

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Desenvolvimento de biossensor óptico para detecção de
microrganismos patogênicos

Bruno da Silva Thomazini
Prof. Dr. Eng. Fernando M. Araújo-Moreira
Prof.^a Dr.^a Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

São Carlos

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Desenvolvimento de biossensor óptico para detecção de
microrganismos patogênicos**

Orientado: Bruno da Silva Thomazini

Orientadores: Prof. Dr. Eng. Fernando M. Araújo-Moreira
Prof.^a Dr.^a Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

Tese de doutorado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da UFSCar como
parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

São Carlos

2016

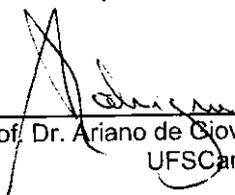


Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Bruno da Silva Thomazini, realizada em 10/11/2016:



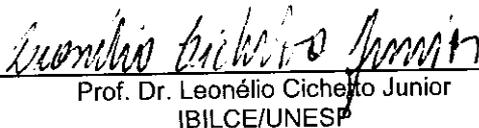
Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo Moreira
UFSCar



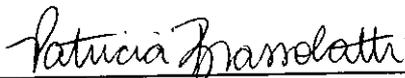
Prof. Dr. Ariano de Giovanni Rodrigues
UFSCar



Profa. Dra. Nadja Fernanda Gonzaga Serrano
UNESP



Prof. Dr. Leonélio Cichetto Junior
IBILCE/UNESP



Profa. Dra. Patricia Brassolatti
UFSCar

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, o grande criador e mantenedor da vida e fonte de toda sabedoria. Agradeço à Ele por me guiar até aqui e por não permitir que eu desanimasse.

Agradeço a toda minha família, especialmente os meus pais, Aida e Oswaldo, pela educação que me deram e pelo apoio e dedicação que tiveram na minha formação. Agradeço também meu irmão Leonardo, pelo apoio e pelo exemplo como professor e pesquisador.

Agradeço de uma forma muito especial a minha esposa Jéssica, pela ajuda incondicional. Obrigado por acreditar em mim e acreditar que eu fosse capaz de superar todos os obstáculos e chegar até aqui. Obrigado por todo apoio que me deu nessa minha jornada e por entender minha ausência nas longas noites de estudo, inclusive aos finais de semana.

Agradeço à minha filha Nina, que me recebe toda manhã com o sorriso mais lindo do mundo e que, mesmo muito pequena, me ensina a dar valor nas coisas realmente importantes.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando M. Araujo-Moreira, primeiramente pela oportunidade que me deu e por ter me aceito como seu aluno. Agradeço também por ser a pessoa que é, por tudo que me ensinou ao longo desses anos e por contribuir para meu crescimento e desenvolvimento acadêmico. Pessoa a qual possuo imensa admiração, um exemplo de professor, pesquisador e orientador.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Elisabeth Loshchagin Pizzolitto, por toda ajuda ao longo desses anos.

Agradeço aos colegas/alunos da Biotec, pela ajuda e pela troca de conhecimento durante esses anos.

Agradeço a parceria com o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB), UFSCar, na pessoa da Prof.^a Dr.^a Cristina Paiva de Sousa, responsável pelo laboratório.

Agradeço ao Laboratório de Semicondutores do Departamento de Física (UFSCar), pelas medidas de fotoluminescência.

Agradeço ao Prof. Dr. Ariano de Giovanni Rodrigues pela ajuda na obtenção e análise das medidas de fotoluminescência e no desenvolvimento do biossensor.

Agradeço à Dr.^a Nadja Serrano pela imensa ajuda no desenvolvimento de todo o projeto e por disponibilizar os microrganismos estudados.

Agradeço à Cláudia Pastega, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por toda ajuda nas questões burocráticas.

Agradeço ao meu sogro, Antônio, pela ajuda na montagem do protótipo do sensor.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa Jéssica, minha filha Nina e aos meus pais. Meus maiores tesouros.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	18
ABSTRACT	19
I. OBJETIVO GERAL	27
I.II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
II. CONCEITOS TEÓRICOS	28
II.I. CONCEITOS DA ÁREA BIOLÓGICA	28
II.I.I. BACTÉRIAS	28
II.I.II. FUNGOS	29
II.I.III. IMPACTO CAUSADO PELA CONTAMINAÇÃO POR MICRORGANISMOS PATOGENÉTICOS	32
II.I.IV. PEPTÍDEOS.....	36
II.II. CONCEITOS DA ÁREA DE FÍSICA	42
II.II.I. ESPECTROSCOPIA	42
II.II.II. INTERAÇÃO LUZ-MATÉRIA.....	43
II.II.III. ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	45
II.II.IV. ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA	46
II.II.V. ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA (FENÔMENO FÍSICO).....	50
II.II.VI. FOTOLUMINESCÊNCIA EM MICRORGANISMOS	54
II.II.VII. SENSORES E BIOSSENSORES.....	55
III. MATERIAIS E MÉTODOS	60
III.I. PREPARO DA SOLUÇÃO DO PEPTÍDEO POLYCERRADIN	60
III.II. PREPARO DAS SUSPENSÕES-TESTE MICROBIANAS	61
III.III. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE FOTOLUMINESCÊNCIA	62
III.IV. TRATAMENTO DOS DADOS OBTIDOS	66
III.V. PROPOSTA DE ELABORAÇÃO DO SENSOR	66
III.VI. COMPONENTES DO SENSOR	68
III.VI.I. FONTE DE EXCITAÇÃO	68
III.VI.II. FILTRO	69
III.VI.III. DETECTOR (LDR)	70

III.VII. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO SENSOR	71
III.VII.I. FONTE EXCITAÇÃO.....	71
III.VII.II. FILTRO.....	74
IV. DADOS E RESULTADOS	77
IV.I. ESPECTROS DE FOTOLUMINESCÊNCIA	77
IV.I.I. Candida albicans.....	77
IV.I.II. Colletotrichium gloeosporioides.....	80
IV.I.III. Escherichia coli.....	82
IV.I.IV. Enterococcus faecalis.....	88
IV.I.V. Fusarium subglutinans.....	90
IV.I.VI. Staphylococcus aureus.....	92
IV.I.VII. Shigella sonnei.....	96
IV.I.VIII. COMPARATIVO DE TODOS MICRORGANISMOS ESTUDADOS.....	98
V. PROTÓTIPO	101
VI. DISCUSSÃO	109
VII. CONCLUSÃO	114
VIII. ETAPAS FUTURAS	116
BIBLIOGRAFIA	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de identificação de microrganismos com respectivos custos e tempo para análise.....	24
Tabela 2. Espécies bacterianas, área de relevância e respectivas características patogênicas.....	25
Tabela 3. Bactérias patogênicas, doenças causadas, toxinas secretadas, fonte de infecção e taxa de mortalidade quando usadas como armas biológicas (Adaptado de: Ivnitski et al., 1999).....	32
Tabela 4. Principais agentes biológicos que contaminam alimentos.....	34
Tabela 5. Exemplos de PAMs agrupados de acordo com as características estruturais.....	39
Tabela 6. Vários tipos de luminescência (Valeur, 2001).....	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aumento no número de bactérias super-resistentes (gráfico à esquerda) versus redução no desenvolvimento de novas drogas (gráfico à direita). A) Crescimento da resistência à antibióticos de cepas de E. coli, Enterobacter e Klebsiella. B) Número de novos antibióticos aprovados pela FDA entre os anos de 1983 e 2007.....25
- Figura 2.** Diferenças na composição da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....28
- Figura 3.** Estrutura e organização dos fungos multicelulares (Fonte: <http://cadernosdofernando.blogspot.com.br/2014/03/reino-fungi-meu-caderno-de-biologia.html>).....30
- Figura 4.** Mecanismo de ação proposto para peptídeos antimicrobiano (PAM) em bactérias Gram-negativas. Os PAM se associam com a superfície externa carregada negativamente tanto pela neutralização de carga sobre um fragmento da membrana externa ou interagindo fortemente com os locais de ligação de cátions divalentes em lipopolissacarídeos (LPS). Os modelos listados explicando os mecanismos de permeabilidade da membrana incluem: tapete, barril, toroidal, e canal agregado. O efeito líquido de A a D é que alguns monômeros serão translocados para o citoplasma e podem dissociar a forma da membrana e ligar-se a polianions celulares tais como DNA e RNA, inibir atividade enzimática tal como síntese de proteínas ou folding protéico.....38
- Figura 5.** Espectro eletromagnético (Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectro_vis%C3%ADvel#/media/File:Espectro_eletromagnetico-pt.svg).....43
- Figura 6.** Diagrama de níveis de energia para espalhamento Raman; (a) espalhamento Raman Stokes (b) espalhamento Raman anti-Stokes (Fonte: http://www.kosi.com/na_en/products/raman-spectroscopy/raman-technical-resources/raman-tutorial.php)...46
- Figura 7.** Tipos de interação entre luz e matéria com destaque para a fotoluminescência.....47
- Figura 8.** Esquema mostrando os três processos pelos quais um elétron pode ganhar ou perder energia através da luz no fenômeno de fotoluminescência. (Serrano, 2014).....48

Figura 9. Espectro de fotoluminescência, em temperatura ambiente, de um diodo Gunn (Dover, 1971)	50
Figura 10. Diagrama de Jablonski.	51
Figura 11. Diferença dos estados excitados nos fenômenos de fluorescência e fosforescência.	53
Figura 12. Símbolo e estrutura de um fotoresistor (Fonte: http://www.dreaminc.com.br/sala_de_aula/ldr-fotoreistor/).....	56
Figura 13. Principais componentes funcionais de um biossensor. A detecção da molécula alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C) (Calil & Silva, 2011).	57
Figura 14. Sistema de duas fases utilizado para obtenção do ELP a partir do ET (Serrano, 2014).	60
Figura 15. Imagem do equipamento experimental utilizado neste trabalho para o estudo da fotoluminescência, pertencente ao Grupo de Semicondutores do Departamento de Física da UFSCar.	63
Figura 16. Montagem experimental utilizada neste trabalho para o estudo da fotoluminescência.	63
Figura 17. (a) Geração e desvio da luz de laser de argônio; (b) Ingresso do feixe de laser no primeiro monocromador.	64
Figura 18. Imagem do primeiro monocromador, utilizado para conseguir o estreitamento do feixe de luz laser utilizado no estudo do fenômeno de fotoluminescência.	64
Figura 19. (a) Amostra montada no microscópio em lâmina de vidro; (b) feixe de laser incidindo sobre a amostra montada na lâmina de vidro no microscópio.	65
Figura 20. Esquema proposto com os principais componentes do sensor óptico.	67
Figura 21. Esquema de ligação dos componentes eletrônicos.	67

Figura 22. LED monocromático utilizado na montagem do dispositivo.	68
Figura 23. Módulo LED utilizado na montagem do dispositivo.	69
Figura 24. Caneta Laser ($\lambda=405$ nm) utilizada na montagem do dispositivo.	69
Figura 25. Filtro passa-faixa utilizado na montagem do dispositivo.	69
Figura 26. Perfil de transmissão do filtro passa-faixa utilizado na montagem do dispositivo. A transmissão de luz pelo filtro ocorre somente entre $\lambda=625-720$ nm.	70
Figura 27. Resistor dependente de luz (LDR) utilizado na montagem do dispositivo...	70
Figura 28. Espectrômetro utilizado para caracterização da fonte de excitação utilizada na construção do sensor.....	71
Figura 29. Espectro de emissão do LED utilizado na montagem do protótipo.....	72
Figura 30. Espectro de emissão da placa de LED utilizada na montagem do protótipo.....	72
Figura 31. Espectro de emissão do laser utilizado na montagem do protótipo.....	73
Figura 32. Medidor de potência (low power meter) utilizado na medição da intensidade de emissão das fontes de excitação.....	73
Figura 33. Espectrômetro utilizado na caracterização do filtro óptico (A) montagem geral; (B) detalhe do compartimento onde é colocado o filtro para análise.....	74
Figura 34. Espectro de transmitância do filtro utilizado no protótipo A) coletado experimentalmente utilizando o espectrômetro e B) disponibilizado pelo vendedor do filtro. A transmitância do filtro analisada pelo espectrômetro está na mesma faixa de comprimento de onda do <i>datasheet</i> disponibilizado pelo vendedor.....	75
Figura 35. Detalhe do espectro de transmitância do filtro utilizado no protótipo. Na faixa entre $\lambda=405-461$ nm (faixa de emissão das fontes de excitação) a transmitância do filtro é nula.....	75

Figura 36. Esquema de montagem de aparato para confirmação da eficiência do filtro passa-faixa. A) Com o filtro entre a luz da fonte de excitação e o detector (fibra-óptica), não foi possível detectar o espectro da luz da fonte de excitação. B) Ao retirar o filtro passa-faixa, foi possível obter o espectro da luz da fonte de excitação.....76

Figura 37. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Candida albicans* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha) para dados não normalizados. Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.78

Figura 38. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Candida albicans* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha) para dados normalizados em relação ao valor do pico à direita. Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.78

Figura 39. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Candida albicans* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha) com $t=273K$ para dados não normalizados. Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.79

Figura 40. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Candida albicans* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), com $T=273K$, para dados normalizados em relação ao valor do pico à direita. Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.79

Figura 41. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Colletotrichium* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.81

Figura 42. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Colletotrichium* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação ao pico estreito (à esquerda). Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.81

Figura 43. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.84

Figura 44. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação à intensidade relativa do pico estreito (à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.84

Figura 45. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha), pura com o dobro da concentração padrão (curva azul) e amostra com o dobro da concentração após a adição do ELP (curva rosa), para dados não normalizados. As curvas contendo amostra pura, com concentração padrão (curva preta) e com o dobro da concentração padrão (curva azul), possuem o mesmo padrão, com pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm. Após a adição do ELP é possível notar a supressão total do pico e o padrão permanece o mesmo para as duas concentrações.85

Figura 46. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha), pura com o dobro da concentração padrão (curva azul) e amostra com o dobro da concentração após a adição do ELP (curva rosa), para dados normalizados em relação ao máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). As curvas contendo amostra pura, com concentração padrão (curva preta) e com o dobro da concentração padrão (curva azul), possuem o mesmo padrão, com pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, mas a intensidade com o dobro da concentração é maior. Após a adição do ELP é possível notar a supressão total do pico e o padrão permanece o mesmo para as duas concentrações.85

Figura 47. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha) e $t=15$ min após a adição do ELP, para dados não normalizados. A curva contendo amostra pura possui picos em torno de $\lambda=550$ nm e $\lambda=700$ nm. Após a adição do ELP é possível notar a supressão total do pico à esquerda ($\lambda=700$ nm) em $t=0$ (curva vermelha) e $t=15$ min.86

Figura 48. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha) e $t=15$ min após a adição do ELP, para dados normalizados em relação ao pico estreito em torno de $\lambda=550$ nm. A curva contendo amostra pura possui picos em torno de $\lambda=550$ nm e $\lambda=700$ nm. Após a adição do ELP é possível notar a supressão total do pico à esquerda ($\lambda=700$ nm) em $t=0$ (curva vermelha) e $t=15$ min.86

Figura 49. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), com $T=273$ K, para dados não normalizados. É possível notar a supressão quase total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.87

Figura 50. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), com $T=273$ K, para dados normalizados em relação ao pico estreito (à esquerda). É possível notar a supressão quase total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.87

Figura 51. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Enterococcus F.* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.89

Figura 52. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Enterococcus F.* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação ao máximo valor de intensidade relativa (pico à esquerda), em torno de $\lambda=550$ nm. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.89

Figura 53. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Fusarium* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.91

Figura 54. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Fusarium* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação ao valor máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.91

Figura 55. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.93

Figura 56. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação ao máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.93

Figura 57. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta), após a adição do ELP em $t=0$ (curva vermelha) e $t=15$ (curva azul), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, logo após a adição do ELP ($t=0$). O espectro permanece inalterado após 15 minutos ($t=15$).94

Figura 58. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta), após a adição do ELP em $t=0$ (curva vermelha) e $t=15$ (curva azul), para dados normalizados em relação ao valor máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm,

logo após a adição do ELP ($t=0$). O espectro permanece inalterado após 15 minutos ($t=15$).94

Figura 59. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha) em $T=273K$, para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.....95

Figura 60. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha) em $T=273K$, para dados normalizados em relação ao máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.....95

Figura 61. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Shigella* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.....97

Figura 62. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Shigella* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação ao máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.....97

Figura 63. Espectros de fotoluminescência para todas as amostras puras (conforme legenda), para dados normalizados em relação à intensidade relativa em torno de $\lambda=550$ nm (pico à esquerda), comum à todos microrganismos.....99

Figura 64. Espectros de fotoluminescência para todas as amostras (conforme legenda) após a adição do ELP, para dados não normalizados. O pico em torno de $\lambda=550$ nm é comum à todos microrganismos, assim como a supressão do pico à direita.....99

Figura 65. Espectros de fotoluminescência para todas as amostras (conforme legenda) após a adição do ELP, para dados normalizados em relação ao valor máximo de emissão em torno de $\lambda=550$ nm. O pico em torno de $\lambda=550$ nm é comum à todos microrganismos, assim como a supressão do pico à direita. Todas as curvas são equivalentes após a adição do ELP.....100

Figura 66. Protótipo montado utilizando o LED como fonte de excitação.....101

Figura 67. Detalhe da caixa de proteção do sensor onde estão localizados o LED, o filtro passa-faixa e o sensor de luminosidade LDR (localizado abaixo do filtro).....	102
Figura 68. Espectro de transmitância do filtro passa-faixa. Detalhe para a transmitância em $\lambda=700$ nm.....	105
Figura 69. Espectro de transmitância do filtro passa-faixa. Detalhe para faixa de comprimento de onda com transmitância acima de 60%.....	105
Figura 70. Fluorescência do extrato de clorofila com excitação em $\lambda=405$ nm e $\lambda=532$ nm.....	106
Figura 71. Extrato de clorofila em luz ambiente, apresentando coloração verde (A) e sob excitação de luz azul ($\lambda=461$ nm), apresentando fluorescência (B)	107
Figura 72. Sensor com lâmina no interior da caixa de detecção, sem clorofila. A tensão indicada no multímetro é 0V, indicando a ausência de clorofila.....	107
Figura 73. (A) Lâmina contendo extrato de clorofila; (B) Detalhe da caixa de proteção do sensor com a lâmina contendo clorofila em seu interior.....	108
Figura 74. Sensor com lâmina no interior da caixa de detecção, com clorofila. A tensão indicada no multímetro é 12V, indicando a presença de clorofila.....	108

RESUMO

As infecções causadas por microrganismos super-resistentes representam um grande fardo clínico e fiscal sendo um problema de ordem mundial. Além disso, os microrganismos são responsáveis pela deterioração de alimentos que, se consumidos, podem causar grandes danos à saúde de consumidor. Por esse motivo, existe a necessidade de constante monitoramento tanto na área da saúde, quanto nos processos industriais, com o intuito de evitar que as infecções ocorram. Os métodos convencionais de detecção dos microrganismos baseiam-se na identificação biológica e bioquímica específicas. Embora esses métodos sejam sensíveis, baratos e forneçam informações quantitativas e qualitativas com relação à natureza do micro-organismo, eles são restritos, pois demandam um tempo relativamente grande, e precisam de um tratamento inicial da amostra para detecção de patógenos em baixas concentrações. A utilização de peptídeos na detecção de microrganismos patogênicos tem sido motivo de estudos uma vez que permite uma detecção precisa e rápida. Os peptídeos são conhecidos componentes antimicrobianos utilizados há muito tempo no combate às infecções causadas por patógenos. Estudos anteriores demonstraram que o peptídeo *polycerradin* pode ser utilizado no desenvolvimento de sensores, uma vez que sua ação antimicrobiana inibe a luminescência dos microrganismos, devido à morte celular. Os sinais luminosos provenientes da ação antimicrobiana desse peptídeo contra o microrganismo foram analisados para os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella sonnei*, *Furasim subglutinans*, *Colletotrichium gloeosporioides* e *Candida albicans*. Os espectros obtidos através dos dados, que foram coletados por espectroscopia de fotoluminescência, demonstram que houve a supressão da luminescência em torno de $\lambda=700-750$ nm, quando o extrato lipopeptídico (ELP) foi adicionado, em todos os microrganismos avaliados. Sendo assim, foi possível a determinação da ação antimicrobiana desse peptídeo contra os microrganismos estudados, bem como a presença desses microrganismos através de seu espectro de emissão. Esta técnica foi aplicada no desenvolvimento e construção de um sensor óptico, utilizando materiais de baixo custo, para utilização no monitoramento e identificação de microrganismos patogênicos em diversas áreas, como por exemplo, na área da saúde e na indústria alimentícia.

Palavras-chave: *Polycerradin*, peptídeo, fotoluminescência de microrganismos, sensor óptico.

ABSTRACT

Infections caused by super-resistant microorganisms represent a major clinical and fiscal burden as a global problem. In addition, microorganisms are responsible for the deterioration of foods that, if consumed, can cause great harm to consumer health. For this reason, there is a need for constant monitoring both in the health area and in industrial processes, in order to prevent infections from occurring. Conventional methods for detecting micro-organisms are based on specific biological and biochemical identification. Although these methods are sensitive, inexpensive, and provide quantitative and qualitative information regarding the nature of the microorganism, they are restricted because they require relatively long time and require initial sample treatment for pathogens at low concentrations. The use of peptides in the detection of pathogenic microorganisms has been the subject of studies since it allows a precise and rapid detection. Peptides are known antimicrobial components used for a long time in the fight against infections caused by pathogens. Previous studies have demonstrated that the *polycerradin* peptide can be used in the development of sensors, since its antimicrobial action inhibits the luminescence of microorganisms due to cell death. The light signals from the antimicrobial action of this peptide against the microorganism were analyzed for the microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella sonnei*, *Furasim subglutinans*, *Colletotrichium gloeosporioides* e *Candida albicans*. The spectra obtained through the data, which were collected by photoluminescence spectroscopy, showed that there was suppression of the luminescence around $\lambda = 700-750$ nm, when the lipopeptide extract (ELP) was added in all evaluated microorganisms. Thus, it was possible to determine the antimicrobial action of this peptide against the microorganisms studied, as well as the presence of these microorganisms through its emission spectrum. This technique was applied in the development and construction of an optical sensor, using materials of low cost, for use in the monitoring and identification of pathogenic microorganisms in several areas, such as health and food industry.

Keywords: *Polycerradin*, peptide, photoluminescence of microorganisms, optical sensor.

MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVAS

As contaminações por microrganismos patogênicos causam anualmente um grande impacto na economia. Somado a isso, o crescente aumento no número de bactérias super-resistentes a cada ano, tem se tornado uma grande ameaça mundial. Os custos para tratamento dessas infecções têm gerado um grande fardo econômico principalmente em virtude dos tipos de medicamentos necessários e tempo de estadia no hospital prolongado. Além disso, a taxa de desenvolvimento de novos antibióticos, capazes de combater as bactérias super-resistentes, não acompanha a taxa de aparecimento de novas bactérias com resistência à antibióticos. Além da área da saúde, a agricultura e a indústria alimentícia também sofrem o impacto causado por esse tipo de patógeno, onde lavouras inteiras ou lotes inteiros de alimentos são descartados devido a contaminação.

Os métodos de detecção desse tipo de microrganismos mais utilizados são eficazes, mas necessitam de um tempo relativamente grande para detecção. Novos métodos têm surgido a cada ano, mas ainda existe a carência por métodos de detecção que além de eficazes, consigam uma detecção *real-time* ou em poucos minutos e sejam de baixo custo. Quanto mais rápida a detecção, maiores são as chances de uma tomada de decisão efetiva e menores os impactos causados.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão presentes amplamente na natureza e no meio ambiente inclusive no trato intestinal de animais e dos seres humanos (Ivnitski *et al*, 1999; Leonard *et al*, 2003). Muitos desses organismos possuem funções essenciais tanto natureza quanto aos seres humanos, dentre as quais podemos citar a biodegradação de compostos tóxicos (Leonard *et al*, 2003), a fermentação que dá origem a inúmeros produtos e os probióticos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Reid *et al*, 2003). Estima-se que, em média, uma pessoa possua 150 tipos de bactérias no corpo, tanto do lado de fora, quanto de dentro (Madigan *et al*, 1997), sendo *Candida albicans* o patógeno com maior sucesso no corpo humano (Calderone, 2002).

Embora muitas espécies de microrganismos sejam benéficas e desempenhem papéis essenciais à vida e à saúde humana, muitas outras são responsáveis por inúmeras doenças e causam a morte de milhares de pessoas anualmente. Estima-se que, a cada ano, mais de dois milhões de pessoas desenvolvam infecções graves e 23 mil venham a óbito só nos Estados Unidos (O Globo, 2013). As chamadas bactérias super-resistentes são as grandes responsáveis por esse grande número de mortes, causadas por infecções, cada vez mais crescente. A resistência aos antibióticos ocorre quando as bactérias mudam a resposta ou criam mecanismos que bloqueiam a ação dos antibióticos usados para tratar as infecções. As infecções causadas por esse tipo de bactéria são

muito mais difíceis de serem tratadas e aumentam os custos médicos para tratamento e a taxa de mortalidade (WHO, 2016).

Os métodos convencionais de detecção dos microrganismos baseiam-se na identificação biológica e bioquímica específicas. Embora esses métodos sejam sensíveis, baratos e forneçam informações quantitativas e qualitativas com relação à natureza do micro-organismo, eles são altamente restritos no quesito tempo de ensaio, pois demandam um tempo relativamente grande, e precisam de um preparo inicial para detecção de patógenos em baixas concentrações (Leonard *et al.*, 2003). Alguns métodos padrões, levam até 7 dias para obtenção de resultados e se baseiam na habilidade das bactérias de formarem colônias visíveis (De Boer & Beumer, 1999; Artault *et al.*, 2001).

Outros métodos de detecção se baseiam em técnicas moleculares, as quais envolve o uso da Reação em cadeia da polimerase (PCR), diminuindo o tempo necessário para identificação de dias para algumas horas. A análise por PCR é altamente específica e consegue identificar inclusive microrganismos que não são identificados por meio de cultura convencional (Rahn 1992; Cohen, 1993). As técnicas moleculares estão sendo utilizadas com maior frequência nos últimos tempos, possibilitando diagnósticos mais precisos e em um curto prazo de tempo (Andrade *et al.*, 2010). Embora a análise por PCR seja específica, com custos de análise reduzidos e seja possível a obtenção de resultados em até 24h (Rodrigues *et al.*, 2011), alguns fatores devem ser considerados na utilização dessa técnica para detecção de patógenos, como, por exemplo, o alto custo tecnológico, a necessidade de aprovação e regulamentos e a padronização das instruções

(Malorny *et al.*, 2003). Diante disso, seria de grande importância a possibilidade de utilização de técnicas de detecção que sejam tão eficientes e específicas quanto a PCR, mas com detecção praticamente em tempo real, permite uma redução ainda maior dos custos dos processos envolvidos.

A utilização de biossensores ópticos utilizando peptídeos como elemento de reconhecimento para detecção de bactérias tem sido motivo de estudo nos últimos anos. Vários estudos se baseiam na imobilização do peptídeo (elemento de reconhecimento) em um substrato que pode ser inclusive uma fibra óptica (Dacres *et al.*, 2013; Deisingh & Thompson, 2004; (Ivnitski *et al.*, 1999; Kulagina *et al.*, 2005; Leonard *et al.*, 2003). Porém, algumas limitações têm sido encontradas, como por exemplo, a detecção somente de fragmentos celulares de bactérias e a não abrangência na detecção, onde somente uma espécie de bactéria pode ser detectada (Tenenbaum & Segal, 2015)

Atualmente, vários estudos têm sido realizados na busca por novas ferramentas de detecção que permitam a obtenção dos resultados em um tempo ainda mais curto mantendo a mesma qualidade dos dados obtidos nos métodos tradicionais (Ivnitski *et al.*, 1999; Leonard *et al.*, 2003; Kulagina *et al.*, 2005; Deisingh & Thompson, 2004; Mannoer *et al.*, 2010; Tenenbaum & Segal, 2015).

A tabela 1 apresenta o custo aproximado e o tempo necessário para análise de cada método de identificação.

