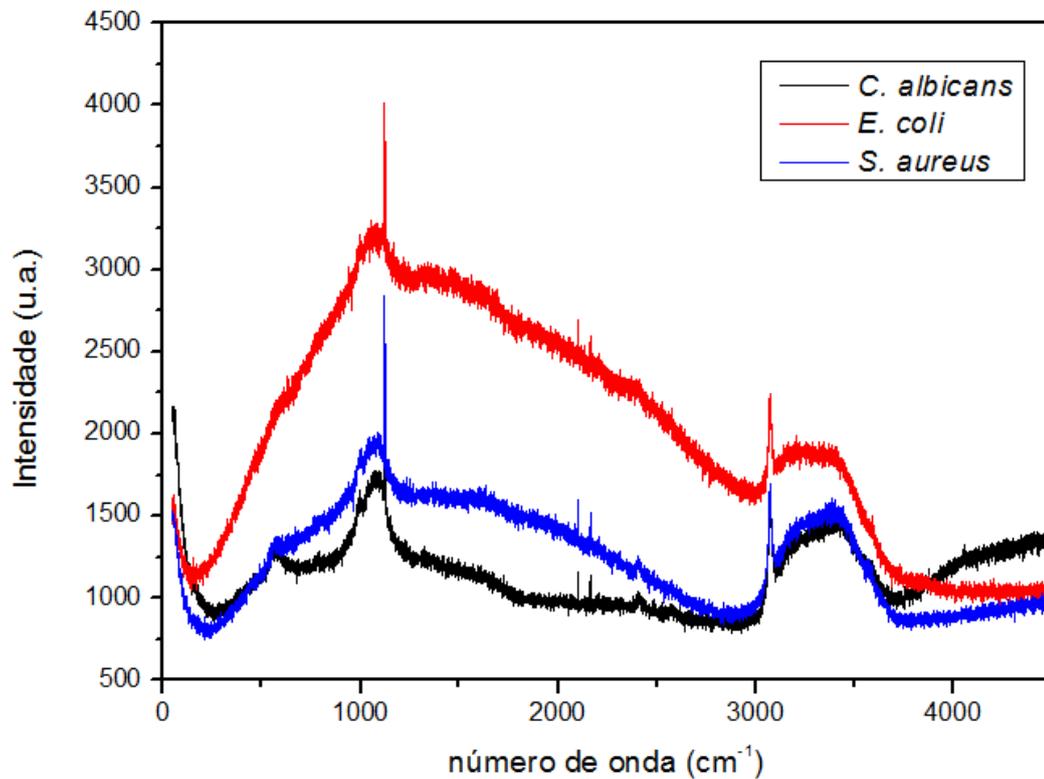


Figura 49- Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman dos micro-organismos com adição de ELP, para dados não normalizados.

