

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
GERÊNCIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E
INFORMÁTICA INDUSTRIAL - CPGEI

FRANCIELE MENDES DE LIMA BOMBARDI

SENSORIAMENTO ÓTICO DA DINÂMICA DO CRESCIMENTO DE
COLÔNIAS DE *ESCHERICHIA COLI* EM AMBIENTE HÍDRICO

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2017

FRANCIELE MENDES DE LIMA BOMBARDI

**SENSORIAMENTO ÓTICO DA DINÂMICA DO CRESCIMENTO DE
COLÔNIAS DE *ESCHERICHIA COLI* EM AMBIENTE HÍDRICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências” - Área de Concentração: Fotônica em Engenharia.

Orientador: Prof. Dr. José Luís Fabris

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Muller

CURITIBA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B695s
2017 Bombardi, Franciele Mendes de Lima
Sensoriamento ótico da dinâmica do crescimento de colônias de escherichia coli em ambiente hídrico / Franciele Mendes de Lima Bombardi.-- 2017.
71 f. : il. ; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês
Disponível também via World Wide Web
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Curitiba, 2017
Bibliografia: f. 67-71

1. Bactérias. 2. Raman, Espectroscopia de. 3. Análise espectral. 4. Microbiologia – Cultura e meios de cultura. 5. Água – Microbiologia. 6. Coliformes – Identificação. 7. Engenharia elétrica – Dissertações. I. Fabris, José Luís. II. Muller, Márcia. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.

CDD: Ed. 22 – 621.3

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Curitiba



Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial

Título da Dissertação Nº. ____

Sensoriamento Ótico da Dinâmica do Crescimento de Colônias de *Escherichia Coli* em Ambiente Hídrico

por

Franciele Mendes de Lima Bombardi

Orientador: Prof. Dr. José Luis Fabris (UTFPR)

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Muller (UTFPR)

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS – Área de Concentração: FOTÔNICA EM ENGENHARIA do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, às 14:30h do dia 24 de fevereiro 2016. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos professores doutores:

Prof. Dr. José Luis Fabris
(Presidente – UTFPR)

Prof^a. Dr^a. Francelli Klemba Coradin
(Faculdade Estácio - Curitiba)

Prof. Dr. Júlio César Rodrigues Azevedo
(UTFPR)

Visto da coordenação:

Prof. Jean Carlos Cardozo da Silva, Dr.
(Coordenador do CPGEI)

Dedico este trabalho ao meu pai, Odival
Mendes de Lima, que sempre será um
modelo de trabalho, responsabilidade e
amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador e co-orientadora, Professor Dr. José Luís Fabris e Professora Dra. Márcia Muller, pela disponibilidade e dedicação em guiar-me na realização deste trabalho mesmo com todas as dificuldades. Vocês sempre serão uma referência de postura profissional para minha vida.

Ao meu esposo, André, por todo amor, companheirismo e força que recebi nesta jornada. Você é a minha vida.

Agradeço a minha mãe, Ana, pelo apoio e amor.

Agradeço à professora Dra. Jacinta Sanchez Pelayo da Universidade Estadual de Londrina por ceder as cepas de bactérias que foram usadas no trabalho.

À professora Dra. Hedda Elizabeth Kolm e à bióloga Fernanda Kasumi Ishii Lima do laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos do Mar (UFPR), por toda ajuda com o meio de cultura, materiais de apoio e ensinamentos que fizeram com que fosse possível traçar um caminho para o trabalho.

À amiga, Heloisa Fernandes, por dispor de seu tempo e espaço.

Aos amigos que me incentivaram e apoiaram.

À colega de sala e trabalho, Ana Carla Cordeiro, pelas discussões decorridas ao longo de todas as etapas do mestrado.

Não existe triunfo sem perda, não há vitória sem sofrimento, não há liberdade sem sacrifício. (TOLKIEN, J. R. R., 1955)

RESUMO

BOMBARDI, Franciele M. L. **Sensoriamento ótico da dinâmica do crescimento de colônias de *Escherichia coli* em ambiente hídrico**, 2017. Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

Este trabalho apresenta um estudo empregando duas técnicas óticas para monitorar o crescimento de culturas de cepas de *Escherichia coli* em dois meios de cultura líquidos: Espectroscopia de absorção UV-Vis (turbidimetria) e espectroscopia Raman. Na primeira técnica, a turbidez permite avaliar as diferentes fases naturais de crescimento de uma cultura bacteriana (lag, exponencial, estacionária e decaimento) por meio da densidade ótica, medida com um espectrômetro UV-VIS. Na segunda, o espalhamento Raman (medido com um espectrômetro dispersivo), a partir de amostras de água contaminada, fornece não apenas informações sobre as fases de crescimento, mas também abre a possibilidade de identificação bacteriana através da sua impressão digital característica. Mediu-se a dinâmica de duas cepas de *E. coli* – (nomeadas como H2/11 e H3C2/12) em um caldo líquido nutriente e quatro cepas de *E. coli* (nomeadas como H2/11, H3C2/12, 109 e 110) em caldo líquido EC, mantidas a 37,0°C ao longo de 24 horas. Aliquotas das amostras foram removidas da cultura em intervalos de tempo regulares para medições espectrais. A análise da turbidez permitiu medir o tempo de geração (isto é, o tempo de duplicação de uma população), que foi maior para cepas crescidas em caldo EC. Os espectros Raman forneceram informações sobre a evolução temporal das bandas a 942 cm⁻¹, 977 cm⁻¹, 1036 cm⁻¹, 1086 cm⁻¹, 1140 cm⁻¹, 1188 cm⁻¹, 1182 cm⁻¹, 1207 cm⁻¹ e 1251 cm⁻¹, associadas com impressões digitais de componentes biológicos específicos. Os dados espectrais foram analisados por Análise de Componentes Principais (PCA). Os resultados obtidos em ambas as técnicas permitiram identificar as fases lag, exponencial e estacionária das cepas estudadas.

Palavras-chave: *E. coli*. Espectroscopia Raman. Espectroscopia UV-Vis. Meio de cultura. Fases de crescimento.

ABSTRACT

BOMBARDI, Franciele M. L. ***Optically monitoring the growth dynamics of Escherichia coli bacterial population in water environment***, 2017. Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

This work is a study using two optical techniques to monitor the growth of cultures of Escherichia coli strains in two liquid culture medium: Raman spectroscopy and UV-Vis absorption spectroscopy (turbidimetry). In one hand, turbidity allows evaluating the different phases of growth of a bacterial culture (lag, exponential, stationary and decay) by optical density, measured with an UV-VIS spectrometer. On the other hand, Raman scattering (measured with a dispersive spectrometer) from contaminated water samples not only provides information about the grow phases, but also opens a possible identification of bacterial by its characteristic fingerprint. Two strains of E. coli (named as H2 / 11 and H3C2 / 12) were measured in liquid nutrient broth and four E. coli strains (named H2 / 11, H3C2 / 12, 109 and 110) in EC liquid broth, kept at 37.0 ° C over 24 hours. Aliquots of the samples were removed from the culture at regular time intervals for spectral measurements. The turbidity analysis allowed to measure the generation time, which was higher for strains grown in EC broth. Raman spectra provided information about the time evolution of the bands at 942 cm⁻¹, 977 cm⁻¹, 1036 cm⁻¹, 1086 cm⁻¹, 1140 cm⁻¹, 1188 cm⁻¹, 1182 cm⁻¹, 1207 cm⁻¹ e 1251 cm⁻¹, associated with fingerprints of biological components. Data were analyzed by Principal Component Analysis (PCA). These results of both techniques allowed identifying the phases lag, exponential and stationary of the studied strains.

Keywords: *E. coli. Raman spectroscopy. UV-Vis spectroscopy. Culture medium. Growth phases.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas de uma célula de E. coli.....	16
Figura 2: Representação esquemática da parede de uma bactéria E. coli.	17
Figura 3: Curva de crescimento bacteriano.....	22
Figura 4: Estimativa do Tempo de Geração bacteriano através de análise da curva de crescimento.	24
Figura 5: (A) Diagrama de níveis de energia mostrando os estados envolvidos no espalhamento Raman. (B) Espectro Raman representando o espalhamento Stokes e anti-Stokes	28
Figura 6: Modelo simples representando os modos de vibração de uma molécula orgânica ($O=CH_2$). Os sinais + e – indicam movimentos perpendiculares ao plano da página.	30
Figura 7: Cepas de E. coli em ágar estoque.	34
Figura 8: Tubos de ensaio contendo caldo nutriente.....	35
Figura 9: Equipamento de banho térmico.	35
Figura 10: Representação esquemática da montagem experimental para aquisição de espectros Raman.	37
Figura 11: Representação esquemática da montagem experimental para medidas de absorção e transmissão das amostras.....	38
Figura 12: Suavização dos espectros através da técnica Savitzky-Golay. A: Espectro antes da suavização; B: Espectro após a suavização e antes da remoção do sinal de fluorescência; C: Espectro após a remoção do sinal de fluorescência.....	39
Figura 13: PC1 e PC2 formando um novo plano no espaço multidimensional de dados. Os pontos representam observações, que recebem um escores por suas projeções nesse plano PC1xPC2.....	40
Figura 14: Espectro de Absorbância recolhido após 24 horas de crescimento da amostra.	41
Figura 15: Absorbância da luz em 600 nm para caldo nutriente semeado com cepas de E. coli (A): H2/11 e (B): H3C2/12. As linhas são apenas para melhor visualização.	42
Figura 16: Absorbância da luz em 600 nm para caldo EC semeado com cepas de E. coli (A): H2/11; (B): H3C2/12; (C): 109; (D): 110. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos.	42
Figura 17: Cálculo do tempo de geração para as amostras de E. coli, em meio de caldo nutriente, através do gráfico de Absorbância em escala logarítmica. (A) H2/11: 0,47 horas; (B) H3C2/12: 0,49horas.....	43
Figura 18: Cálculo do tempo de geração para as amostras de E. coli, em meio caldo EC, através do gráfico de Absorbância em escala logarítmica. (A) H2/11: 0,46 horas; (B) H3C2/12: 0,7 horas; (C)109: 0,7 horas; (D) 110: 1,2 horas.....	44
Figura 19: Espectros Raman do caldo de cultura nutriente e caldo de cultura EC sem semeadura de E. coli.....	45

Figura 20: Espectros Raman ao longo de 24 horas para cepas de E. coli crescidas em caldo nutriente. A) Amostra H2/11. B) Amostra H3C2/12. Os espectros estão deslocados em 'y' para facilitar a visualização.	47
Figura 21: Espectros Raman sobrepostos das amostras H2/11 e H3C2/12 crescidos em meio de cultura caldo nutriente. As setas indicam picos identificáveis.	48
Figura 22: Espectros Raman sobrepostos ao longo de 24 horas para cepas de E. coli: amostras H2/11 e H3C2/12 em caldo EC. As setas indicam picos identificáveis	49
Figura 23 Espectros Raman sobrepostos ao longo de 24 horas para cepas de E. coli: 109 e 110 em caldo EC. As setas indicam picos identificáveis.	50
Figura 25: Intensidades dos picos de interesse 1 e 2 em função do tempo, para as amostras H3C2/12 e H2/11 de E. coli semeada em meio Caldo Nutriente. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos.....	52
Figura 26: Intensidades dos picos de interesse de 3 a 8 em função do tempo, para as amostras H3C2/12 e H2/11 de E. coli semeada em meio Caldo Nutriente. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos	53
Figura 27: Intensidades do pico 9 em função do tempo, para as amostras H3C2/12 e H2/11 de E. coli semeada em meio Caldo Nutriente. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos.	54
Figura 28: Intensidades dos picos de interesse de 1 a 4 em função do tempo, para as amostras H3C2/12, H2/11, 109 e 110 de E. coli semeada em meio Caldo EC. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos.	54
Figura 29: Intensidades dos picos de interesse 5 a 9 em função do tempo, para as amostras H3C2/12, H2/11, 109 e 110 de E. coli semeada em meio Caldo EC. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos.	55
Figura 30: Espectros dos Componentes principais PC1 e PC2 para as amostras H3C2/12 e H2/11 de E. coli semeadas em Caldo Nutriente. Os espectros foram deslocados verticalmente para melhor visualização.	58
Figura 31: Espectros dos Componentes principais PC1 e PC2 para as amostras H3C2/12 e H2/11 de E. coli semeadas em Caldo EC. Os espectros foram deslocados verticalmente para melhor visualização.	59
Figura 32: Espectros dos Componentes principais PC1 e PC2 para as amostras 109 e 110 de E. coli semeadas em Caldo EC. Os espectros foram deslocados verticalmente para melhor visualização.	60
Figura 33: PC1 versus PC2 para as amostras H3C2/12 e H2/11 de E. coli semeadas em Caldo Nutriente.	61
Figura 34: PC1 versus PC2 para as amostras H3C2/12 e H2/11 de E. coli semeadas em Caldo EC.....	62
Figura 35: PC1 versus PC2 para as amostras 109 e 110 de E. coli semeadas em Caldo EC.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química da célula bacteriana	19
Tabela 2 – Picos Raman identificados nos espectros bacterianos e sua atribuição biológica, baseada na literatura. (Naumann <i>et al.</i> , 1982; Puppels <i>et al.</i> , 2000; Maquelin <i>et al.</i> , 2002; Paret.....	51
Tabela 3 – Porcentagem da variância obtida com a análise de componentes principais (PCA) para amostras crescida em caldo nutriente.	57
Tabela 4 - Porcentagem da variância obtida com a análise de componentes principais (PCA) para amostras crescida em caldo EC.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 MOTIVAÇÕES	13
1.2 OBJETIVOS GERAIS	14
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 ESCHERICHIA COLI	16
2.1.1 Estrutura celular	16
2.1.2 Metabolismo e Crescimento	18
2.2 ESPECTROSCOPIA	19
2.2.1 Espectroscopia de Absorção UV-VIS	20
2.2.1.1 Turbidimetria e cálculo do tempo de geração	21
2.2.2 Espectroscopia Raman	24
2.2.3 Vibrações moleculares	28
2.3 APLICAÇÕES DE ESPECTROSCOPIA RAMAN EM MICROBIOLOGIA	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 ORIGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS	34
3.1.1 Protocolo 1: duas amostras crescidas em caldo nutriente	34
3.1.2 Protocolo 2: quatro amostras em caldo EC.	36
3.2 AQUISIÇÃO DE DADOS	36
3.2.1 Espectroscopia Raman	36
3.2.2 Absorção e Transmissão	37
3.3 PRÉ-PROCESSAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS	41
4.1 RESULTADOS PARA A ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS: CURVA DE CRESCIMENTO	41
4.2 RESULTADOS PARA A ESPECTROSCOPIA RAMAN	45
4.3 RESULTADOS PARA A PCA	56
5 CONCLUSÕES	64
5.1 TRABALHOS FUTUROS	66
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÕES

Escherichia coli é o mais utilizado organismo de identificação fecal na água. Isso se deve ao fato de que sua presença proporciona deterioração da qualidade microbiológica, o que, por outro lado, acarreta riscos à saúde humana (BRASIL, 2005). Segundo a Organização Mundial de Saúde, diarreia é a sétima maior causa de mortes em seres humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

O tempo gasto na identificação de microrganismos responsáveis por infecções é determinante para o tratamento de pacientes hospitalizados (IBRAHIM *et al.*, 2000). Quanto mais rápida a identificação de um agente causador de infecção, maiores são as chances de o tratamento ser eficaz (KERREMANS *et al.*, 2008). Testes microbiológicos rotineiros para identificação de bactérias são baseados na observação quanto à morfologia e às reações bioquímicas com diferentes substratos. Em geral, tais testes são demorados e de alto custo, porque dependem de reagentes e corantes (ANVISA, 2004).

A espectroscopia ótica é um método de rápida execução e que permite a obtenção de resultados com pequenas quantidades da cultura do microrganismo (MAQUELIN *et al.*, 2003). Essa técnica se baseia na interação (absorção, emissão e espalhamento) da radiação eletromagnética com as estruturas atômicas e moleculares de compostos presentes na composição das células (proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos). A técnica pode fornecer informações que propiciam a identificação da espécie microbiológica.

Uma vez que inibidores do crescimento bacteriano devem ser capazes de alterar a curva de crescimento e diminuir a resistência do microrganismo, identificar a fase de crescimento em que este se encontra é importante para o desenvolvimento de novos tratamentos. Daí a necessidade de uma caracterização dos estágios de crescimento bacteriano. Criar impressões digitais das fases metabólicas da *E. coli*, através dos espectros é de grande importância para o desenvolvimento e teste de novos antibióticos capazes de inibir o desenvolvimento dessa bactéria em meio hídrico (ATHAMNEH *et al.*, 2014). As taxas de mortalidade mostraram uma diminuição

significativa em grupos de pacientes que receberam tratamento adequado e imediato (KOLLEF, 2000).

Com a absorção UV-VIS (turbidimetria), é possível acompanhar as fases do crescimento bacteriano à medida que ocorrem sem interferências químicas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Essa técnica fornece informações sobre detecção, identificação e enumeração de microrganismos e células (ALUPOAEI; GARCÍA-RUBIO, 2004).

A espectroscopia Raman, dentre as técnicas óticas, destaca-se por medir a energia vibracional das ligações químicas das moléculas e componentes celulares, permitindo obter informações sobre a estrutura molecular. O espalhamento Raman, por sua vez, é um fenômeno que se deve ao espalhamento inelástico de radiação monocromática que incide na molécula.

A análise dos espectros Raman é um método rápido de observação das mudanças metabólicas que acontecem no desenvolvimento de uma colônia de bactérias. Isso se deve ao fato de tratar-se de um método não invasivo que consegue detectar picos referentes a atividade da célula, diferente de outras técnicas óticas que podem incluir em seus resultados contagem de células mortas (HANLON *et al.*, 2000).

Sendo assim, a espectroscopia de absorção UV-Vis e Raman tornam-se ferramentas para identificação e discriminação de cepas clínicas de diferentes bactérias.

1.2 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar a eficiência de duas técnicas óticas (espectroscopia Raman e espectroscopia de absorção UV-VIS – turbidimetria) na determinação do crescimento bacteriano de quatro cepas de *Escherichia coli*, por 24 horas, inoculadas em meio líquido.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma metodologia de análise que atribua rapidez e precisão no controle microbiológico de *Escherichia coli* no ambiente hídrico;

- Avaliar espectros Raman da bactéria em diferentes estados metabólicos durante 24 horas;
- Utilizar a técnica de Espectroscopia de absorvância na região do UV-VIS como método de contagem indireta dos microrganismos;
- Implementar uma análise multivariada dos dados através da aplicação da Análise de Componentes Principais (PCA);
- Contribuir para o desenvolvimento de métodos óticos de determinação e monitoração das fases de crescimento da *E. coli* em água.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ESCHERICHIA COLI

A *Escherichia Coli* (ou *E. coli*) é uma bactéria patogênica que possui formato de bacilo do grupo de Gram-negativas e dimensão da ordem de 3 μm . Foi identificada em 1885, por um pediatra alemão, em um estudo sobre bactérias intestinais de crianças (ESCRERICH, 1885). Classificada como pertencente à família *Enterobacteriaceae*.