Tabela 1. Métodos de identificação de microrganismos com respectivos custos e tempo para análise

Método de identificação	Custo	Tempo de análise
Clássico	R\$ 3,38/amostra	Até 7 dias
Biologia molecular (PCR)	R\$ 30,00/amostra Investimento: R\$ 150 mil (equipamentos)	3 horas
Sensor (ELP)	R\$ 600,00 (estimativa) equipamento	< 3 minutos

Além da necessidade e de monitoramento dos processos industriais, a fim de se evitar contaminações na linha de produção, e das perdas causadas por contaminação de microrganismos nas lavouras, outro fator importante para o desenvolvimento de sensores de rápida detecção tem sido o crescimento no número de bactérias super-resistentes, que tem atingido níveis críticos no mundo todo devido ao surgimento de novos mecanismos de resistência e o rápido espalhamento dessas bactérias, o que tem dificultado o tratamento dessas infecções. Quando infecções não podem ser tratadas com antibióticos comuns, existe a necessidade do uso de medicamentos mais sofisticados e mais caros, causando um fardo econômico para sociedade (WHO, 2016). Recentemente, no Brasil, foi encontrada pela primeira vez em cepas de *E. coli*, um gene que causa resistência à uma classe de antibióticos utilizados no tratamento de infecções por bactérias super-resistentes. Essa aparição pode contribuir para o surgimento de bactérias totalmente resistentes aos antibióticos (Fernandes *et al.*, 2016a, 2016b). Esse aumento no número de bactérias super-resistentes tem provocado um custo anual entre 100-300 milhões de dólares nos Estados Unidos (Wojkowska-Machj, 2006).

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

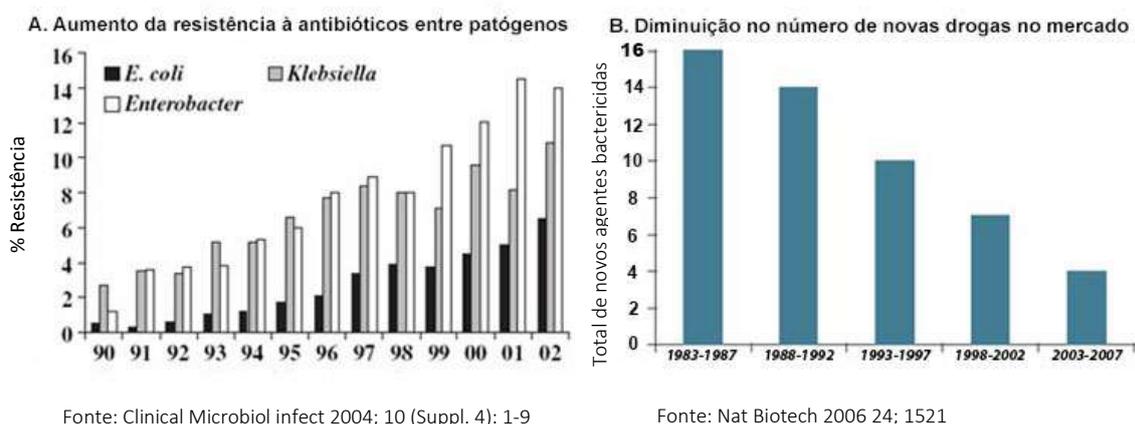


Figura 1. Aumento no número de bactérias super-resistentes (gráfico à esquerda) versus redução no desenvolvimento de novas drogas (gráfico à direita). A) Crescimento da resistência à antibióticos de cepas de *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. B) Número de novos antibióticos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) entre os anos de 1983 e 2007.

A tabela 2 demonstra alguns dos principais tipos de microrganismos patogênicos que causam um grande impacto tanto na área da saúde quanto na agricultura.

Tabela 2. Espécies bacterianas, área de relevância e respectivas características patogênicas.

Microrganismo	Área de Relevância	Características patogênicas	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i>	Saúde	Responsável por até 80% das infecções hospitalares no Brasil.	Oliveira <i>et al</i> , 2001
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Agricultura	Fitopatógeno de relevância em cultivos de caju, ocasionando a podridão dos frutos. Foram registradas perdas de 40% do volume total de produção a nível nacional	Viana <i>et al</i> .

<i>Enterococcus faecalis</i>	Saúde	<p>Principal causa de infecção em dentes com tratamento endodôntico (cerca de 81,5%).</p> <p>Estudos realizados em UTIs no Brasil indicam taxas de 14 a 25% de infecção em pacientes com uso prévio de antibióticos</p>	<p>Paradella <i>et al.</i>, 2007</p> <p>Brevilieri <i>et al.</i>, 2010</p>
<i>Escherichia coli</i>	Saúde	<p>Em 2010, causou a morte de 37 mil pessoas que ingeriram alimentos e água contaminados em todo o mundo.</p> <p>Em 2007 foram gastos 18,1 milhões de Euros no tratamento de infeções na Europa.</p>	<p>Laboissière, 2015</p> <p>de Kraker <i>et al.</i>, 2011</p>
<i>Shigella sonnei</i>	Saúde	<p>O número de mortes estimadas em 2013 a nível mundial foi de 34.400 crianças com menos de 5 anos devido a ingestão de água contaminada.</p> <p>Estima-se que anualmente ocorram entre 80-165 milhões de casos de doenças por <i>Shigella</i>.</p>	<p>Mani <i>et al.</i>, 2016</p> <p>Bowen, 2016</p>
<i>Candida albicans</i>	Saúde	<p>Anualmente são gastos aproximadamente 1,8 bilhões de dólares nos EUA para tratamento de infecções por <i>Candida</i>.</p>	<p>Foxman <i>et al.</i>, 2000</p>
<i>Fusarium subglutinans</i>	Agricultura	<p>Causa perda de 30 a 40% dos frutos e 20% de plantas, da produção de abacaxi a nível nacional.</p>	<p>Ventura <i>et al.</i>, 2009</p>

I. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biossensor óptico para detecção de microrganismos patogênicos, com rápida resposta (em menos de um minuto), capaz de detectar bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, para utilização na indústria de alimentos, na agricultura e na área da saúde, possibilitando uma tomada de decisão mais efetiva frente às contaminações por esses patógenos.

I.II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e analisar os espectros de fotoluminescência dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Candida albicans*, *Colletotrichium gloeosporioides* e *Fusarium subglutinans*.

- Obter e analisar o espectro de fotoluminescência do composto *Polycerradim* puro.

- Obter e analisar os espectros de fotoluminescência resultantes da interação entre o composto *Polycerradim* e os microrganismos.

- Propor um modelo de sensor baseado na fotoluminescência dos microrganismos utilizando materiais de baixo custo.

- Construir um protótipo do sensor utilizando os materiais mais adequados.

- Confirmar o funcionamento e a viabilidade de produção do sensor através de testes utilizando o protótipo construído para detecção de microrganismos.

II. CONCEITOS TEÓRICOS

II.I. CONCEITOS DA ÁREA BIOLÓGICA

II.I.I. BACTÉRIAS

As bactérias podem ser classificadas quanto a composição da sua parede celular. O método de coloração Gram, desenvolvido pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram, em 1884, permite separá-las em Gram positivas e Gram negativas. As Gram positivas não perdem a cor azul-roxeada após serem submetidas a um processo de descoloração, após serem coloridas com violeta de genciana. As Gram negativas, por sua vez, assumem um tom róseo-avermelhado quando submetidas ao mesmo processo (ABCMED, 2014). A Figura 2 ilustra a diferença da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

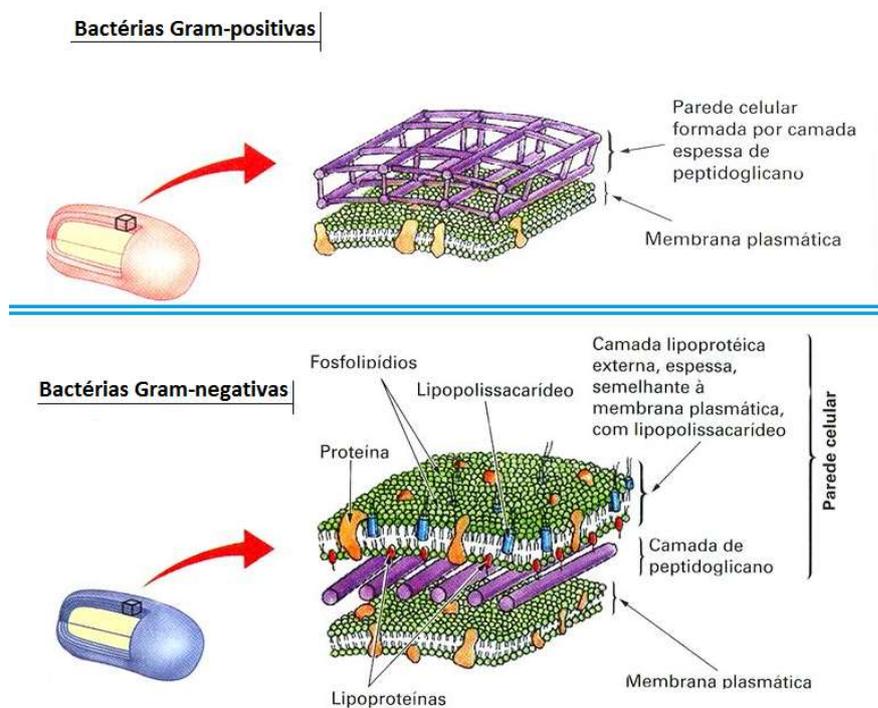


Figura 2. Diferenças na composição da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Enquanto as Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptidoglicano, as Gram-negativas possuem uma estrutura mais complexa formada por uma fina camada de peptidoglicano, uma membrana externa e polissacarídeos.

Essa identificação é importante pois cerca de 90 a 95% das bactérias Gram-negativas são patogênicas devido sua estrutura da membrana ser mais complexa. Além disso são mais resistentes à antibióticos e possuem uma maior virulência (ABCMED, 2014).

Entretanto, as bactérias Gram-positivas têm se tornado importantes patógenos ao longo dos anos e as infecções causadas por essas bactérias multirresistentes representam um grande problema de saúde pública tanto em relação à mortalidade quanto ao aumento com os gastos necessários para controle e desinfecção. Além disso, o aumento do arsenal terapêutico utilizado para o tratamento dessas infecções por patógenos Gram-positivos multirresistentes traz consigo outros desafios como, por exemplo, a necessidade de se encontrar maneiras de diminuir a resistência dos microrganismos aos antibióticos. (Woodford & Livermore, 2009; Wilcox, 2009).

II.I.II. FUNGOS

Os fungos são microrganismos pertencentes a um reino separado dos demais por apresentarem características específicas e diferentes tanto dos animais como dos vegetais, o reino Fungi, embora muitas vezes seja confundido com vegetais. O reino Fungi engloba uma grande variedade de organismos, quais

sejam, bolores, mofos, leveduras, fermentos, dentre outros. Esses microrganismos são eucariontes, ou seja, possuem um núcleo celular separado por uma membrana, e pode ser unicelulares ou multicelulares (Silva & Coelho, 2006).

As células dos fungos agrupam-se em filamentos que são denominados hifas. O agrupamento dessas hifas dá origem aos micélios (Figura 3).

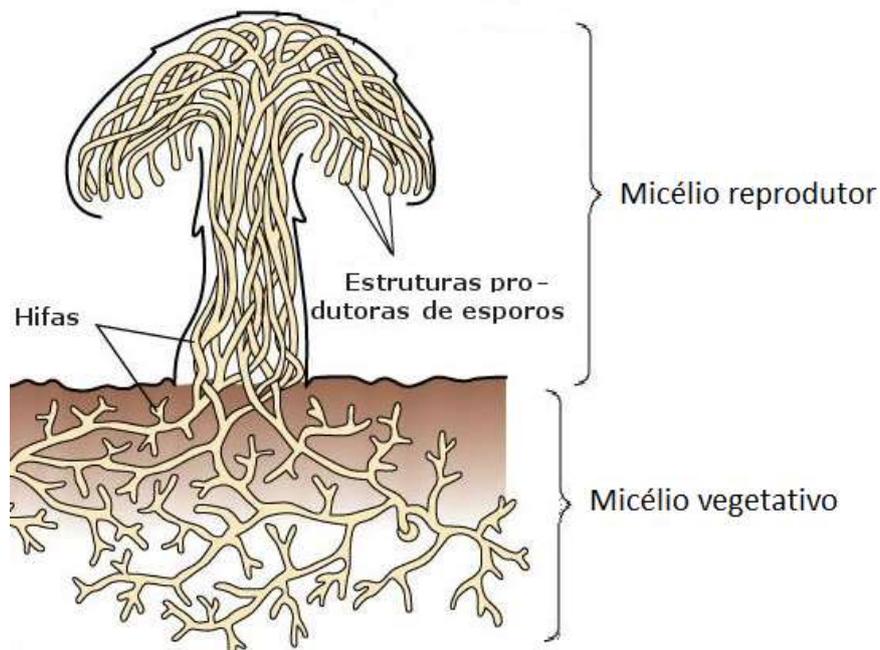


Figura 3. Estrutura e organização dos fungos multicelulares (Fonte: <http://cadernosdofernando.blogspot.com.br/2014/03/reino-fungi-meu-caderno-de-biologia.html>).

Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos na natureza, mas somente cerca de 69 mil espécies são conhecidas. Eles obtêm os nutrientes necessários para sobrevivência por absorção lançando enzimas aos substratos que colonizaram e absorvendo os nutrientes pela membrana celular (Silva & Coelho, 2006).

As leveduras vêm sendo utilizadas na fabricação de bebidas fermentadas desde 1880 quando iniciou a utilização de estirpes puras na fabricação de cerveja. Desde então a utilização desses microrganismos vem se tornando cada vez mais abrangente. Hoje em dia são amplamente utilizadas também na panificação. (Albertin *et al.*, 2014).

Nos processos biotecnológicos esses microrganismos são utilizados em diversos processos de fermentação seja para produção de etanol para combustível ou para produção de biocombustíveis a partir de resíduos agrícolas. Também pode ser utilizado na biorremediação de compostos tóxicos ao meio ambiente e na produção de uma série de outros produtos (Silva & Coelho, 2006).

Apesar dos benefícios que esses microrganismos apresentam, muitas espécies causam grandes prejuízos econômicos desde a área da agricultura até a área da saúde. Nos últimos anos tem havido um aumento significativo no número de infecções causadas por fungos. Esse fato pode ser explicado pelo aumento no número de procedimentos cirúrgicos invasivos e pela exposição à uma grande diversidade de antibióticos e imunossupressores (Harris, 2009).

Um estudo em particular demonstra que o fungo *Trichosporon insectorum* pode ser o responsável por infecções no trato gastrointestinal, particularmente, em pacientes com doenças imunossupressoras. Essas Infecções são ainda mais problemáticas devido à dificuldade de tratamento (Fuentefria, 2008).

II.I.III IMPACTO CAUSADO PELA CONTAMINAÇÃO POR MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

Embora a maioria desses microrganismos possuam um papel essencial na saúde humana, existem também os que são potencialmente nocivos podendo causar diversas doenças infecciosas (Tabela 3).

Tabela 3. Bactérias patogênicas, doenças causadas, toxinas secretadas, fonte de infecção e taxa de mortalidade quando usadas como armas biológicas. (Adaptado de: Ivnitski et al., 1999)

Bactéria	Doença	Toxina	Fonte de infecção
<i>Bacillus anthracis</i>	Antraz	Fator edema	Leite ou carne, AB
<i>Brucella melitensis</i>	Brucelose	-	Leite ou carne, AB
<i>Campylobacter jejuni</i>	Disenteria	-	Laticínios, carnes e cogumelos
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo	Neurotoxina	Alimentos
<i>Coxiella burnetii</i>	Pneumonia	-	AB
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria	Toxina diftérica	AB
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterite	Enterotoxina	Carne, peixe, leite, arroz, vegetais
<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia	-	AB
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose	-	AB
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Febre maculosa	-	AB
<i>Salmonella paratyphi</i>	Febre paratifoide	-	Contaminação fecal, ovos, leite, carne
<i>Salmonella typhi</i>	Febre tifoide	-	AB
<i>Shigella dysenteriae</i>	Disenteria bacteriana	Neurotoxina	Contaminação fecal
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pneumonia	Enterotoxina	Transportadores humanos
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumonia pneumocócica	Toxina eritrogenica	Transportadores humanos
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis	-	Secreção ou sangue contaminados
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Enterotoxina	Contaminação fecal
<i>Yersinia pestis</i>	Peste bubônica	Toxina da peste	AB

* AB= Arma biológica

As infecções causadas por microrganismos super-resistentes representam um grande fardo clínico e fiscal, principalmente as infecções causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina (SARM) que são um problema mundial. No

Brasil, embora não exista um controle de quantas pessoas morrem anualmente em decorrência de infecções, um levantamento realizado pela Associação Nacional de Biossegurança (Anbio) em 2011, apontou que as infecções hospitalares são responsáveis por cerca de 100 mil óbitos por ano (Benevides, 2011).

O aumento no uso de antibióticos tem causado o crescimento no número de bactérias resistentes, principalmente no ambiente hospitalar (Finking & Marahiel, 2004). Por esse motivo, o impacto econômico causado por essas infecções são os mais estudados, visando métodos mais eficazes e mais baratos no tratamento dessas infecções (Nathwani, 2009).

Staphylococcus aureus e *Enterococcus* spp. são encontradas no ambiente hospitalar e a utilização constante de antibióticos ao longo do tempo tem selecionado cepas resistentes, dificultando a terapia e o tratamento do paciente infectado. Nas últimas décadas não houve uma mudança nas espécies mais problemáticas, mas elas se tornaram mais resistentes (Woodford & Livermore, 2009).

As bactérias podem se espalhar amplamente e rapidamente se estiverem em um ambiente com condições adequadas de nutrição, temperatura e umidade (Ivnitski *et al.*, 1999). Um ambiente propício para o desenvolvimento desses microrganismos é a cavidade bucal onde são encontrados em uma grande quantidade. Estima-se que cerca de trezentas espécies bacterianas distintas possam ser isoladas no sulco periodontal (Zambon & Haraszthy, 1995). Muitas delas são responsáveis por doenças periodontais, como por exemplo

Actinobacillus actinomycetemcomitans, *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas Gingivalis* (Zambon, 1996).

As bactérias também são responsáveis por grande parte da deterioração dos alimentos e o consumo de alimentos contaminados põe em risco a saúde do consumidor causando graves doenças (Gram *et al.*, 2002; Rahman & Kang, 2009). Nesse caso, geralmente a população menos favorecida é a mais afetada, uma vez que os produtos mais baratos não possuem um controle adequado, aumentando a probabilidade de contaminação (Balbani & Butugan, 2001). A tabela 4 demonstra os principais agentes biológicos que contaminam alimentos.

Tabela 4. Principais agentes biológicos que contaminam alimentos.

Agentes biológicos	
<p>Bactérias</p> <p>Produtoras de toxinas pré-formadas <i>Clostridium botulinum</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i></p> <p>Produtoras de toxinas na luz intestinal <i>Vibrio spp</i> <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga <i>E. coli</i> enterotoxigênica</p> <p>Invasoras do epitélio intestinal <i>Salmonella spp</i> <i>Campylobacter spp</i> <i>Yersinia spp</i> <i>Shigella spp</i> <i>E. coli</i> enteroinvasiva <i>Listeria monocytogenes</i></p> <p>Outras <i>Aeromonas spp</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>E. coli</i> enteropatogênica</p> <p>Fungos <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i></p>	<p>Vírus</p> <p>Vírus da hepatite A Vírus da hepatite B Rotavírus Adenovírus (entérico) Parvovírus</p> <p>Protozoários</p> <p><i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Isospora belli</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Blastocystis hominis</i></p> <p>Parasitas</p> <p><i>Taenia solium</i> <i>Taenia saginata</i> <i>Hymenolepis nana</i> <i>Ascaris</i> <i>Trichuris</i> <i>Trichinella spiralis</i></p> <p>Toxinas</p> <p>Tetrodotoxina Micotoxinas Aflatoxinas</p>

Na indústria de alimentos, a utilização de bactérias e fungos é de extrema importância, como por exemplo, na produção de fermentados ou pães, onde os microrganismos veem sendo utilizados à muito tempo. Porém, existe também a possibilidade de contaminação por microrganismos patogênicos que podem causar uma série de doenças nos seres humanos.

Sendo assim, a análise se faz necessária para liberação de lotes de alimentos seguros. São utilizados métodos analíticos microbiológicos, porém, existe uma demanda por novos métodos mais rápidos e confiáveis, principalmente devido aos falsos-negativos que podem levar à liberação de lotes contaminados (Rodrigues *et al.*, 2011).

Na indústria de alimentos existe a necessidade de constante higienização dos equipamentos utilizados devido à formação de biofilmes. Biofilmes são comunidades de bactérias envoltas por substâncias, principalmente açúcares, produzidas pelas próprias bactéria, que conferem a comunidade proteção contra diversos tipos de agressões que ela pode vir a sofrer como, por exemplo, a falta de nutrientes, o uso de um antibiótico ou algum agente químico utilizado para combater bactérias, que podem se formar em qualquer superfície (Stoodley et al, 2002). Esses biofilmes são mais resistentes aos processos de sanitização do que as células dispersas e a sua remoção gera grandes custos à indústria além da possibilidade de contaminação dos alimentos processados e consequentes danos à saúde de consumidor. Uma das principais causas de surtos de origem alimentar é a formação de biofilmes nas superfícies de processamento de alimentos sendo os

microrganismos patógenos mais problemáticos a *E. coli* e *S. aureus* (Teixeira *et al.*, 2015).

Um estudo recente demonstrou a eficácia da utilização de óleo essencial de capim limão na inibição do crescimento de algumas espécies bacterianas e na remoção de células bacterianas aderidas em aço inoxidável (Barros *et al.*, 2015).

O leite, por possuir uma grande diversidade de nutrientes, representa um excelente meio de cultura para diversos tipos de microrganismos, sendo assim um importante meio de contaminação humana (Frazier, 1993). Na indústria de laticínio existe a necessidade de constante monitoramento para evitar a contaminação. Estudo realizado por Catão & Ceballos, 2001, concluiu que no leite cru, existe a presença de uma grande diversidade de espécies *Listeria* e mesmo a utilização da pasteurização não é suficiente para eliminação desses microrganismos.

II.IV. PEPTÍDEOS

Os peptídeos são compostos biológicos formados pela ligação entre dois ou mais aminoácidos através de ligações peptídicas (Lehninger *et al.*, 1995.) Esses compostos são produzidos por todos os tipos de organismos vivos e podem apresentar ação antimicrobiana contra uma vasta quantidade de microrganismos como bactérias, fungos e vírus (Giuliani *et al.*, 2007; Mookherjee & Hancock, 2007). Além disso, podem ser utilizados, inclusive, no tratamento de câncer (Papo & Shai, 2005).

A resistência bacteriana à antibióticos convencionais, tem aumentado a uma taxa muito maior que o desenvolvimento de novos antibióticos. Com isso, cresce, cada vez mais, o interesse por peptídeos antimicrobianos. Os peptídeos são moléculas que possuem entre 6 e 100 aminoácidos e tem variados pesos, sequencias e estruturas. Cada aminoácido possui um peso molecular médio de 110u. Assim, o peso molecular médio dos peptídeos vai de 660 a 11.000u. Eles possuem características únicas, diferentes dos antibióticos tradicionais, dentre as quais podemos citar: 1- O mecanismo de resistência dos microrganismos aos peptídeos não é tão bem desenvolvido, se comparado com o mecanismo de resistência aos antibióticos tradicionais; 2- Muitos antibióticos agem lentamente, enquanto os peptídeos podem matar os patógenos muito rapidamente (em questão de segundos); 3- Possuem um amplo espectro de atividade contra uma grande variedade de microrganismos., dentre eles, os fungos e bactérias (Lee, 2002; Giuliani *et al.*, 2007; Hajji *et al.*, 2010). Os peptídeos antimicrobianos curtos (com menos de 18 resíduos de aminoácidos) possuem vantagens para o desenvolvimento de agentes terapêuticos por possuírem baixa antigenicidade e baixo custo de síntese (Lee, 2002).

Sua atividade bactericida se dá por diversos mecanismos (Figura 4). Basicamente, os peptídeos se ligam à membrana celular, levando à ruptura da mesma e conseqüente morte celular (Harris, 2009). Esse mecanismo depende de diversos fatores como: sequência de aminoácidos, composição da membrana e concentração de peptídeos (Giuliani *et al.*, 2007). Estudos indicam que mudanças na camada externa da membrana celular de fungos pode influenciar a habilidade

dos peptídeos antimicrobianos de interagir com a parede celular (Harris, 2009). A figura 4 representa o mecanismo de ação do peptídeo descrito acima.

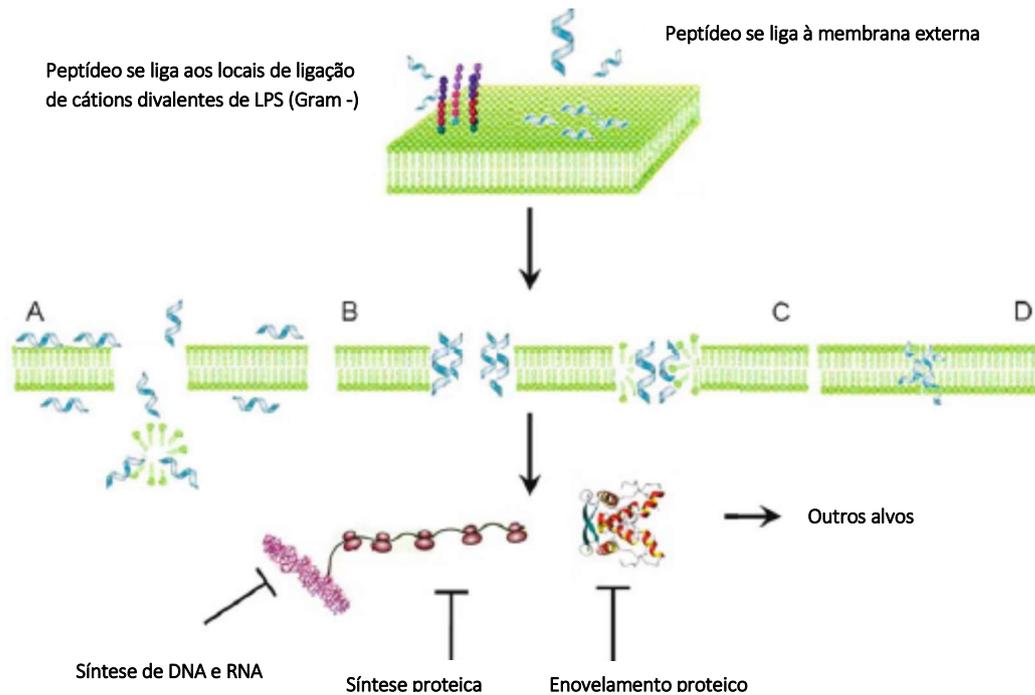


Figura 4. Mecanismo de ação proposto para peptídeos antimicrobianos (PAM) em bactérias Gram-negativas. Os PAM se associam com a superfície externa carregada negativamente tanto pela neutralização de carga sobre um fragmento da membrana externa ou interagindo fortemente com os locais de ligação de cátions divalentes em lipopolissacarídeos (LPS). Os modelos listados explicando os mecanismos de permeabilidade da membrana incluem: tapete, barril, toroidal, e canal agregado. O efeito líquido de A a D é que alguns monómeros serão translocados para o citoplasma e podem dissociar a forma da membrana e ligar-se a polianions celulares tais como DNA e RNA, inibir atividade enzimática tal como síntese de proteínas ou folding protéico.

Os peptídeos também podem causar um aumento na permeabilidade da parede celular. Isso, por si só, não causa a morte celular. Por esse motivo, estudos que tem investigado a relação entre a permeabilidade da membrana bacteriana e a morte celular, tem demonstrado que a morte celular pode ocorrer sem a ruptura da parede celular, o que sugere que os peptídeos antimicrobianos (PAMs) podem interagir com alvos intramoleculares (Giuliani *et al.*, 2007; Papagianni, 2003).

Os PAMs possuem uma ampla atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral e imunomodulatória (Giuliani *et al.*, 2007). Eles podem ser agrupados de acordo com suas características estruturais da seguinte forma: os que possuem alta concentração de determinado aminoácido; os que possuem ponte dissulfeto intramoleculares; e os que possuem uma estrutura de α -hélice com uma região anfifílica (Tabela 5) (Papagianni, 2003).

Tabela 5. Exemplos de PAMs agrupados de acordo com as características estruturais.

Alto conteúdo de determinado aminoácido			Ponte dissulfeto intramolecular		Estrutura anfifílica α -hélice	
Peptídeo	Aminoácido	Fonte	Peptídeo	Fonte	Peptídeo	Fonte
Abaecina	Pro	Insetos	α -Defensina	Humanos, ratos, coelhos	Magainina	Anfíbios
Apidaecinas	Pro, Arg	Insetos	B-defensina	Gado	Dermaseptina	Anfíbios
Bac-5	Pro, Arg	Ovinos	Defensina de insetos	Insetos	Bombinina	Anfíbios
Bac-7	Pro, Arg	Gado, ovelhas	Defensina de plantas	Plantas	Cecropina	Insetos
Drosocina	Pro	Insetos	Protegrina	Porcos	Esculentina 1	Anfíbios
Profenina	Pro, Phe	Porcos	Drosomicina	Insetos	Esculentina 2	Porcos

Em um estudo desenvolvido por Hajji *et al.*, 2010, foi isolado o primeiro peptídeo de fungo com poder bactericida contra uma variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Esse peptídeo, chamado AcAMP, possui estabilidade a temperatura (100°C durante 15min.) e pH (de 6.0 a 10.0), além de apresentar um grande espectro de ação contra bactérias e fungos. Dessa forma, eles são excelentes candidatos para aplicação como conservante alimentar e no controle biológico de doenças de plantas.