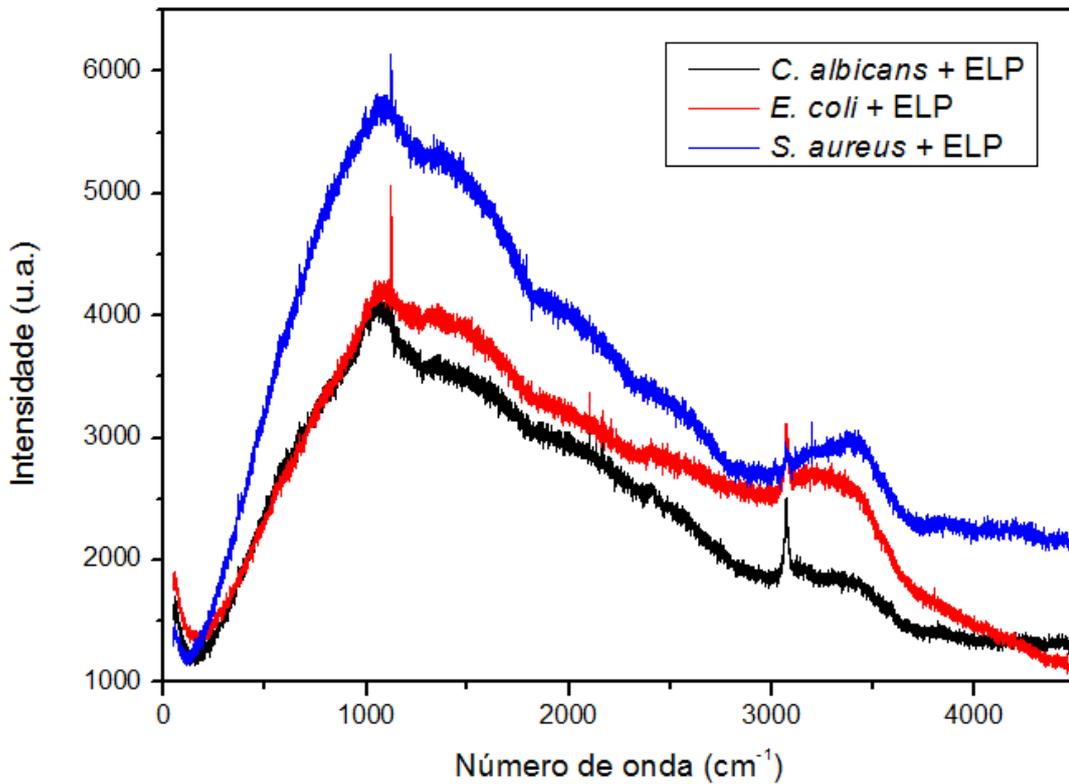
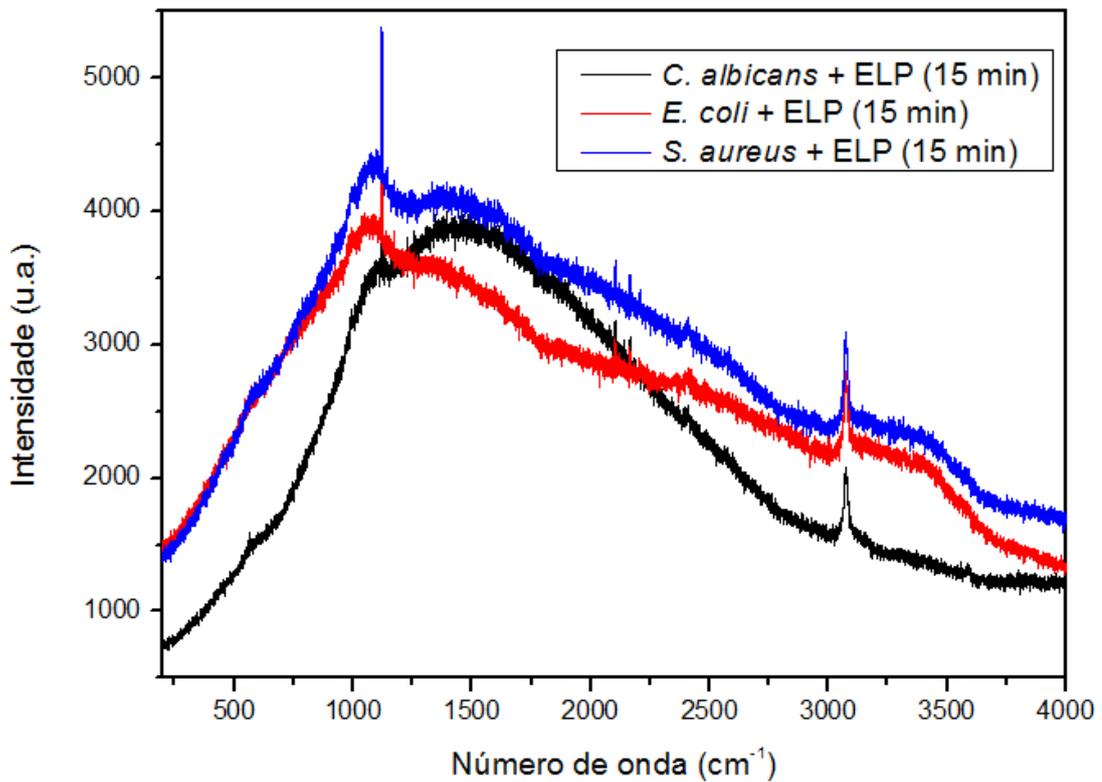


Figura 50- Sobreposição dos espectros de espalhamento Raman dos micro-organismos após quinze minutos da adição de ELP, para dados não normalizados.



5 CONCLUSÕES

Este trabalho investigou alterações nos espectros de espalhamento Raman e de fotoluminescência de micro-organismos quando era adicionado a eles o agente antimicrobiano ELP, constituído do peptídeo *polycerradin*. Os resultados obtidos para a técnica de espalhamento Raman não foram conclusivos, uma vez que houve emissão de fotoluminescência concomitantemente. É necessário que sejam feitos estudos dessa técnica utilizando uma fonte de excitação com energia ainda mais baixa para tentar suprimir a emissão de fotoluminescência, permitindo a obtenção do espectro proveniente apenas de espalhamento Raman.