2.1.1 Estrutura celular

A célula bacteriana apresenta várias estruturas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A Figura 1 apresenta esquematicamente uma célula bacteriana típica com as principais estruturas externas e internas à membrana plasmática.

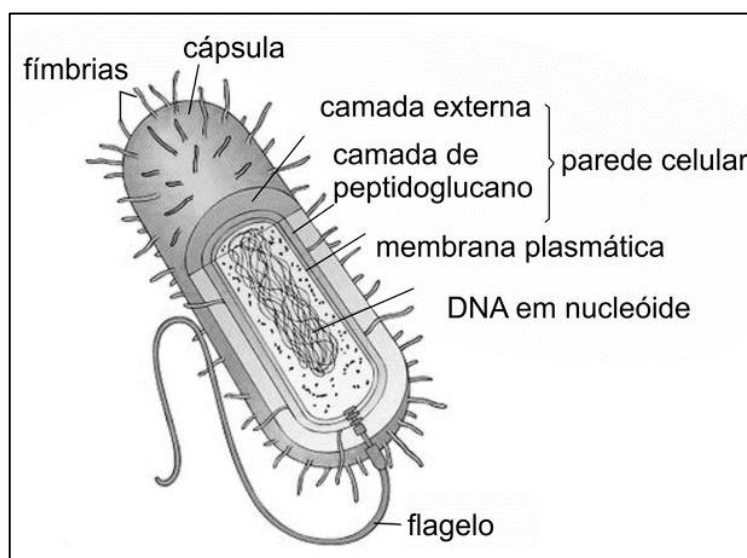


Figura 1: Estruturas de uma célula de *E. coli*.

A membrana citoplasmática, também chamada de membrana plasmática, é vital para a célula por formar uma barreira que separa o meio externo do interno (citoplasma). Dispõe de aproximadamente 8 nm de espessura (PELCZAR *et al.*, 2008).

A estrutura química da membrana das bactérias, como a maioria das membranas biológicas, é composta de cerca de 60% de proteínas imersas em uma bicamada fosfolipídica que corresponde aos 40% restantes. Ácidos graxos dos lipídios são responsáveis pela condição hidrofóbica.

Em bactérias Gram-negativas, a parede celular é composta por várias camadas que diferem na sua composição química. O conhecimento das diferenças entre os elementos e a estrutura da parede das bactérias é de alta relevância para o estudo dos mecanismos de ação de cada uma.

Como mostra a Figura 2, a parede da *E. coli* é formada por camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa. O espaço periplasmático separa a membrana citoplasmática da membrana externa. A membrana externa é formada por dupla camada lipídica, com interior hidrofóbico (KAYSER, 2005).

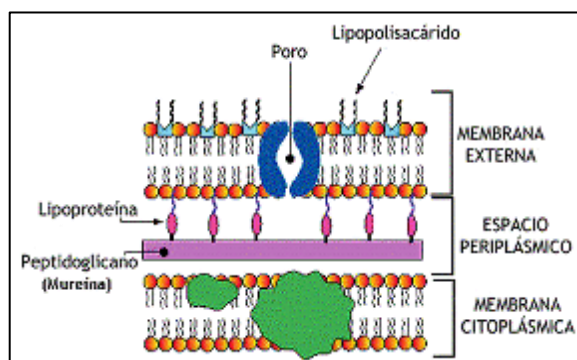


Figura 2: Representação esquemática da parede de uma bactéria *E. coli*.

A membrana externa, assim como a membrana citoplasmática, é um conjunto de proteínas imersas em matriz lipídica. As principais proteínas com funções conhecidas são as porinas (proteínas triméricas que formam poros para o transporte passivo de solutos). As proteínas da membrana externa são estruturalmente diferentes das porinas, mas também estão envolvidas na passagem de alguns solutos, além de funcionarem como receptores de fímbria sexual e de fagos e lipoproteínas (proteínas com função estrutural: fazem uma ponte entre a parte externa e interna).

Cápsula ou camada mucosa é uma camada que fica ligada à parede celular como um revestimento externo. É composta por proteínas ou glicoproteínas. Desempenha a função de reservatório de água e nutrientes, auxiliando no aumento da capacidade invasiva, do poder infectante, bem como da resistência microbiana a biocidas (PELCZAR *et al.*, 2008).

O flagelo confere movimento à célula e é formado por um gancho e um longo filamento externo à membrana. O filamento é composto de uma proteína chamada flagelina.

Fímbrias (ou pelos) são apêndices filamentosos que não desempenham papel relativo à mobilidade, mas atuam como estrutura de aderência aos tecidos que fornecem nutrientes às células.

Plasmídios são moléculas de DNA circulares presentes no citoplasma, menores que o cromossomo, que determinam fatores sexuais e resistência a antibióticos.

2.1.2 Metabolismo e Crescimento

A obtenção de energia se dá através de reações químicas nas quais substratos adequados são oxidados, daí ela ser chamada bactéria quimiotrófica. A água é indispensável para o crescimento da bactéria, não apenas porque regula a pressão osmótica, mas sobretudo porque a bactéria se nutre por meio da passagem de substâncias em solução através da membrana citoplasmática.

Em condições artificiais, o crescimento de bactérias é conseguido pela semeadura em meios de cultura. Para compor um meio adequado é preciso conhecer a fisiologia da bactéria. Não existe um meio de cultura universal, pois os tipos nutritivos das células são muito variados. Na Tabela 1 tem-se a composição química aproximada de uma bactéria *E. coli* com massa de $9,5 \times 10^{-13}$ g e conteúdo aquoso de $6,7 \times 10^{-13}$ g, que serve como referencial.

Tabela 1 – Composição química da célula bacteriana

Macromoléculas	Massa Seca (%)	Massa/Célula $\times 10^{-15}g$	Peso Molecular (g/mol)	Número de Moléculas/Célula
Proteína	55,0	155,0	$4,0 \times 10^4$	2.360.000
RNA (total)	20,5	59,0		
23rRNA		31,0	$1,0 \times 10^6$	18.700
16rRNA		16,0	5×10^5	18.700
5rRNA		1,0	$3,9 \times 10^4$	18.700
Transferência		8,6	$2,5 \times 10^4$	205.00
Mensajeiro		2,4	$1,0 \times 10^6$	1.308
DNA	3,1	9,0	$2,5 \times 10^9$	2.130
Lipídeo	9,1	26,0	705	22.000.000
Lipopolissacarídeo	3,4	10,0	4346	1.200.000
Mucocomplexo	2,5	7,0	(904)n	1
Glicogênio	2,5	7,0	$1,0 \times 10^6$	4.360
Total de macromoléculas	96,1	273,0		
Material em solução:	2,9	8,0		
subunidades		7,0		
Vitaminas metabólicas		1,0		
Íons inorgânicos	1,0	3,0		
Massa seca - total	100,0	284,0		

Fonte: TRABULSI; ALTERTHUM, 2008.

O desenvolvimento de uma cultura bacteriana é um somatório dos processos metabólicos que conduzem à reprodução, resultando em duas células-filhas iguais para cada espécime da colônia. Esse crescimento pode ser medido tanto por um aumento de quantidade de protoplasma, quanto pela contagem de organismos. A massa e número de componentes podem ser relacionados por comparação através de métodos diretos ou indiretos.

2.2 ESPECTROSCOPIA

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia dos átomos ou moléculas. Os espectros fornecem as transições (diferença de energia entre os níveis) através da radiação absorvida, refletida, emitida ou espalhada por uma substância. A partir dessas medidas, determinam-se as posições relativas dos níveis energéticos. No caso de moléculas, a região espectral onde essas transições

são observadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais (SOLEÉ *et al.*, 2005).

As diferentes regiões espectrais e o estado da matéria (sólido, líquido ou gasoso) que interage com essa radiação exigem espectrômetros com elementos dispersivos e detectores apropriados. Portanto, existe uma grande variedade de técnicas espectroscópicas as quais, por sua vez, exigem tecnologias específicas.

Neste trabalho, foram empregados dois tipos de espectroscopia: de absorção UV-VIS e Raman.

2.2.1 Espectroscopia de Absorção UV-VIS

A absorção de radiação eletromagnética na região do ultravioleta (100-400 nm), e visível (390-780 nm) por moléculas, átomos ou íons, ocorre quando um elétron da matéria absorvedora é promovido de um estado eletrônico de baixa energia a outro de energia mais elevada.

A quantidade de luz absorvida quando um feixe de radiação monocromática atravessa o meio absorvente depende da concentração, do coeficiente de absorção molar da espécie absorvente e do percurso ótico da radiação (SKOOG *et al.*, 2014). O estudo da sua variação com a concentração permite a determinação quantitativa de um grande número de substâncias químicas e biológicas, bem como o estudo cinético de reações lentas em solução e a determinação de curvas de titulação.

A intensidade de um feixe de ondas eletromagnéticas é atenuada ao atravessar um meio que contém uma espécie absorvente, devido a sucessivos processos de absorção, a reflexões nas paredes da célula e a fenômenos de espalhamento.

Considerando apenas os processos de absorção, a intensidade do feixe transmitido, I , relaciona-se com o feixe incidente, I_0 (paralelo e monocromático de comprimento de onda λ), pela lei de Beer (SOLEÉ *et al.*, 2005)

$$I = I_0 10^{-\varepsilon(\lambda)cb} \quad (1)$$

onde c (mol/L) é a concentração da espécie absorvente, ε (L/mol-cm) é o coeficiente de absorção molar e b (cm) é o percurso ótico da radiação do meio.

Experimentalmente, mede-se a razão entre as intensidades, chamada de transmitância, T .

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon(\lambda)cb} \quad (2)$$

Para um meio totalmente absorvente a transmitância é nula ($I = 0$), enquanto que para um meio completamente transparente a transmitância é unitária ($I = I_0$). Então, fazendo uso das equações (1) e (2) pode-se escrever a absorbância, A , como

$$A = -\log_{10} T = \varepsilon(\lambda)cb \quad (3)$$

A densidade ótica, DO , é definida como

$$DO = \log \frac{I_0}{I} \quad (4)$$

Através das equações (2), (3) e (4) observa-se que a DO relaciona-se com a T e A da seguinte forma

$$\begin{aligned} T &= 10^{-DO} \\ A &= 1 - 10^{-DO} \end{aligned} \quad (5)$$

2.2.1.1 Turbidimetria e cálculo do tempo de geração

A turbidimetria é um exemplo de método indireto de contagem de bactérias. Nela, as bactérias são transferidas para um meio de cultura líquido, causando a turvação do meio (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A quantidade de massa pode ser medida por variância da quantidade de luz absorvida, transmitida ou espalhada.

Quando certa quantidade de uma determinada bactéria é semeada em um meio líquido de composição adequada e incubada em temperatura apropriada, o seu crescimento segue uma curva definida e característica, como representado na Figura 3. Ela é dividida em quatro fases (WIDDEL, 2007):

- a) Fase de lag: praticamente não ocorre divisão celular, porém há aumento de massa. Em condições favoráveis ao desenvolvimento celular essa fase tende a ser menor ou não existir.

b) Fase exponencial: ocorre divisão celular numa velocidade máxima e constante. A expressão matemática de crescimento nessa fase é

$$N = N_0 2^n \quad (6)$$

onde, N_0 é o número de microrganismos inicial, N é o número após determinado tempo e n o número de gerações.

c) Fase estacionária: a velocidade de multiplicação diminui gradualmente, até que se anule. O número de bactérias presentes, por unidade de volume, permanece constante por um tempo determinado. Durante essa fase, o número de bactérias novas que se formam equivale com o número daquelas que estão morrendo.

d) Fase de declínio: os microrganismos gradualmente diminuem em número até que todos morram.

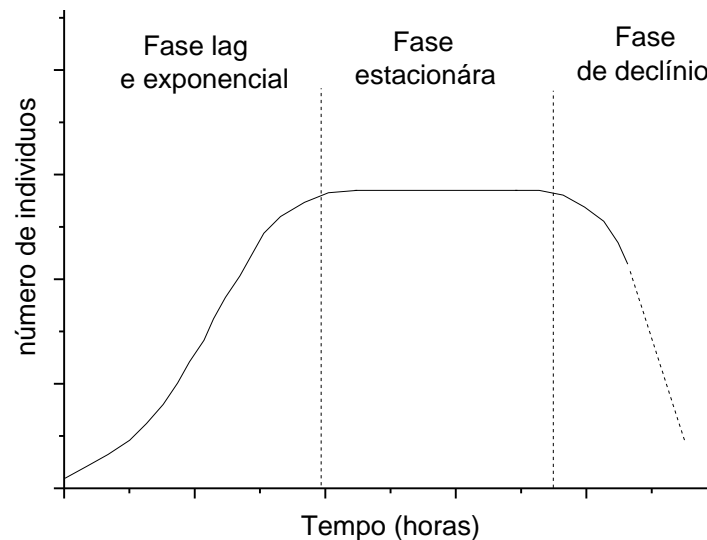


Figura 3: Curva de crescimento bacteriano.

A equação (6) normalmente é escrita na forma logarítmica, pois ocorrem inúmeras mudanças na população durante o crescimento exponencial. Desta forma, tomando o logaritmo de ambos os lados da equação (6)

$$\log N = \log N_0 + n \log 2 \quad (7)$$

A equação (7) é usada para descobrir o número de gerações (n) e o tempo de geração (t/n) que é característico para cada microorganismo em determinado meio de cultura.

Também pode-se obter uma velocidade em termos de número de gerações por unidade de tempo, fazendo-se a partir da equação (7), n/t . Assim,

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \quad (8)$$

O número de gerações por unidade de tempo, definida como velocidade exponencial de crescimento (R), é dado por:

$$R = \frac{n}{t - t_0} = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2 (t - t_0)} \quad (9)$$

Sendo assim, o inverso de R será o tempo de geração, G (BASSIRI, 2016):

$$G = \frac{1}{R} = \frac{t - t_0}{n} \quad (10)$$

A intensidade de dispersão da luz ou turbidez, medida através da densidade ótica (Equação 4), é proporcional a densidade celular: $N/V = a \cdot OD$, onde V é o volume da amostra e a uma constante de proporcionalidade. Observando as Equações 6 e 10 vemos que $DO = DO_0 2^{t/G}$. Assim, pode-se simplesmente monitorar a DO por medição ótica e plotá-la em relação ao tempo para obter uma curva de crescimento como da Figura 3.

O tempo de geração pode ser determinado de maneira indireta através de análise gráfica. A escala da densidade ótica deve ser transformada em uma escala logarítmica. Seleciona-se dois pontos da densidade ótica que representam uma duplicação da turbidez. Em seguida, traça-se linhas perpendiculares a partir dessas DO até a curva de crescimento e seus respectivos intervalos de tempo (Figura 4). Esse intervalo de tempo é o tempo de geração, G , da cultura bacteriana em questão.

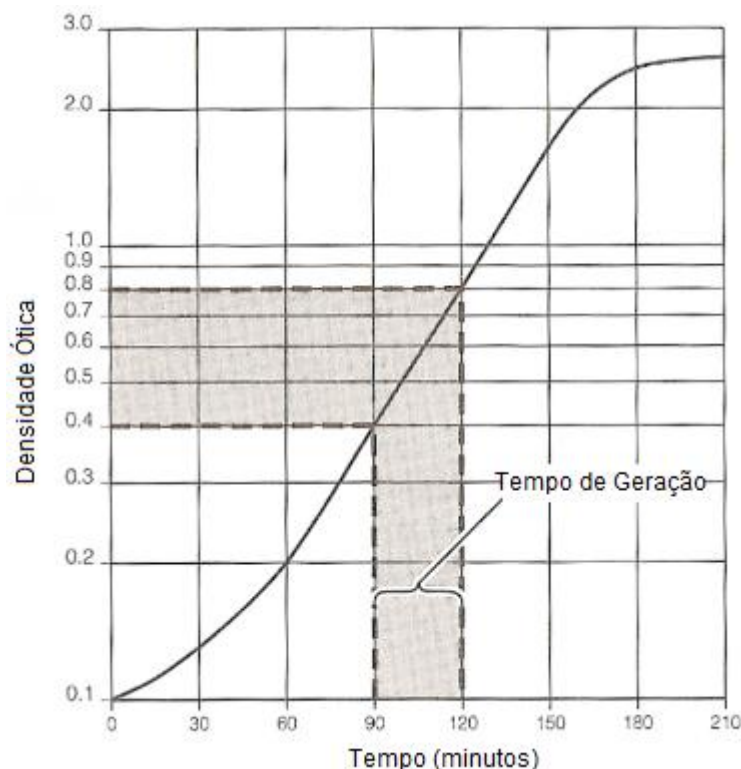


Figura 4: Estimativa do Tempo de Geração bacteriano através de análise da curva de crescimento.

O meio de cultura, dependendo da sua concentração e presença de nutrientes essenciais, contribui para a velocidade de crescimento. Em geral, o desenvolvimento bacteriano é mais eficiente em meios complexos.

2.2.2 Espectroscopia Raman

Espectroscopia Raman é uma técnica eficaz para determinação molecular na qual os materiais são analisados através da interação das moléculas do material com o raio de luz laser incidente (RAMAN; KRISHNAN, 1928). As aplicações da espectroscopia Raman são diversas, desde o estudo de minerais (TAYLOR *et al.*, 2010), até caracterização de polímeros (CHEN, 2004), passando pela sua aplicação na medicina (CHOO-SMITH *et al.*, 2010).

Apesar de ter sido utilizada por um longo tempo para caracterização de diferentes materiais, apenas recentemente a técnica foi aplicada ao estudo de amostras biológicas com a intenção de promover uma rápida identificação e discriminação patogênica dos organismos. Isso se deve ao desenvolvimento cada vez

mais sofisticado, eficaz, rápido e portátil da instrumentação da espectroscopia Raman e técnicas estatísticas usadas para analisar os dados.

Em 1923, Smekal descobriu teoricamente o espalhamento inelástico (SMEKAL, 1923) e em 1927 Raman e Krishnan reportaram a observação desse efeito (RAMAN; KRISHNAN, 1928) que foi chamado de “Espalhamento Raman” desde então. Como o efeito de espalhamento Raman é fraco, não foi muito difundido antes da invenção do laser em 1960. Nos anos 1980 a espectroscopia Raman foi usada com sucesso para a caracterização de materiais, depois da invenção de detectores e componentes óticos sensíveis (PELLETIER, 1999).