Alguns lipopeptídeos apresentam características que conferem, a esses compostos, propriedades surfactantes. Estudos demonstram a potencial aplicação

de lipopeptídeos na remediação de águas contaminadas por compostos orgânicos derivados do benzeno, oriundos de vazamentos de tanques de estocagem em postos de combustíveis. Esses vazamentos causam a contaminação de águas subterrâneas causando um importante impacto na saúde humana (Etchegaray & Herculano, 2011).

Lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis* possuem alta atividade antifúngica e podem ser usados para o controle de fungos e bactérias patogênicas (Etchegaray *et al.*, 2008).

Um estudo realizado recentemente por Huang & Yousef, 2014, procurou investigar o mecanismo de ação do lipopeptídeo Paenibacterin contra *E. coli* e *S. aureus*. Paenibacterin é um lipopeptídeo bacteriano catiônico que possui atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo bactérias super-resistentes. Os peptídeos antimicrobianos catiônicos são carregados positivamente e possuem propriedades anfifílicas, ou seja, possuem uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica. Esse lipopeptídeo interage com as membranas lipídicas por interações hidrofóbicas e pode interferir em diversas funções celulares, através dos danos que causa na membrana celular, uma vez que a membrana é essencial para a vida bacteriana (Lee, 2002). Outros peptídeos catiônicos naturais, ou mesmo peptídeos catiônicos sintéticos, são fortes candidatos para tratamento de uma série de infecções causadas por patógenos. (Mookherjee & Hancock, 2007; Lee, 2002)

As bactérias e fungos produzem peptídeos não-ribossômicos (PNRs) que possuem uma gama extremamente ampla de atividades biológicas, sintetizados

por enzimas chamadas sintetases. Apesar de ambos mecanismos de produção de peptídeos (ribossômicos e não-ribossômicos) apresentarem suas vantagens, os não-ribossômicos apresentam uma maior diversidade estrutural (Finking & Marahiel, 2004)

Os peptídeos não-ribossômicos (PNRs) representam uma classe de compostos naturais que apresentam um grande potencial biotecnológico devido à sua biossíntese e aplicações (Etchegaray & Herculano, 2011).

Diversos estudos têm investigado o poder bactericida dos PAMs contra uma enorme gama de microrganismos (Welker & von Döhren, 2006; Etchegaray *et al.*, 2008; Giuliani *et al.*, 2007; Hajji *et al.*, 2010; Huang & Yousef, 2014; Mookherjee & Hancock, 2007)

Estudo realizado por Serrano, 2014, conseguiu isolar, pela primeira vez, um lipopeptídeo, chamado *Polycerradin*, produzido por *P. polymyxa* RNC-D.

No mesmo estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana do lipopeptídeo *Polycerradin* contra um grande número de microrganismos, dentre eles *E. coli*, *Candida albicans* e *S. Aureus*, confirmando o potencial bactericida desse composto contra uma enorme gama de microrganismos, abrangendo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Estes resultados indicam o potencial desta molécula para aplicações biotecnológicas, tais como construções de sensores e biossensores para detecção de microrganismos e dispositivos para combate às infecções causadas inclusive por armas biológicas.

II.II. CONCEITOS DA ÁREA DE FÍSICA

II.II.I. ESPECTROSCOPIA

A energia eletromagnética é gerada a partir da oscilação dos campos elétrico e magnético e se propaga na forma de radiação. As ondas eletromagnéticas transportam a energia em pacotes denominados fótons que é a menor quantidade de energia que pode ser emitida ou absorvida. Max Plank foi o cientista que propôs quantização da energia, afirmando que a quantidade de energia total dos osciladores seria sempre um múltiplo inteiro de um mínimo de energia. Essas energias podem ser descritas em termos do comprimento de onda (λ) ou da frequência (ν) conforme as equações:

$$E = h\nu \qquad E = \frac{hc}{\lambda}$$

Onde, h é a constante de Planck e c é a velocidade da luz no vácuo (Eisberg & Resnick, 1985)

O espectro eletromagnético é o intervalo de todas as possíveis frequências de radiação eletromagnética. Também pode ser representado de acordo com o comprimento de onda da radiação (figura 5). É possível perceber que apenas uma pequena porção do espectro corresponde à luz visível.

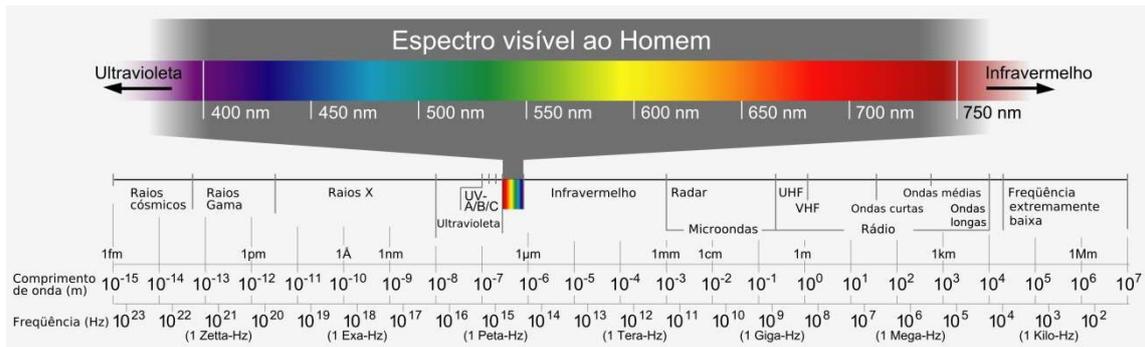


Figura 5. Espectro eletromagnético (Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectro_vis%C3%ADvel#/media/File:Espectro_eletromagnetico-pt.svg)

A relação entre a frequência e o comprimento de onda é inversamente proporcional $\lambda = \frac{c}{\nu}$, onde:

λ = comprimento de onda;

c = velocidade da luz no vácuo;

ν = frequência

II.II.II. INTERAÇÃO LUZ-MATÉRIA

A energia total dentro de uma molécula é a soma de várias energias distintas (Albani, 2007):

$E(\text{total}) = E(\text{translação}) + E(\text{rotação}) + E(\text{vibração})$

+ $E(\text{eletrônica}) + E(\text{orientação eletrônica do spin})$

+ $E(\text{orientação nuclear do spin})$

Dessa forma, quando a luz atinge um material, diversos fenômenos podem ocorrer da interação entre a luz e o material.

Duas importantes técnicas espectroscópicas utilizadas para caracterização de diversos tipos de materiais são a espectroscopia Raman e a espectroscopia de fotoluminescência. Ambas são baseadas em processos de interação entre a luz e a matéria, porém, os fenômenos físicos envolvidos, em cada uma delas, são diferentes. Basicamente, a espectroscopia Raman está baseada nos processos de espalhamento da luz pela matéria, enquanto a espectroscopia de fotoluminescência se baseia no fenômeno de emissão de radiação por um meio (Rodrigues & Galzerani, 2012).

Quando a radiação incidente está na faixa da luz visível, podem ocorrer basicamente dois processos: absorção do fóton emitido ou o espalhamento dele (Harvey, 2000).

No processo de absorção, quando um feixe de luz (fóton) incide sobre um material, este é absorvido, gerando um aumento na energia. Os elétrons do material, nesse caso, sofrem transição para um estado de maior energia (excitado) que o estado de equilíbrio. Esses estados excitados são instáveis e quando os elétrons retornam para os estados de equilíbrio, o excesso de energia é liberado podendo emitir luz (processo radioativo) ou não (processo não radioativo). A energia da luz emitida depende da diferença entre os dois estados (de equilíbrio e excitado) envolvidos no processo. Dessa forma, a cor (ou comprimento de onda) da luz emitida no processo está relacionada com essa diferença de energia (Rodrigues & Galzerani, 2012).

A transição do estado de equilíbrio para o estado excitado é acompanhada pela redistribuição da nuvem eletrônica dentro dos orbitais moleculares (Albani, 2007).

II.II.III. ESPECTROSCOPIA RAMAN

Quando uma onda eletromagnética atinge um material, parte dessa luz é refletida e parte é transmitida para dentro do material. Dessa parte que é transmitida para o material, uma parcela é absorvida na forma de calor e outra parcela é retransmitida como luz espalhada. Esse fenômeno de espalhamento inelástico da luz denomina-se espalhamento Raman e a luz espalhada é composta por comprimentos de ondas diferentes da luz incidente.

O espalhamento Raman pode ser classificado em duas formas: Stokes e anti-Stokes (Figura 6). No espalhamento Stokes, a frequência da luz emitida é menor que a frequência da luz incidente. Sendo assim, parte da energia é absorvida no processo e transformada em outras formas. Quando a frequência da luz emitida é maior que a frequência da luz incidente o processo denomina-se anti-Stokes. Nesse processo ocorre a transformação de energia que é retirada do meio espalhador em energia do campo de radiação (Rodrigues & Galzerani, 2012).

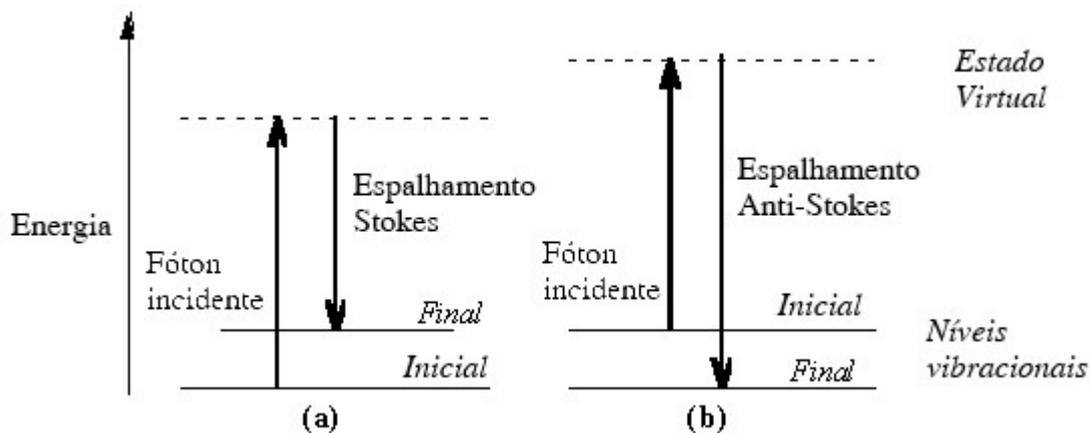


Figura 6. Diagrama de níveis de energia para espalhamento Raman; (a) espalhamento Raman Stokes (b) espalhamento Raman anti-Stokes (Fonte: http://www.kosi.com/na_en/products/raman-spectroscopy/raman-technical-resources/raman-tutorial.php).

II.II.IV. ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA

A luminescência é o fenômeno de emissão de fótons (energia eletromagnética) na região ultravioleta, visível ou infravermelho, do espectro eletromagnético, a partir de espécies eletronicamente excitadas. Em 1888, o físico e historiador científico Eilhardt Wiedemann, utilizou pela primeira vez a palavra luminescenz para descrever todos os fenômenos envolvendo a luz, que não estão relacionados com o aumento da temperatura. A luminescência é um processo que gera luz fria, ou seja, não ocorre o aumento de temperatura, enquanto no processo de incandescência ocorre o aumento da temperatura, e a luz gerada é denominada, luz quente (Valeur, 2001).

A tabela 6 apresenta a classificação dos vários tipos de luminescência, de acordo com o modo de excitação:

Tabela 6. Vários tipos de luminescência (Valeur, 2001).

<i>Fenômeno</i>	<i>Modo de excitação</i>
Fotoluminescência (fluorescência, fosforescência, fluorescência atrasada)	Absorção de luz (fótons)
Radioluminescência	Radiação ionizante (raios-X, α , β , γ)
Catodoluminescência	Raios catódicos (feixe de elétrons)
Eletroluminescência	Campo elétrico
Termoluminescência	Aquecimento após armazenamento prévio de energia (ex. radiação radioativa)
Quimioluminescência	Processos químicos (ex. oxidação)
Bioluminescência	Processos bioquímicos
Triboluminescência	Forças de fricção e eletrostática
Sonoluminescência	Ultrasom

A fluorescência e fosforescência são casos particulares do fenômeno de luminescência. Isso ocorre quando um fóton é absorvido por determinado material, fazendo com que as moléculas fiquem em um estado eletronicamente excitado. A possível posterior emissão de fótons e consequente desexcitação, é chamada de fotoluminescência e é apenas um dos efeitos possíveis para a interação entre a luz e matéria, como mostra a figura 7.

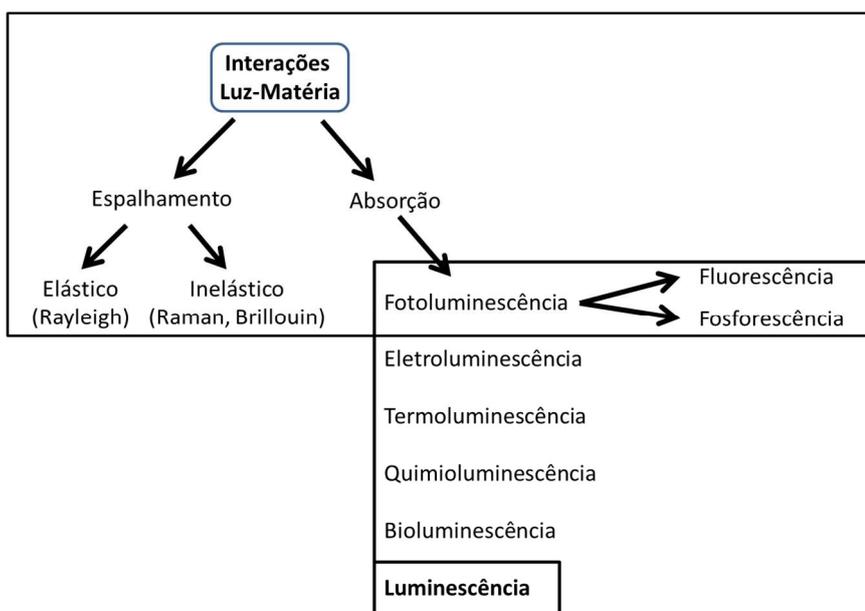


Figura 7. Tipos de interação entre luz e matéria com destaque para a fotoluminescência.

Os compostos luminescentes podem ser de diversos tipos, classificados da seguinte maneira:

- compostos orgânicos: hidrocarbonetos aromáticos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno, perilo, etc.), fluoresceína, rodamina, cumarina, oxazinas, polienos, difenilpolienos, aminoácidos (triptofano, tirosina, fenilalanina), etc.
- compostos inorgânicos: íon uranila, íons lantanídeos, vidros dopados (com Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag), cristais (ZnS, CdS, ZnSe, CdSe), etc.
- compostos organometálicos

Como visto anteriormente, a fotoluminescência consiste na emissão de radiação por uma molécula durante a passagem do estado de excitação para o estado de equilíbrio. A figura 8 ilustra o processo de ganho e perda de energia pelo elétron.

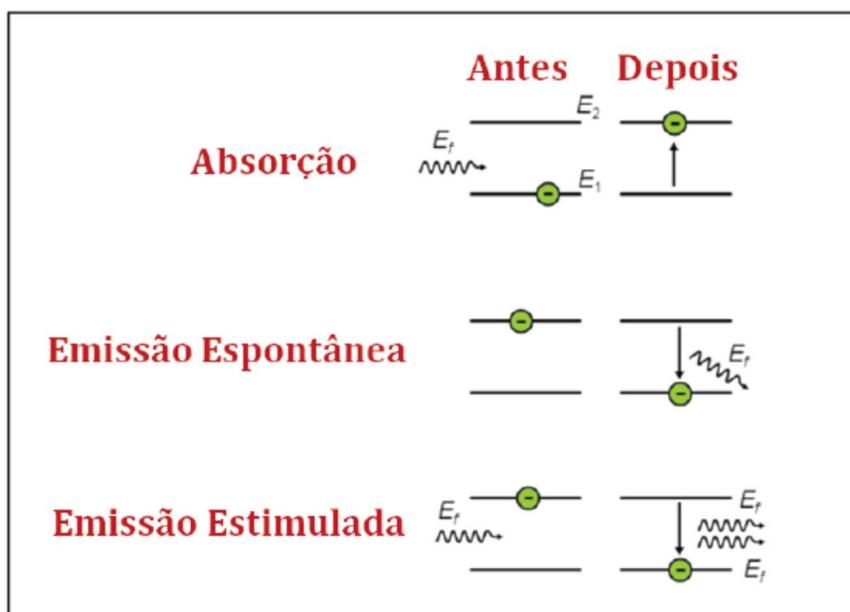


Figura 8. Esquema mostrando os três processos pelos quais um elétron pode ganhar ou perder energia através da luz no fenômeno de fotoluminescência. (Serrano, 2014)

Primeiramente, o elétron se encontra em um nível de energia, aqui chamado E_1 , onde o elétron se encontra eletronicamente estável. Com a emissão de radiação sobre o material, um fóton fornece energia e o elétron passa do nível E_1 para o nível E_2 , ultrapassando a banda de energia proibida (*gap*), indo ocupar um espaço na banda de valência (Rodrigues & Galzerani, 2012).

Quando o elétron se encontra em um nível excitado, é possível que ele retorne ao nível de equilíbrio espontaneamente, perdendo energia e liberando um fóton. Esse processo é denominado, emissão espontânea. Nesse caso, o fóton emitido possui fase e direção aleatórias e não tem nenhuma relação com o que ocorreu antes da excitação.

Uma outra possibilidade é a de fornecer mais um fóton para o material com a mesma energia que separa os níveis E_1 e E_2 . Nesse caso, o fóton faz com que o elétron que se encontra excitado passe do nível E_2 para o nível E_1 emitindo mais um fóton com a mesma fase e direção do fóton incidente. Assim, as intensidades dos fótons são somadas causando uma amplificação da luz emitida. Esse é o princípio utilizado no funcionamento de lasers.

A Figura 9 apresenta o espectro de fotoluminescência do diodo Gunn. É possível notar um pico de emissão em torno de 1,4 eV. Esse valor é o valor do *gap* do arseneto de gálio (GaAs)

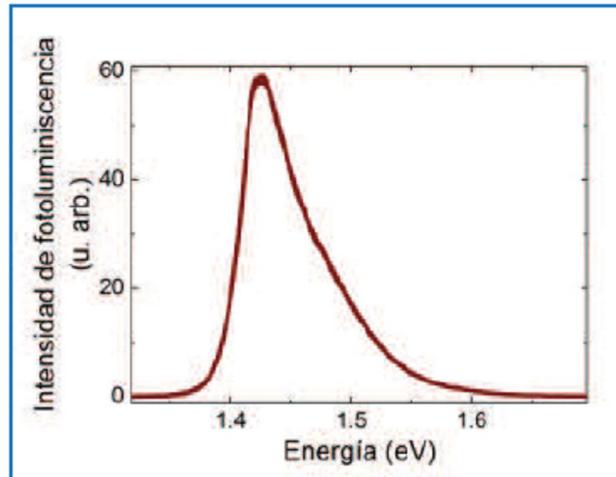


Figura 9. Espectro de fotoluminescência, em temperatura ambiente, de um diodo Gunn (Dover, 1971).

II.II.V. ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA (FENÔMENO FÍSICO)

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

Os átomos, ou moléculas podem emitir luz quando os elétrons que se encontram no estado excitado, decaem radiativamente ao estado fundamental. No diagrama de Jablonski (Figura 10) é possível visualizar os possíveis processos envolvidos: absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistema, fosforescência e fluorescência atrasada. É importante notar que a

absorção é um processo bastante rápido (10^{-15} s) em relação aos outros processos, pois não há deslocamento do núcleo de acordo com o princípio de Franck-Condon. A maioria das moléculas se encontram no nível fundamental S_0 à temperatura ambiente. A absorção de um fóton, nesse nível, pode levar as moléculas para um dos níveis vibracionais de S_1 , S_2 . Após a absorção, existem diversos processos possíveis de decaimento radioativo e não radioativo possíveis:

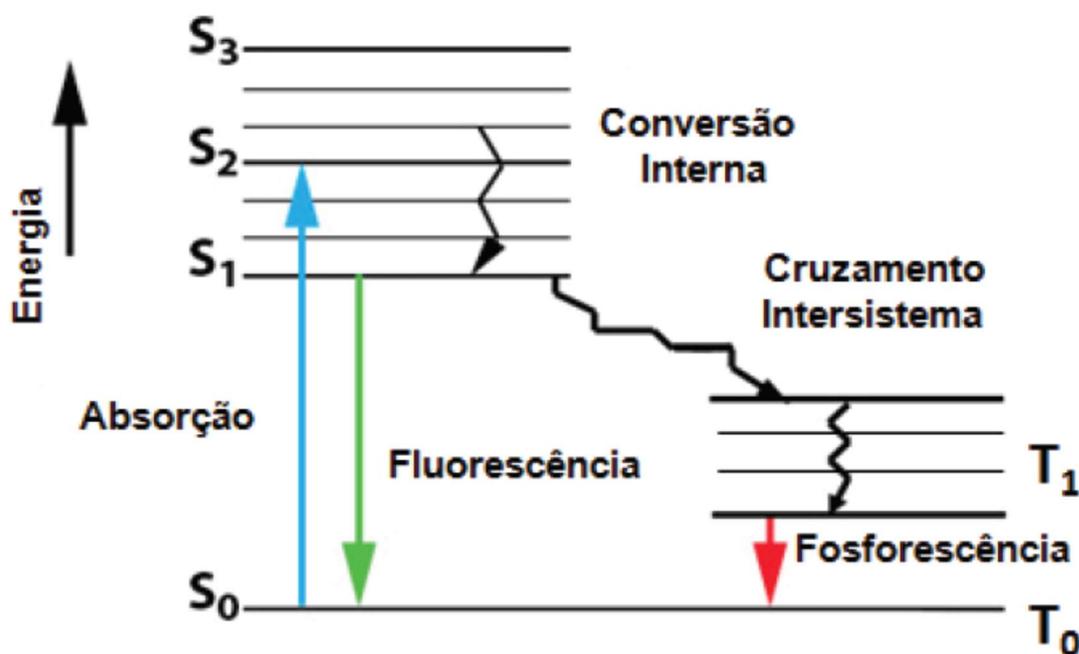


Figura 10. Diagrama de Jablonski

➤ Conversão Interna: trata-se de um processo de decaimento não-radiativo entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin. Em sólidos, este processo é seguido por uma relaxação vibracional para um nível vibracional de menor energia do que no estado eletrônico final.

➤ Fluorescência: trata-se da emissão de fótons originada pelo decaimento de $S_1 \rightarrow S_0$. A emissão de fluorescência ocorre a partir de S_1 e não

depende do comprimento da onda de excitação (considerando que somente existe uma espécie no estado fundamental). A energia entre S_0 e S_1 é geralmente a mesma para a absorção e para a fluorescência. No entanto, o espectro de fluorescência localiza-se em comprimentos de onda maiores (com energia mais baixa) em relação ao espectro de absorção, devido à perda de energia no estado excitado (relaxação vibracional). De acordo com a regra de Stokes, o comprimento da onda de emissão de fluorescência deve ser sempre maior que o da absorção. Entretanto, na maioria dos casos, o espectro de absorção se sobrepõe parcialmente ao espectro de fluorescência, ou seja, uma fração de luz é emitida em comprimento de onda menor que a luz absorvida parecendo estar em contradição com o princípio da conservação da energia. Isso pode ser explicado pelo fato de que em temperatura ambiente, uma pequena fração de moléculas está num nível vibracional maior que o nível tanto no estado fundamental como no estado excitado. Essa violação da lei de Stokes desaparece a baixas temperaturas.

➤ Cruzamento Intersistema CIS: é uma transição proibida, não-radiativa entre dois níveis vibracionais de mesma energia, que pertencem a estados eletrônicos de multiplicidades diferentes ($S_1 \rightarrow T_1$). Por exemplo, uma molécula excitada no nível vibracional 0 do estado S_1 pode mover-se para o nível vibracional isoenergético do estado tripleto T; então a relaxação vibracional leva-a para o nível vibracional mais baixo de T_1 . Nesse caso, a molécula pode se desativar a partir do estado tripleto (T_1) por meio de processo não radioativo ou por meio de fosforescência.

➤ Fosforescência: corresponde ao decaimento de um estado excitado tripleto (T_1) para um estado de menor energia (S_0), a qual é proibida por regra de spin, mas pode ser observada devido ao acoplamento spin-órbita (Figura 12). Durante esse processo, que é mais curto em relação à fluorescência, ocorrem numerosas colisões entre moléculas que favorecem o cruzamento intersistema e a relaxação vibracional em S_0 .

A Figura 11 representa a diferença dos estados excitados da Fluorescência e Fosforescência.



Figura 11. Diferença dos estados excitados nos fenômenos de fluorescência e fosforescência.

Cada tipo de interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, possui características únicas e cada espectro de emissão fornece informações distintas sobre a mesma molécula. No presente estudo, será abordada as informações referente à técnica de fotoluminescência.

II.II.VI. FOTOLUMINESCÊNCIA EM MICRORGANISMOS

Uma das principais características das técnicas de espectroscopia em relação às outras técnicas de caracterização de materiais é o seu caráter não destrutivo (Rodrigues & Galzerani, 2012). Isso permite que organismos sejam estudados sem que ocorra a morte celular. Além disso, a fotoluminescência pode fornecer informações e características do microambiente ao redor da molécula excitada devido à interação dessa molécula com o seu entorno imediato. Devido a certas características como, alta sensibilidade, especificidade da emissão de radiação característica do microentorno/microambiente, e capacidade de fornecer informação em tempo real, a fotoluminescência se apresenta como uma técnica promissora para utilização em sistemas biológicos, como, por exemplo, na detecção de microrganismos.

Várias técnicas de detecção de bactérias patogênicas envolvendo a luz tem sido motivo de estudos à muito tempo. Essas técnicas envolvem: guia de onda dielétrica monomodo (Sloper et al., 1990; Lukosz et al., 1991), ressonância plasmônica de superfície (Pollard-Knight et al., 1990; Karlsson et al., 1991; Bringham-Burke et al., 1992; Medina et al., 1997; Frat Amico et al., 1998), elipsometria (Nakamura et al., 1991; Swenson, 1993), o espelho ressonante (Watts et al., 1994) e interferômetro (Schneider et al., 1997). Entretanto, a técnica de fluorescência pode ser usada para detecção direta de bactérias patogênicas. Uma mistura de produtos metabólicos fluorescentes é detectada quando a amostra é irradiada com luz ultravioleta (UV) (Ivnitski *et al.*, 1999).

II.II.VII. SENSORES E BIOSSENSORES

Sensor é qualquer dispositivo que seja sensível a alguma forma de energia (ex. térmica, cinética, luminosa) e seja capaz de relacionar essa energia com a grandeza física que queremos medir. Normalmente o sinal gerado não é suficiente para análise direta e precisa ser manipulado por um sistema antes que possa ser lido e analisado.

Os sensores podem ser dos mais diversos tipos, tanto analógicos quanto digitais. Com o avanço da eletrônica e dos circuitos microeletromecânicos esses dispositivos tem se tornado cada vez menores, precisos e presentes no nosso dia-a-dia.

Os sensores que utilizam a luz, como os sensores fotoelétricos, são sensores que permitem uma detecção mais rápida que os sensores mecânicos pois não possuem partes móveis, não desgastam e não quebram. Esses sensores ópticos baseiam-se nos processos de interação entre luz e matéria. A detecção da radiação absorvida, refletida ou dispersa por um material ou composto permite determinar a relação entre o composto que queremos detectar e o sinal gerado (Sari *et al*, 2015). Dessa forma, possuem uma infinidade de aplicações nos mais diversos setores, dentre eles no setor industrial. Uma aplicação dos sensores ópticos é na determinação da concentração de sedimentos nos rios que é fundamental para o gerenciamento das bacias hidrográficas e na execução de obras de engenharia hidráulica (Sari *et al*, 2015).

O fotoresistor (LDR) é um dispositivo que permite a detecção quantitativa da luz. Este apresenta resistência elétrica variável e dependente da intensidade de

luz que incide sobre ele. A figura 12 ilustra um fotoresistor. Quando a luz atinge o fotoresistor, a resistência deste diminui e permite a passagem de corrente elétrica. Quanto maior for a intensidade de luz, menor será a resistência e portanto, maior a corrente. Assim é possível relacionar o valor da corrente com a intensidade de luz que atinge o fotoresistor.