Por outro lado, os resultados obtidos para a espectroscopia de fotoluminescência são bastante promissores. Para os três micro-organismos estudados, que representam as espécies de fungos, bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas, foi observada a diminuição da razão entre as intensidades dos picos, atribuída principalmente à significativa diminuição do pico em 695 nm, quando o ELP é adicionado. Embora o mecanismo de ação do peptídeo *polycerradin* ainda esteja sendo investigado, uma possível explicação de sua atividade antimicrobiana e da diminuição observada na intensidade do pico em 695 nm, quando o mesmo foi adicionado aos micro-organismos, é a inibição da síntese do polissacarídeo glicano, presente na parede celular dos fungos e constituinte do heteropolissacarídeo peptidoglicano, principal componente da parede celular de bactérias. Esta interpretação corrobora com o fato de que a porcentagem de diminuição na razão entre as intensidades foi maior para a bactéria gram-positiva *S. aureus* do que para a bactéria gram-negativa *E. coli*, cuja camada de peptidoglicano é menos espessa.

Além disso, é observado que o espectro, após quinze minutos da adição de ELP, apresenta o pico em 695 nm com intensidade superior à do espectro colhido imediatamente após a adição do mesmo. Este comportamento ainda precisa ser investigado com mais rigor, no entanto, é possível afirmar que a resposta imediata à adição do ELP, observada nos espectros colhidos, é a diminuição brusca do pico em 695 nm, que pode ser resultado da mudança estrutural da parede celular do micro-organismo, e, em seguida, a intensidade do pico é ligeiramente aumentada conforme o micro-organismo vai sendo inibido e/ou morto.

Os espectros de fotoluminescência mostraram também uma boa relação sinal-ruído, visto que materiais biológicos apresentam comumente sinais muito ruidosos e que nas análises foi utilizada uma pequena quantidade de material a fim de reproduzir as condições de diagnóstico clínico.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram, portanto, o grande potencial de aplicação da espectroscopia de fotoluminescência para a identificação da inibição e/ou morte dos micro-organismos, ao se adicionar um agente antimicrobiano.

Visto que não foram encontrados na literatura estudos que reportem alterações nas propriedades espectroscópicas de micro-organismos, quando os mesmos são submetidos à ação de compostos antimicrobianos, mais estudos são necessários para a confirmação dos comportamentos descritos neste trabalho.

6 PERSPECTIVAS

Uma vez que a rápida e eficiente identificação de micro-organismos, bem como o acompanhamento da ação do agente antimicrobiano, é de relevada importância, não só para a saúde pública, no caso de doenças causadas por micro-organismos patogênicos, como também para a indústria sucroalcooleira, para tornar mais eficiente a fermentação alcoólica (detecção de agentes contaminantes), e que os resultados obtidos neste trabalho são bastante promissores, visamos, posteriormente, a correlação entre a razão entre as intensidades dos picos, obtida através de espectros de fotoluminescência, com a porcentagem de inibição e/ou morte dos micro-organismos, obtida por medidas de densidade óptica, a fim de desenvolver um biossensor que identifique os micro-organismos e determine a porcentagem de inibição deles, quando um agente antimicrobiano é adicionado, através de espectros de fotoluminescência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Eisberg, R. e Resnick, R. (1985). *Física quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas*. 9ª edição. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1994. 928 p.
- ² Luz, tecnologia e arte. Disponível em: <<http://luztecnologiaearte.weebly.com/luz-natural-e-luz-cecirnica.html>> Acessado em: 04/12/2014.
- ³ Sathyanarayana, D. N. (2004). *Vibrational Spectroscopy: theory and applications*. New Delhi: New age international publishers, 2007. p.1-40.
- ⁴ Trzesniak, D. Métodos teóricos em química molecular. In: *Modelagem quântica de inibidores enzimáticos*. 2002. Dissertação de mestrado em física - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002. p. 1-19.
- ⁵ Harvey, D. *Modern Analytical Chemistry*. 1ª edition. Boston: McGraw-Hil, 2000. 798 p.
- ⁶ Valeur, B. and Berberan-Santos, M. N. *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2ª edition. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. 567 p.
- ⁷ Colthup, N.B., Daly, L.H. and Wiberley, S.E. *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. 3rd edition. San Diego: Academic Press, 1990. 543 p.
- ⁸ Yadav, L.D.S. *Organic Spectroscopy*. New Delhi: Anamaya Publishers; copublished by Boston: Kluwer Academic Publishers, 2005. 324 p.
- ⁹ Workman Jr, J., and Weyer, L. *Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy*. Boca Raton: CRC press – Taylor and Francis, 2007. 344 p.
- ¹⁰ Singh, R. C. V. Raman and the Discovery of the Raman Effect. *Physics in perspective*, 4, 399-420, 2002.
- ¹¹ Raman, C. V and Krishnan.K. S., A new type of secondary radiation. *Nature*, 121, 501-502, 1928.
- ¹² Smith, E. and Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy: A practical approach*. Chichester: John Wiley & Sons, 2005. 224 p.
- ¹³ Das, R. S. and Agrawal, Y. K., Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy*, 57, 163-176, 2011.
- ¹⁴ Ball, D.W., Theory of Raman Spectroscopy, *Spectroscopy*, 16 (11), 32-34, 2001.