O efeito Raman é causado por espalhamento inelástico que ocorre quando a luz incidente (assumidamente radiação laser monocromática) de comprimento de onda λ_0 e frequência f_0 é espalhada por moléculas vibrantes da amostra. Em decorrência de um modo de vibração específico, o deslocamento em coordenadas cartesianas dessas moléculas sobre a sua posição de equilíbrio é dado por

$$\Delta q = q_0 \cos(2\pi f_m t) \quad (11)$$

onde f_m é a frequência de vibração do modo e q_0 é a amplitude de vibração. O campo elétrico do feixe laser oscila com o tempo (t) e é dado por

$$E = E_0 \cos(2\pi f_0 t) \quad (12)$$

onde, E_0 é a amplitude de oscilação do campo elétrico. Esse campo elétrico induz um dipolo elétrico em uma molécula de momento P , o qual é dado pela equação (13).

$$P = \alpha E \quad (13)$$

A constante de proporcionalidade α é chamada de polarizabilidade molecular. Trata-se de uma propriedade do material e depende da estrutura e da ligação natural. A constante α pode ser expandida em torno das coordenadas normais de vibração da molécula para pequenas amplitudes de vibração, como é apresentado na equação seguinte:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 \Delta q + \dots \quad (14)$$

onde α_0 é a polarizabilidade do modo molecular em posição de equilíbrio. Baseado nas equações (11), (12) e (14), a equação (13) torna-se:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi f_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 [\cos(2\pi\{f_0 + f_m\}t) + \cos(2\pi\{f_0 - f_m\}t)] \quad (15)$$

Essa equação representa um dipolo oscilando que irradia fótons em três diferentes frequências, que são: f_0 , espalhamento elástico, no primeiro termo, $(f_0 + f_m)$, espalhamento inelástico com comprimento de onda menor que o da radiação incidente, no segundo termo e $(f_0 - f_m)$, espalhamento inelástico com comprimento de onda maior que o da radiação incidente, no terceiro termo. Como se pode observar na equação (15), o efeito Raman é associado com o espalhamento inelástico que ocorre apenas quando $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 \neq 0$, o que significa que a polarizabilidade deve mudar com o deslocamento de vibração para conseguir o que é chamado de “modo Raman ativo”.

A intensidade (I) da banda do Raman ativo é proporcional ao quadrado da taxa de variação da polarizabilidade em relação à taxa de variação do deslocamento $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0^2$.

O valor teórico da intensidade do espalhamento Raman está vinculado à composição molecular da amostra, dos modos vibracionais específicos das moléculas, da fonte de excitação (normalmente um laser) e do comprimento de onda laser, pois a intensidade é proporcional à quarta potência da frequência laser (PELLETIER, 1999).

A variação da frequência entre a luz incidente e a luz espalhada (Δf) é chamada de deslocamento Raman, e a magnitude dessa variação é determinada pelos vários modos vibracionais das moléculas da amostra. O deslocamento Raman é tipicamente medido em unidades de cm^{-1} . A equação (16) dá o valor do deslocamento Raman em termos do comprimento de onda dos fótons incidentes e espalhados.

$$\Delta f(cm^{-1}) = \left(\frac{1}{\lambda_{incidente}(nm)} - \frac{1}{\lambda_{espalhado}(nm)} \right) \times 10^{-7} \quad (16)$$

A maioria dos fótons incidentes será espalhada elasticamente, sem variação na frequência (espalhamento Rayleigh), enquanto uma pequena porção da luz ($\sim 10^{-8}$ do feixe incidente) será espalhada inelasticamente (espalhamento Raman).

Se o fóton espalhado tem mais energia que o fóton incidente, a diferença de energia destruirá o fóton que muda o estado vibracional da molécula e como resultado serão observadas as linhas anti-Stokes. As linhas anti-Stokes, possuem mais energia que a luz incidente, resultando em um comprimento de onda menor para o fóton espalhado (ou deslocado para o azul). As linhas Stokes ocorrem quando os fótons espalhados têm menos energia que os fótons incidentes e a diferença de energia cria um fóton. As linhas Stokes terão um comprimento de onda maior (ou deslocado para o vermelho) do que a luz incidente (FERRARO *et al.*, 2003). Em geral, elas são consideravelmente mais intensas que as linhas anti-Stokes, uma vez que os estados vibracionais mais baixos possuem maior probabilidade de ocupação.

A Figura 5 (A) mostra um modelo simples do mecanismo de espalhamento da luz no qual o fóton incidente coloca o sistema molecular em um estado virtual de energia, que geralmente não é igual a qualquer estado de energia eletrônico (linhas tracejadas localizadas entre o estado eletrônico fundamental E_0 e o primeiro estado excitado E_1), tendo um tempo de vida curto – a cerca de 10^{-14} segundos. Um espectro Raman característico, mostrando o número de fótons espalhados (intensidade) em função do deslocamento Raman, é apresentado na Figura 5 (B) – nesse caso, a intensidade do espalhamento Rayleigh é diminuída para mostrar as linhas Stokes e anti-Stokes.

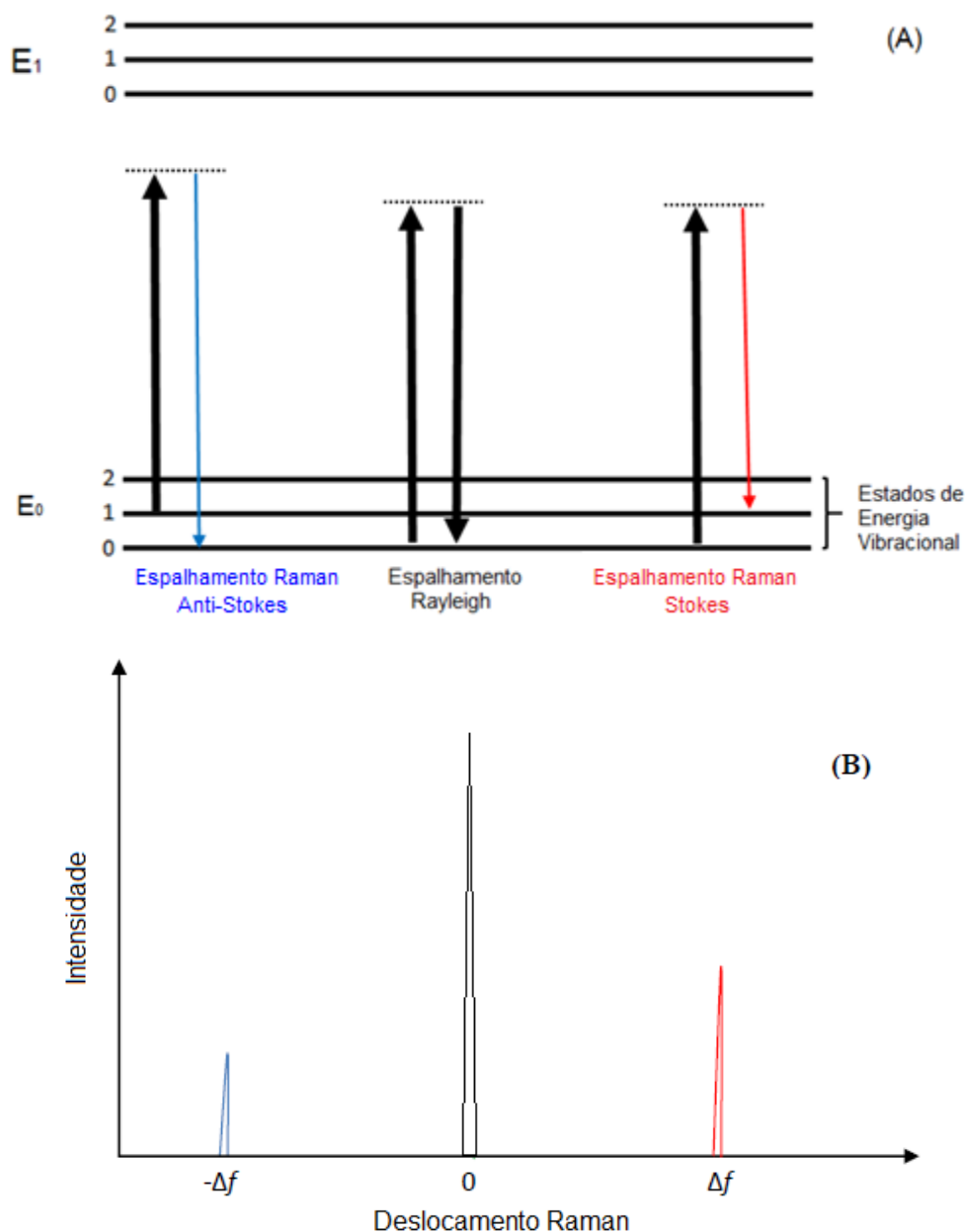


Figura 5: (A) Diagrama de níveis de energia mostrando os estados envolvidos no espalhamento Raman. (B) Espectro Raman representando o espalhamento Stokes e anti-Stokes

2.2.3 Vibrações moleculares

Moléculas consistem em átomos unidos por ligações químicas. Os átomos possuem um movimento periódico, mesmo que a molécula não sofra movimento rotacional ou translacional. O movimento periódico é chamado de vibração molecular e sua frequência é chamada de frequência de vibração ou frequência vibracional. Em geral, para cada molécula com N átomos há $3N$ graus de liberdade para o movimento

translacional, rotacional e vibracional. Três desses graus de liberdade são devidos à translação molecular nas direções x, y e z e três para a rotação molecular ao redor desses eixos. No caso de uma molécula linear, existem apenas dois movimentos rotacionais. Os demais graus de liberdade correspondem a modos normais de vibração independentes. Ou seja, uma molécula linear possui $3N-5$ modos normais e uma molécula não linear possui $3N-6$ modos normais (LANDAU; LIFSHITZ, 1976).

A frequência de um modo normal específico depende da força da ligação e da massa dos átomos envolvidos. A frequência própria de cada modo vibracional Raman ativo é medida experimentalmente utilizando espectroscopia Raman em unidade de número de onda (cm^{-1}) (HARRIS; BERTOLUCCI, 1978). Os modos de vibração representam complexas mudanças de posição dos átomos em relação uns aos outros, entre as quais pode-se mencionar:

(1) Modos de estiramento: Nesse modo, o comprimento de ligação entre dois átomos vai mudar de forma simétrica ou assimétrica. Ele tem uma energia maior do que os outros modos, porque é mais difícil comprimir ou esticar o vínculo do que dobrá-lo.

(2) Modo de deformação: Nesse caso, o ângulo entre as duas ligações mudará periodicamente enquanto o comprimento de ligação fica inalterado, ocorrendo no plano e fora do plano de deformação. No plano, a deformação pode ser do tipo "tesoura" – na qual os átomos se movem em sentidos opostos, o que leva a uma mudança no ângulo entre eles – e "balanço" – em que os átomos se movem na mesma direção de maneira que o ângulo entre eles e o restante da molécula vai mudar. A flexão para fora do plano inclui "rotação", que representa a variação do ângulo entre o plano de certo grupo de átomos e um plano através do resto da molécula, e "torção", que representa a variação do ângulo entre os planos de dois grupos de átomos.

Essas vibrações podem ser difíceis de visualizar, razão pela qual são mostradas aqui com determinada molécula. Por exemplo, a molécula orgânica simples ($\text{O}=\text{CH}_2$) tem seis modos normais de vibração ilustrados na Figura 6.

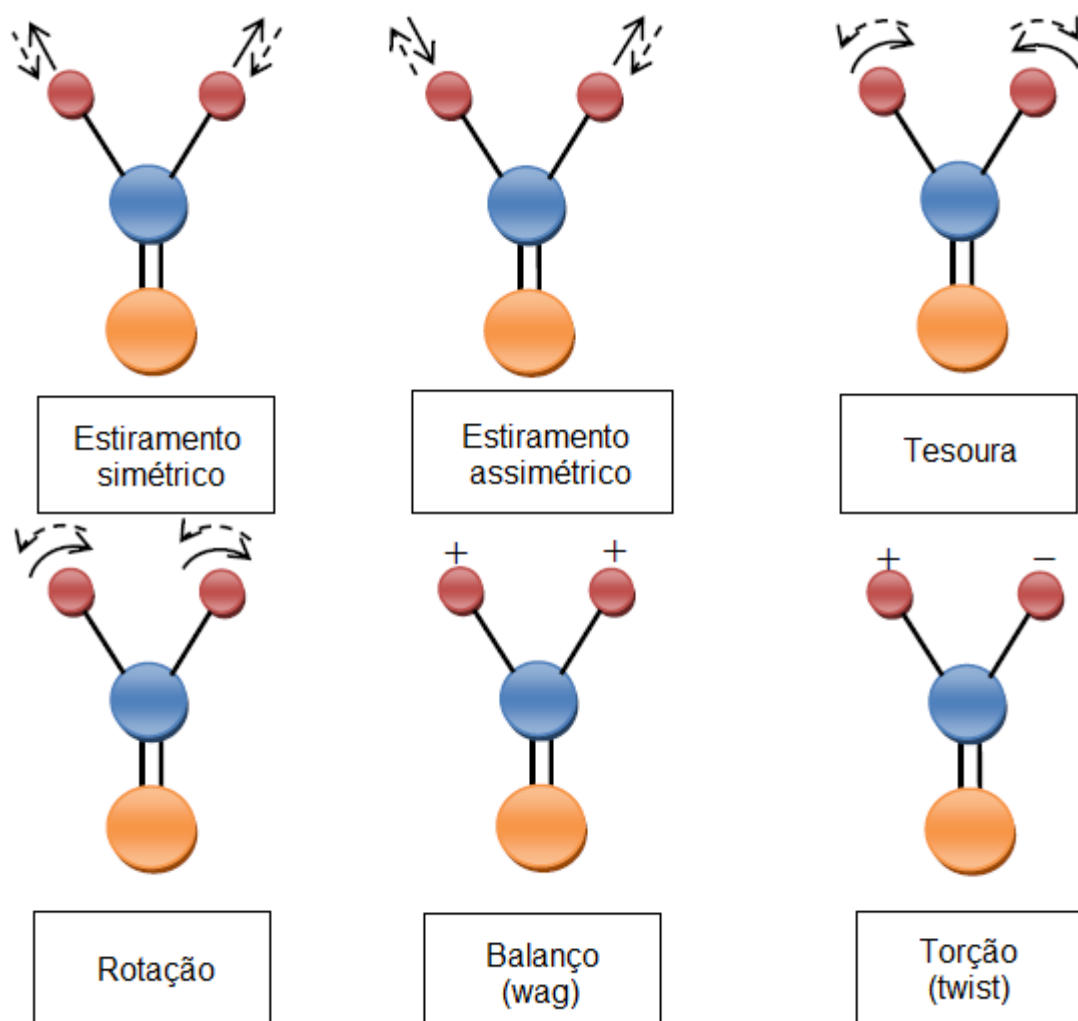


Figura 6: Modelo simples representando os modos de vibração de uma molécula orgânica ($\text{O}=\text{CH}_2$). Os sinais + e - indicam movimentos perpendiculares ao plano da página.

Devido à estrutura molecular complexa de amostras biológicas, os seus espectros de Raman são compostos por bandas largas sobrepostas que representam diferentes modos de vibração de um grande número de moléculas diferentes. Isso faz com que a identificação de modos vibracionais específicos não seja simples.

Uma das vantagens da espectroscopia Raman em relação a demais técnicas óticas é não ser invasiva e fornecer informações sobre o material estudado em tempo real. No caso de células de bactérias essas características são ainda mais relevantes, porque podemos acompanhar o desenvolvimento dos componentes celulares, através da identificação de picos, garantindo que os resultados espectrais são devidos a atividade de células vivas (ZU *et al.*, 2014).

2.3 APLICAÇÕES DE ESPECTROSCOPIA RAMAN EM MICROBIOLOGIA

Por ser uma técnica não invasiva, dispensar o uso de reagentes e indicadores químicos - e na medida em que seus resultados podem ser obtidos em tempo real (HUANG *et al.*, 2004) -, a espectroscopia Raman é amplamente empregada na caracterização microbiológica.

Em um estudo clínico feito para identificar patógenos causadores de infecções na corrente sanguínea de pacientes hospitalizados, Maquelin *et al.* (2003) analisaram 135 amostras de sangue, das quais 129 apresentaram contaminação por bactérias. Essas amostras, devidamente preparadas e cultivadas em Ágar Mueller Hinton, resultaram em microcolônias cultivadas por um período de 6 a 8 h, que foram avaliadas por espectroscopia Raman (laser em 830 nm) diretamente da colônia no Ágar. A identificação dessas cepas resultou em 92,2% de acerto, o que sinaliza a possibilidade do uso da espectroscopia Raman como ferramenta para uma rápida identificação microbiana.

Em outro estudo, realizado por Choo-Smith *et al.* (2001) com cinco cepas microbianas (*Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *Staphylococcus aureus* CIP 53.154, *Escherichia coli* CIP 53.126, *Escherichia coli* CIP 54.8T e *Candida albicans* ATCC 90028), os pesquisadores registraram o espectro das microcolônias diretamente do meio de cultura depois de 6 h, 12 h e 24 h de incubação e estabeleceram uma base de dados. Ainda no referido trabalho, usando a microespectroscopia Raman (laser em 830 nm), os autores conseguiram identificar e separar os microrganismos de espécies e gêneros diferentes. Esses resultados também demonstram que as técnicas espectroscópicas vibracionais podem ser ferramentas úteis para estudar a natureza do desenvolvimento de colônias.

Puppels *et al.* (2000) realizaram um estudo avaliando a influência que o meio de cultura poderia ter sobre o espectro Raman obtido, bem como diferenças espectrais em função da profundidade de penetração do laser (830 nm) na colônia. Foram utilizadas colônias de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecium* crescidas em meio de Mueller Hinton após 6 h de incubação. Embora tenha utilizado apenas um tipo de meio, observou-se a influência deste nos espectros obtidos, assim como os picos referentes à água entre 1550-1700 cm^{-1} . Na avaliação quanto à região da colônia em que era realizada a incidência da luz e coleta dos espectros (superfície ou em profundidade),

foram verificadas diferenças nos espectros, provavelmente devidas aos diferentes níveis de moléculas de RNA em regiões de bordas comparativamente ao centro. Além disso, os espectros diferentes mostraram picos de timina (749 cm^{-1}) e fenilalanina (1004 cm^{-1}), indicando a presença de outras substâncias biológicas (PUPPELS *et al.*, 2000).

Huang *et al.* (2004) analisaram com microscópio Raman (laser em 532 nm) os espectros de uma única célula de espécies microbiológicas (*Acinetobacter* ADP1, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli* DH5R, *Pseudomonas putida* NCIMB 11764 e *Citrobacter*). Essas medidas foram utilizadas para discriminação das espécies e diferenciação das fases de crescimento. Esse trabalho sugere que a espectroscopia Raman tem um potencial significativo para estudos que requerem a identidade ótica dos agentes biológicos responsáveis pelo funcionamento das células microbianas.

Hamasha *et al.* (2013) com a técnica da Espectroscopia Raman obtiveram a discriminação de cepas patogênicas (*E. coli* O157:H7) e não patogênicas (*E. coli* C, *E. coli* Hfr K-12, e *E. coli* HF4714).

Athamneh *et al.* (2014) realizaram um estudo em que foram testados os efeitos de novos fármacos na inibição de DNA e RNA de células de *E. coli*, após 16 horas de crescimento da cultura, demonstrando o poder da espectroscopia Raman (laser em 532nm) como metodologia de perfil celular. Os autores ressaltaram que o uso da espectroscopia Raman é vantajoso por ser uma técnica não invasiva e seus resultados são obtidos em tempo real.