Figura 12. Símbolo e estrutura de um fotoresistor (Fonte: http://www.dreaminc.com.br/sala_de_aula/ldr-fotoresistor/)

Os biossensores são dispositivos que utilizam um componente biológico (bactéria, fungos, células, DNA, etc) na detecção da molécula alvo. Esses dispositivos têm sido muito pesquisados atualmente, principalmente devido a sua sensibilidade e especificidade com a molécula alvo. Por isso, tem se mostrado uma grande ferramenta na detecção e monitoramento dos mais diversos alvos (WANG 2000).

Conforme ilustrado na figura 13, os três componentes principais de um biossensor são o componente biológico, o transdutor e a unidade processadora. O componente biológico é o elemento de reconhecimento da molécula alvo e é escolhido de acordo com a molécula a ser detectada. Esse componente pode ser

bactéria, enzimas, células, DNA, tecidos, anticorpos, etc., desde que consiga de alguma forma detectar a presença da molécula alvo. O transdutor de sinal é a maneira com que o sinal será detectado de acordo com o tipo de sinal que esse componente biológico irá gerar na presença da molécula alvo. Por exemplo, se, na presença de determinada molécula alvo ocorre uma reação que gere uma diferença de cargas, a detecção é possível através de um eletrodo. O sinal pode ser também a mudança de pH, variação de calor, emissão de luz e mudança de massa do sistema. Após a detecção e geração do sinal, este passa para uma unidade processadora de sinal que irá tratar o sinal gerado anteriormente e transformá-lo em um sinal elétrico que possa ser analisado posteriormente.

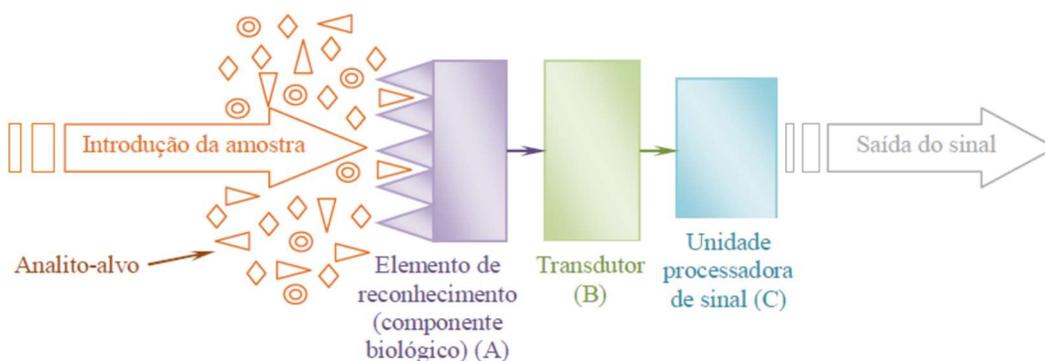


Figura 13. Principais componentes funcionais de um biossensor. A detecção da molécula alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C) (Calil & Silva, 2011).

O aspecto mais importante para se obter o sinal é o uso de componentes bioativos desenvolvidos de maneira que possam ser monitorados adequadamente (MUKHERJEE, 2015). Nesse aspecto as enzimas apresentam uma grande vantagem. Elas apresentam uma grande afinidade com o substrato e o sinal pode

ser gerado de diversas maneiras, como por exemplo, pela formação dos produtos, variação na quantidade de substrato, conversão de coenzimas, etc.

Esses dispositivos são altamente sensíveis, mas não são fáceis de serem desenvolvidos. Além disso, apresentam algumas dificuldades no uso em biossensores. A pouca estabilidade a longo prazo e a dificuldade na imobilização das biomoléculas são alguns fatores limitantes no uso desses dispositivos em larga escala.

Alguns critérios devem ser mantidos para o desenvolvimento do biossensor. O primeiro deles é que o biossensor não deve interferir com a comunidade microbiana presente na região específica onde será utilizado. Segundo, ele não deve interferir com as condições ambientais. Deve somente ser “reativo” com as moléculas alvo. E terceiro, o biossensor não deve ser tóxico ao meio ambiente. Dessa maneira, podemos perceber que as condições ambientais devem ser mantidas inalteradas, enquanto que somente a detecção das moléculas alvo é o que importa, e essa detecção não deve de forma alguma interferir ou alterar o meio ambiente (Ivnitski *et al.*, 1999; Leonard *et al.*, 2003; Kulagina *et al.*, 2005; Deisingh & Thompson, 2004; Mannoer *et al.*, 2010; Tenenbaum & Segal, 2015). A utilização de biossensores ópticos na detecção de bactérias tem sido motivo de estudos à vários anos. Essa técnica geralmente envolve o uso de receptores, ácidos nucleicos ou anticorpos e um transdutor apropriado (Ivnitski *et al.*, 1999). Os estudos com base na utilização de transdutores ópticos buscam encontrar um sistema analítico mais robusto, de fácil utilização, portátil e barato (Leonard *et al.*, 2003). A utilização da fluorescência como elemento de

transdução do biossensor tem sido avaliada. Proteínas fluorescentes podem ser adicionadas ao transdutor gerando um sinal luminoso na presença da molécula alvo (Dacres *et al.*, 2013).

III.II. PREPARO DAS SUSPENSÕES-TESTE MICROBIANAS

Os microrganismos analisados foram bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 29212 e *Shigella sonnei* ATCC 1578, e os fungos *Candida albicans* ATCC 10231, *Colletotrichium gloeosporioides* AB01 e *Fusarium subglutinans* ABX01. As cepas utilizadas pertencem ao Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB), Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos.

As cepas encontravam-se criopreservadas, e para reativação utilizou-se um volume de 10 µl de cultivo de cada microrganismo que foi plaqueado em meios de cultivo seletivos ágar sal manitol (*S. aureus*), ágar *Enterococos* (*E. faecalis*), eosina azul de metileno (*E. coli*), ágar S-S (*S. sonnei*) e ágar Saboraud (*C. albicans*), BDA (*C. gloeosporioides* e *F. subglutinans*). As placas foram incubadas a 37°C/24 h e após o período de incubação, colônias típicas dos microrganismos foram repicadas em placas de ágar TSA (trypticase soy agar), e incubadas novamente sob as mesmas condições. Colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo solução salina 0,85%, e a densidade óptica (\square 600 nm) da suspensão celular foi ajustada até atingir a concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/ml (para bactérias) e $5,0 \times 10^5$ UFC/ml (para os fungos), conforme as normas CLSI (2011).

As suspensões microbianas foram transportadas até o Laboratório de Semicondutores, Departamento de Física, UFSCar, em caixa isotérmica com gelo.

III.III. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE FOTOLUMINESCÊNCIA

Esta etapa da pesquisa foi realizada no Laboratório de Raman (Departamento de Física, UFSCar), o qual está sob supervisão do Prof. Dr. Ariano de Giovanni Rodrigues. Para detecção da fotoluminescência foi utilizado um espectrômetro com três grades de difração da marca Jobin Yvon, modelo T64000, equipado com microscópio (Figura 15). O sistema de detecção conta com uma câmera CCD (charge coupled device) que é refrigerada por nitrogênio líquido. A fonte de excitação utilizada foi um laser de argônio com emissão em 457 nm (violeta).

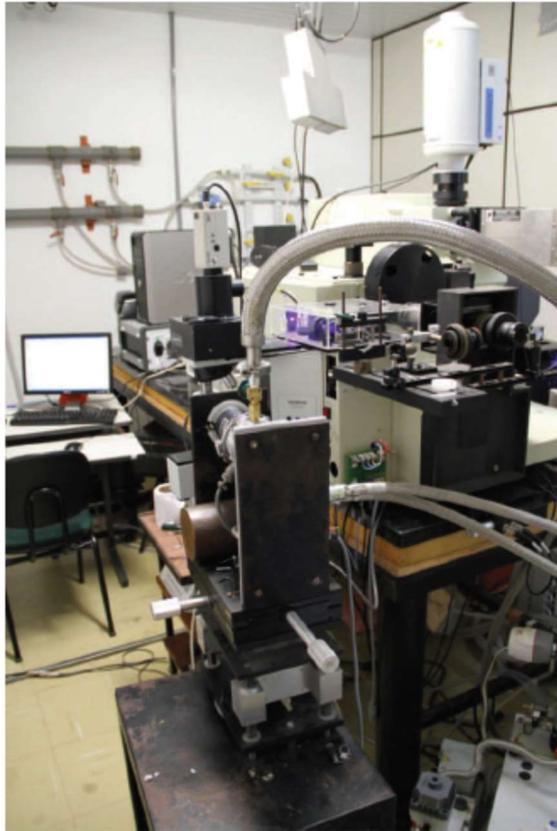


Figura 15. Imagem do equipamento experimental utilizado neste trabalho para o estudo da fotoluminescência, pertencente ao Grupo de Semicondutores do Departamento de Física da UFSCar.

A figura 16 representa esquematicamente a montagem experimental utilizada para a obtenção dos dados de fotoluminescência deste trabalho.

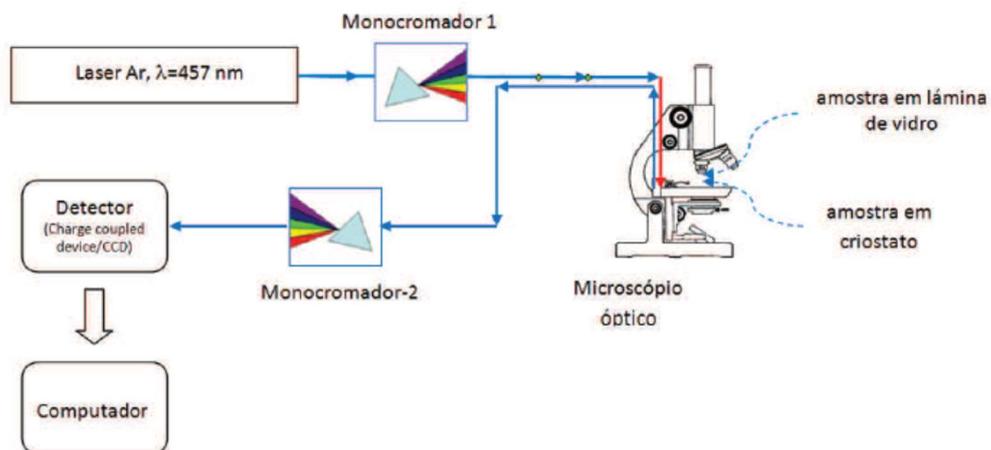


Figura 16. Montagem experimental utilizada neste trabalho para o estudo da fotoluminescência.

O laser de argônio gera um feixe de luz que é refletido através de espelhos até atingir a amostra (Figura 17). Como é possível observar na figura 16 são utilizados dois monocromadores. O primeiro é utilizado para conseguir o estreitamento da linha de luz que vai atingir a amostra (Figura 18). O segundo monocromador analisa a radiação de fotoluminescência emitida pela amostra enviando as informações para o computador.

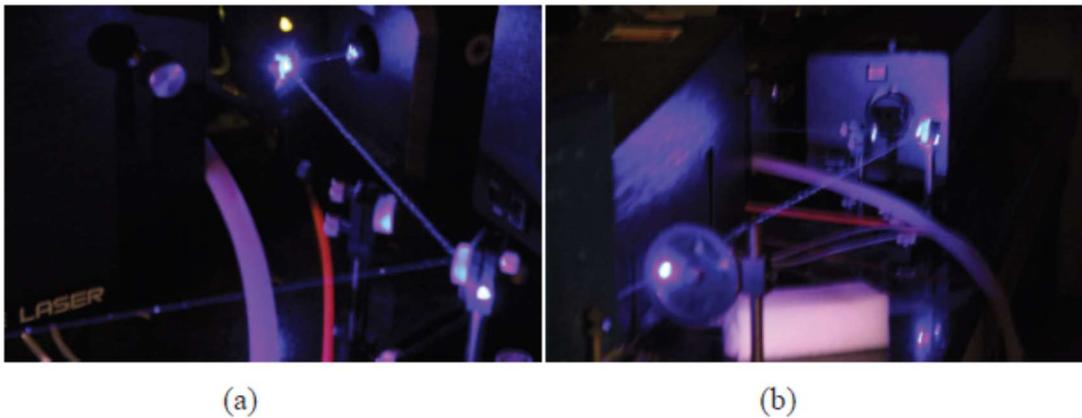


Figura 17. (a) Geração e desvio da luz de laser de argônio; (b) Ingresso do feixe de laser no primeiro monocromador.

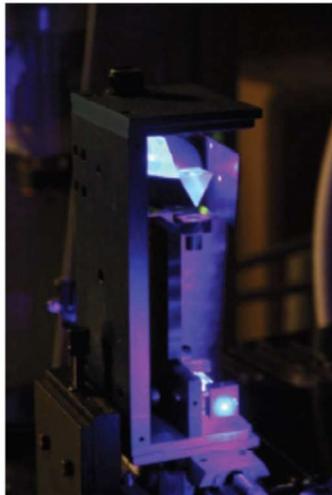


Figura 18. Imagem do primeiro monocromador, utilizado para conseguir o estreitamento do feixe de luz laser utilizado no estudo do fenômeno de fotoluminescência.

Esse sistema permite a análise de amostras em temperatura ambiente e também em baixas temperaturas, próximo do zero absoluto ($T=0K$). Na análise das amostras à temperatura ambiente, estas foram depositadas sobre uma lâmina de vidro, como foi realizado no presente estudo (Figura 19). No presente trabalho também foram analisadas algumas amostras em temperaturas próximas à $0^{\circ}C$ ($\pm 273K$).

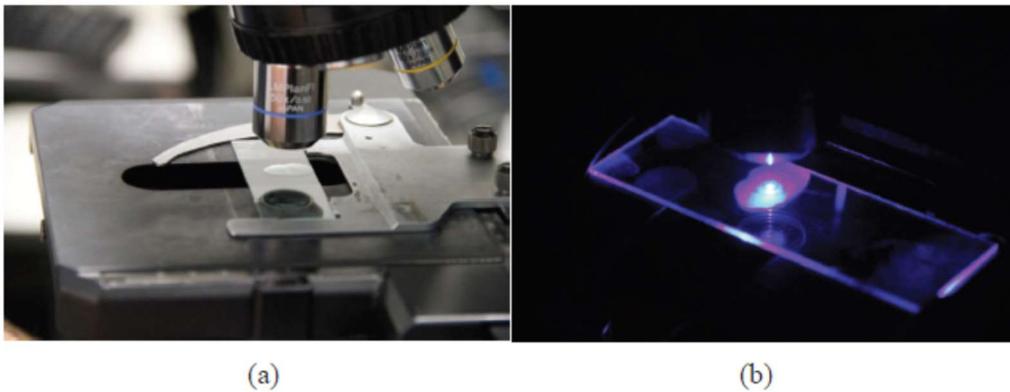


Figura 19. (a) Amostra montada no microscópio em lâmina de vidro; (b) feixe de laser incidindo sobre a amostra montada na lâmina de vidro no microscópio.

Os espectros de fotoluminescência foram obtidos da seguinte maneira: inicialmente a suspensão celular microbiana ($50\mu l$) foi avaliada pura, ou seja, contendo somente o microrganismo na concentração padrão. Em seguida foi adicionado o ELP ($20\mu l$) e então avaliou-se a emissão fotoluminescente imediatamente ($t=0$) após a mistura (microrganismo + ELP).

Complementarmente, os microrganismos *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus* foram analisados a temperatura de $273K$. Tais amostras microbianas foram mantidas em gelo durante aproximadamente 30 minutos até que atingissem a temperatura desejada. Então foi analisado o espectro do microrganismo puro e da mistura (microrganismo + ELP) no tempo $t=0$.

Para os microrganismos *E. coli* e *S. aureus* foram analisadas também amostras destas bactérias com ELP num intervalo de tempo de 15 minutos após a mistura (t=15).

Para *E. coli* foi analisada amostra com o dobro da concentração padrão do microrganismo puro e da mistura (microrganismo + ELP) nos t=0 e t=15.

A suspensão microbiana e o peptídeo foram homogeneizados durante 10 segundos sobre a superfície da lâmina antes de cada análise da mistura microrganismo + ELP.

III.IV. TRATAMENTO DOS DADOS OBTIDOS

Os espectros de fotoluminescência obtidos foram normalizados em relação ao pico estreito, comum à todas as curvas, utilizando o programa Origin versão 9.0

III.V. PROPOSTA DE ELABORAÇÃO DO SENSOR

Foi proposta a construção de um sensor óptico, conforme demonstrado esquematicamente na figura 20.

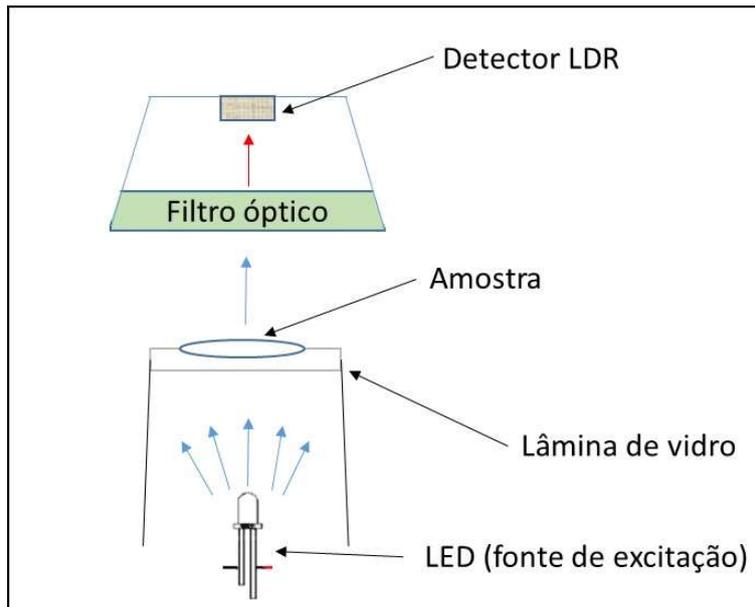


Figura 20. Esquema proposto com os principais componentes do sensor óptico.

O sensor é composto basicamente por materiais de fácil aquisição no mercado, quais sejam: uma fonte de excitação (LED), um filtro óptico e um resistor dependente de luz (LDR), utilizado como detector. Além desses componentes, existe ainda um conjunto de componentes eletrônicos formando o circuito que permite o correto funcionamento do sensor. A figura 21 demonstra esquematicamente o circuito eletrônico utilizado.

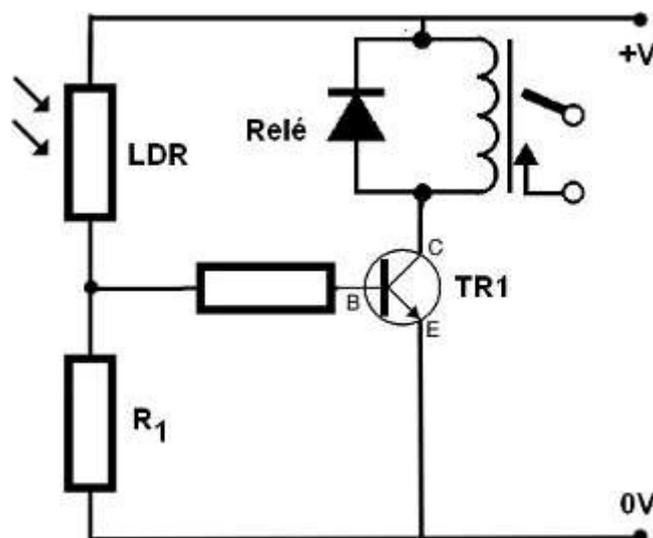


Figura 21. Esquema de ligação dos componentes eletrônicos.

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

III.VI. COMPONENTES DO SENSOR

III.VI.I. FONTE DE EXCITAÇÃO

Como fonte de excitação, foram testados três tipos de fontes de luz facilmente encontrados no mercado:

- LED monocromático (figura 22)
- Módulo LED RoHS 5050-3LED (figura 23)
- Laser (figura 24)



Figura 22. LED monocromático utilizado na montagem do dispositivo



Figura 23. Módulo LED utilizado na montagem do dispositivo



Figura 24. Caneta Laser ($\lambda=405$ nm) utilizada na montagem do dispositivo.

III.VI.II. FILTRO

Na montagem do sensor foi utilizado o filtro passa-baixa (passa-banda) BP660 MidOptic, demonstrado na figura 25.



Figura 25. Filtro passa-faixa utilizado na montagem do dispositivo

Esse filtro permite a passagem de luz entre $\lambda=680-720$, (faixa do vermelho), conforme demonstrado no *datasheet* disponibilizado no site do vendedor (figura 26).

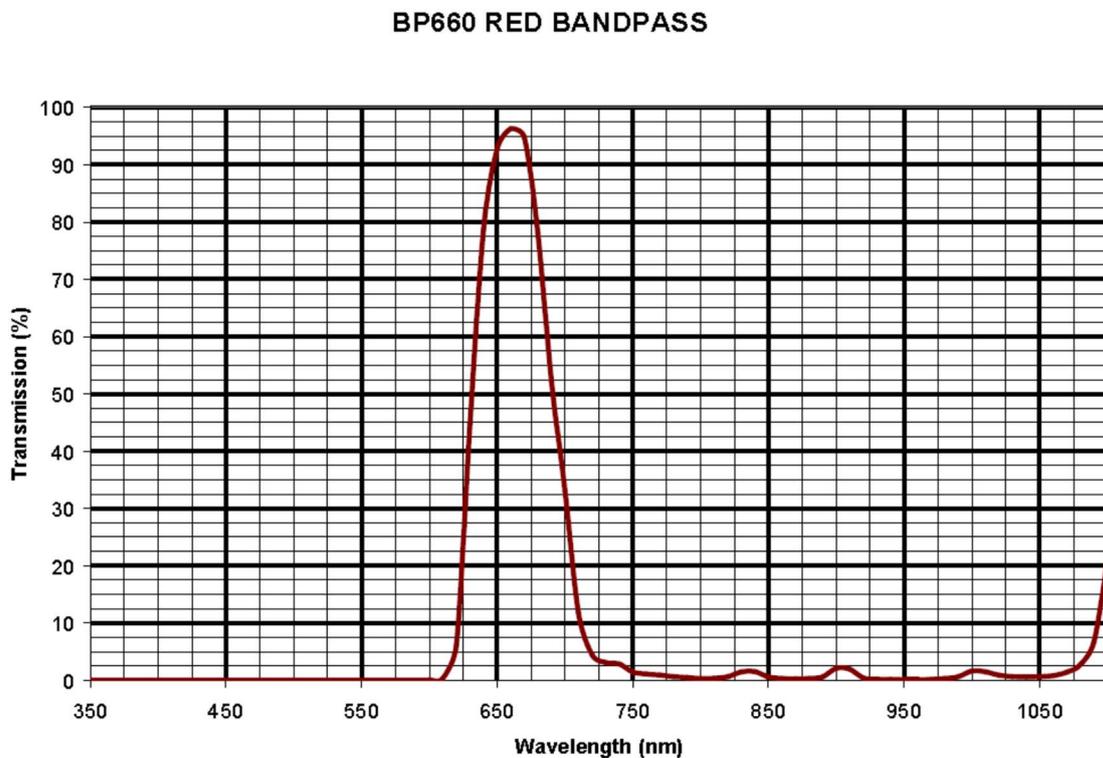


Figura 26. Perfil de transmissão do filtro passa-faixa utilizado na montagem do dispositivo. A transmissão de luz pelo filtro ocorre somente entre $\lambda=625-720$ nm.

III.VI.III. DETECTOR (LDR)

O detector (LDR) utilizado foi retirado de uma fotocélula utilizada para acendimento de luz ambiente na ausência de luz natural (figura 27).



Figura 27. Resistor dependente de luz (LDR) utilizado na montagem do dispositivo.

III.VII. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO SENSOR

III.VII.I. FONTE EXCITAÇÃO

Para caracterização das fontes de emissão foi utilizado um espectrômetro portátil RoHS, modelo VIS-100 (Figura 28) acoplado ao computador. A ponta de detecção conectada através de uma fibra óptica até o espectrômetro transmite a luz da fonte de excitação até o detector. Os dados são então visualizados na tela do computador. Essa configuração permite verificar o comprimento de onda da fonte de luz.



Figura 28. Espectrômetro utilizado para caracterização da fonte de excitação utilizada na construção do sensor.

As três fontes de excitação estão na região do violeta-azul, como pode ser observado nos espectros demonstrado nas figuras 29, 30 e 31. O laser apresenta uma curva mais estreita fornecendo uma luz mais monocromática ($\lambda=405$ nm).

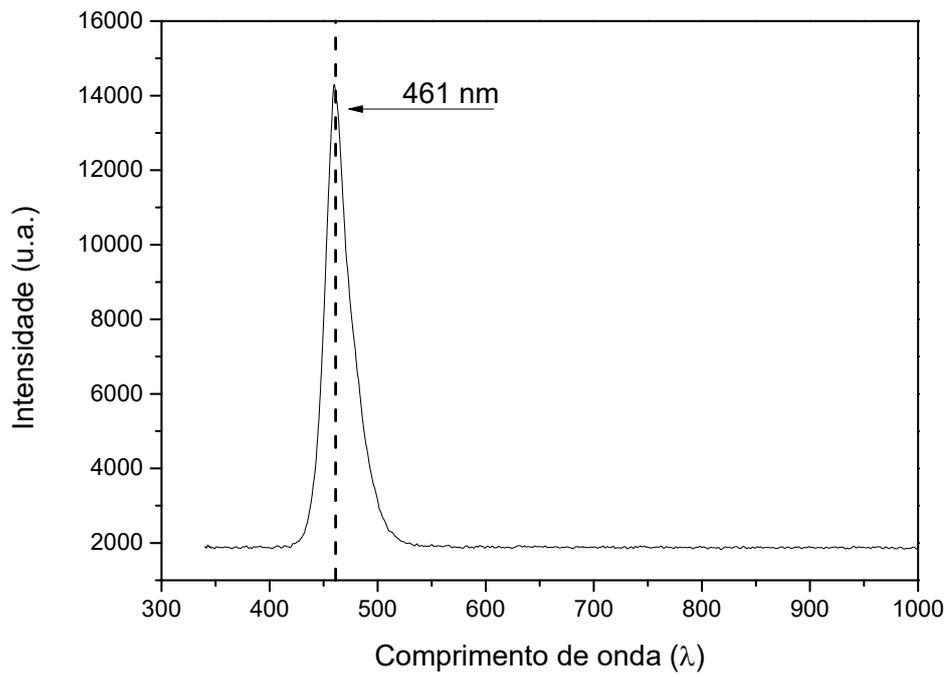


Figura 29. Espectro de emissão do LED utilizado na montagem do protótipo.

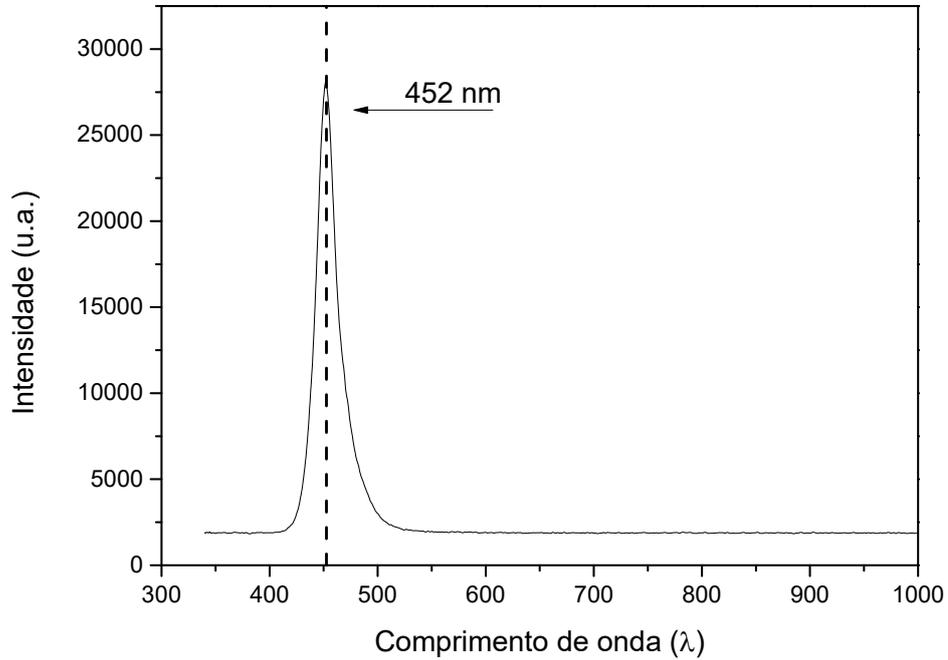


Figura 30. Espectro de emissão da placa de LED utilizada na montagem do protótipo.