- ¹⁵ Thermo Fisher Scientific. Molecular Spectroscopy - Introduction to Raman Spectroscopy. Disponível em: <<https://www.biotechprofiles.com/companyfiles/madisonnetwork/5bdd0a9f37694d6c9fb6e62db5049477.pdf>> Acesso em: 07 de dez. 2014.
- ¹⁶ McCreery, R. L. *Raman Spectroscopy for chemical analysis*, 3^a edition, New York: John Wiley & Sons, 2000.
- ¹⁷ Ryder, A.G., O'Connor, G.M. and Glynn, T.J. Identifications and Quantitative Measurement of Narcotics in Solid Mixtures Using Near-IR Raman Spectroscopy and Multivariate Analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 44(5), 1013-1019, 1999.
- ¹⁸ Rodriguez-Manzo, J.A. and Banhart, F. Creation of Individual Vacancies in Carbon Nanotubes by Using an Electron Beam of 1 Å Diameter, *Nano Letters*, 9 (6), 2285-2289, 2009.
- ¹⁹ Tu, Q. and Chang, C. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8, 545-558, 2012.
- ²⁰ Maquelin, K. et al., Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy, *Journal of Microbiological Methods*, 51, 255-271, 2002.
- ²¹ Jarvis, R.M. and Goodacre, R. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 76(1), 40-47, 2004.
- ²² da Silva, I. F. Espectroscopia de fotoluminescência. Disponível em: <<http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/Pl.pdf>> Acesso em: 11 de dez. 2014.
- ²³ Albani, J.R. *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Blackwell Publishing, 2007.
- ²⁴ Marin, N., Buszka, J. and Miller, L.S. *Alternative light source imaging: forensic photography techniques*. Burlington: Anderson, 2013.
- ²⁵ Perkowitz, S. *Optical characterization of semiconductors: infrared, Raman, and photoluminescence spectroscopy*. San Diego: Academic Press, 1993.
- ²⁶ Lasers. Disponível em: < <http://photonicswiki.org/index.php?title=Lasers>> Acesso em: 16 de dez. 2014.

- ²⁷ Serrano, N. F. G. Produção de compostos antimicrobianos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D: otimização das condições de cultivo, purificação e caracterização dos bioprodutos. Tese de doutorado (233 f). São Carlos: UFSCar, 2014.
- ²⁸ Gorman, D. *Photoluminescence and Excitation Studies of Semiconductors*. 2001. 76 f. Thesis (Master of science) - School of Physical Sciences, Dublin City University, Dublin, 2001.
- ²⁹ Wagnieres, G. A. et al., In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications. *Photochemistry and Photobiology*, 68(5), 603-632, 1998.
- ³⁰ LeVine, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*, 2, 404-410, 1993.
- ³¹ Walsh, J. D. et al. Rapid Intrinsic Fluorescence Method for Direct Identification of Pathogens in Blood Cultures. *mBio*, 4(6), 2013.
- ³² Fung, D.Y.C. Types of microorganisms. In: Cunningham, F.E and Cox, N.A. (eds). *The Microbiology of Poultry Meat Products*. London: Academic Press, 1987.
- ³³ Gupta, R.S. Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62, 1435–1491, 1998.
- ³⁴ Blaber, M. Membrane and cell surface polysaccharides, Glycoproteins, Proteoglycans. Disponível em: <http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture15/Lecture15.htm> Acesso em: 16 de dez. 2014.
- ³⁵ Todar, K. Pathogenic *E. coli*. Disponível em: <http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html> Acesso em: 16 de dez. 2014.
- ³⁶ Cunha, A.S. e da Cunha, M.R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. *Saúde & Ambiente em Revista*, 2(1), 105-114, 2007.
- ³⁷ Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ³⁸ Naglik, J. R. et al. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and infection*, 13 (12), 963-976, 2011.

39

Farmacologia.

Disponível

em:

<http://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/antimicrobials/tools/module-pdf-files/pharmacology>

Acesso em: 30 de dez. 2014.

⁴⁰ Raza, W., W. Yang, and Q. R. Shen. Paenibacillus polymyxa: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. *Journal of Plant Pathology*, 90(3), 419-430, 2008.