Com o mesmo objetivo, de associar a bactéria ao uso de fármacos, Moritz *et al.* (2010) acompanharam os espectros dos estados metabólicos de *E. coli* (ATCC 25922). A amostra foi semeada em ágar sangue por 12 horas antes das medidas, retirando-se uma parte para medidas de absorbância ($\lambda = 600\text{ nm}$) a cada 1-2 horas com o objetivo de determinar uma curva de crescimento em função do tempo. Com espectroscopia Raman de pinça laser (LTRS) em 785 nm pode-se obter as “impressões digitais” dos diferentes estados metabólicos da bactéria e as mudanças espectrais quando as células estão em tratamento com o antibiótico estudado. Através do emprego da PCA os espectros foram divididos em três grupos de acordo com seu estágio metabólico

Walter *et al.* (2011), mostraram que espectroscopia Raman (excitação 224 nm e 532 nm), pode diferenciar cepas de *E. coli* de acordo com um plasmídeo contendo

um gene resistente a ampicilina. Os autores concluíram que os espectros resultantes sugerem maior teor de lipídeos e RNA e baixo citocromo em cepas que continham o plasmídeo. A espectroscopia Raman monitorou o estado metabólico das amostras com e sem presença de medicamento. As cepas foram discriminadas com o emprego da análise estatística LDA (*Linear Discriminant Analysis*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ORIGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras denominadas H2/11, H3C2/12, 109 e 110 foram coletadas de água não tratada destinada a irrigação rural na região norte do estado do Paraná, Brasil. No Laboratório de Bacteriologia da Universidade Estadual de Londrina, as bactérias foram identificadas, isoladas, armazenadas em ágar estoque (como visto na Figura 7) e mantidas na temperatura de 4 °C.



Figura 7: Cepas de *E. coli* em ágar estoque.

Para as medidas espectroscópicas, as amostras foram replicadas seguindo dois protocolos, descritos a seguir, com meios de cultura diferentes: caldo nutriente e caldo EC. Optou-se por fazer o crescimento das cepas em meio de cultura líquido, porque o estado físico da amostra influencia o resultado dos espectros (PUPPELS *et al*, 2000) e essas cepas habitam comumente ambientes hídricos.

3.1.1 Protocolo 1: duas amostras crescidas em caldo nutriente.

Para replicar as amostras H2/11 e H3C2/12 foi preparado um caldo líquido nutriente no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná. Para tal preparo, fez-se uso de extrato de carne (1 g/L), peptona (5 g/L), cloreto de sódio (5 g/L) e extrato de levedura (2 g/L).

O caldo nutriente foi dosado em 10 mL e depositado em tubo de ensaio, passando em seguida por processo de esterilização. A Figura 8 mostra os tubos de ensaio contendo o caldo nutriente esterilizado.



Figura 8: Tubos de ensaio contendo caldo nutriente.

As colônias foram semeadas no caldo nutriente com auxílio de uma alça descartável. A seguir, foram colocadas em aparelho de banho térmico (*Lauda – Ecoline Staredition E200*, resolução de $0,1^{\circ}\text{C}$) durante 24 horas (Figura 9), com a finalidade de manter a temperatura constante a $(37,00 \pm 0,05)^{\circ}\text{C}$.



Figura 9: Equipamento de banho térmico.

Para as aferições óticas, cerca de 4 mL da mistura foram transferidos do tubo de ensaio para uma cubeta de quartzo a cada 1,5 h. As amostras sob análise foram acomodadas em um suporte de cubetas (CUV-ALL-UV, *Ocean Optics*). Após o

processamento de medidas de espectroscopia Raman e de absorção, o conteúdo da cubeta de quartzo foi devolvido ao tubo de ensaio no banho térmico.

3.1.2 Protocolo 2: quatro amostras em caldo EC.

Para a replicação das amostras H2/11, H3C2/12, 109 e 110, depositaram-se 10 mL em tubo de ensaio de caldo líquido EC (K25-610063, KASVI) composto de: Triptose (20,0 g/L), Lactose (5,0 g/L), Cloreto de Sódio (5,0 g/L), Fosfato Dipotássio (4,0 g/L), Fosfato Diidrogênio de Potássio (1,5 g/L) e Sais Biliares n°3 (1,5 g/L). Após a esterilização em autoclave, as microcolônias foram semeadas com auxílio de uma alça descartável.

Após alguns testes, percebeu-se que todas as cepas exigiam um tempo longo para adaptar-se ao meio. Por essa razão, os tubos de ensaio permaneceram 12 horas em aparelho de banho térmico (Figura 9) a $37,00 \pm 0,05$ °C, antes da primeira medição.

Para as aferições óticas, cerca de 4 mL da mistura foram transferidos do tubo de ensaio para uma cubeta de quartzo nos tempos: 12h, 14h, 15h, 16h, 17h, 20h, 21h, 22h, 23h e 24h. As amostras sob análise foram acomodadas em um suporte de cubetas (CUV-ALL-UV, *Ocean Optics*). Após o processamento de medidas de espectroscopia Raman e de absorção, o conteúdo da cubeta de quartzo foi devolvido ao tubo de ensaio no banho térmico.

3.2 AQUISIÇÃO DE DADOS

3.2.1 Espectroscopia Raman

Um espectrômetro ótico (iHR550, HORIBA Jobin Yvon) com um detector CCD (do inglês, *charge-coupled device*) (Synapse, 1024 x 256 elementos, Horiba Jobin Yvon), resfriado termoeletricamente a -70 °C, foi usado para coletar as informações de desvio relativo Raman das bactérias excitadas, conforme apresentado na Figura 10. O espectrômetro é equipado com uma grade de difração de 1200 linhas/mm. O tempo de exposição para obtenção dos espectros foi de 40 s com 10 acumulações por espectro.

A amostra foi excitada por um laser de diodo em $785,0 \pm 0,6$ nm com potência de 100 mW. A conexão ótica entre o suporte de cubetas e o espectrômetro foi feita com uma fibra ótica (M37L02, 550 μ m de diâmetro, Thorlabs). A fenda do espectrômetro foi ajustada em 200 μ m, levando a uma resolução de $3,5$ cm^{-1} .

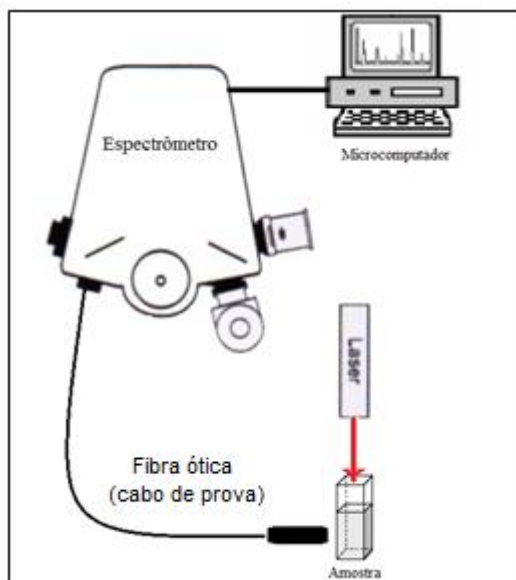


Figura 10: Representação esquemática da montagem experimental para aquisição de espectros Raman.

A aquisição e a acumulação de espectros foram feitas por um microcomputador com o software de dados foi centrada a 1100 cm^{-1} , que corresponde a faixa de $885,33$ cm^{-1} até $1302,13$ cm^{-1} .

3.2.2 Absorção e Transmissão

A presença de *Escheria Coli* leva à turvação do caldo nutriente, por isso pode-se detectar a concentração de bactérias por medidas de turbidimetria. Para isso, os espectros de absorção e transmissão foram medidos com um espectrômetro à fibra ótica UV-VIS (HR4000, 200-1100 nm, *Ocean Optics*, rede de difração holográfica composta HC-1), operando com resolução de 7 nm no comprimento de onda de 550 nm, e utilizando como fonte de luz uma lâmpada de tungstênio halógena (LS-1 *Ocean Optics*). A conexão ótica entre a fonte de luz e o suporte de cubetas foi feita com uma fibra ótica da *Ocean Optics* (P200-2-UV-VIS, 200 μ m de diâmetro). O sinal da amostra foi guiado, por uma fibra ótica de 200 μ m (M25L02, Thorlabs), do suporte de cubetas

até o espectrômetro. Os dados foram processados pelo software *Spectra Suite* (Ocean Optics)

A Figura 11 apresenta um esquema da montagem experimental.

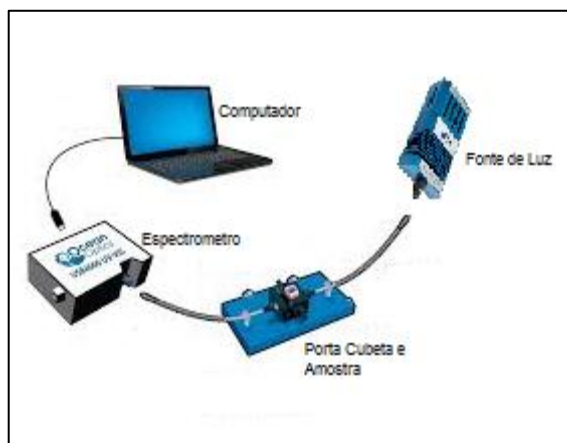


Figura 11: Representação esquemática da montagem experimental para medidas de absorção e transmissão das amostras.

3.3 PRÉ-PROCESSAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a coleta e processamento de dados, os espectros foram sujeitos a uma suavização através da técnica Savitzky-Golay para amenizar os sinais de ruído. Esse método consiste em executar regressão polinomial entre 20 pontos vizinhos, cujos valores são substituídos. As larguras e alturas de picos são preservadas. Na Figura 12 (A e B), apresenta-se um exemplo de espectro antes e depois da suavização. Com o sinal suavizado, a fluorescência de fundo (linha de base) foi retirada para melhor avaliação das intensidades de sinais, como exemplificado na Figura 12C.

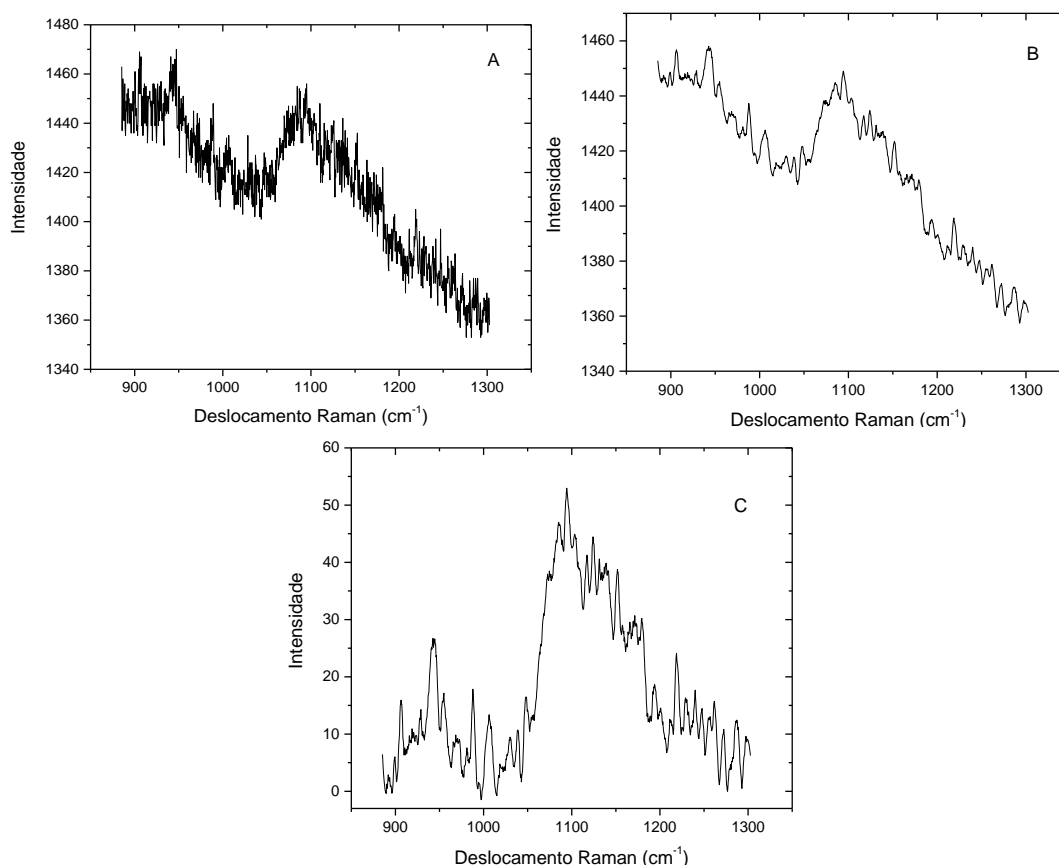


Figura 12: Suavização dos espectros através da técnica Savitzky-Golay. A: Espectro antes da suavização; B: Espectro após a suavização e antes da remoção do sinal de fluorescência; C: Espectro após a remoção do sinal de fluorescência.

A fim de verificar a possibilidade de identificar as diferenças espectrais das cepas clínicas e propor uma metodologia para agrupamento seu agrupamento de acordo com características espectrais semelhantes, os espectros foram submetidos à Análise dos Componentes Principais (PCA - *Principal Components Analysis*) (PEARSON, 1901). A PCA é uma ferramenta estatística que ajuda a identificar a relação entre as características extraídas dos dados coletados, podendo ser utilizada quando se pretende analisar dados de natureza multivariada.

Para essa ferramenta, os dados precisam estar dispostos em uma matriz X com N linhas (observações) e K colunas (variáveis). Através da transformação linear dos dados de X para um novo sistema de coordenadas, a maior variância de todas as projeções será posicionada como a primeira coordenada (PC1), a segunda maior variância (ortogonal à primeira) será a segunda coordenada (PC2) e assim por diante. Cada componente possui um peso, o escore (ES), que corresponde à intensidade que cada componente principal possui no dado original. Dessa forma, o método PCA

agrupa as variáveis que estão altamente correlacionadas nas primeiras coordenadas (Figura 13).

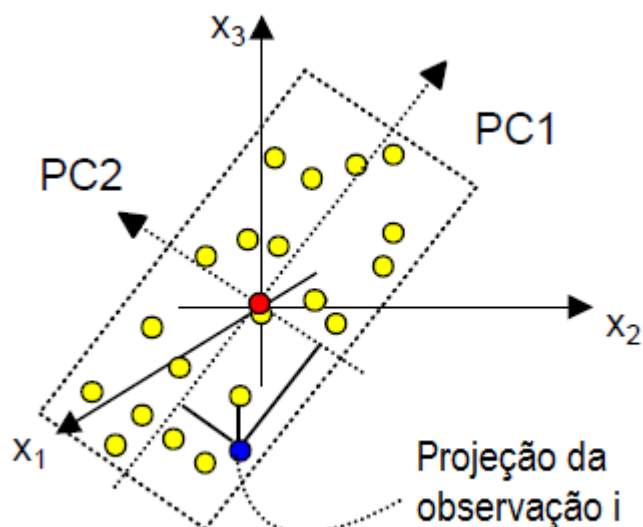


Figura 13: PC1 e PC2 formando um novo plano no espaço multidimensional de dados. Os pontos representam observações, que recebem um escore por suas projeções nesse plano PC1xPC2.

Pode-se escrever que:

$$A = ES \times PC \quad (15)$$

onde A é a matriz m por n dos espectros Raman obtidos (m = intensidade do espalhamento para cada desvio Raman medido no espectro, n = tempo em que cada espectro foi coletado), ES é a matriz n por n dos escores de reconstrução dos espectros originais e PC é a matriz n por m dos componentes principais do conjunto de dados A . Desde que ES é o "peso" de cada componente principal na formação do espectro original, este parâmetro apresenta informação sobre tendências e características da estrutura dos dados, como agrupamentos, podendo ser utilizado para a classificação.

A PCA foi calculada através do software OriginPro 2015 (OriginLab) utilizando todos os espectros das diferentes cepas. As variáveis PC1 e PC2 foram plotadas uma em relação a outra e, para o agrupamento dos dados em cada uma das medidas utilizou-se os valores de ES .

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS PARA A ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS: CURVA DE CRESCIMENTO

Para a obtenção da curva de crescimento bacteriano, foram realizadas medidas de absorbância na faixa de 300 nm até 1050 nm. Durante 24 horas, os espectros foram coletados em concordância com as medidas Raman. Na Figura 14 observa-se um espectro de absorbância.

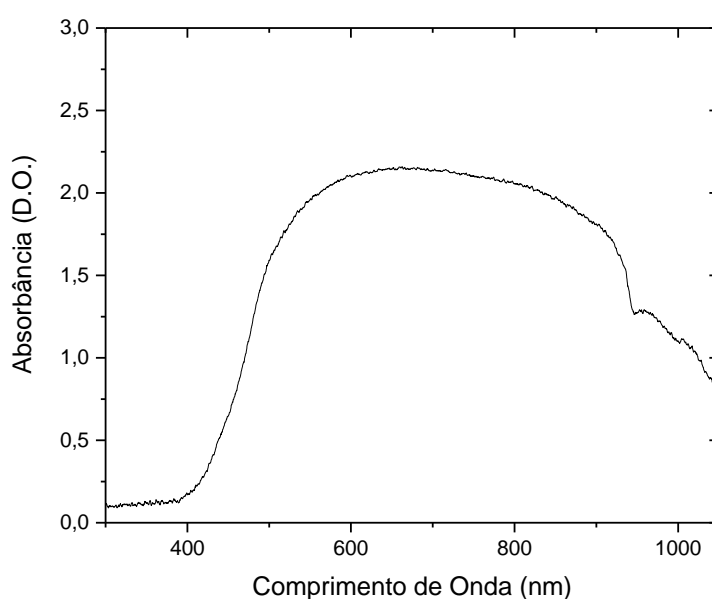


Figura 14: Espectro de Absorbância recolhido após 24 horas de crescimento da amostra.

As curvas de crescimento em meio caldo nutriente e em caldo EC estão representadas nos gráficos das Figuras 15 e 16, respectivamente. Para compor a curva e melhor analisar a evolução das amostras em relação ao tempo, foi escolhido, por relevância, o valor da absorbância para o comprimento de onda de 600 nm. Observa-se que o tempo limite para as fases lag, exponencial e estacionária não coincidem nas diferentes amostras.