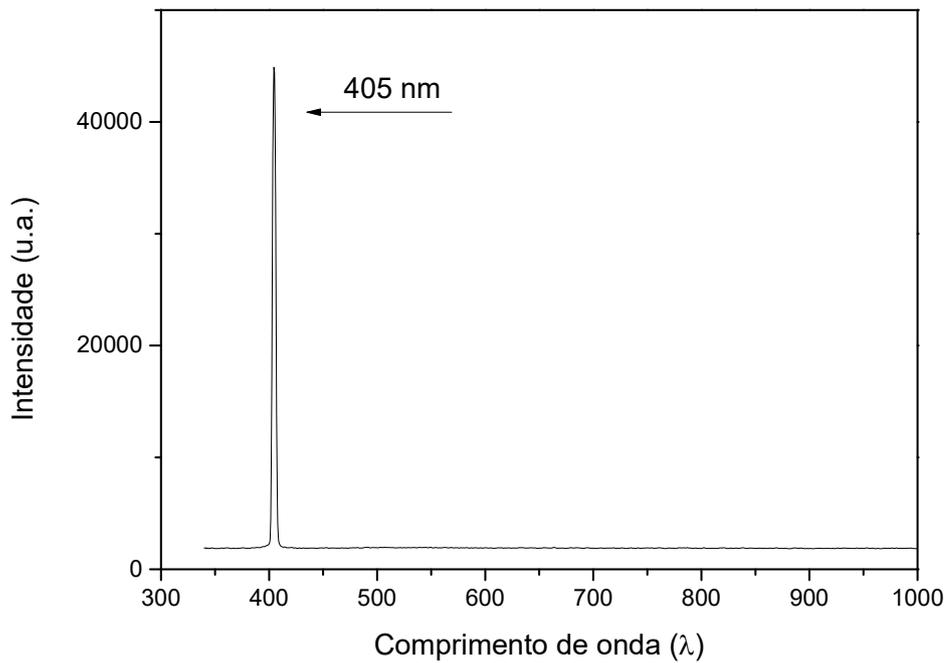


Figura 31. Espectro de emissão do laser utilizado na montagem do protótipo.

As intensidades de emissão de cada fonte de excitação foram medidas utilizando um medidor de potência da empresa Coherent (figura 32).



Figura 32. Medidor de potência (low power meter) utilizado na medição da intensidade de emissão das fontes de excitação.

A fonte de excitação com maior intensidade detectada é o laser (8mW), seguido pela placa LED (513 μ W) e o led (220 μ W).

III.VII.II. FILTRO

Para caracterização do filtro foi utilizado o espectrômetro UV-Vis-NIR Varian Cary 5000, da Agilent Technologies (Figura 33). O equipamento realiza uma varredura no espectro eletromagnético com dois feixes (um passando pelo filtro e outro não) comparando a intensidade dos dois feixes, possibilitando a determinação da transmitância do filtro. Foi coletado o espectro de transmitância do filtro em relação ao comprimento de onda de emissão (figura 34).

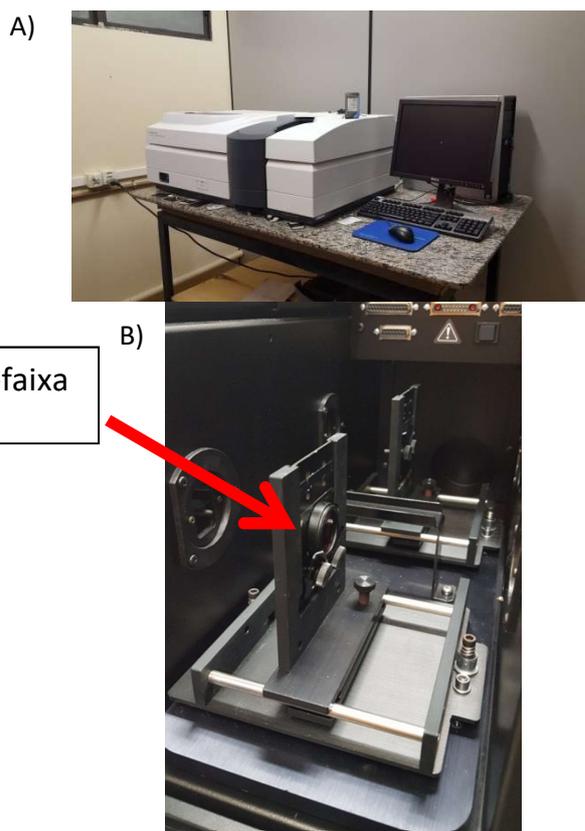


Figura 33. Espectrômetro utilizado na caracterização do filtro óptico (A) montagem geral; (B) detalhe do compartimento onde é colocado o filtro para análise.

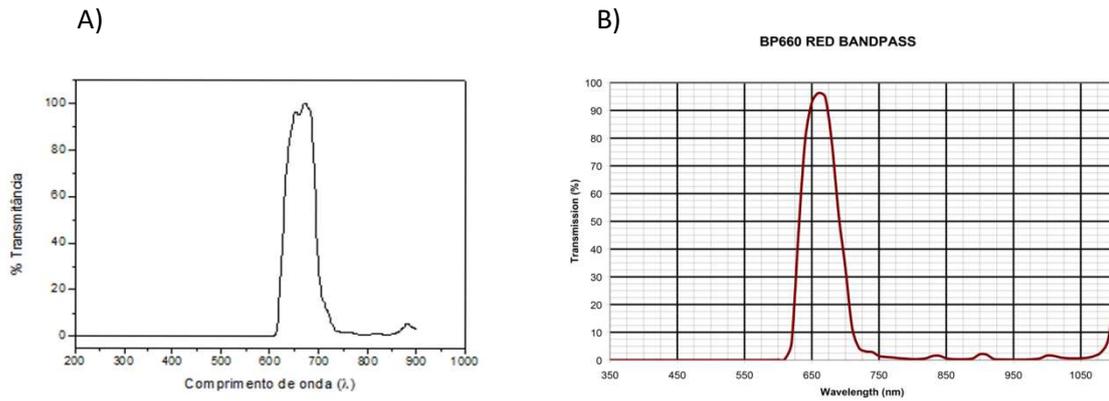


Figura 34. Espectro de transmitância do filtro utilizado no protótipo, A) coletado experimentalmente utilizando o espectrômetro e B) disponibilizado pelo vendedor do filtro. A transmitância do filtro analisada pelo espectrômetro está na mesma faixa de comprimento de onda do *datasheet* disponibilizado pelo vendedor.

As fontes de excitação utilizadas estão na faixa de $\lambda=405-461$ nm. O filtro utilizado não permite a passagem de luz nessa região, conforme pode ser observado na figura 35.

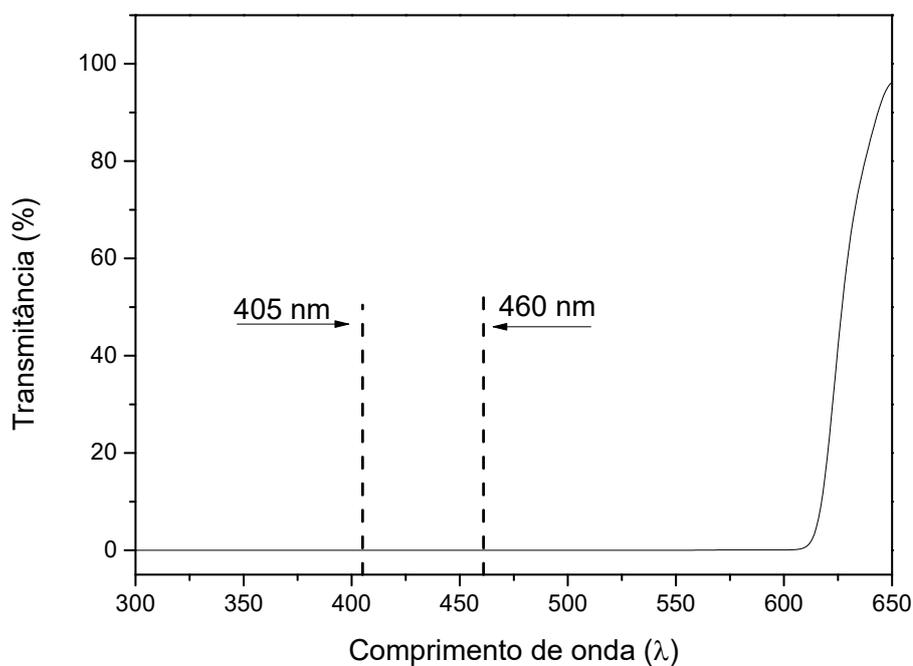


Figura 35. Detalhe do espectro de transmitância do filtro utilizado no protótipo. Na faixa entre $\lambda=405-461$ nm (faixa de emissão das fontes de excitação) a transmitância do filtro é nula.

A confirmação do bloqueio do filtro na região de emissão das fontes de excitação utilizadas foi verificada utilizando a fonte de excitação, o filtro e o espectrômetro portátil conforme demonstrado na figura 36. Quando colocado o filtro na direção da luz da fonte de excitação, não foi possível detectar nenhum espectro de emissão, confirmando que o filtro bloqueou totalmente a luz da fonte de excitação.

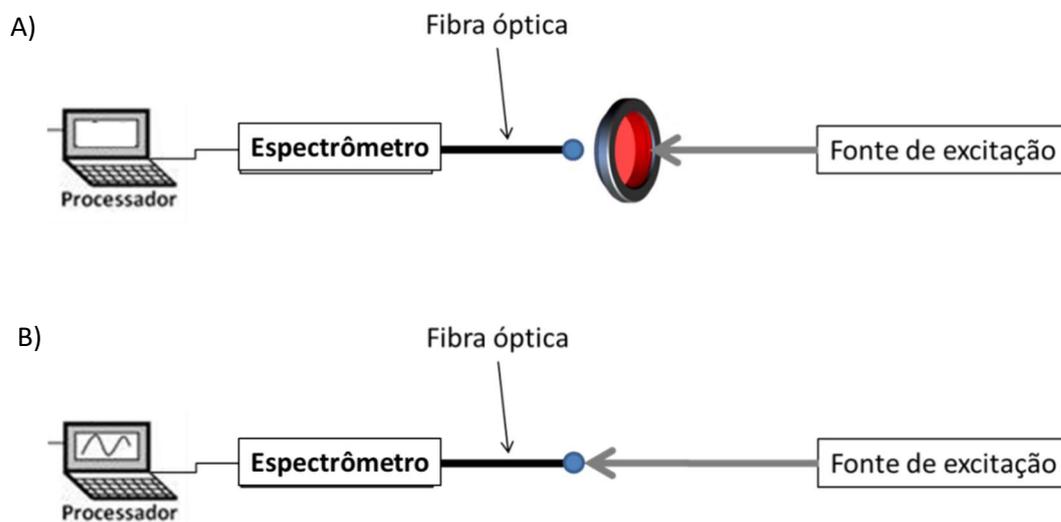


Figura 36. Esquema de montagem de aparato para confirmação da eficiência do filtro passa-faixa. A) Com o filtro entre a luz da fonte de excitação e o detector (fibra-óptica), não foi possível detectar o espectro da luz da fonte de excitação. B) Ao retirar o filtro passa-faixa, foi possível obter o espectro da luz da fonte de excitação.

IV. DADOS E RESULTADOS

IV.I. ESPECTROS DE FOTOLUMINESCÊNCIA

Os espectros de fotoluminescência obtidos no espectrômetro, modelo T64000, para cada amostra, estão apresentados a seguir:

IV.I.I. *Candida albicans*

A Figura 37 apresenta o espectro de fotoluminescência do fungo *Candida albicans* puro e da mistura: *Candida albicans* + ELP (dados não normalizados). É possível notar a presença de dois picos de emissão para o fungo (curva preta). O pico da esquerda, mais intenso e estreito, está localizado em torno de 538 nm, e o pico mais largo está localizado em torno de 750 nm. Após a adição do ELP percebemos a supressão do pico largo (curva vermelha) permanecendo somente um pico que se sobrepõe ao pico estreito, porém ligeiramente mais largo.

Após a normalização da intensidade curvas espectrais em relação ao pico coincidente em torno de 538 nm, fica ainda mais evidente a supressão do pico largo após a adição do ELP (figura 38).

Foram analisados também os espectros de luminescência para o fungo com $T=273K$ (figura 39). Para isso, ele foi mantido em gelo por aproximadamente 30 minutos até a estabilização da temperatura. Podemos notar o mesmo pico estreito em torno de 538 nm para o fungo puro. Porém, o pico largo aparece em torno de 700 nm, diferente de quando o fungo está à temperatura ambiente. Após a adição do ELP percebemos um considerável aumento na intensidade de emissão em torno de 538 nm (pico estreito) e um alargamento do pico, porém ainda são coincidentes.

Os dados normalizados são apresentados na figura 40. É possível notar que os picos estreitos do fungo puro e após a adição do ELP são coincidentes e o pico largo é suprimido após a adição do ELP.

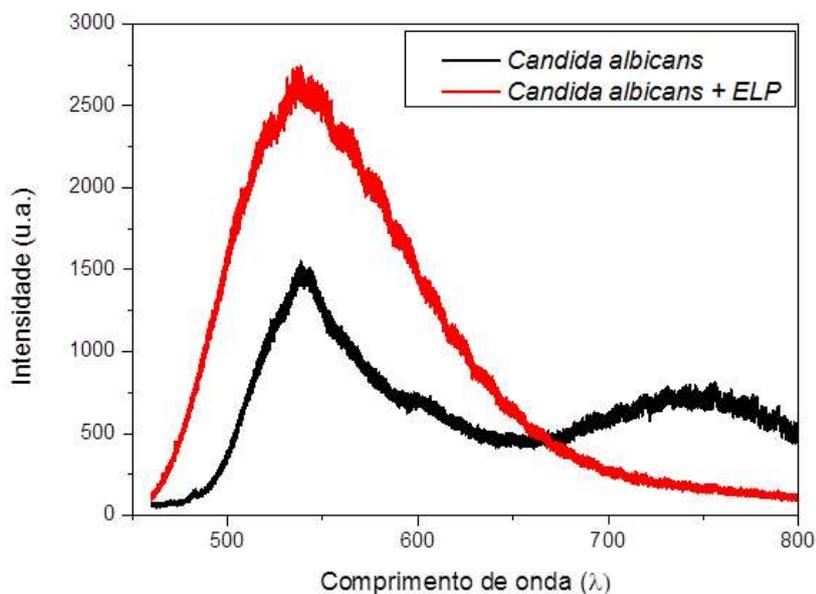


Figura 37. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Candida albicans* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha) para dados não normalizados. Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.

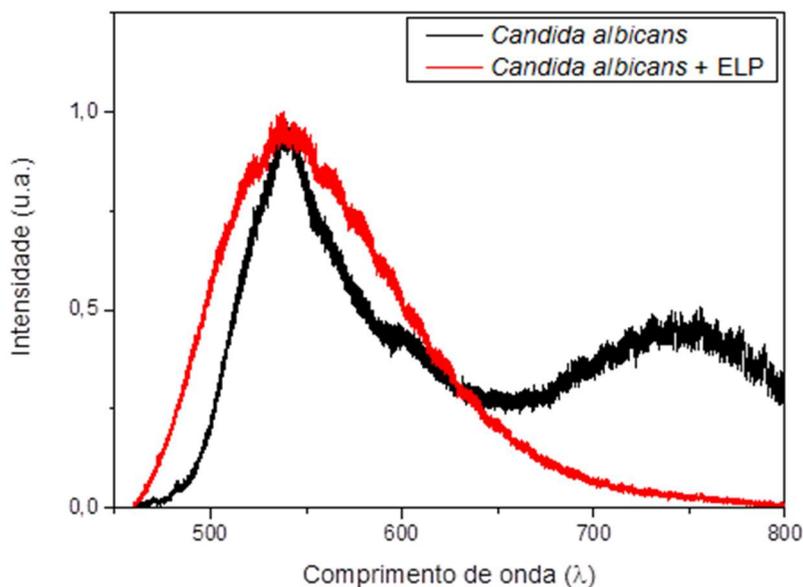


Figura 38. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Candida albicans* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha) para dados normalizados em relação ao valor do pico à direita. Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.

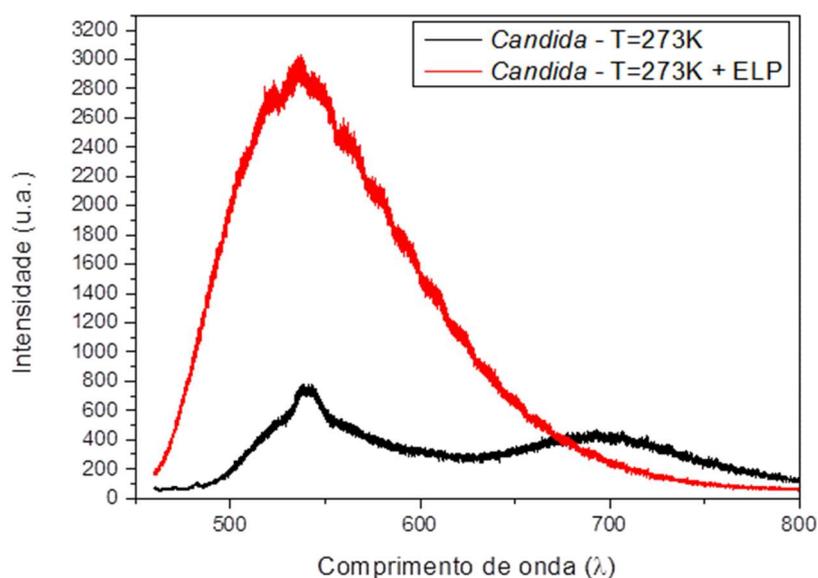


Figura 39. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Candida albicans* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha) com $t=273K$ para dados não normalizados. Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP

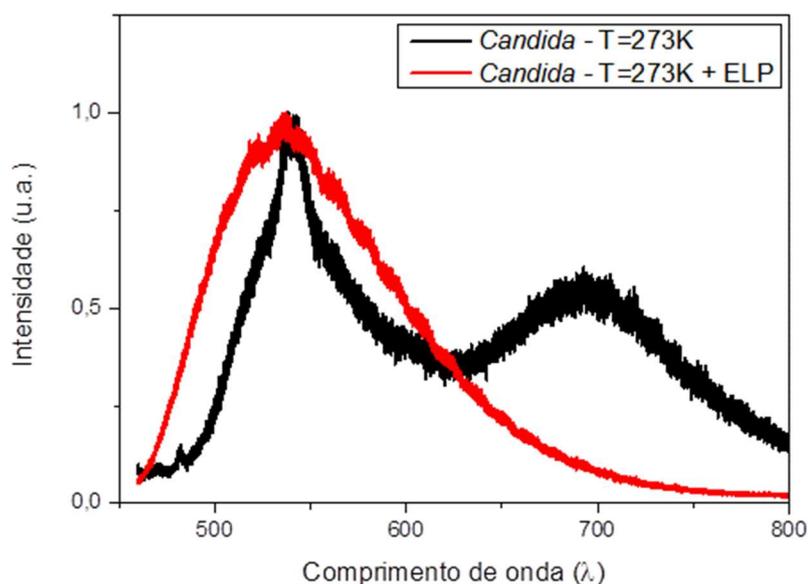


Figura 40. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Candida albicans* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), com $T=273K$, para dados normalizados em relação ao valor do pico à direita. Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP

IV.I.II. *Colletotrichium gloeosporioides*

O espectro de luminescência para o fungo *Colletotrichium* está representado na figura 41 para o fungo puro (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha). Para o fungo puro percebemos um pico estreito em torno de 538 nm e outro pico largo em torno de 700 nm. Neste caso, o pico largo apresenta intensidade maior que o pico estreito. Após a adição do ELP o pico largo em torno de 700nm é totalmente suprimido, permanecendo o pico estreito que se apresenta ligeiramente mais largo.

Após a normalização das curvas em relação ao pico estreito que são sobrepostos, fica ainda mais evidente a supressão total do pico largo após a adição do ELP (Figura 42).

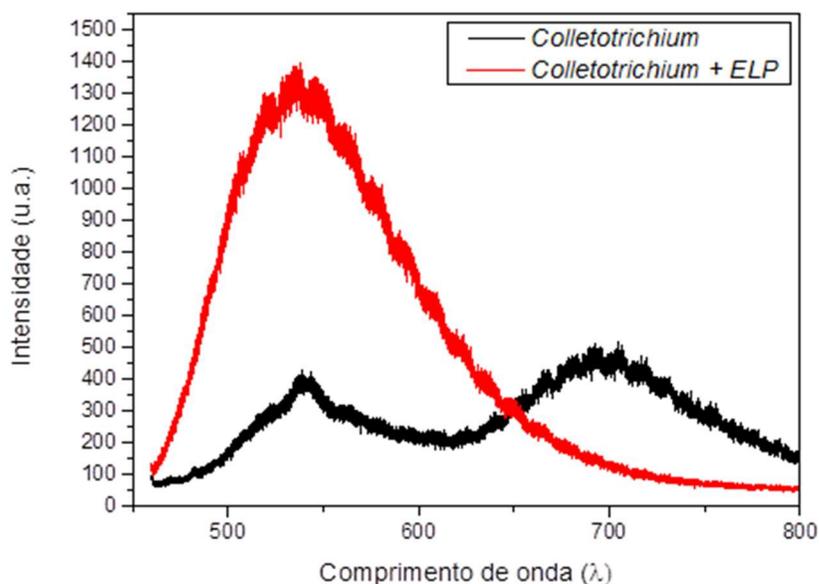


Figura 41. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Colletotrichium* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.

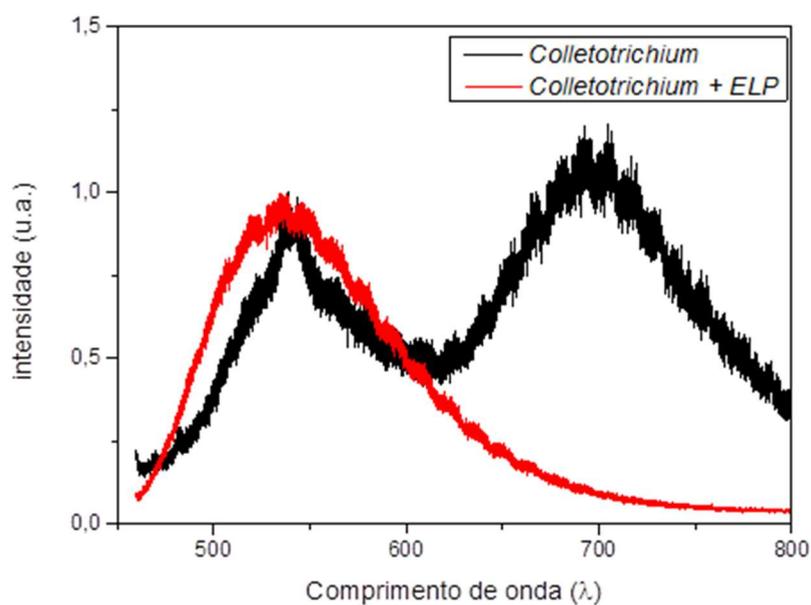


Figura 42. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Colletotrichium* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação ao pico estreito (à esquerda). Nota-se a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.

IV.I.III. *Escherichia coli*

A figura 43 apresenta o espectro de fotoluminescência para a bactéria *Escherichia coli* pura (curva preta) e para a bactéria com a adição de ELP (curva vermelha). No espectro da bactéria pura (curva preta) é possível notar a presença de um pico estreito em torno de 538 nm e outro pico largo em torno de 700 nm. O pico estreito apresenta maior intensidade em relação ao pico largo. Após a adição do ELP, o pico estreito permanece em 538 nm, porém ligeiramente mais largo, e o pico largo é totalmente suprimido. A normalização das curvas em relação ao pico estreito permite uma melhor visualização da supressão do pico largo após a adição do ELP (figura 44).

Para a bactéria *E. coli* também foi analisado o espectro de fotoluminescência da bactéria pura e da bactéria com adição do ELP, com o dobro da concentração padrão utilizada nas outras análises. Os espectros com os dados não normalizados estão apresentados na figura 45. É possível notar que os picos estreitos são coincidentes tanto para a concentração padrão quanto para o dobro da concentração. Isso fica ainda mais evidente após a normalização das curvas em relação ao pico estreito (figura 46). Nota-se também que a intensidade do pico largo é maior quando a concentração é o dobro da concentração padrão. Após a adição do ELP as curvas são idênticas para as duas concentrações.

Foi analisado ainda o espectro de emissão fotoluminescente após 15 minutos da adição do ELP na bactéria com o dobro da concentração padrão (figura 47). Percebemos que as curvas referentes as medidas logo após a adição do ELP e após 15 minutos da adição do ELP são exatamente iguais (figura 47,

curvas vermelha e azul), ocorrendo a supressão do pico largo logo após a adição do ELP e assim permanecendo após 15 minutos. A Figura 48 apresenta as curvas dos espectros normalizados em relação ao pico estreito para a bactéria pura com o dobro da concentração (curva preta), bactéria com o dobro da concentração + ELP (curva vermelha) e bactéria com o dobro da concentração + ELP após 15 minutos (curva azul).

A avaliação da influência da temperatura no espectro de emissão da bactéria *E. coli* é apresentada na figura 49. Percebe-se o pico estreito em torno de 538 nm e o pico largo em torno de 700 nm. Neste caso, o pico largo apresenta intensidade consideravelmente maior em relação ao pico estreito. Para os dados não normalizados, nota-se que o pico largo diminui consideravelmente após a adição do ELP (figura 49, curva vermelha), porém ainda percebemos uma discreta curva em torno de 700 nm. Com os dados normalizados em relação ao pico estreito a diferença na intensidade do pico largo fica mais evidente (figura50).

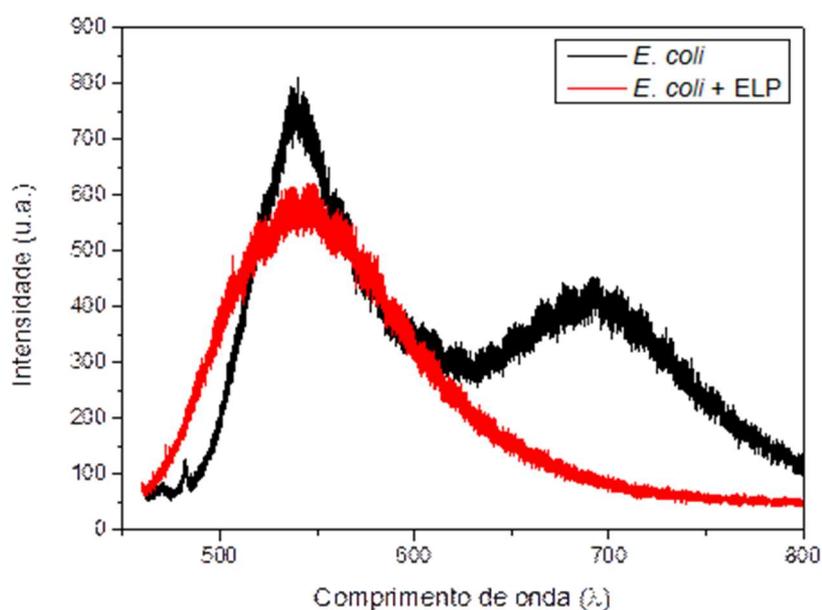


Figura 43. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.

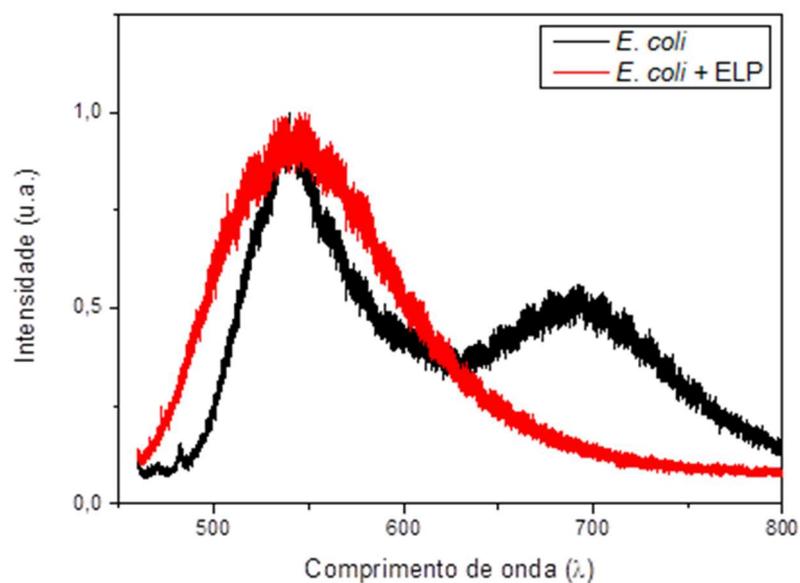


Figura 44. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação à intensidade relativa do pico estreito (à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita após a adição do ELP.