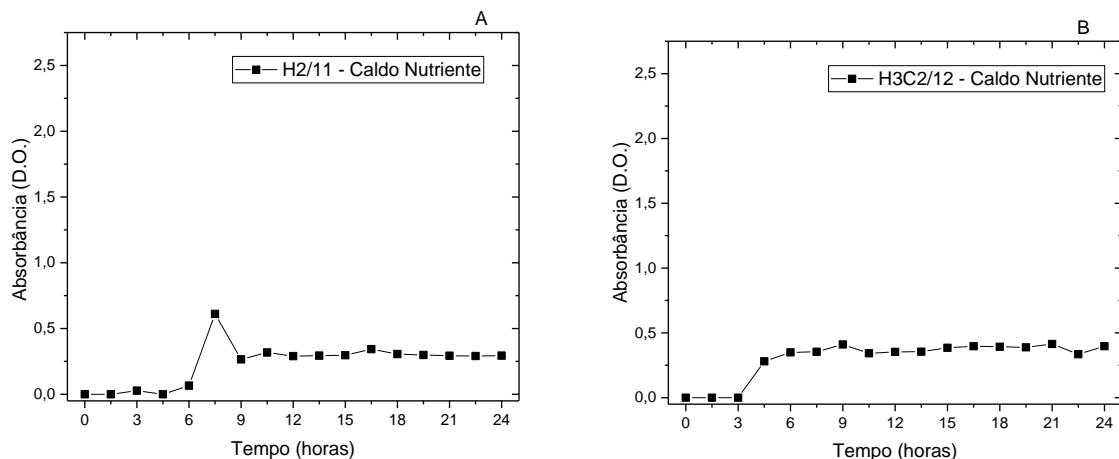


Figura 15: Absorbância da luz em 600 nm para caldo nutriente semeado com cepas de *E. coli* (A): H2/11 e (B): H3C2/12. As linhas são apenas para melhor visualização.

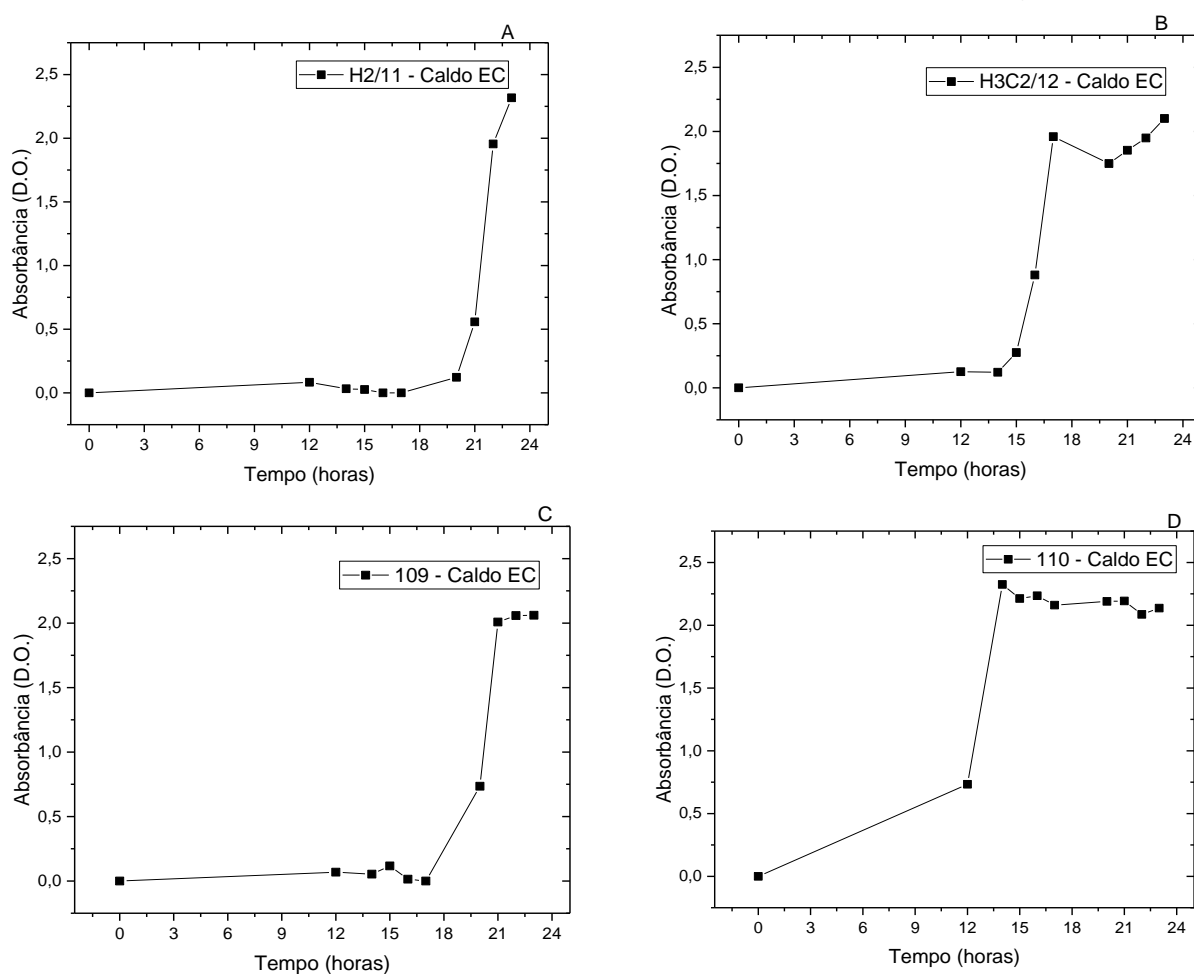


Figura 16: Absorbância da luz em 600 nm para caldo EC semeado com cepas de *E. coli* (A): H2/11; (B): H3C2/12; (C): 109; (D): 110. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos.

A partir da observação dos resultados nas Figuras 15 e 16, pode-se afirmar a presença e o desenvolvimento das colônias de bactérias nos meios de cultura. Também, pode-se dizer que o crescimento durante as 24 horas de todas as amostras imersas em caldo nutriente permaneceram por uma quantidade de tempo menor na

fase lag (de adaptação) em comparação com as amostras imersas em caldo EC. Em contrapartida, as amostras em caldo EC obtiveram valores de absorvância mais elevados, nota-se que a turbidez máxima para as amostras crescidas em caldo nutriente foi $DO \approx 0,5$, enquanto que para as amostras crescidas em caldo EC foi de $DO \approx 2,5$. Esses resultados estão de acordo com o esperado (LINDQVIST, 2006).

Através da fase exponencial na curva de crescimento, calculou-se o tempo de geração, isto é, o tempo exigido para a população dobrar em número. Os resultados para cada amostra estão representados na Figura 17 (meio caldo nutriente) e na Figura 18 (meio caldo EC).

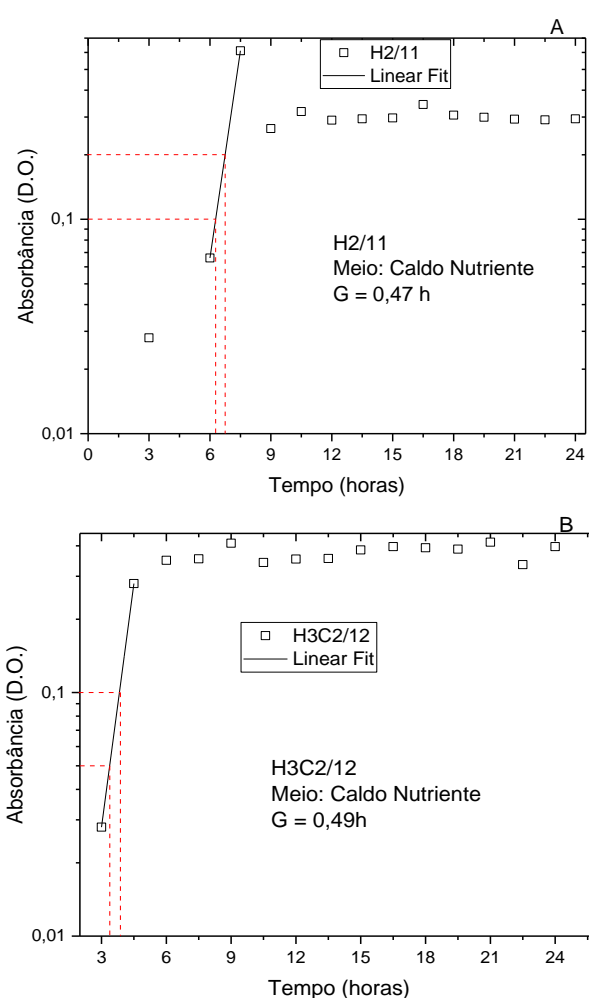


Figura 17: Cálculo do tempo de geração para as amostras de *E. coli*, em meio de caldo nutriente, através do gráfico de Absorbância em escala logarítmica. (A) H2/11: 0,47 horas; (B) H3C2/12: 0,49horas.

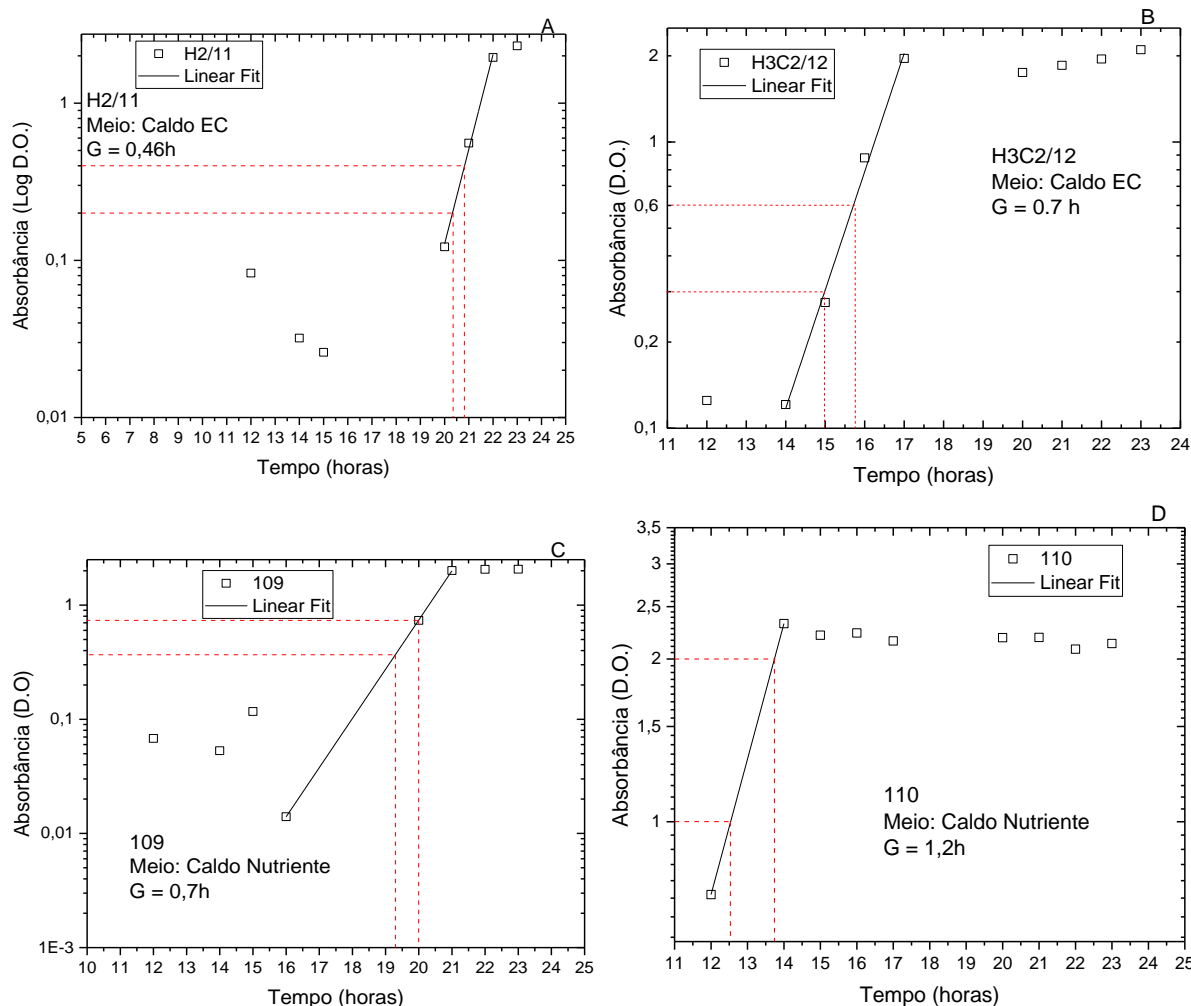


Figura 18: Cálculo do tempo de geração para as amostras de *E. coli*, em meio caldo EC, através do gráfico de Absorbância em escala logarítmica. (A) H2/11: 0,46 horas; (B) H3C2/12: 0,7 horas; (C) 109: 0,7 horas; (D) 110: 1,2 horas.

Os tempos de geração nas amostras H2/11 e H3C2/12, em caldo nutriente, possuem valores próximos um do outro (0,47 horas e 0,49 horas). Em caldo EC, a amostra H2/11 obteve um tempo de geração de 0,47 horas, valor semelhante ao do outro meio; as amostras H3C2/12 e 109 tiveram o mesmo tempo de geração, 0,7 horas, e a amostra 110 teve o maior tempo de geração de todas as cepas analisadas, 1,2 horas.

Observou-se que os tempos de geração das amostras H2/11, H3C2/12 em caldo nutriente e a amostra 110 em caldo EC foram determinados a partir de uma reta ajustada por apenas dois pontos. Isso se deve a uma taxa da amostragem baixa comparada ao rápido desenvolvimento na fase exponencial. Nesses casos, os valores devem ser analisados com precaução.

4.2 RESULTADOS PARA A ESPECTROSCOPIA RAMAN

Para as medidas de espectroscopia Raman, inicialmente foi adquirido o espectro para o caldo de cultura nutriente e caldo EC a 37° C. Na Figura 19, pode-se observar os espectros característicos recolhidos dos caldos de cultura puros.

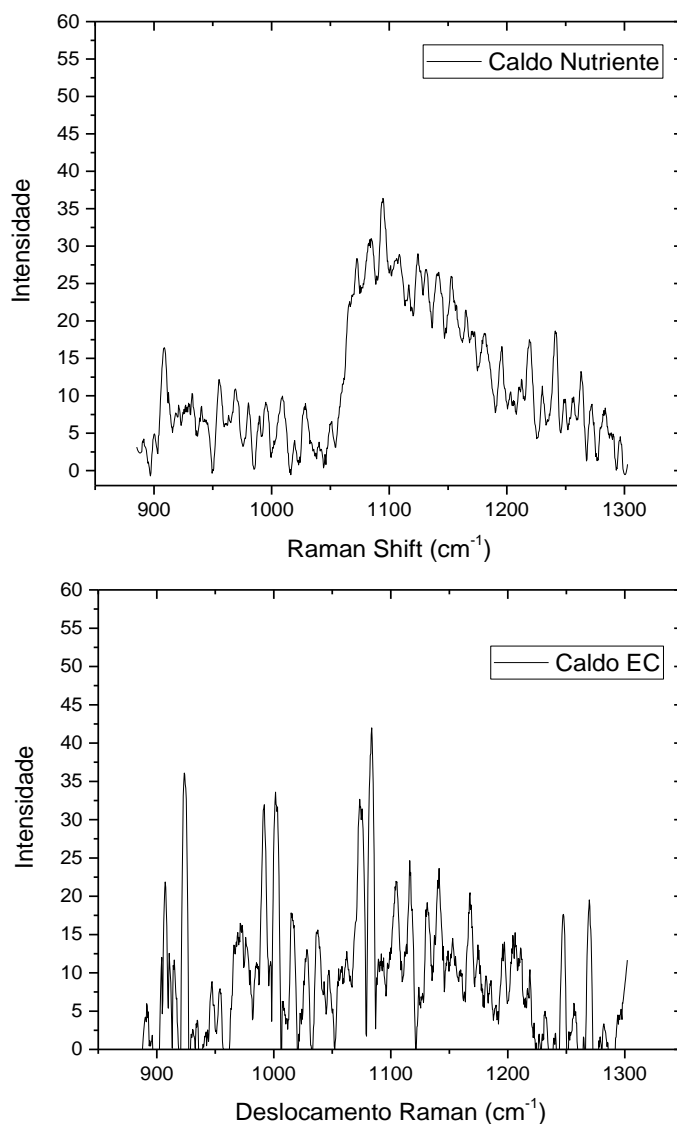


Figura 19: Espectros Raman do caldo de cultura nutriente e caldo de cultura EC sem semeadura de *E. coli*.

Nota-se que no caldo nutriente existe um sinal de uma banda entre 1050 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} que não ocorre no caldo EC, mas a intensidade dos picos nessa região é semelhante para os dois espectros.

A Figura 20 apresenta os espectros de monitoração por espectroscopia Raman das duas cepas (H2/11 e H3C2/12) de *E. coli*, quando semeadas em caldo de cultura nutriente a 37° C para crescimento.

Para melhor observar as diferenças nas intensidades dos picos nos espectros ao longo do tempo, nas Figura 21 (caldo nutriente) e Figuras 22/23 (caldo EC), são mostrados apenas os espectros sobrepostos correspondentes aos tempos após a inoculação: 1,5h, 6,0h, 12,0h e 24,0 h.

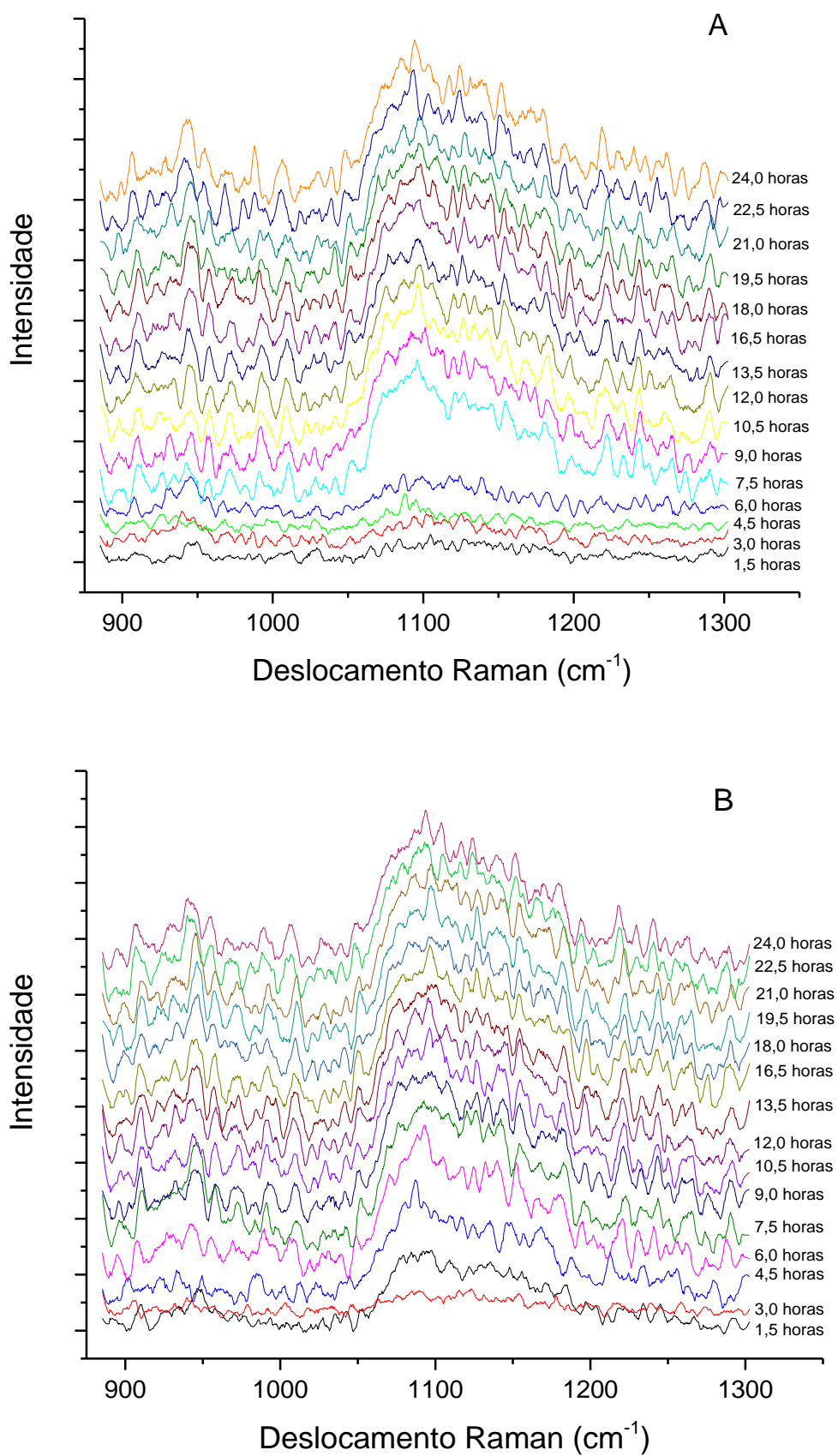


Figura 20: Espectros Raman ao longo de 24 horas para cepas de *E. coli* crescidas em caldo nutriente. A) Amostra H2/11. B) Amostra H3C2/12. Os espectros estão deslocados em 'y' para facilitar a visualização.

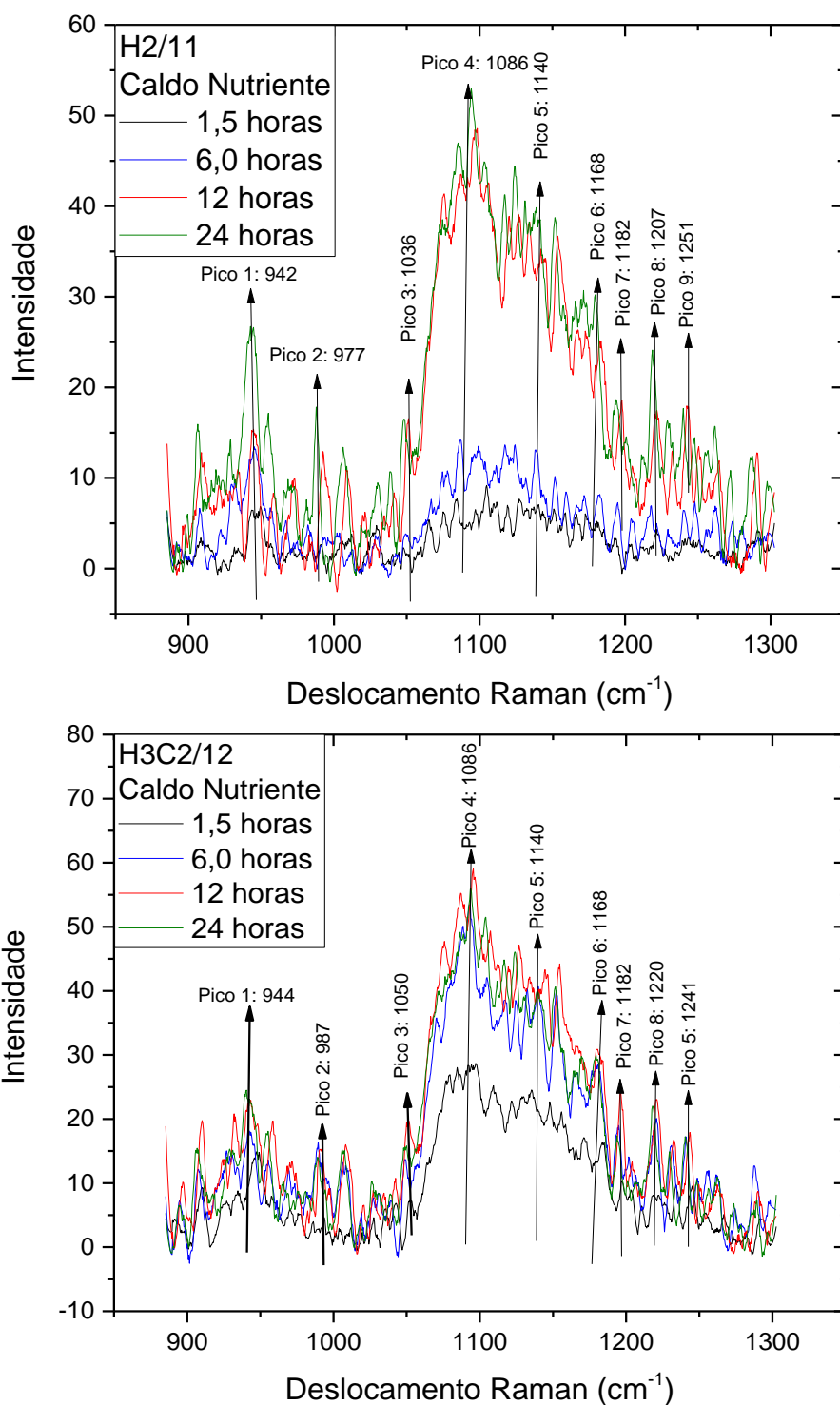


Figura 21: Espectros Raman sobrepostos das amostras H2/11 e H3C2/12 crescidos em meio de cultura caldo nutriente. As setas indicam picos identificáveis.

Os espectros de monitoração do crescimento sobrepostos das quatro cepas (H2/11, H3C2/12, 109 e 110) semeadas em caldo EC a 37° C são apresentados nas Figuras 22 e 23.

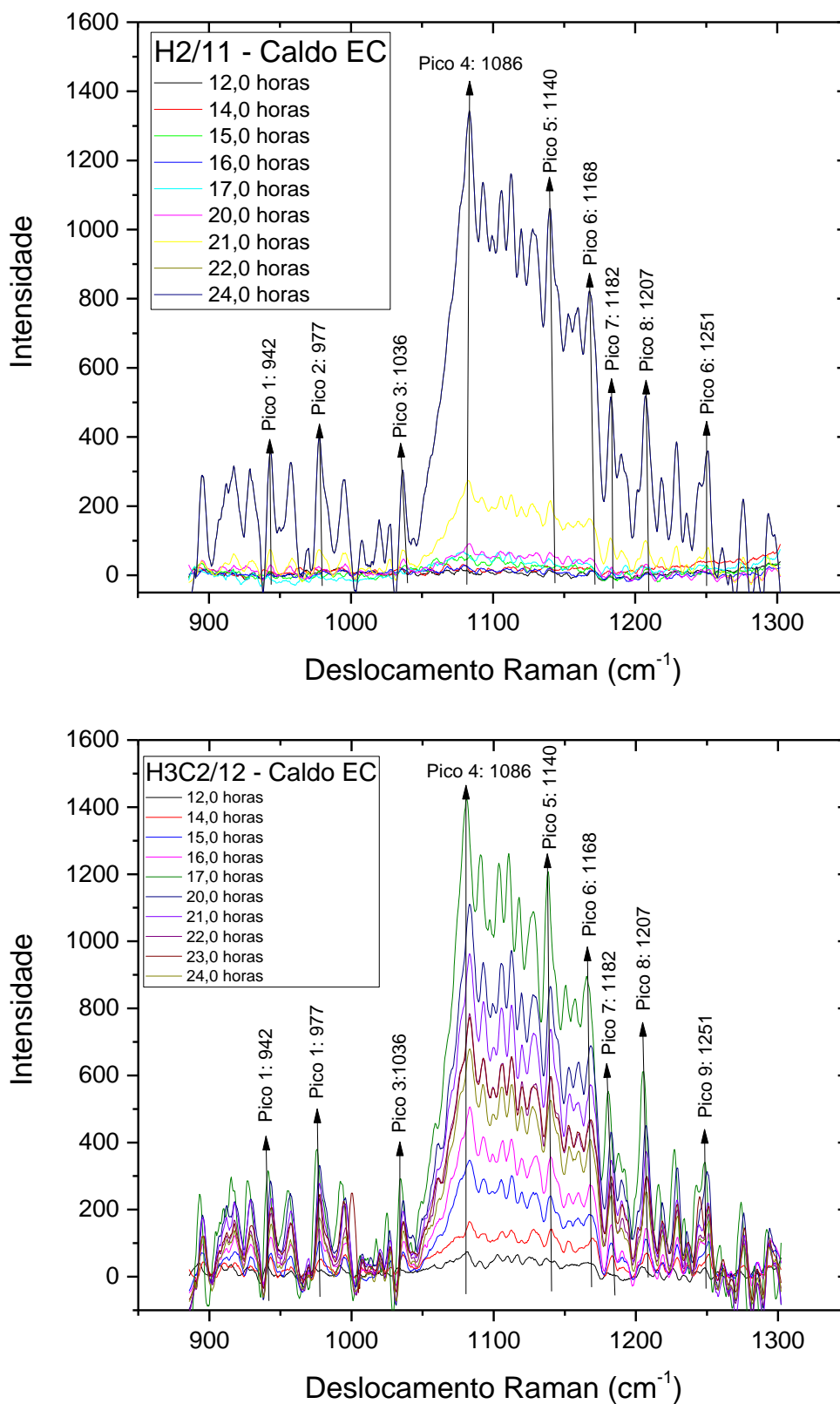


Figura 22: Espectros Raman sobrepostos ao longo de 24 horas para cepas de *E. coli*: amostras H2/11 e H3C2/12 em caldo EC. As setas indicam picos identificáveis

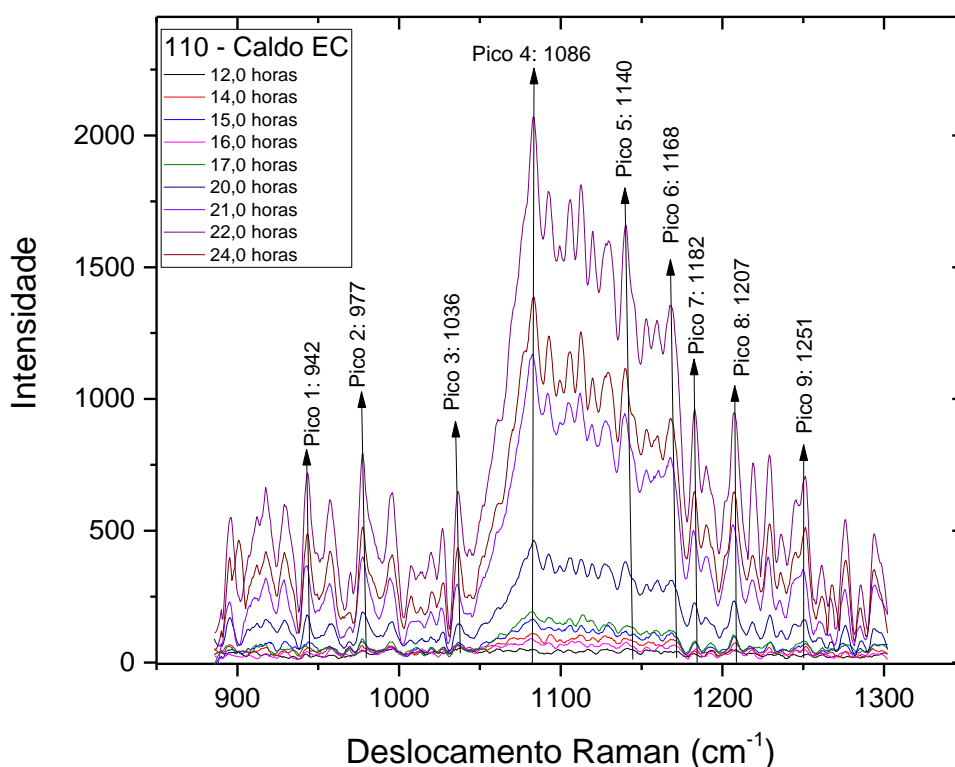
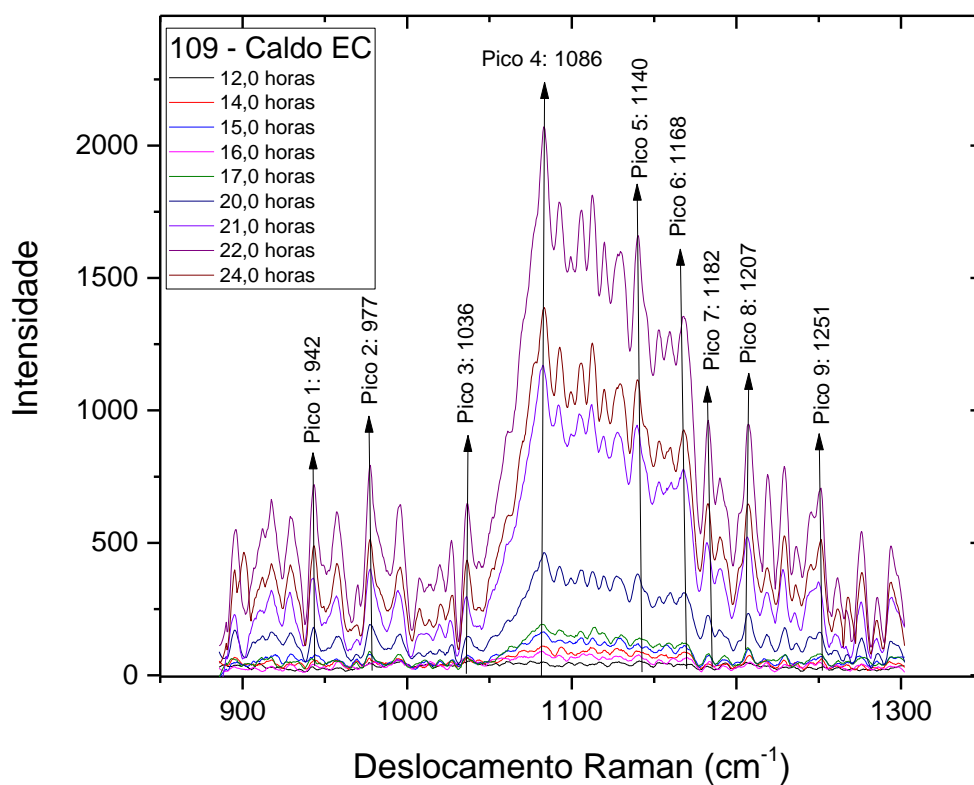


Figura 23 Espectros Raman sobrepostos ao longo de 24 horas para cepas de *E. coli*: 109 e 110 em caldo EC. As setas indicam picos identificáveis.

A evolução dos espectros mostra que durante o tempo houve variação significativa na intensidade. Uma distinção relevante entre os dois meios de

crescimento foi a presença de lactose no caldo EC, um importante constituinte para a nutrição da *E. coli*. Por esse motivo, os espectros em caldo nutriente apresentaram baixa intensidade em relação aos espectros em caldo EC.

Nesses espectros foram identificados nove picos (942 cm^{-1} , 977 cm^{-1} , 1036 cm^{-1} , 1086 cm^{-1} , 1140 cm^{-1} , 1188 cm^{-1} , 1192 cm^{-1} , 1207 cm^{-1} e 1251 cm^{-1}), para todas as amostras. Isso se deve a uma constituição química semelhante entre as cepas. Os nove picos de interesse e sua identificação biológica estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Picos Raman identificados nos espectros bacterianos e sua atribuição biológica, baseada na literatura. (NAUMANN *et al.*, 1982; PUPPELS *et al.*, 2000; MAQUELIN *et al.*, 2002; PARET *et al.*, 2010; POPP *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2004).

Deslocamento Raman (cm^{-1})	Identificação
Pico 1: 942	Estiramento C-C (amida III)
Pico 2: 977	Estiramento C-C esquelético do anel aromático da fenilalanina - proteínas
Pico 3: 1036	Estiramento C-N e C-C
Pico 4: 1086	Ácidos nucleicos (estiramento simétrico PO_2) e estiramento esquelético C-C e C-O-C da ligação glicosídica de sacarídeos
Pico 5: 1140	Estiramentos C-C, C-O, C-O-H
Pico 6: 1188	Dobramento C-H no plano de tirosina, guanina e citosina e ácidos graxos (ácido esteárico)
Pico 7: 1192	Deformação COH
Pico 8: 1207	Amida III, estiramento C-C da tirosina
Pico 9: 1251	Fenilalanina, triptofano e proteínas

Para melhor acompanhamento da evolução dos picos de interesse, encontrados nos espectros Raman, as intensidades foram acompanhadas em relação ao tempo de crescimento das amostras nas Figuras 24, 25, 26, 27 e 28.