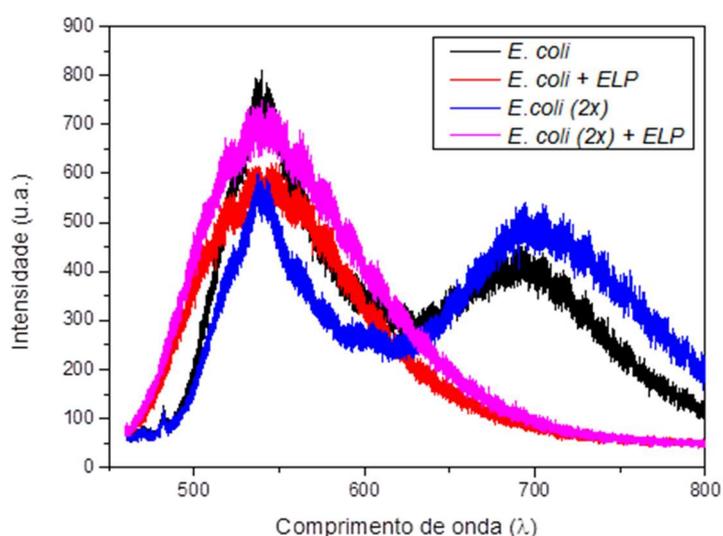


Figura 45. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha), pura com o dobro da concentração padrão (curva azul) e amostra com o dobro da concentração após a adição do ELP (cuva rosa), para dados não normalizados. As curvas contendo amostra pura, com concentração padrão (curva preta) e com o dobro da concentração padrão (curva azul), possuem o mesmo padrão, com pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm. Após a adição do ELP é possível notar a supressão total do pico e o padrão permanece o mesmo para as duas concentrações.

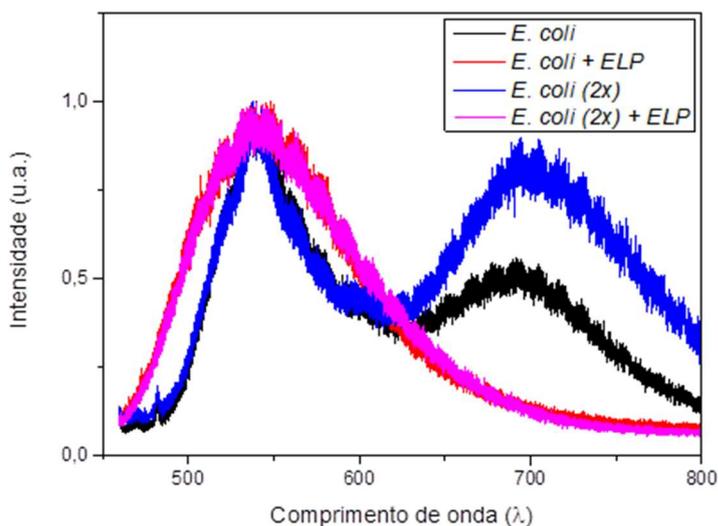


Figura 46. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha), pura com o dobro da concentração padrão (curva azul) e amostra com o dobro da concentração após a adição do ELP (cuva rosa), para dados normalizados em relação ao máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). As curvas contendo amostra pura, com concentração padrão (curva preta) e com o dobro da concentração padrão (curva azul), possuem o mesmo padrão, com pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, mas a intensidade com o dobro da concentração é maior. Após a adição do ELP é possível notar a supressão total do pico e o padrão permanece o mesmo para as duas concentrações.

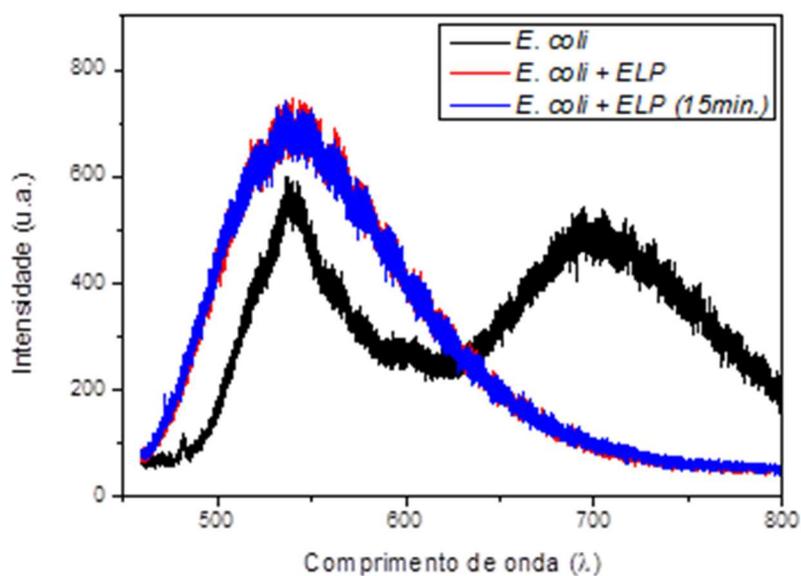


Figura 47. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha) e $t=15\text{min}$ após a adição do ELP, para dados não normalizados. A curva contendo amostra pura possui picos em torno de $\lambda=550\text{ nm}$ e $\lambda=700\text{ nm}$. Após a adição do ELP é possível notar a supressão total do pico à esquerda ($\lambda=700\text{nm}$) em $t=0$ (curva vermelha) e $t=15\text{min}$.

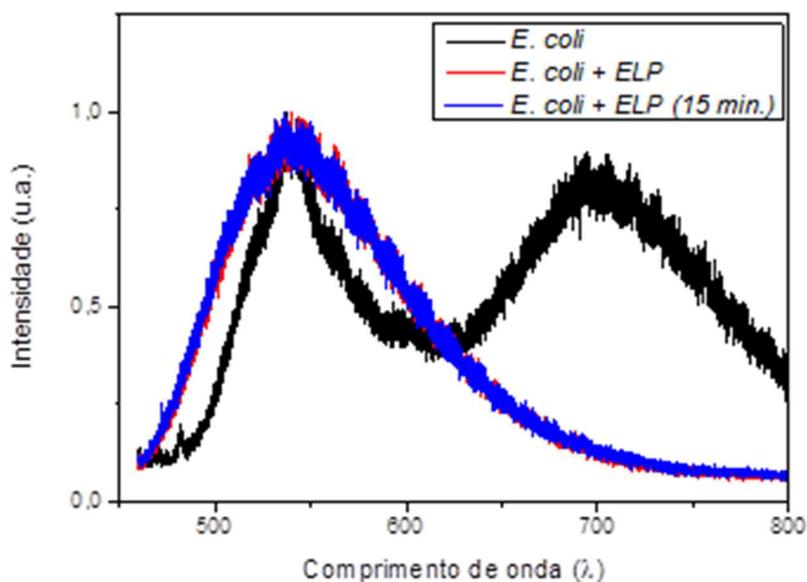


Figura 48. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha) e $t=15\text{min}$ após a adição do ELP, para dados normalizados em relação ao pico estreito em torno de $\lambda=550\text{ nm}$. A curva contendo amostra pura possui picos em torno de $\lambda=550\text{ nm}$ e $\lambda=700\text{ nm}$. Após a adição do ELP é possível notar a supressão total do pico à esquerda ($\lambda=700\text{nm}$) em $t=0$ (curva vermelha) e $t=15\text{min}$.

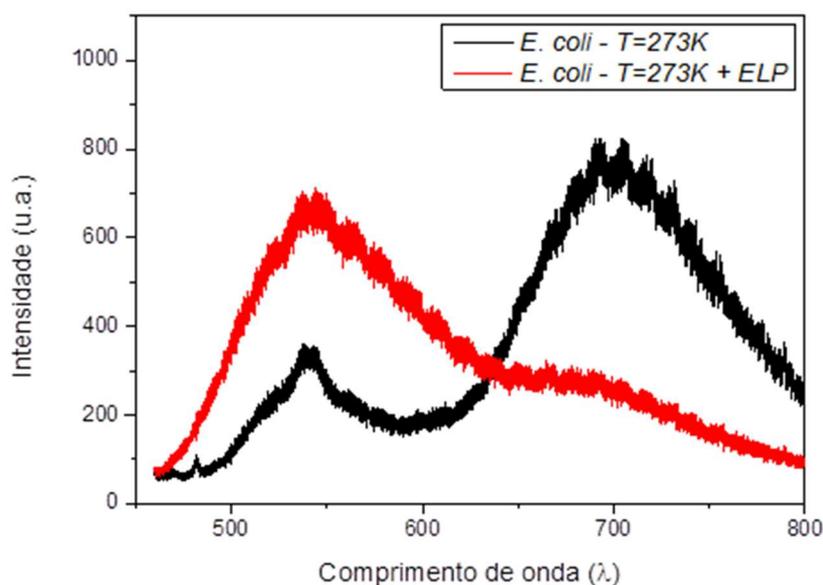


Figura 49. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), com $T=273K$, para dados não normalizados. É possível notar a supressão quase total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.

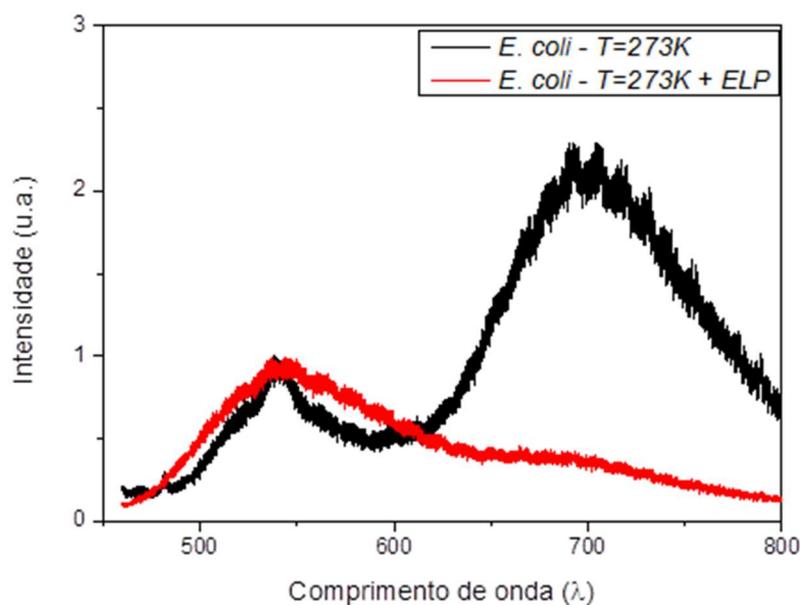


Figura 50. Espectros de fotoluminescência para amostra de *E. coli* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), com $T=273K$, para dados normalizados em relação ao pico estreito (à esquerda). É possível notar a supressão quase total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.

IV.I.IV. *Enterococcus faecalis*

Os dados de fotoluminescência para a bactéria *Enterococcus faecalis* estão apresentados na figura 51 tanto para a bactéria pura (curva preta) quanto para a bactéria com adição do ELP (curva vermelha). Percebemos um pico estreito em torno de 538 nm tanto para a bactéria pura quanto para a bactéria com a adição do ELP. Percebemos também um pico largo em torno de 750 nm para a bactéria pura que não aparece após a adição do ELP. Com os dados normalizados em relação ao pico estreito (figura 52) percebemos mais claramente a supressão do pico largo após a adição do ELP.

O pico estreito, coincidente tanto na amostra de bactéria pura quanto na amostra de bactéria com ELP, apresenta-se mais largo na amostra contendo ELP.

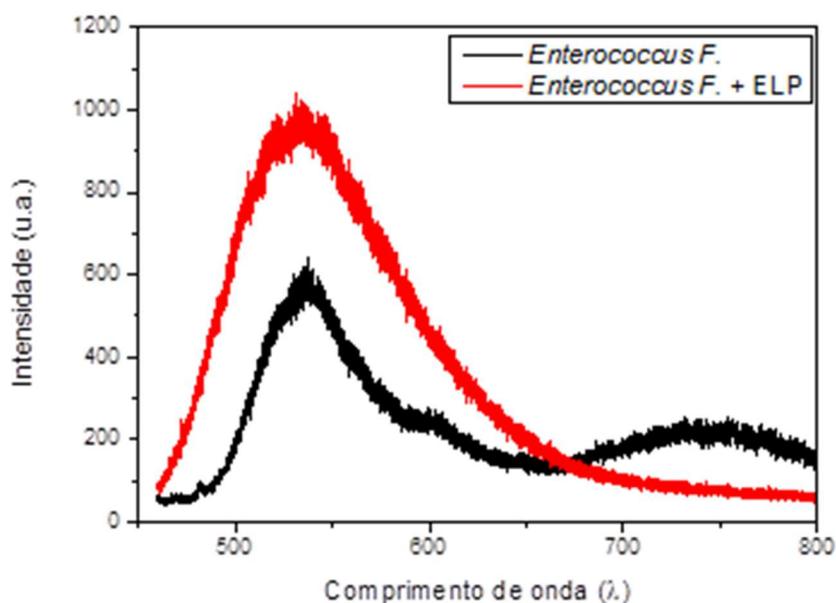


Figura 51. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Enterococcus F.* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.

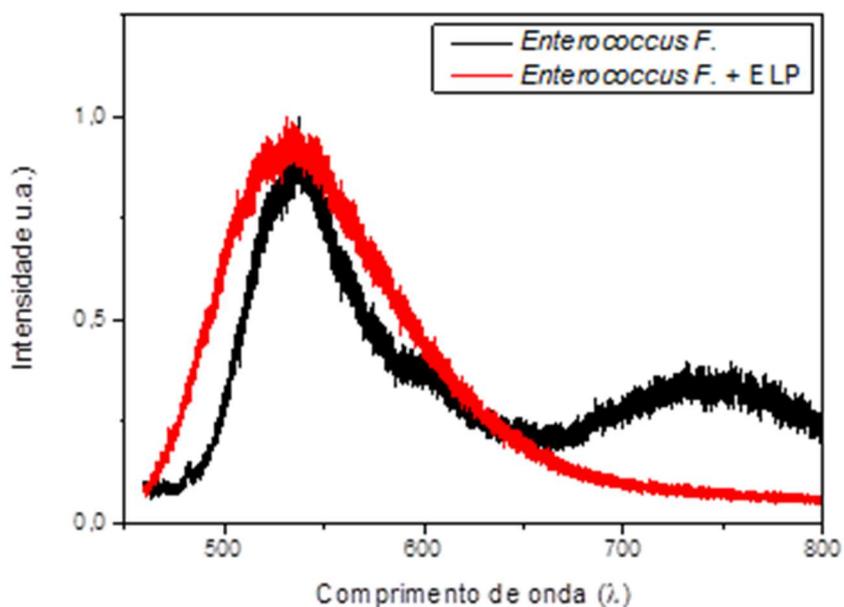


Figura 52. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Enterococcus F.* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação ao máximo valor de intensidade relativa (pico à esquerda), em torno de $\lambda=550$ nm. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.

IV.I.V. *Fusarium subglutinans*

Os dados de fotoluminescência obtidos para o fungo *Fusarium subglutinans* estão apresentados na figura 53. Para a amostra contendo somente o fungo (curva preta), nota-se a presença de um pico estreito em torno de 538 nm e outro pico largo em torno de 700 nm. Após a adição do ELP percebe-se a supressão do pico largo (curva vermelha) que fica ainda mais evidente na figura 54, onde estão apresentados os espectros de emissão normalizados em relação ao pico estreito.

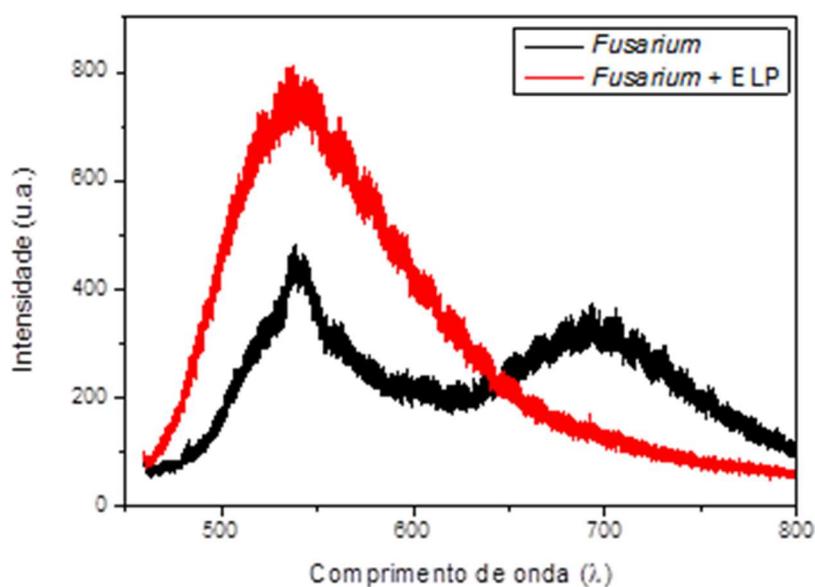


Figura 53. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Fusarium* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.

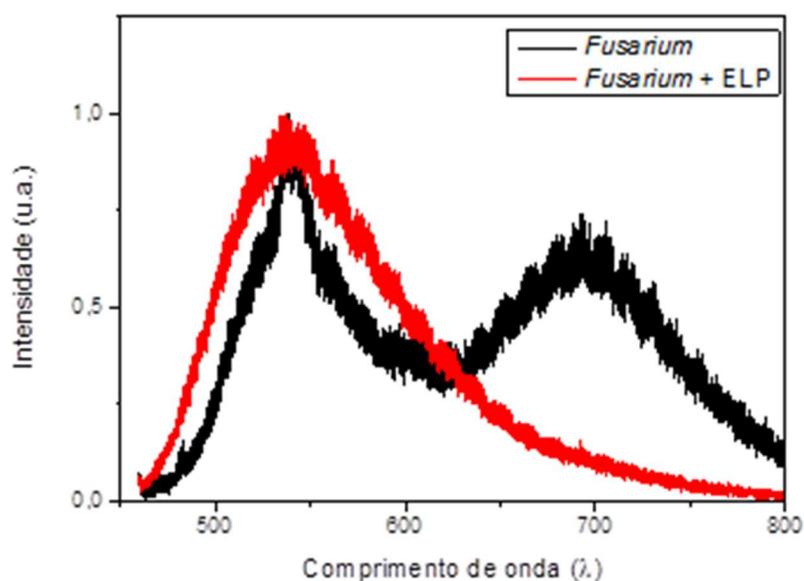


Figura 54. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Fusarium* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação ao valor máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.

IV.I.VI. *Staphylococcus aureus*

Os espectros de fotoluminescência para a bactéria *Staphylococcus aureus* pura (curva preta) e com adição de ELP (curva vermelha) estão representadas na figura 55, onde nota-se a presença de um pico estreito em torno de 538 nm na bactéria pura, que permanece após a adição do ELP. O pico largo em torno de 750 nm, presente na bactéria pura, é suprimido após a adição o ELP (curva vermelha). A normalização, realizada em relação ao pico estreito (figura 56) permite uma melhor visualização da supressão do pico largo após a adição do ELP.

A figura 57 apresenta um comparativo entre a bactéria pura, logo após a adição do ELP e 15 minutos após a adição do ELP. O pico estreito, em torno de 538 nm, é coincidente nas três curvas: bactéria pura, logo após adição do ELP e 15 minutos após a adição do ELP. O pico largo, em torno de 750 nm, presente no espectro da bactéria pura, é suprimido após a adição do ELP (curva vermelha) e permanece suprimido mesmo após 15 minutos da adição do ELP (curva azul). A normalização das curvas em relação ao pico estreito permite observar que os espectros de emissão da bactéria logo após a adição do ELP e 15 minutos após a adição do ELP são coincidentes, estando presente apenas o pico estreito (Figura 58).

Com a bactéria com $T=273K$, notamos a presença dos picos de emissão nos mesmos comprimentos de onda da bactéria em temperatura ambiente (figura 59). Tanto as curvas originais quanto as curvas normalizadas (figura 60) em

relação ao pico estreito permitem identificar a supressão do pico largo após a adição do ELP.

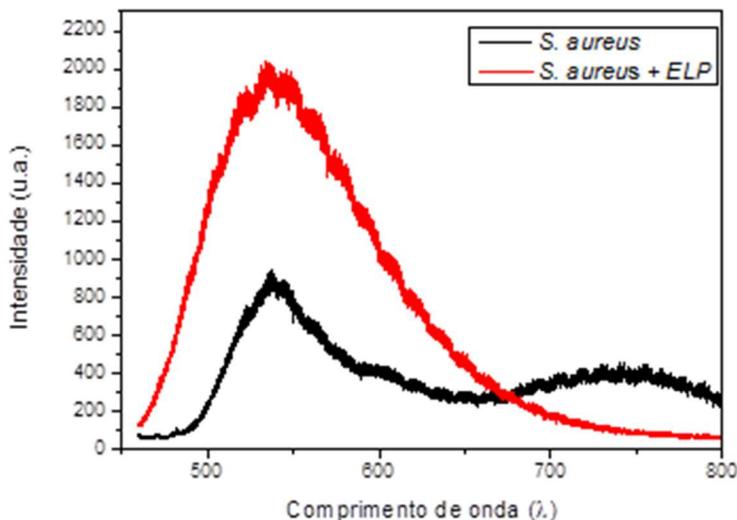


Figura 55. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.

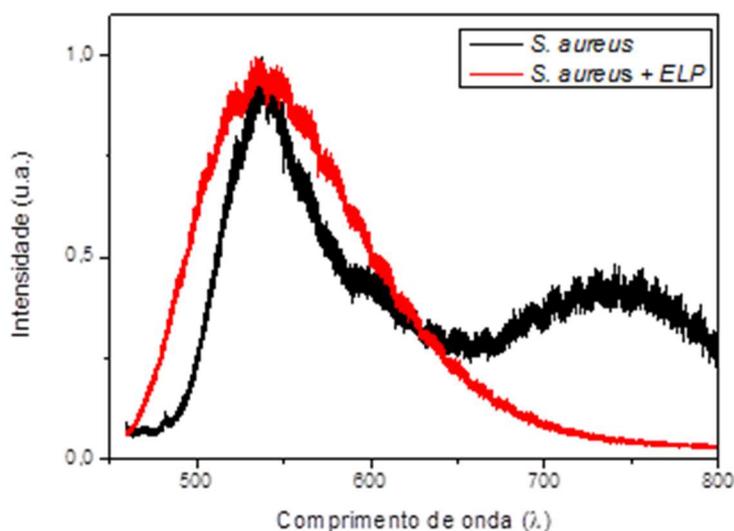


Figura 56. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta) e após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação ao máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.

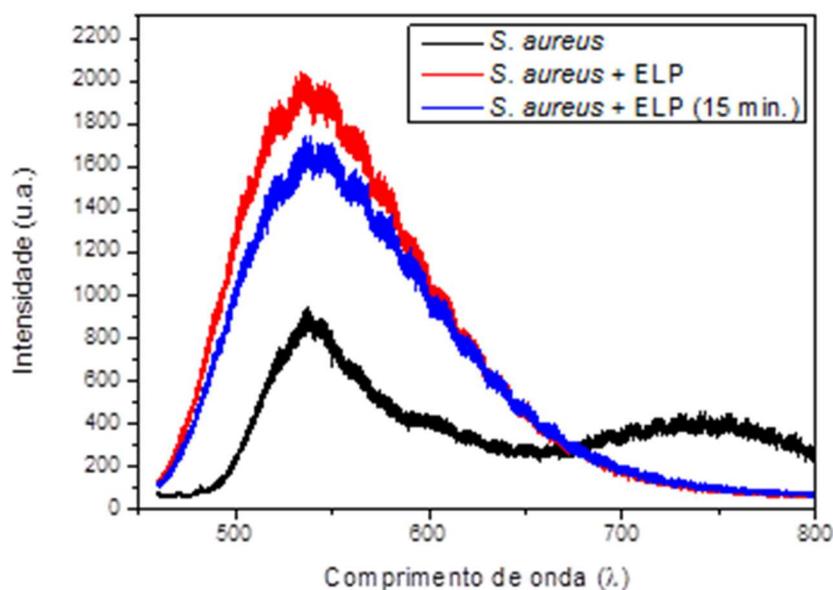


Figura 57. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta), após a adição do ELP em $t=0$ (curva vermelha) e $t=15$ (curva azul), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, logo após a adição do ELP ($t=0$). O espectro permanece inalterado após 15 minutos ($t=15$).

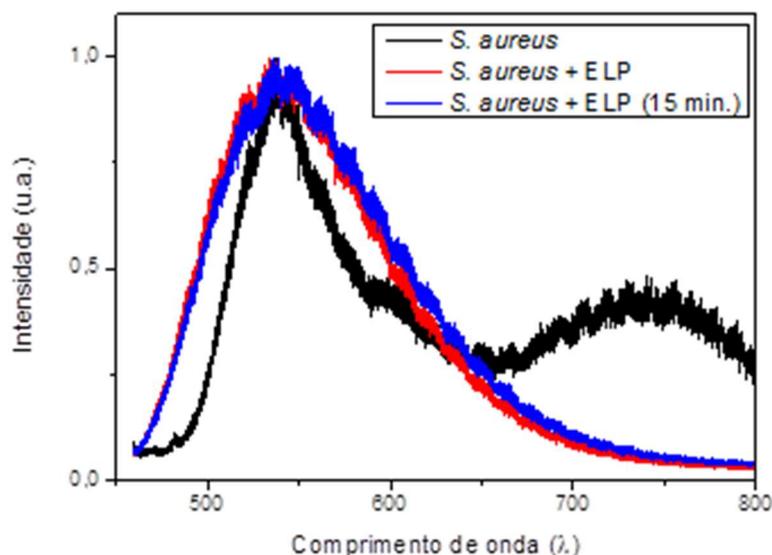


Figura 58. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta), após a adição do ELP em $t=0$ (curva vermelha) e $t=15$ (curva azul), para dados normalizados em relação ao valor máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, logo após a adição do ELP ($t=0$). O espectro permanece inalterado após 15 minutos ($t=15$).

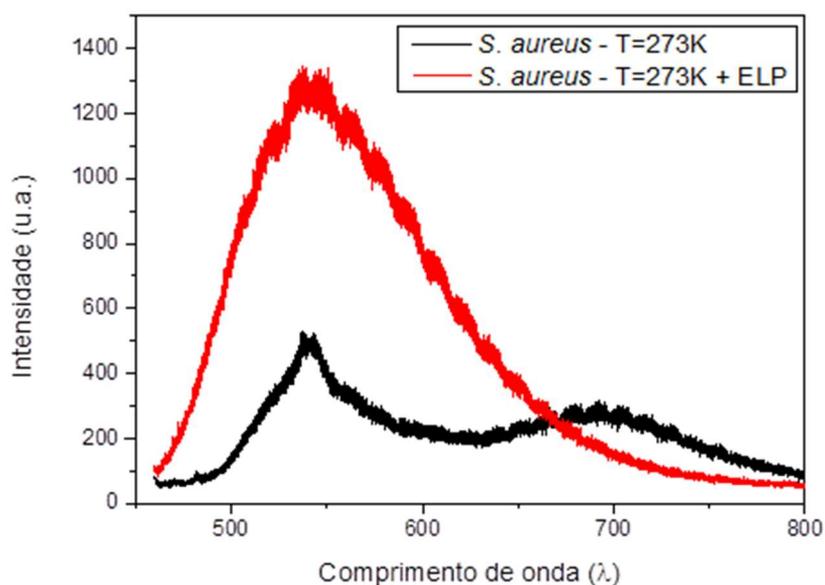


Figura 59. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha) em T=273K, para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.

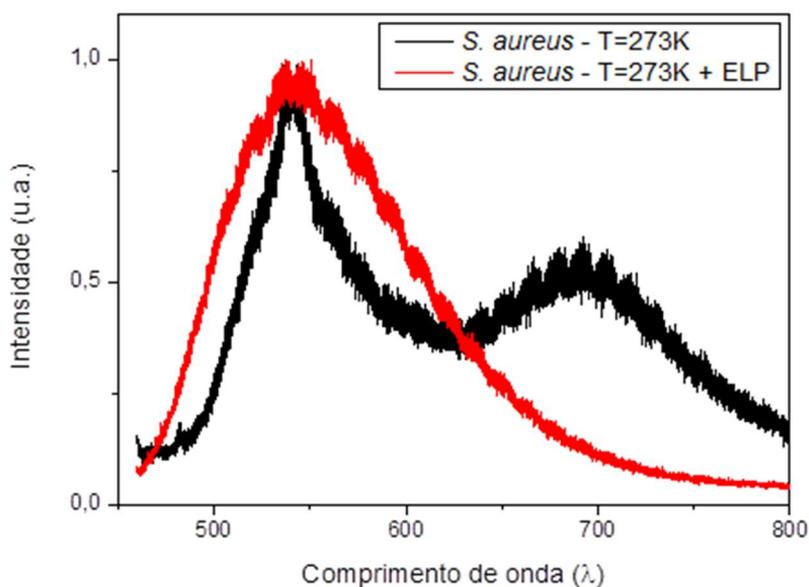


Figura 60. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Staphylococcus aureus* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha) em T=273K, para dados normalizados em relação ao máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=700$ nm, após a adição do ELP.

IV.1.VII. *Shigella sonnei*

A figura 61 apresenta o espectro de fotoluminescência da bactéria *Shigella sonnei*. A curva preta representa o espectro da bactéria pura enquanto a curva vermelha apresenta o espectro após a adição do ELP. É possível notar que a bactéria pura apresenta um pico estreito e mais intenso em torno de 538 nm e um pico largo em torno de 750 nm. Para os dados não normalizados o pico largo apresenta-se bem discreto. Após a adição do ELP, o pico largo é totalmente suprimido permanecendo o pico estreito que se apresenta com intensidade consideravelmente maior e ligeiramente mais largo que o pico estreito da bactéria pura (curva preta). Após a normalização dos dados em relação ao pico estreito (figura 62) o pico largo da bactéria pura (curva preta) torna-se mais evidente e fica mais clara a supressão deste após a adição do ELP (curva vermelha).

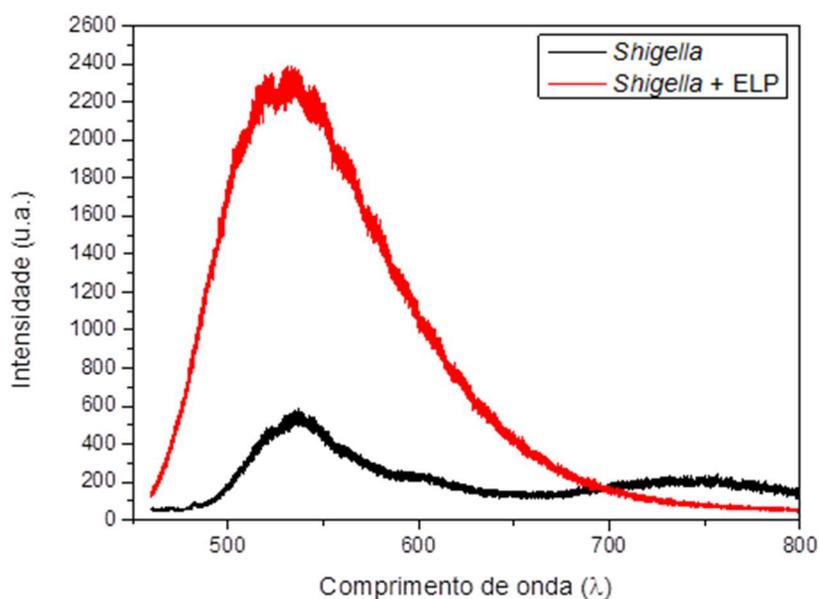


Figura 61. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Shigella* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha), para dados não normalizados. É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.

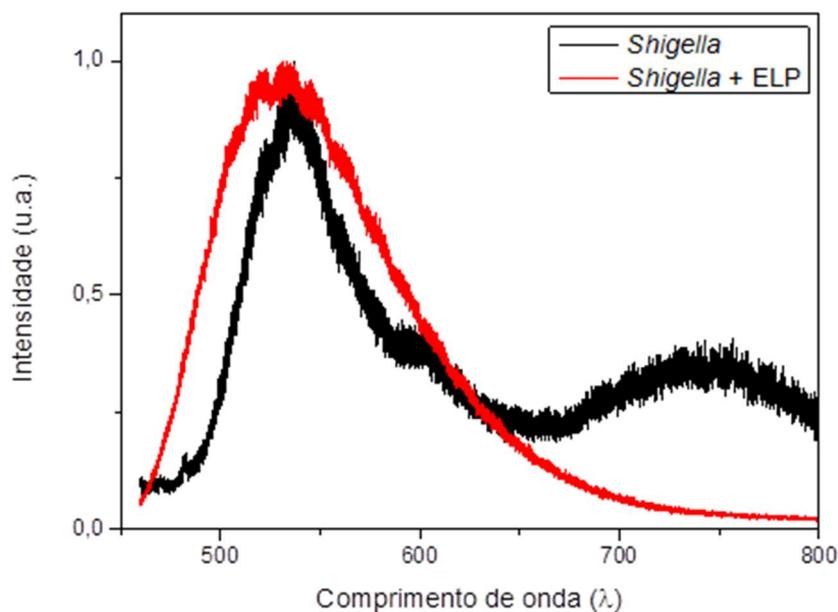


Figura 62. Espectros de fotoluminescência para amostra de *Shigella* pura (curva preta), após a adição do ELP (curva vermelha), para dados normalizados em relação ao máximo de intensidade relativa (pico à esquerda). É possível notar a supressão total do pico à direita, em torno de $\lambda=750$ nm, após a adição do ELP.

IV.I.VIII. COMPARATIVO DE TODOS MICRORGANISMOS ESTUDADOS

Na Figura 63 estão demonstrados os espectros de emissão de todos os microrganismos estudados neste presente trabalho, normalizados em relação ao pico estreito. Podemos perceber que todos microrganismos apresentam um pico estreito em $\lambda=538\text{nm}$ e um segundo pico largo que em alguns microrganismos está localizado em torno de $\lambda=700\text{nm}$ (curvas vermelha, verde e azul) e, em outros, está localizado em torno de $\lambda=750\text{nm}$.

Após a adição do ELP, os espectros de emissão apresentam apenas um pico, como pode ser visto na figura 64, onde são apresentados os espectros de emissão originais de todos os microrganismos contendo ELP. A figura 65 apresenta os espectros de emissão de todos microrganismos + ELP, normalizados em relação ao pico estreito ($\lambda=538\text{nm}$), ficando ainda mais evidente que, após a adição do ELP, as curvas são idênticas independentemente do microrganismo.

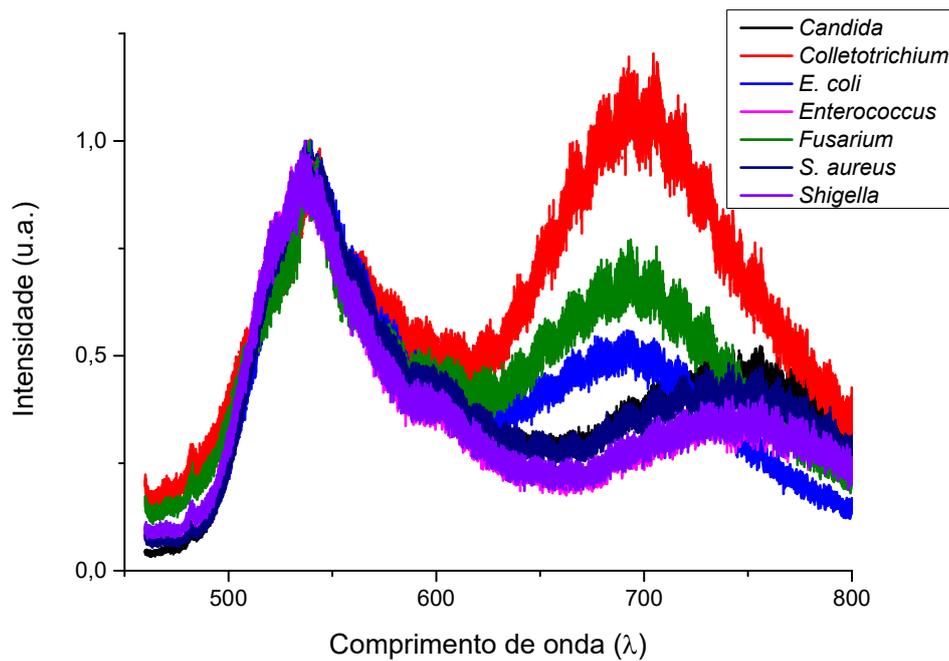


Figura 63. Espectros de fotoluminescência para todas as amostras puras (conforme legenda), para dados normalizados em relação à intensidade relativa em torno de $\lambda=550$ nm (pico à esquerda), comum à todos microrganismos.

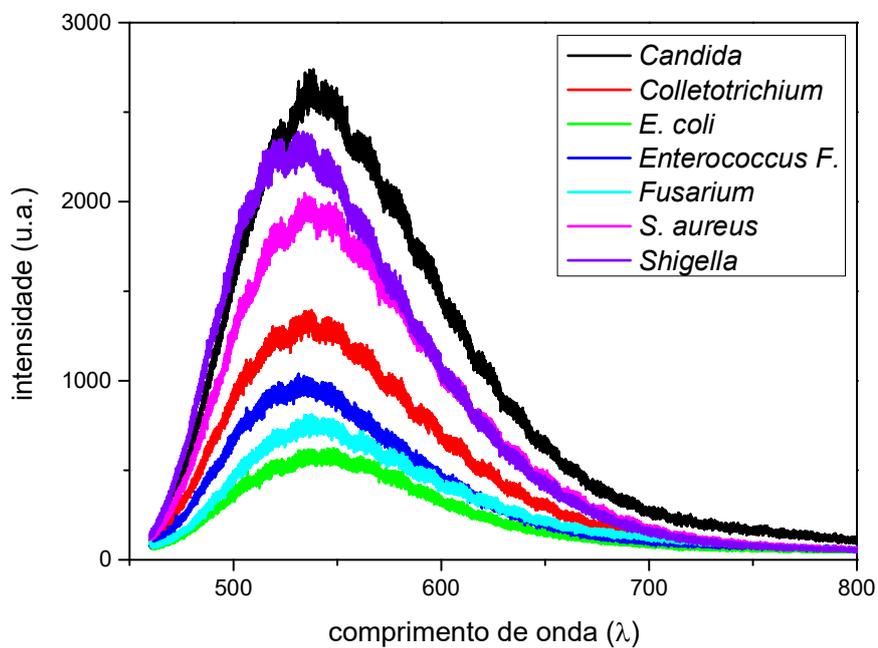


Figura 64. Espectros de fotoluminescência para todas as amostras (conforme legenda) após a adição do ELP, para dados não normalizados. O pico em torno de $\lambda=550$ nm é comum à todos microrganismos, assim como a supressão do pico à direita.

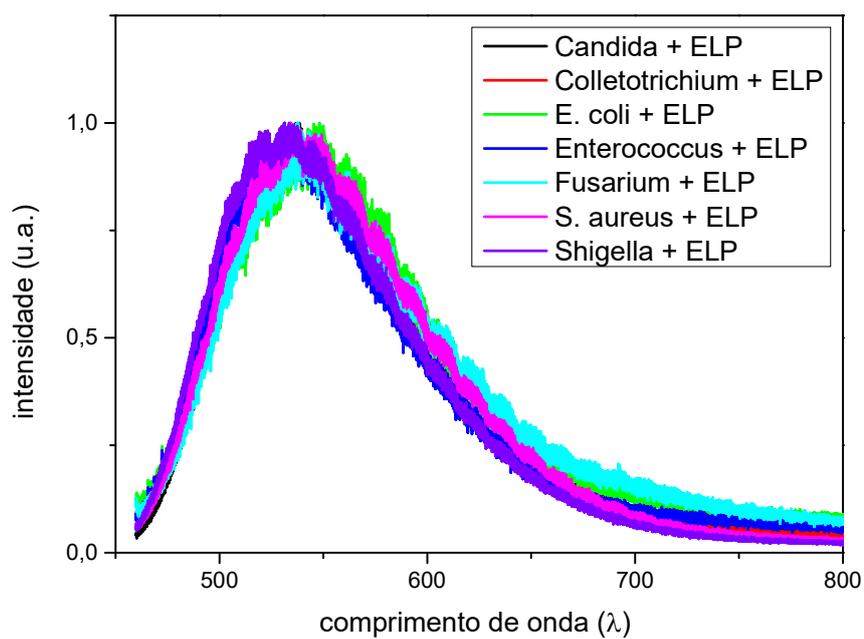


Figura 65. Espectros de fotoluminescência para todas as amostras (conforme legenda) após a adição do ELP, para dados normalizados em relação ao valor máximo de emissão em torno de $\lambda=550$ nm. O pico em torno de $\lambda=550$ nm é comum à todos microrganismos, assim como a supressão do pico à direita. Todas as curvas são equivalentes após a adição do ELP.

V. PROTÓTIPO

Para o desenvolvimento do sensor, os principais componentes utilizados foram:

- Laser/LED azul (emissão em $\lambda=405$ nm e $\lambda=461$ nm)
- Filtro passa-faixa ($\lambda=680-720$ nm)
- LDR (sensor de luz)

A figura 66 demonstra o sensor montado em um tripé, com o led de excitação ligado.

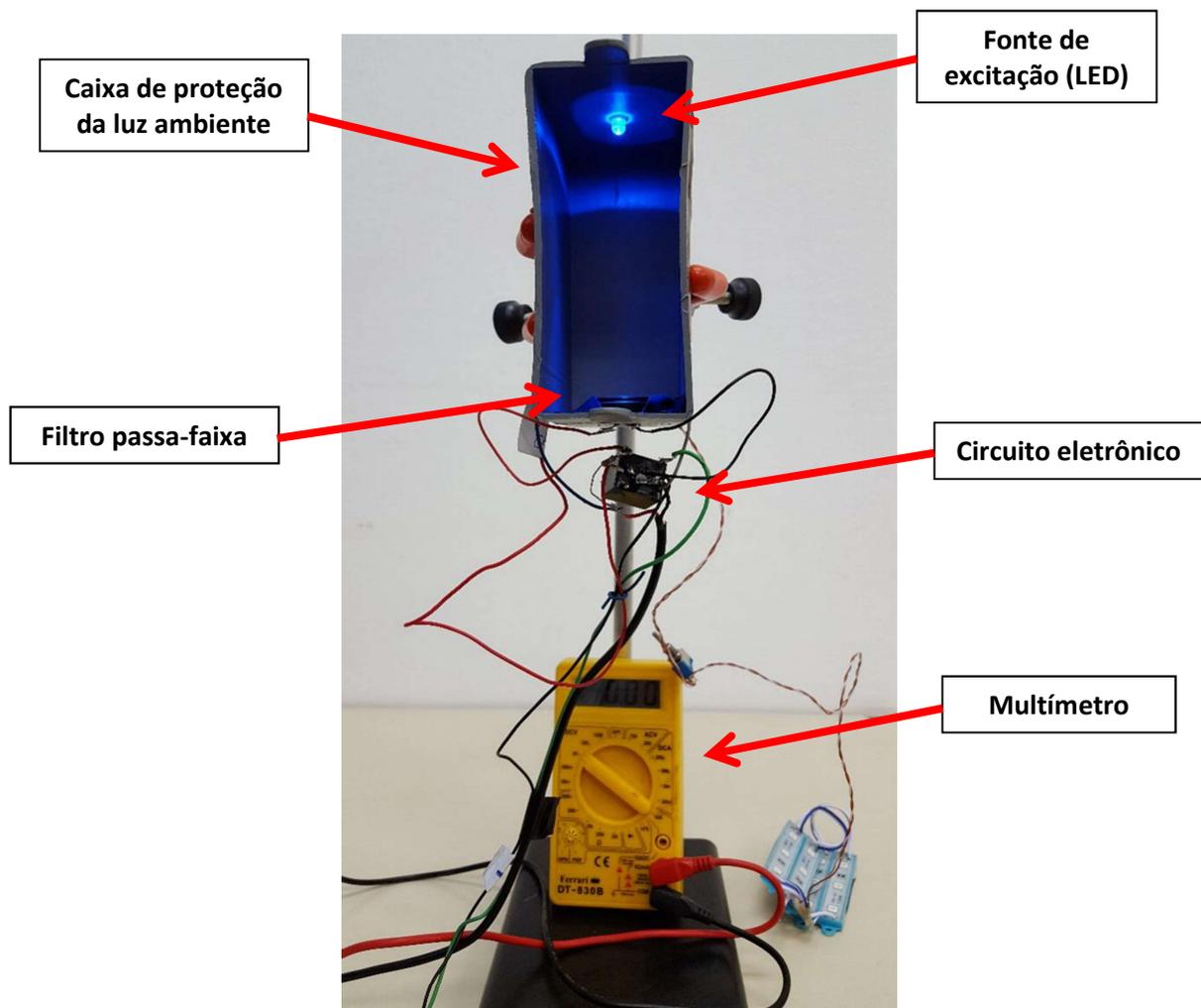


Figura 66. Protótipo montado utilizando o LED como fonte de excitação.

Na figura 66 é possível visualizar a caixa de proteção para bloqueio da luz ambiente, o led de excitação azul e o filtro passa faixa. Abaixo da caixa, estão os componentes eletrônicos que formam o circuito eletrônico. Foi ligado também um multímetro digital para detecção do sinal quando da detecção do microrganismo.

A figura 67 apresenta o interior da caixa de proteção onde estão localizados o led de excitação, o filtro passa-faixa e, abaixo do filtro, o sensor LDR.

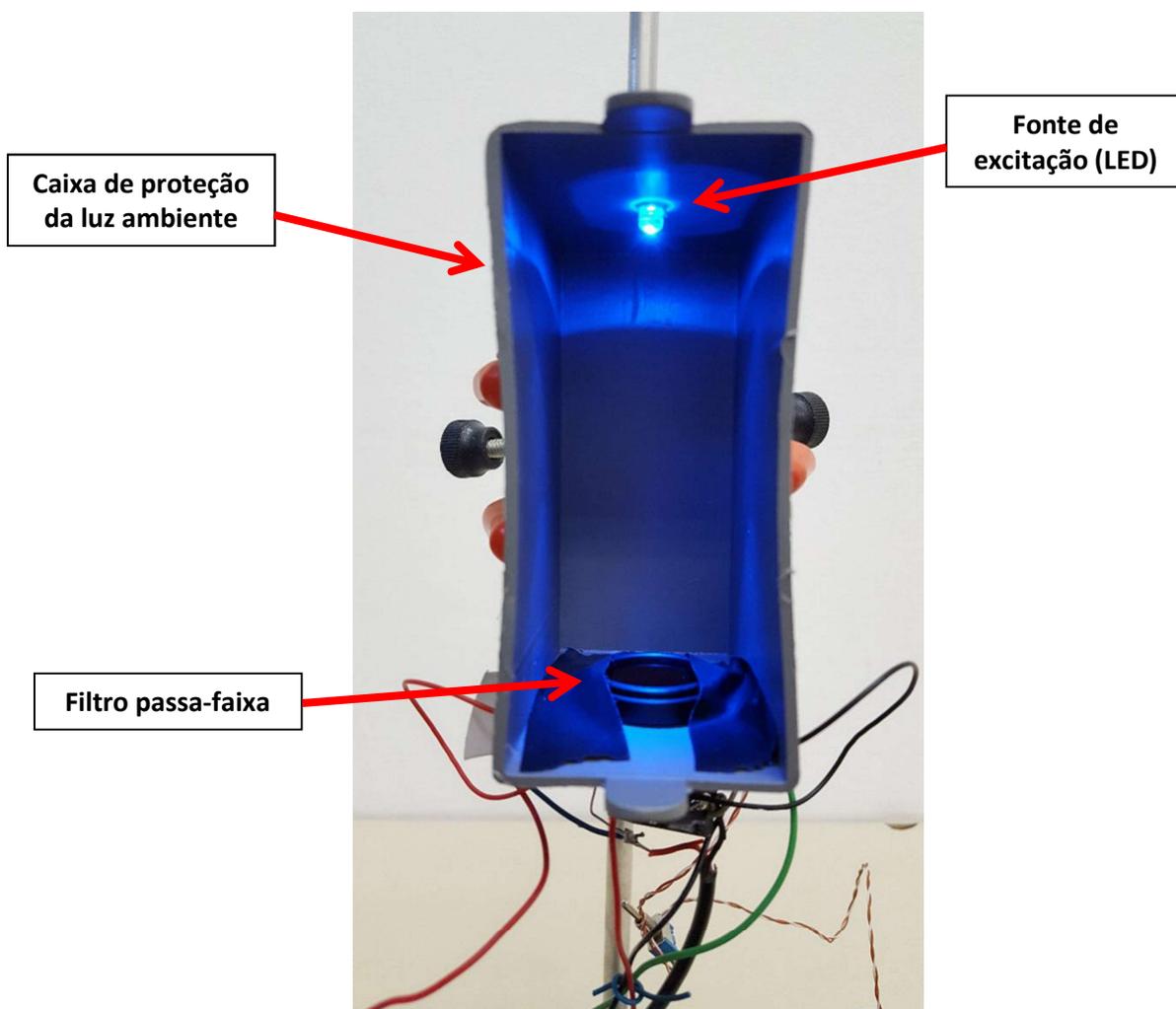


Figura 67. Detalhe da caixa de proteção do sensor onde estão localizados o LED, o filtro passa-faixa e o sensor de luminosidade LDR (localizado abaixo do filtro).

A lâmina, contendo a amostra, é apoiada sobre o filtro passa-faixa. A luz emitida pelo led primeiramente atinge a amostra. A presença de microrganismos na amostra faz com que apareça emissão na faixa de $\lambda=700-750\text{nm}$. O filtro óptico utilizado é projetado de tal forma que permite somente a passagem de luz entre $\lambda=680-720\text{nm}$. Sendo assim, ao atingir o filtro, parte da luz é filtrada, passando somente a faixa de emissão correspondente a presença do microrganismo na amostra. O detector LDR detecta então a luz que passou pelo filtro, possibilitando a detecção de microrganismos na amostra. A confirmação da presença de microrganismos é feita utilizando o lipopeptídeo *Polycerradyn*. Ao adicionar o lipopeptídeo, os microrganismos morrem e após nova leitura da amostra não é possível a detecção de luz pelo LDR pois na ausência de microrganismos, não é emitida luz na faixa de $\lambda=680-720\text{nm}$. Assim, nenhuma luz passa pelo filtro e o detector LDR não detecta nenhuma luz.

Para o sensor proposto existem três possibilidades que estão descritas a seguir.

- a. Se é feita uma primeira leitura (amostra sem ELP) e o detector LDR detecta a luz emitida pela amostra, é possível que existam microrganismos na amostra. Assim, é adicionado o lipopeptídeo *Polycerradin* e, após homogeneização é realizada nova leitura. Se nenhuma luz for detectada, fica comprovado a presença dos microrganismos que foram mortos após a adição do lipopeptídeo.

- b. Se na primeira leitura não é detectada nenhuma luz pelo LDR, a amostra está livre de microrganismos, pois nenhuma luz conseguiu passar pelo filtro.
- c. Existem ainda a possibilidade de, na primeira leitura, ser detectada luz e após a adição do lipopeptídeo ainda ser possível a detecção de luz. Nesse caso, não é possível afirmar a presença de microrganismos. Pode ser que algum outro composto presente na amostra esteja emitindo a luz detectada ou pode ser que a amostra não tenha sido homogeneizada corretamente e ainda restaram microrganismos vivos presentes na amostra.

O filtro utilizado na montagem do protótipo não permite a passagem de luz acima de $\lambda=720$ nm. Dessa forma, permite somente a detecção dos microrganismos que apresentam luminescência com pico em $\lambda=700$ nm. Através da análise da transmitância realizada no filtro passa-faixa, verificou-se que a transmitância do filtro nesse comprimento de onda ($\lambda=700$ nm), é somente 27%, ou seja, somente 27% da luz que incide sobre o filtro nessa faixa, consegue atravessá-lo, conforme demonstrado na figura 68. Assim, 73% da luz incidente é bloqueada pelo filtro, não permitindo uma detecção eficiente.

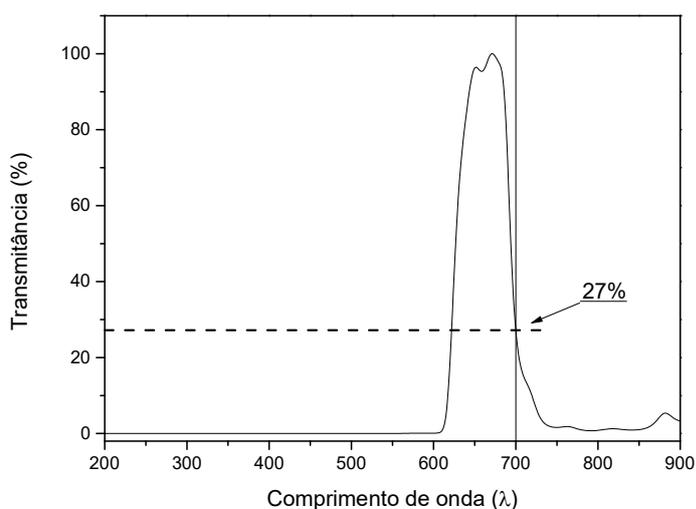


Figura 68. Espectro de transmitância do filtro passa-faixa. Detalhe para a transmitância em $\lambda=700$ nm.

Para uma detecção eficiente, o pico de transmitância do filtro deve ser coincidente com o pico de emissão da amostra. A utilização de um filtro adequado possibilitaria uma detecção mais eficiente. Conforme demonstrado na figura 69, para uma eficiência acima de 60% de transmitância do filtro, a emissão deve estar na faixa de $\lambda=629-690$ nm.

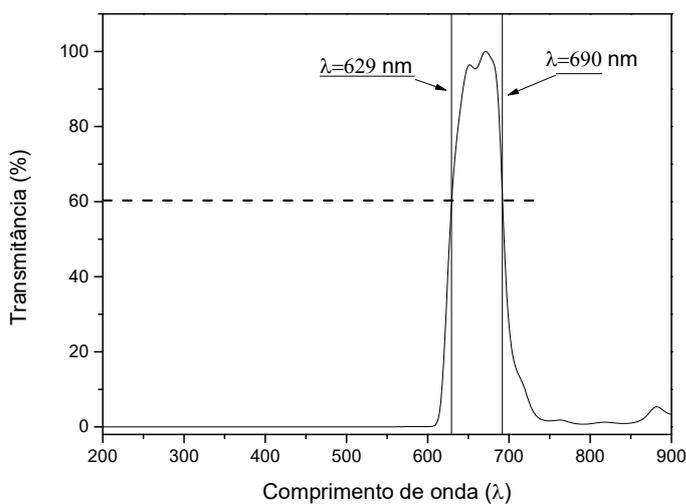


Figura 69. Espectro de transmitância do filtro passa-faixa. Detalhe para faixa de comprimento de onda com transmitância acima de 60%.

Uma vez que a faixa de emissão de luminescência dos microrganismos estudados está fora da faixa de melhor transmitância do filtro, a confirmação do funcionamento do protótipo foi feita utilizando a clorofila. A clorofila, quando excitada por uma fonte de luz azul (em torno de $\lambda=400-500$ nm), emite luminescência na faixa do vermelho, com pico em $\lambda=675$ nm (Figura 70). A figura 71 apresenta a clorofila com sua cor verde em luz ambiente (à esquerda) e a fluorescência da clorofila (à direita), quando excitada com luz azul ($\lambda=461$ nm) apresentando emissão de luz vermelha.

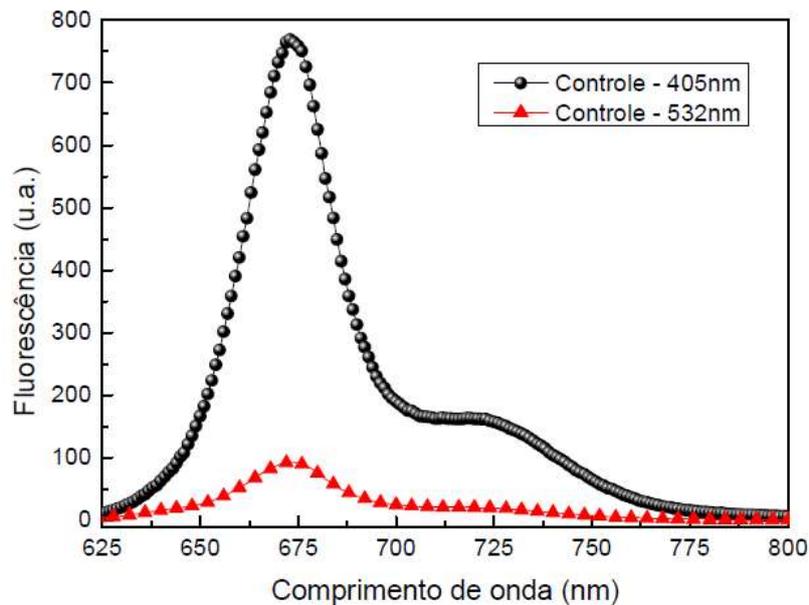


Figura 70. Fluorescência do extrato de clorofila com excitação em $\lambda=405$ nm e $\lambda=532$ nm.

Dessa forma foi possível ajustar os componentes do sensor para melhor eficiência, restando apenas a substituição do filtro passa-faixa por um com a mesma faixa de emissão dos microrganismos.