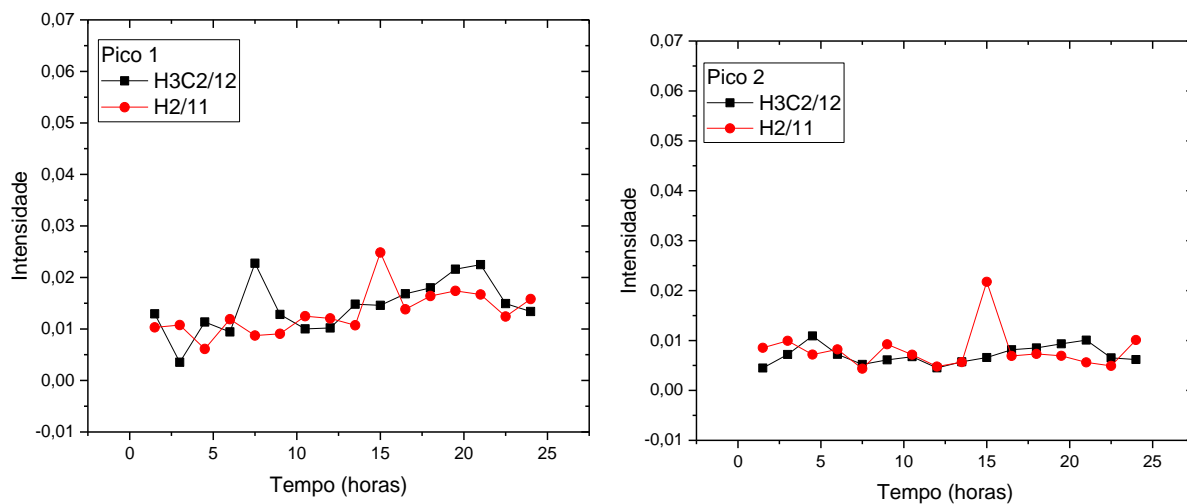


Figura 24: Intensidades dos picos de interesse 1 e 2 em função do tempo, para as amostras H3C2/12 e H2/11 de *E. coli* semeada em meio Caldo Nutriente. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos

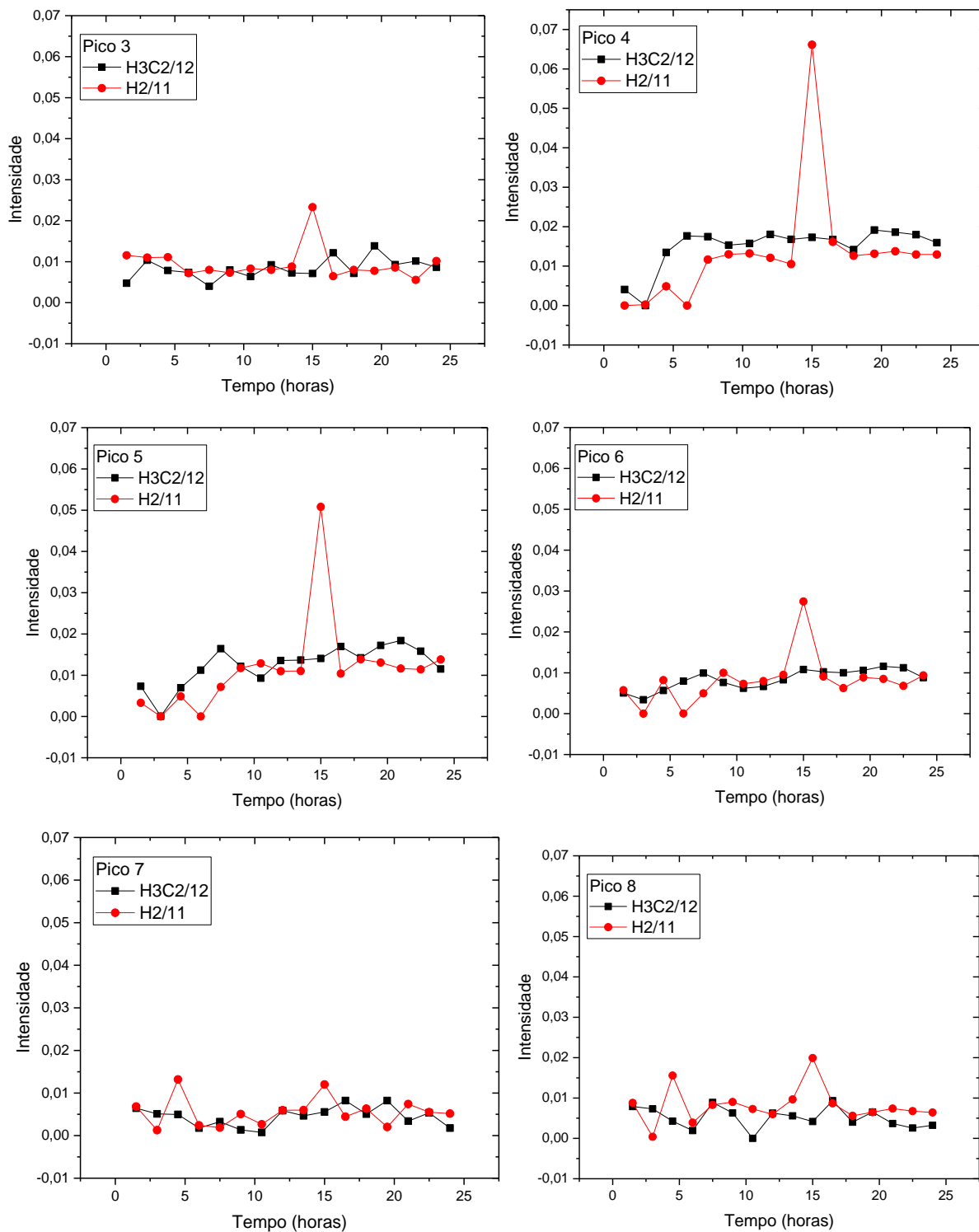


Figura 25: Intensidades dos picos de interesse de 3 a 8 em função do tempo, para as amostras H3C2/12 e H2/11 de *E. coli* semeada em meio Caldo Nutriente. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos

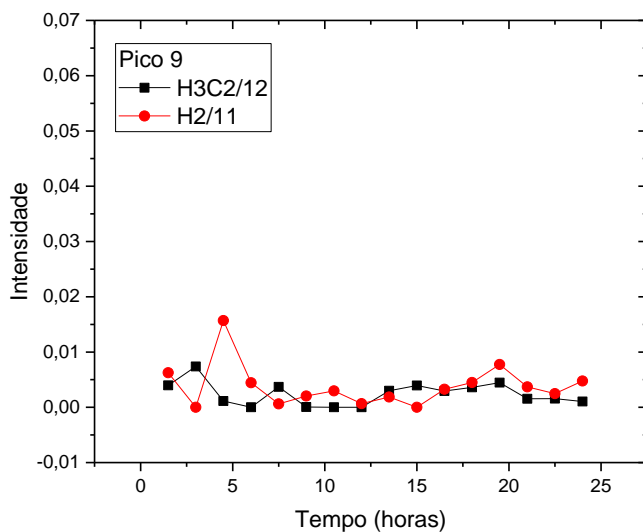


Figura 26: Intensidades do pico 9 em função do tempo, para as amostras H3C2/12 e H2/11 de *E. coli* semeada em meio Caldo Nutriente. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos.

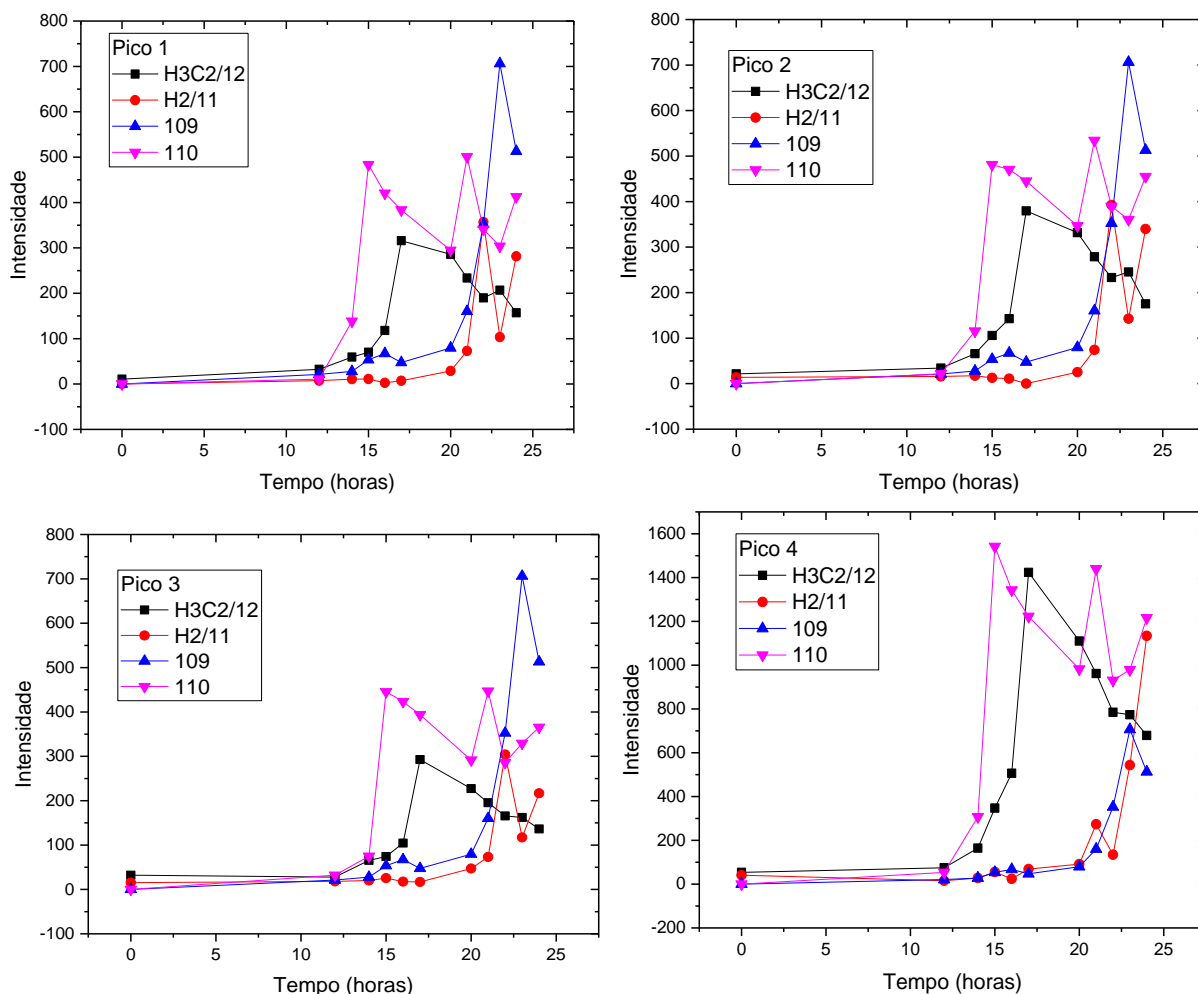


Figura 27: Intensidades dos picos de interesse de 1 a 4 em função do tempo, para as amostras H3C2/12, H2/11, 109 e 110 de *E. coli* semeada em meio Caldo EC. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos.

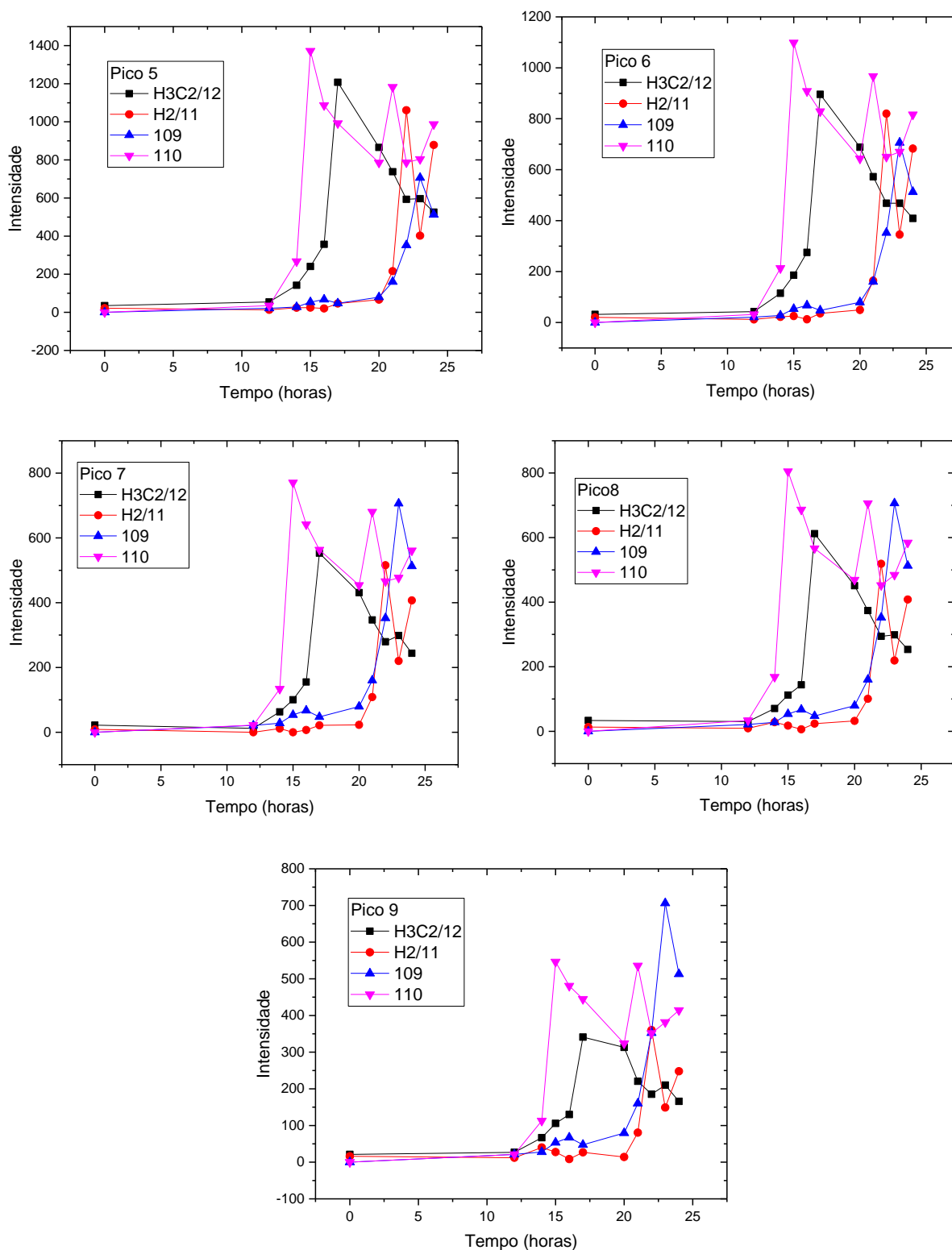


Figura 28: Intensidades dos picos de interesse 5 a 9 em função do tempo, para as amostras H3C2/12, H2/11, 109 e 110 de *E. coli* semeada em meio Caldo EC. As linhas são apenas para melhor acompanhamento dos pontos.

As diferenças de intensidade entre os espectros Raman e entre as curvas de crescimento obtidas para uma mesma cepa podem ser atribuídas a diferente

constituição química dos dois caldos de cultura. Sendo que, amostras crescidas em caldo nutriente apresentaram resultados com intensidades menores do que aqueles obtidos para amostras crescidas em caldo EC.

Observou-se que os picos 4, 5 e 6 foram os que resultaram em maior variação de intensidade no tempo, podendo ser relacionados com a atividade metabólica de células vivas nas colônias, conforme descrição de sua atribuição na Tabela 2.

A tendência, observando os resultados das Figuras 27 e 28, é que os picos tenham o seu máximo no que coincide com o fim da fase exponencial e começo da fase estacionária, para cada amostra, seguido de um decréscimo. Os picos das amostras crescidas em meio caldo nutriente (Figuras 24, 25 e 26) seguiram o padrão da curva de crescimento da Figura 15.

4.3 RESULTADOS PARA A PCA

Os dados espectrais obtidos foram submetidos à análise de dados multivariada PCA, a fim de desenvolver uma classificação metabólica entre os espectros. Os espectros foram analisados segundo a rotina de cálculos no Origin (OriginLab) através de uma matriz com as intensidades de cada desvio Raman (linha) em função do tempo da coleta de cada espectro (coluna) para cada amostra. As variáveis de saída da PCA (PCs e ESs) correlacionam as possíveis diferenças espectrais. Os resultados da porcentagem de variância explicada em cada componente principal estão nas Tabelas 3 e 4.

Por análise PCA se observou que as componentes principais PC1 e PC2 foram responsáveis pela maior parte das variações espectrais, eles foram plotados a fim de comparação com os espectros das bactérias para o meio caldo nutriente (Figura 29) e caldo EC (Figura 30 e 31). Os escores desses componentes principais foram plotados para cada cepa bacteriana e seu meio nutriente, de modo a oferecer melhor discriminação.

Tabela 3 – Porcentagem da variância obtida com a análise de componentes principais (PCA) para amostras crescida em caldo nutriente.

Amostra	Componente Principal	Variância (%)	Variância Total (%)
H2/11	1	62,86	62,86
	2	16,82	79,68
	3	7,62	87,30
	4	5,31	92,61
	5	1,75	94,36
H3C2/12	1	94,09	94,09
	2	2,24	96,33
	3	1,08	97,41
	4	0,74	98,15
	5	0,50	98,65

Tabela 4 - Porcentagem da variância obtida com a análise de componentes principais (PCA) para amostras crescida em caldo EC.

Amostra	Componente Principal	Variância (%)	Variância Total (%)
H2/11	1	63,43	63,43
	2	22,48	85,92
	3	7,29	93,20
	4	3,00	96,20
	5	2,00	98,20
H3C2/12	1	94,61	94,61
	2	3,73	98,34
	3	0,84	99,18
	4	0,39	99,57
	5	0,19	99,76
109	1	84,63	84,63
	2	7,19	91,82
	3	3,10	94,91
	4	1,90	96,82
	5	1,31	98,13
110	1	96,12	96,12
	2	3,39	99,51
	3	0,29	99,80
	4	0,15	99,96
	5	0,02	99,98

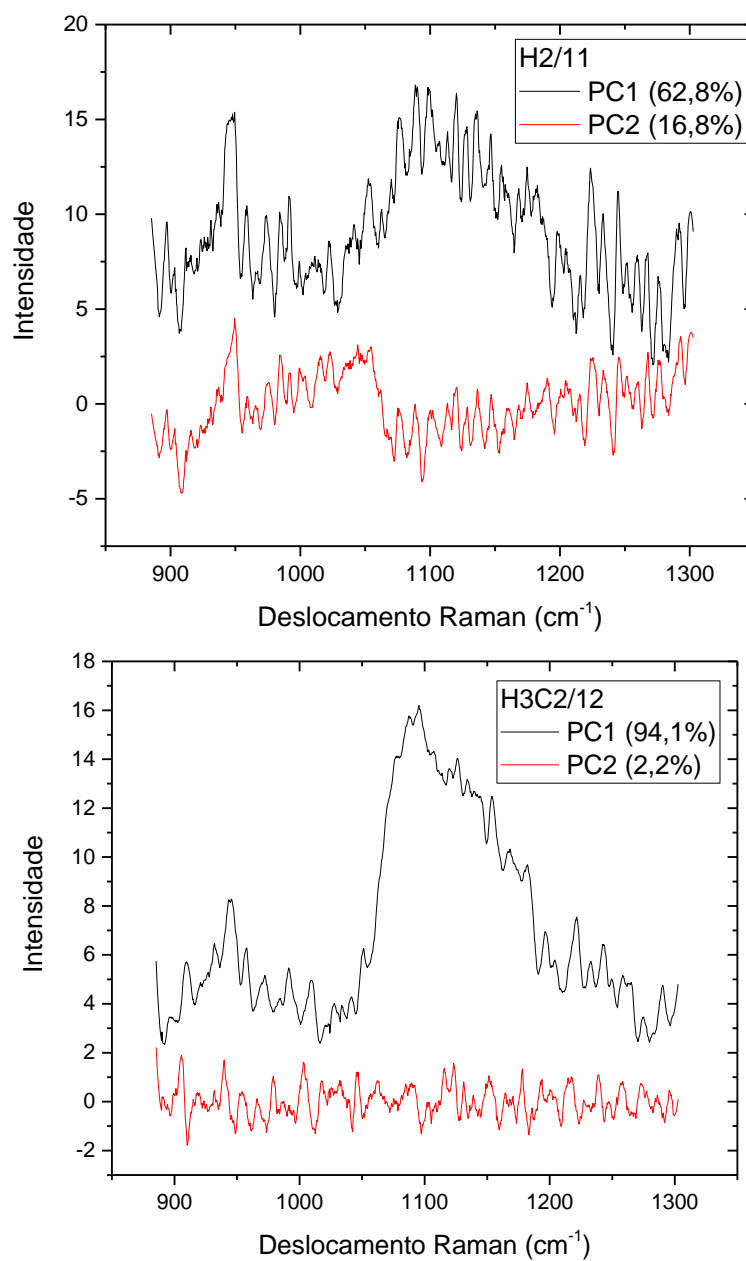


Figura 29: Espectros dos Componentes principais PC1 e PC2 para as amostras H3C2/12 e H2/11 de *E. coli* semeadas em Caldo Nutriente. Os espectros foram deslocados verticalmente para melhor visualização.