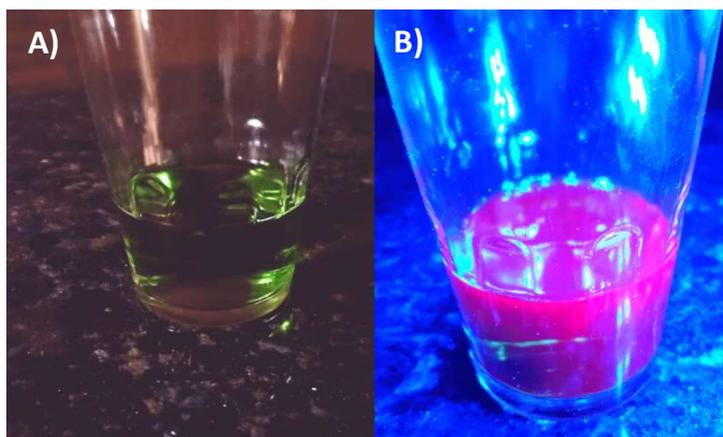


Figura 71. Extrato de clorofila em luz ambiente, apresentando coloração verde (A) e sob excitação de luz azul ($\lambda=461$ nm), apresentando fluorescência (B).

Inicialmente, com o sensor ligado sem a clorofila na lâmina, é possível verificar que a tensão no multímetro é 0V, indicando que não houve detecção (Figura 72). Essa situação é similar à uma amostra sem a presença de microrganismos.



Figura 72. Sensor com lâmina no interior da caixa de detecção, sem clorofila. A tensão indicada no multímetro é 0V, indicando a ausência de clorofila.

Na sequência, a clorofila é colocada sobre a lâmina (Figura 73 A) e esta é colocada dentro da caixa de detecção do sensor (Figura 73 B). A tensão mostrada no multímetro é de 12V, indicando a presença da clorofila (situação semelhante à amostra contendo microrganismos) (Figura 74).

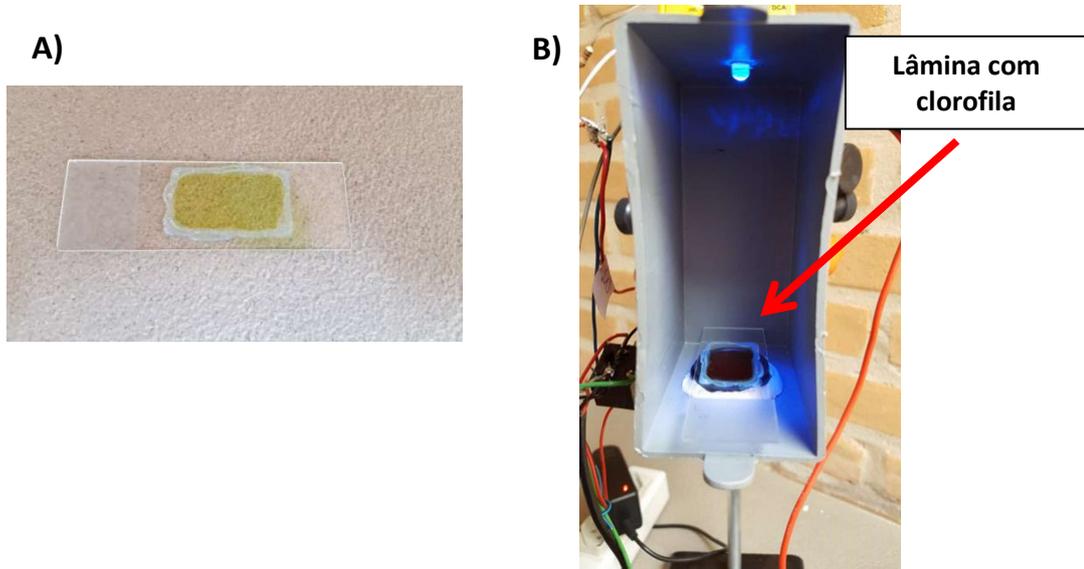


Figura 73. (A) Lâmina contendo extrato de clorofila; (B) Detalhe da caixa de proteção do sensor com a lâmina contendo clorofila em seu interior.

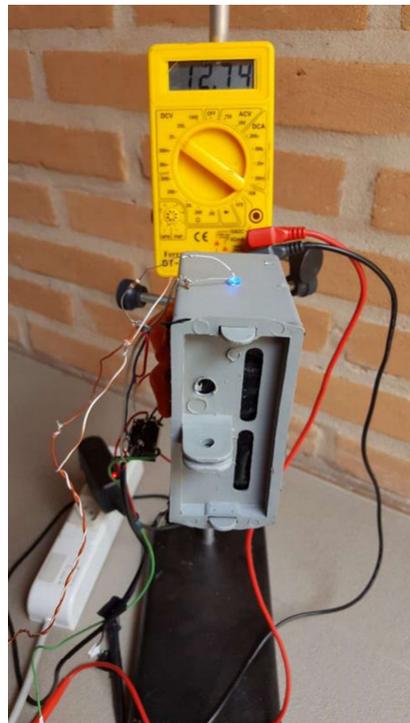


Figura 74. Sensor com lâmina no interior da caixa de detecção, com clorofila. A tensão indicada no multímetro é 12V, indicando a presença de clorofila.

VI. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um dispositivo para detecção de microrganismos patogênicos que fosse de rápida detecção (dentro de poucos minutos), confiável e de baixo custo. A utilização da fotoluminescência se mostrou uma técnica bem interessante por permitir a detecção praticamente em tempo real. A Figura 63, onde estão demonstrados todos os espectros de fotoluminescência de todos os microrganismos estudados no presente trabalho, demonstra claramente que os espectros possuem um pico que é comum à todos os microrganismos, e está localizado em torno de $\lambda=538\text{nm}$, e outro pico que para alguns microrganismos localiza-se em torno de $\lambda=700\text{nm}$, e para outros está localizado em torno de $\lambda=750\text{nm}$. Após a adição do ELP apenas o pico estreito em torno de $\lambda=538\text{nm}$ permanece, como pode ser observado nas figuras 64 e 65. O ELP causa a morte dos microrganismos através da abertura de “buracos” na parede celular, fazendo com que o conteúdo das células “vazem” para fora da célula causando a morte celular. A eficácia da ação do ELP sobre os microrganismos foi comprovada através do trabalho de SERRANO 2014, onde ficou comprovado que o ELP atua muito rapidamente causando a morte dos microrganismos.

A adição do ELP foi feita de forma criteriosa afim de que a mistura ficasse homogênea. Essa homogeneização é extremamente importante pelo fato de que se não for feita de forma adequada, alguma célula bacteriana pode não entrar em contato com o ELP e permanecer viva, fazendo com que os espectros de emissão

forneçam dados incorretos. As bactérias e fungos possuem tamanhos variados que vão de cerca de 0,5 μm até 5,0 μm . Como o feixe de laser que é emitido pelo espectrofotômetro possui cerca de 1-2 μm , esse feixe atinge apenas uma pequena porção da amostra analisada contendo uma pequena quantidade de microrganismos. Se a homogeneização não for adequada, o feixe pode atingir microrganismos vivos, fornecendo um espectro diferente de quando os microrganismos estão todos mortos pela ação do ELP.

Na literatura é possível encontrar outros trabalhos onde são apresentados métodos de detecção de microrganismos patogênicos através de sensores e biossensores ópticos, capazes de detectar microrganismos patogênicos rapidamente. A proposta apresentada neste trabalho baseou-se na detecção de microrganismos em meio líquido. Porém, dispositivos que utilizam fibra óptica tem sido motivo de estudo e pode ser utilizado para detecção de bactérias em suspensão no ar. Esses dispositivos utilizam elementos de reconhecimento imobilizados na fibra óptica, uma fonte de luz e um detector. Essa imobilização interfere na sensibilidade e especificidade do biossensor. Por esse motivo, várias estratégias de imobilização de anticorpos têm sido motivo de estudos (Zourob *et al.*, 2008).

Os biossensores ópticos podem ser divididos em 2 tipos: os baseados em fluorescência e os chamados *label-free*. O biossensor mais simples funciona medindo a fluorescência da superfície do biossensor pelo reconhecimento da molécula alvo. Os elementos de reconhecimento são imobilizados no biossensor ou são utilizados marcadores que geram sinal luminoso quando o elemento de

reconhecimento reage ou entra em contato com a molécula alvo (Ahmed *et al.*, 2014).

Outro método de detecção óptica é através da utilização de um interferômetro. Esse método também utiliza componentes (anticorpos, enzimas, receptores) imobilizados na superfície do dispositivo que servem para que as bactérias se liguem ao interferômetro. A ligação das bactérias causa uma mudança no índice de refração e a detecção é feita pela diferença de fase entre a luz de referência e a detectada. Esse sistema permite a detecção de *E. coli* em poucos minutos (Mathesz *et al.*, 2015).

Esse tipo de biossensor, que utiliza elementos imobilizados em uma superfície, se torna complexo devido à dificuldade de imobilização do elemento de reconhecimento. Alguns compostos biológicos, por exemplo as enzimas, necessitam de mobilidade para desenvolverem seu papel. É necessário que essa mobilidade se mantenha após a imobilização, o que nem sempre é fácil de se conseguir além de elevar o custo para produção do biossensor. Além disso, a necessidade da adição de marcadores também dificulta e encarece a construção desse tipo de dispositivo.

Outra técnica proposta para desenvolvimento de biossensores de bactérias baseia-se na detecção em tempo real de compostos excretados pelas bactérias utilizando um filme biomimético, feito de polímero impresso molecularmente. Esse filme seria integrado em um conjunto capaz de detectar os sinais ópticos gerados, possibilitando a detecção em meio líquido e em tempo real (Homer *et al.*, 2016).

Um estudo demonstrou um sensor óptico que se baseia no reconhecimento de imagem 3D. Para isso, utiliza-se um microscópio digital que faz um escaneamento da amostra e é capaz de contar as partículas em suspensão na amostra. Essas imagens geradas são analisadas por algoritmos e classificadas como bactérias ou outras partículas, sendo possível a quantificação pela contagem das bactérias. Esse sistema é utilizado para controle da qualidade da água potável e permite a obtenção dos resultados em 10 minutos. A precisão na classificação das partículas suspensas é de $90\pm 7\%$ (para um único tipo de partícula suspensa) e $78\pm 14\%$ (para vários tipos de partículas suspensas) (Højris *et al.*, 2016).

Os métodos de detecção descritos anteriormente necessitam de elementos (marcadores, receptores, anticorpos, enzimas) que geralmente devem ser imobilizados em uma superfície para que o sinal luminoso gerado possa ser captado. A utilização desses elementos e a imobilização necessária fazem com que a produção desses sensores e biossensores não seja tão simples e aumentam o custo de produção desses dispositivos. Por outro lado, já existem dispositivos capazes de observar a presença de microrganismos patogênicos à olho nu, sem a necessidade de instrumentos analíticos. Esses sensores colorimétricos são atrativos pois permitem diagnósticos rápidos (aprox.. 15 min.) e são de fácil utilização, portáteis e rentáveis (Yoo & Leel, 2016).

Atualmente, os sensores que utilizam a fluorescência são dispositivos que necessitam de um longo tempo de ensaio, lentes externas e detectores grandes e complexos, o que causa uma limitação na portabilidade e requer certa experiência

na utilização (Yoo & Leel, 2016). A proposta do presente trabalho, de desenvolvimento de um sensor óptico simples, portátil, feito com materiais de baixo custo e que sejam facilmente encontrados no mercado, se mostrou viável e se mostrou um avanço no que diz respeito ao tempo necessário para detecção de microrganismos patogênicos. Utilizando as propriedades fotoluminescentes dos microrganismos, foi possível a confirmação da presença destes em meio líquido.

VII. CONCLUSÃO

Atualmente, vários estudos têm sido realizados para desenvolvimento de sensores e biossensores ópticos para detecção de microrganismos patogênicos. A busca por novas ferramentas de detecção se deve à necessidade de métodos mais rápidos de detecção, principalmente, devido crescente número de microrganismos resistentes à antibióticos.

De fato, a técnica de luminescência se mostrou eficiente na detecção dos microrganismos estudados. Foi possível verificar ainda que os microrganismos emitem luminescência em diferentes comprimentos de onda. Nos microrganismos estudados as emissões foram em $\lambda=700$ nm e $\lambda=750$ nm. Não foi possível associar a faixa de emissão ao tipo de microrganismo. Os fungos *Fusarium* e *Colletotrichium*, e a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* apresentaram luminescência em $\lambda=700$ nm, enquanto a bactéria Gram-negativa *Shigella*, o fungo *Candida albicans* e as bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* apresentaram luminescência em $\lambda=750$ nm.

Embora não seja possível a determinação específica do microrganismo presente na amostra através dessa técnica, existe a possibilidade de determinar o conjunto de possíveis microrganismos de acordo com a faixa de emissão de luminescência. A obtenção do espectro de luminescência de outros microrganismos futuramente possibilitará distribuí-los em grupos, de acordo com a faixa de emissão.

O processo de construção do protótipo permitiu analisar as variáveis com relação ao arranjo geométrico dos componentes ópticos. Esse arranjo se mostrou

extremamente importante para uma melhor eficiência do sensor. Além disso, a utilização de componentes ópticos (filtro, fonte de luz e detector de luminosidade) adequados se faz essencial para o correto funcionamento do sensor e detecção adequada dos microrganismos presentes na amostra. Outro fator importante é a utilização do peptídeo *Polycerradim* no sistema de detecção. Em estudo realizado anteriormente ficou comprovada a ação antimicrobiana desse peptídeo contra uma vasta gama de microrganismos. A ausência de luminescência na amostra após a adição do peptídeo é a chave para confirmação da presença de microrganismos na amostra.

A confirmação do funcionamento do sensor proposto foi feita utilizando a clorofila que emite luminescência na faixa de melhor transmitância do filtro utilizado para construção do protótipo.

Esse novo método de detecção de microrganismos é um grande avanço do ponto de vista biotecnológico com potencial de aplicação nas áreas da saúde, agricultura e industrial.

Por fim, o sensor se mostrou extremamente funcional e permitirá o depósito de um pedido de patente e a publicação de diversos artigos científicos. Outra possibilidade real que está sendo estudada é a abertura de uma *spin-off* para produção e venda do sensor.

VIII. ETAPAS FUTURAS

A técnica utilizada no presente estudo possibilitou o desenvolvimento de um sensor de rápida detecção e baixo custo. Novos estudos possibilitarão o aprimoramento do sensor possibilitando determinar especificamente o microrganismo encontrado na amostra além da determinação da concentração do mesmo através do cálculo da intensidade de radiação emitida pelos microrganismos. Existe ainda a possibilidade de utilização desse tipo de sensor em ações anti-bioterrorismo, onde a necessidade de rápida detecção é fundamental. Na área da saúde, o aprimoramento do sensor possibilitará um maior controle das infecções hospitalares e uma diminuição nos riscos para os pacientes.

BIBLIOGRAFIA

ABCMED, 2014. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: o que são? Como é a técnica de Gram? Quais as vantagens de diferenciar as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas?. Disponível em: <<http://www.abc.med.br/p/587007/bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas-o-que-sao-como-e-a-tecnica-de-gram-quais-as-vantagens-de-diferenciar-as-bacterias-gram-negativas-e-gram-positivas.htm>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

AHMED A, RUSHWORTH JV, HIRST NA, MILLNER PA. (2014) Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clinical Microbiology Reviews* p. 631–646

ALBANI JR, (2007) Principles and applications of fluorescence spectroscopy. Blackwell Science. p.1-2

ALBERTIN W, CHASSERIAUD L, COMTE G, PANFILI A, DELCAMP A, et al. (2014) Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLoS ONE* 9(4): e94246. doi:10.1371/journal.pone.0094246

ANDRADE RB, GEMELLI T, DALL ONDER LP, CRISTINA K, BRITO T, BARBOZA AAL, BRITO BG (2010) Métodos Diagnósticos Para Os Patógenos Alimentares: *Campylobacter* Sp., *Salmonella* Sp. e *Listeria Monocytogenes*. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.77, n.4, p.741-750

ARTAULT S, BLIND JL, DELAVAL J, DUREUIL Y, GAILLARD N. (2001) Detecting *Listeria monocytogenes* in food. *Int Food Hyg*;12(3):23

BALBANI APS, BUTUGAN O. (2001) Contaminação biológica de alimentos. *Pediatria (São Paulo)*. 23(4):320-8

BARROS GF, ROCHA CR, CARELI RT, MENDES FPE, ALMEIDA AC, DUARTE ER, et al. (2015) Sobrevivência de patógenos de origem alimentar aderidos em aço inoxidável após aplicação de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo. 74(3):258-65

BENEVIDES C. (2011) Sem controle eficiente, infecções hospitalares causam cem mil óbitos por ano. Disponível em: <http://oglobo.globo.com/politica/sem-controle-eficiente-infecoes-hospitalares-causam-cem-mil-obitos-por-ano-2697060>. Acessado em: 10/09/2016.

BOWEN A. (2016) Chapter 3: Infectious Diseases Related to Travel. *The Yellow Book: Health Information for International Travel*. CDC. ISBN 978-0-19-937915-6. Disponível em:

<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/shigellosis>. Acessado em: 22/09/2016.

BREVILIERI D, LAGO A, FRANÇA U, BARROSO C, SÓRIA D. (2010) AÇÕES DE ENFERMAGEM PARA O CONTROLE DA TRANSMISSÃO DO VRE. R. pesq.: cuid. fundam. online. 2(Ed. Supl.):704-709

CALDERONE RA, Candida and Candidiasis. Washington: ASM Press, 2002

CALIL SS, SILVA PRQ. (2011) Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. Disponível em: <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>. Acessado em: 15/09/2016.

CATÃO RMR, CEBALLOS BSO. (2001) LISTERIA SPP., COLIFORMES TOTAIS E FECAIS E E.COLI NO LEITE CRU E PASTEURIZADO DE UMA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, NO ESTADO DA PARAÍBA (BRASIL). Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 21(3): 281-287.

DACRES H, MICHIE M, ANDERSON A, TROWELL SC. (2013) Advantages of substituting bioluminescence for fluorescence in a resonance energy transfer-based periplasmic binding protein biosensor. Biosensors and Bioelectronics 41. 459–464

DE BOER E, BEUMER RR. (1999) Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. Int J Food Microbiol;50:119–30.

DEISINGH AK, THOMPSON M. (2004) Biosensors for the detection of bactéria. Can. J. Microbiol. 50: 69-77

DE KRAKER MEA, DAVEY PG, GRUNDMANN H, on behalf of the BURDEN study group (2011) Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. PLoS Med 8(10): e1001104. doi:10.1371/journal.pmed.1001104.

EISBERG, R. E RESNICK, R. (1985). Física quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas. 9ª edição. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1994. p.928.

ETCHEGARAY A, BUENO CC, MELO IS, TSAI SM, FIORE MF, SILVA-STENICO ME, MORAES LAB, TESCHKE O. (2008) Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of Bacillus subtilis on fungal and bacterial cells. Arch Microbiol 190:611–622.

ETCHEGARAY A, HERCULANO J. (2011) Biossintese E Propriedades De Lipopeptídeos De Bacillus Subtilis Produzidos Em Meios De Cultura Alternativos. In: XVI Encontro de Iniciação Científica e I Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da PUC-Campinas. Anais... Campinas.

FERNANDES MR, MOURA Q, SARTORI L, SILVA KC, CUNHA MP, ESPOSITO F, LOPES R, OTUTUMI LK, GONÇALVES DD, DROPA M, MATTÉ MH, MONTE DF, LANDGRAF M, FRANCISCO GR, BUENO MF, DE OLIVEIRA GARCIA D, KNÖBL T, MORENO AM, LINCOPAN N. (2016a) Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill.* 21(17):pii=30214. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214>

FERNANDES MR, MCCULLOCH JA, VIANELLO MA, MOURA Q, PÉREZ-CHAPARRO PJ, ESPOSITO F, SARTORI L, DROPA M, MATTÉ MH, LIRA DPA, MAMIZUKA EM, LINCOPAN N. (2016b) First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a Human Infection in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.01325-16

FINKING R, MARAHIEL MA. (2004) Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annu. Rev. Microbio.* 58:453–88

FOLCH J, LEES M, SLOANE SGH. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1): 497-509.

FOX JL. (2006) The business of developing antibacterials. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1521-1528

FOXMAN B, BARLOW R, D'ARCY H, GILLESPIE B, SOBEL JD (2000) *Candida* vaginitis: self reported incidence and associated costs. *Sex Transm Dis*;27: 230–235

FRAZIER, WC. (1993) *Microbiologia de los alimentos*. Acribia, 4ªed. Zaragoza, España, 681p.

FREITAS EI, LEMOS AA, MARIN VA. (2006) Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. *Ciência & Saúde Coletiva*, 11(4):1073-1083.

FUENTEFRÍA AM. (2008) Farmacêutico brasileiro descobre fungo patogênico. Disponível em: www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/3/25a28.pdf. Acesso em 15/08/2016.

GIULIANI A, PIRRI G, NICOLETTO SF. (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology* 2(1). 1–33.

GRAM L, RAVN L, RASCH M, BRUHN JB, CHRISTENSEN AB, GIVSKOV M. (2002) Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 79–97.

HAJJI M, JELLOULI K, HMIDET N, BALTI R, SELLAMI-KAMOUN A, NASRI M. (2010) A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 37:805–813

HARRIS M, MORA-MONTES HM, GOW NAR, COOTE1, PJ. (2009) Loss of mannosylphosphate from *Candida albicans* cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. *Microbiology* 155, 1058–1070.

Harvey, D. (2000) *Modern Analytical Chemistry*. 1^a edition. Boston: McGraw-Hil, 798 p

HOMER M, KSENDZOV A, YEN SP, RYAN M. (2016) Biomimetic/Optical Sensors for Detecting Bacterial Species. Disponível em: <http://www.techbriefs.com/component/content/article/ntb/tech-briefs/bio-medical/276>. Acessado em: 15/09/2016.

HUANG E, YOUSEF AE. (2014) The Lipopeptide Antibiotic Paenibacterin Binds to the Bacterial Outer Membrane and Exerts Bactericidal Activity through Cytoplasmic Membrane Damage. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 80 N. 9. p. 2700–2704

HØJRIS, B. et al. (2016) A novel, optical, on-line bacteria sensor for monitoring drinking water quality. *Sci. Rep.* 6, 23935; doi: 10.1038/srep23935.

IVNITSKI D, ABDEL-HAMID I, ATANASOV P, WILKINS E. (1999) Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors & Bioelectronics* 14: 599–62

KULAGINA NV, LASSMAN ME, LIGLER FS, TAITT CR. (2005) Antimicrobial Peptides for Detection of Bacteria in Biosensor Assays. *Analytical Chemistry*, Vol. 77, No. 19

LABOISSIÈRE P. (2015) OMS estima 2 milhões de mortes por comida e água contaminadas. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015-04/oms-estima-2-milhoes-de-mortes-por-comida-e-agua-contaminadas-todos-os-anos>. Acessado em: 07/10/2016

- LEE KH. (2002) Development of Short Antimicrobial Peptides Derived from Host Defense Peptides or by Combinatorial Libraries. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 8, n. 9. p. 795-813
- LEHNINGER AL, NELSON DL, COX MM. (1995) *Princípios de Bioquímica*. Editora: Sarvier, 2^a edição.
- LEONARD P, HEARTY S, BRENNAN J, DUNNE L, QUINN J, CHAKRABORTY T, O'KENNEDY R. (2003) Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 3-13
- LIVERMORE DM. (2004) The need for new antibiotics. *Clinical Microbiol Infect.* (Suppl. 4), 1-9
- MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. (1997) *Brock Biology of Microorganisms*, 8. ed. Upper Saddle River, NJ: 986 p.
- MALORNY B, TASSIOS PT, RADSTROM P, COOK N, WAGNER M, HOORFAR J. (2003) Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol*; 83(1):39-48
- MANI S, WIERZBA T, WALKER RI. (2016) Status of vaccine research and development for Shigella. *Vaccine*. Volume 34, Issue 26, p. 2887–2894.
- MANNOOR MS, ZHANG S, LINK AJ, MCALPINE MC. (2010) Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides. *PNAS*. vol. 107. no. 45. 19207–19212
- MATHESZ A, VALKAI S, ÚJVÁROSY A, AEKBOTE B, SIPOS O, STERCZ B, KOCSIS B, SZABÓ D, DÉR A. (2015) Integrated optical biosensor for rapid detection of bacteria. *Optofluid. Microfluid. Nanofluid.*; 2:15–21
- MOOKHERJEE N & HANCOCK REW. (2007) Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell. Mol. Life Sci.* 64. p. 922 – 933
- MUKHERJEE, P. (2015) Bioremediation with the Help of Analytical Tool-Biosensors. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*
- NATHWANI D. (2009) Health economic issues in the treatment of drug-resistant serious Gram-positive infections. *Journal of Infection*. 59(S1) S40 S50
- O Globo (2013) Cerca de 23 mil pessoas morrem anualmente nos EUA por bactérias super-resistentes. Disponível em:

<http://oglobo.globo.com/sociedade/saude/cerca-de-23-mil-pessoas-morrem-anualmente-nos-eua-por-bacterias-super-resistentes-9998962>. Acessado em: 22/09/2016.

OLIVEIRA GA, FARIA JB, LEVY CE, MAMIZUKA EM. (2001) Characterization of the Brazilian Endemic Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Hospitals Throughout Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*.5(4):163-170

PAPAGIANNI M. (2003) Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances* 21, p. 465–499

PAPO N, SHAI Y. (2005) Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 62. p. 784-790

PARADELLA TC, KOGA-ITO CY, JORGE AOC. (2007) *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. *Revista de Odontologia da UNESP*. 36(2): 163-68

RAHMAN A, KANG SC. (2009) In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. *Food Chemistry*, 116(3), 670-675.

Raman Spectroscopy - A Tutorial. Disponível em: http://www.kosi.com/na_en/products/raman-spectroscopy/raman-technical-resources/raman-tutorial.php. acessado em: 10/09/2016.

REID G, JASS J, SEBULSKY MT, MCCORMICK JK. (2003) Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clinical microbiology reviews* Vol. 16, No. 4: 658-672

RODRIGUES MX, BITTENCOURT JVM, MATOS EASA, REIS DR. (2011) Inovação em métodos analíticos microbiológicos na indústria alimentícia. *Latin American Journal of Business Management*. v. 2, n. 2, p. 54-81

RODRIGUES AG, GALZERANI JC. (2012) Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 34, n. 4, 4309

SARI V, CASTRO NMR; KOBIYAMA M. (2015) Estimativa da concentração de sedimentos suspensos com sensores ópticos: revisão. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*. vol. 20 no.4 Porto Alegre. p. 816 – 836

SILVA RR, COELHO GD. (2006) Fungos Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas. Disponível em: http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Glauciane_Coelho.pdf. Acesso em 10/08/2016.

STOODLEY, P et al. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 187-209. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705

TEIXEIRA P, RODRIGUES D, ROMEU MJ, AZEREDO J. (2015) O impacto de biofilmes microbianos na higiene e segurança alimentar. *Boletim de Biotecnologia*.

TENENBAUM E, SEGAL E. (2015) Optical biosensors for bacteria detection by a peptidomimetic antimicrobial compound. *Analyst*, 140, 7726–7733
Valeur B. (2001) *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH. p. 3-70

VENTURA JA, CABRAL JRS, MATOS AP. (2009) ‘Vitória’: new pineapple cultivar resistant to fusariosis. *Acta Horticulturae*, The Hague, v. 822,p.51-55.

VIANA FMP, CARDOSO JE, FREIRE FCO. Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fielsfi902wyiv80z4s473ewtp564.html>. Acessado em: 05/10/2016.

WANG, J. (2000) From DNA Biosensors to Gene Chips. *Nucleic Acids Research*, v.28, n.16, p.3011-3016.

WELKER M, & VON DÖHREN H. (2006) Cyanobacterial peptides - Nature’s own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 30. P. 530–563

WHO (2016) Antibiotic resistance. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>. Acessado em: 10/10/2016.

WILCOX, MH (2009) Future gazing in the management of multiply drug-resistant Gram-positive infection. *Journal of Infection*. 59(S1) S75 S80.

WOJKOWSKA-MACH J, BULANDA M, ROZANSKA A, KOCHAN P, HECZKO PB. (2006) Hospital-acquired pneumonia in the intensive care units of Polish hospitals. *Infection control and hospital epidemiology*, Chicago, v. 27, n. 7, p. 784-786.

WOODFORD N, LIVERMORE DM. (2009) Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *Journal of Infection* 59(S1) S4 S16.

YOO SM, LEE SY. (2016) Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, Vol. 34, No. 1. p. 7-25

ZAMBON JJ, HARASZTHY VI. (1995) The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontology* 2000, v. 7, n.1, p. 69-82.

ZAMBON JJ. (1996) Periodontal diseases : microbial factors. In : American Academy of Periodontology. *Ann. Periodontology*. Chicago, p. 879-925.

ZOUROB M, ELWARY S, TURNER APF (2008) Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer Science+Business Media. 125-126