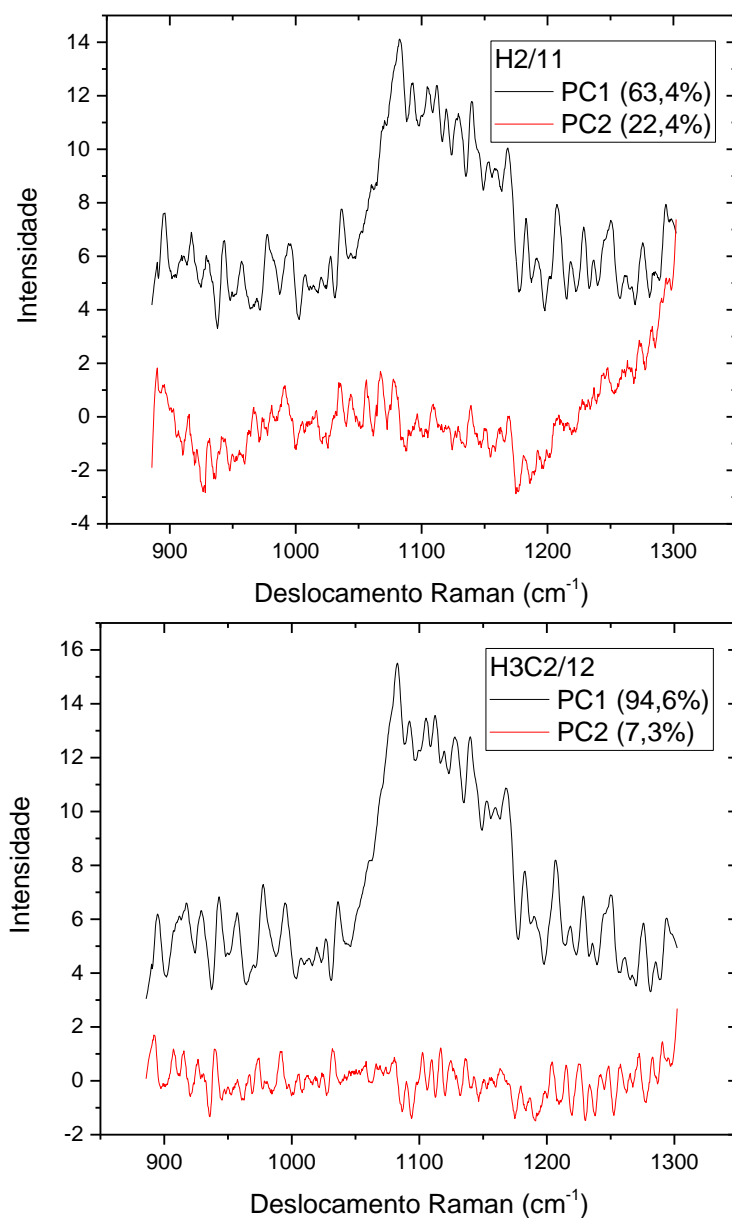


Figura 30: Espectros dos Componentes principais PC1 e PC2 para as amostras H3C2/12 e H2/11 de *E. coli* semeadas em Caldo EC. Os espectros foram deslocados verticalmente para melhor visualização.

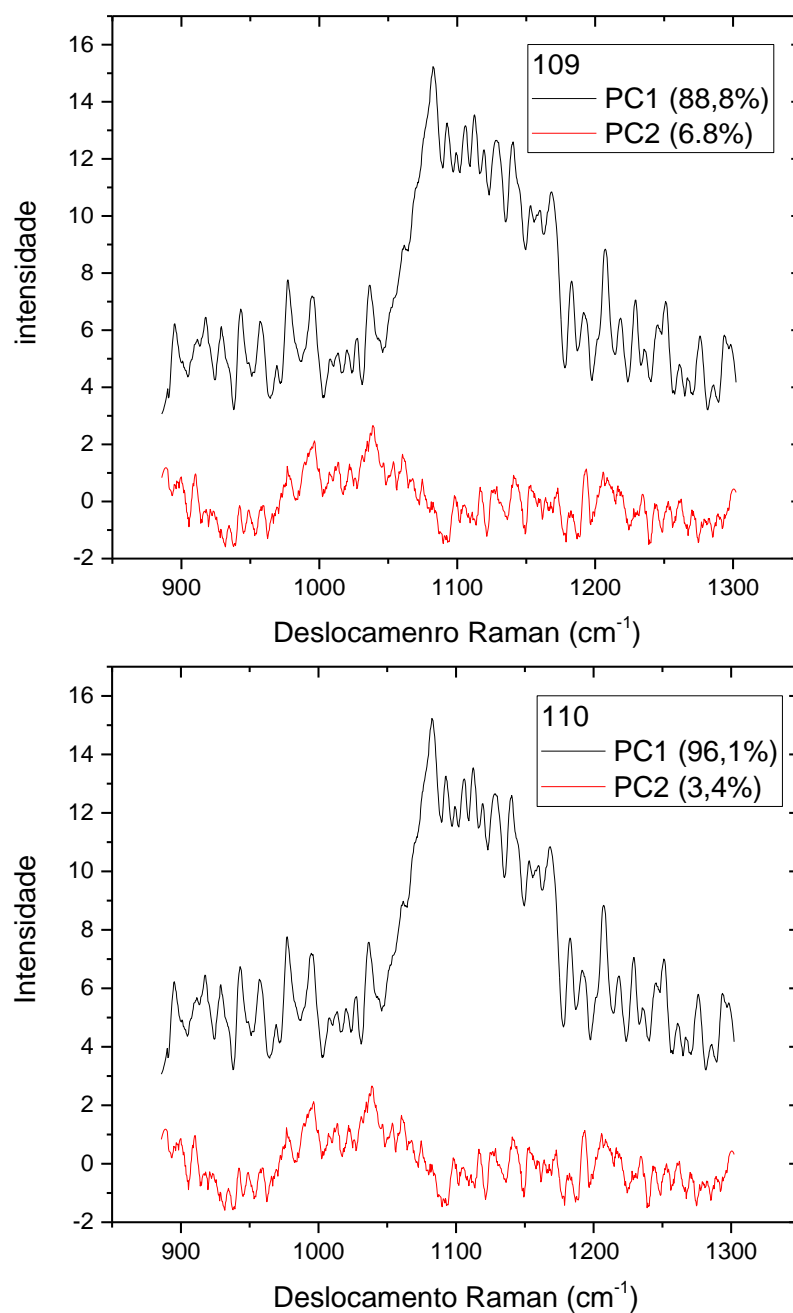


Figura 31: Espectros dos Componentes principais PC1 e PC2 para as amostras 109 e 110 de *E. coli* semeadas em Caldo EC. Os espectros foram deslocados verticalmente para melhor visualização.

Comparando os resultados das Figuras 29 a 31 com os espectros das Figuras 21, 22 e 23 comprovamos que a maior parte da informação dos dados está contida apenas na componente principal PC1.

A Figura 32 representa a plotagem PC1 *versus* PC2 para as amostras H2/11 e H3C2/12 em Caldo Nutriente.

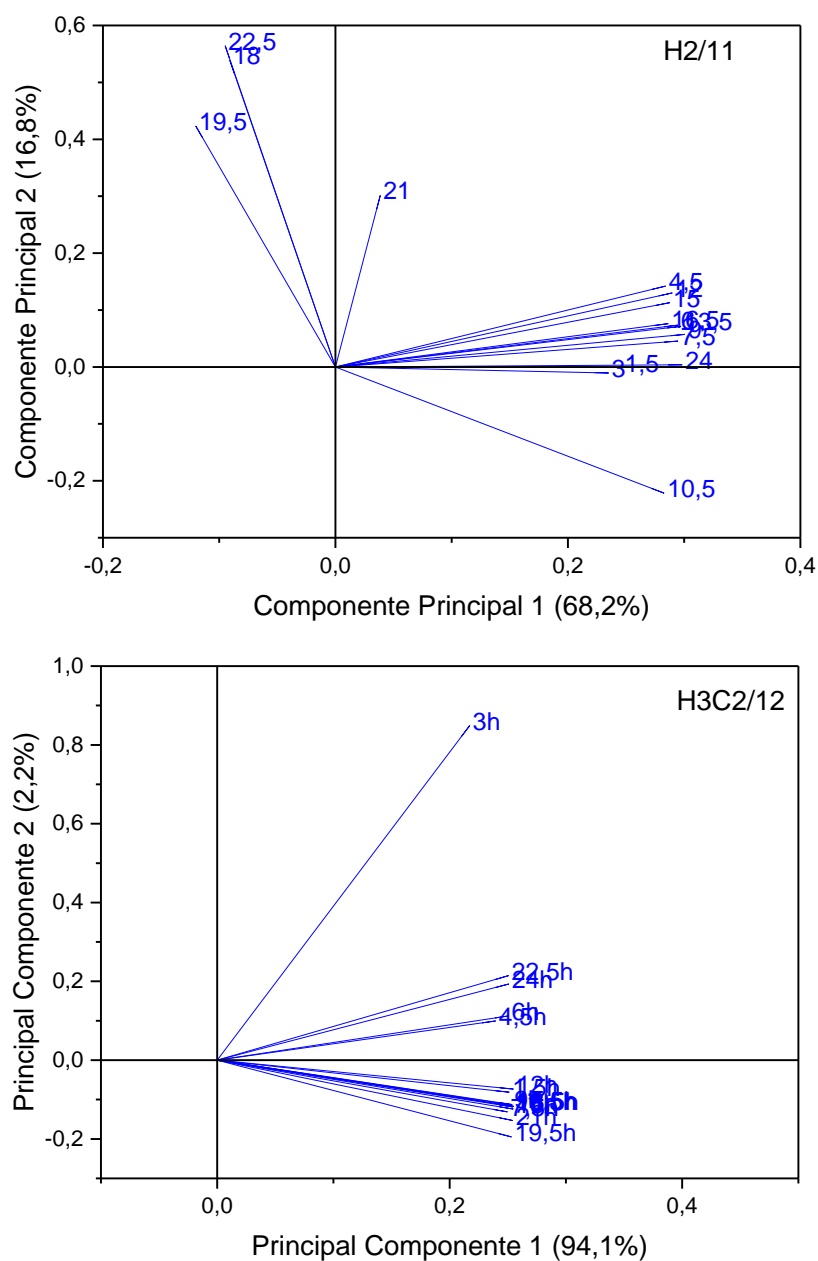


Figura 32: PC1 versus PC2 para as amostras H3C2/12 e H2/11 de *E. coli* semeadas em Caldo Nutriente.

As regiões de separação na Figura 32, para amostras crescidas em meio caldo nutriente, não forneceram informações suficientes para a classificação em regiões metabólicas que foram notadas nos espectros de absorção e Raman. Esse resultado pode estar vinculado ao fato de que os espectros Raman, para esse protocolo, não obtiveram intensidades com diferenças significantes no decorrer das 24 horas. Mas a PCA pode ser considerada uma ferramenta válida, pois consegue reproduzir os picos do espectro Raman medidos experimentalmente (Figura 29).

As Figuras 33 e 34 representam a plotagem PC1 *versus* PC2 para as amostras H2/11, H3C2/12, 109 e 110 em meio Caldo EC. Nessa representação, foi possível separar em regiões metabólicas conforme separação geométrica no gráfico.

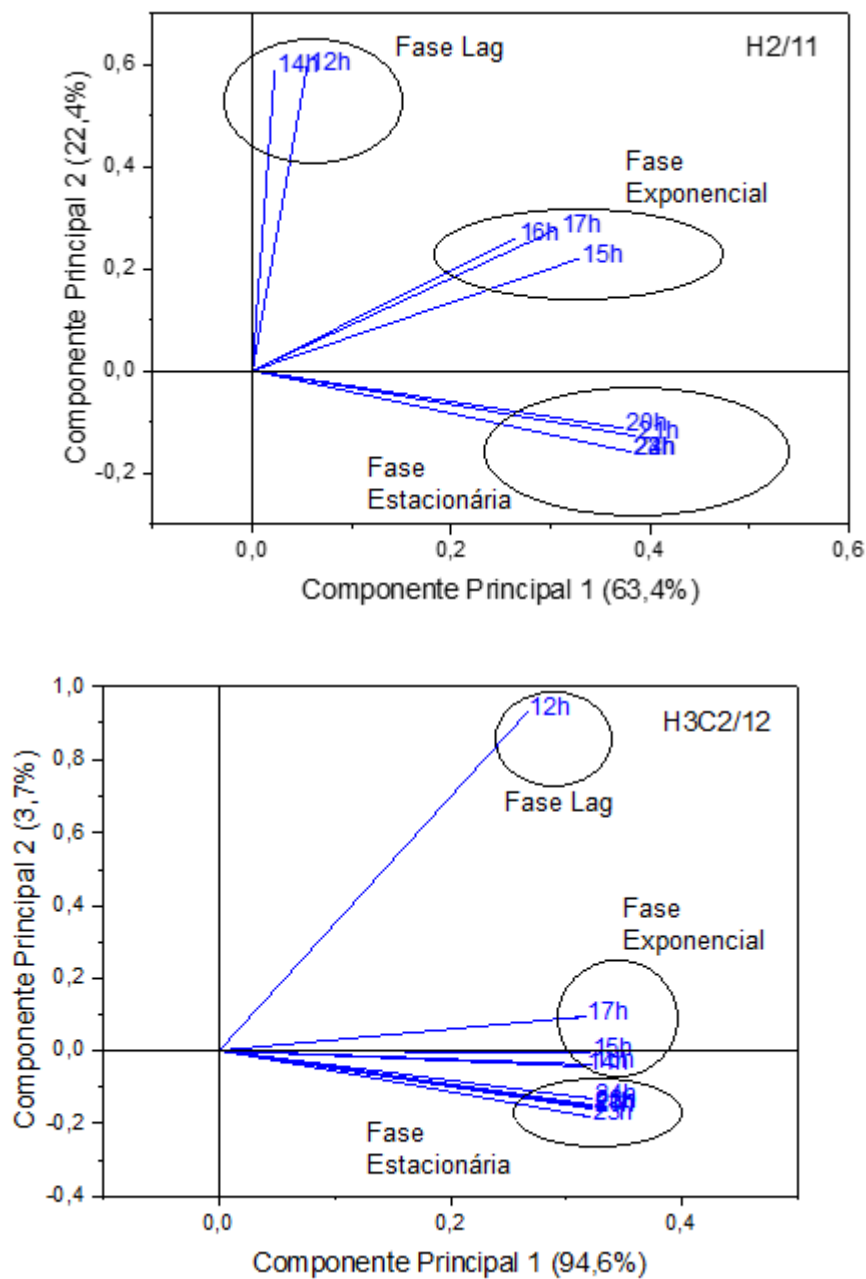


Figura 33: PC1 *versus* PC2 para as amostras H3C2/12 e H2/11 de *E. coli* semeadas em Caldo EC.

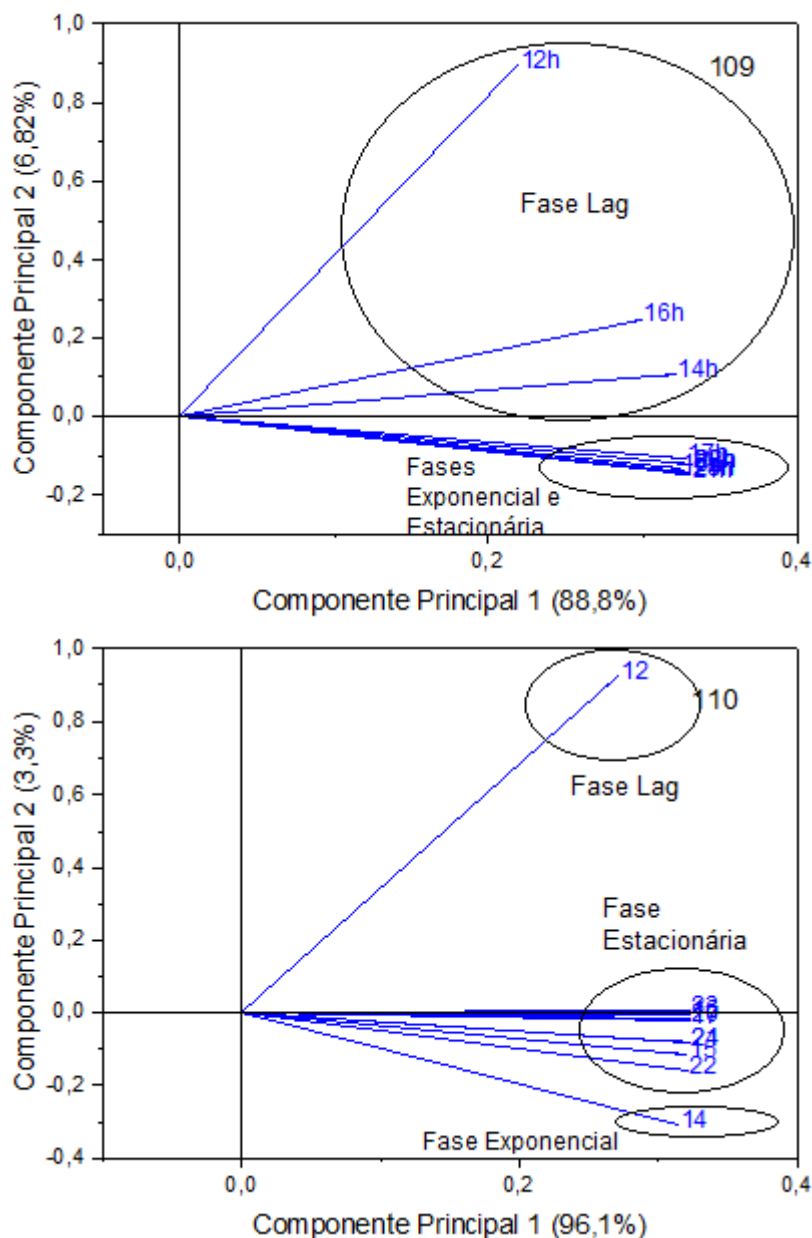


Figura 34: PC1 versus PC2 para as amostras 109 e 110 de *E. coli* semeadas em Caldo EC.

Através da Figura 33 pode-se notar que a amostra H2/11 apresentou uma melhor separação entre as fases de crescimento bacteriano. As amostras H3 e 110 separaram melhor a fase lag, aproximando, ainda que com certa divisão, a fase estacionária da lag. A amostra 109 separou a fase lag, mas mesclou as fases exponencial e estacionária.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho foi desenvolvido para analisar características do crescimento uma espécie bacteriana, comum na contaminação de ambientes hídricos, através de seu comportamento ótico em função do tempo. Duas composições de meios de cultura foram empregadas com o mínimo de manipulação das amostras: caldo nutriente e caldo EC.

As cepas H2/11 e H3C2/12 saíram da fase lag de crescimento (sem reprodução significativa) 4,5 horas e 3,0 horas, respectivamente, após a replicação no caldo nutriente. Enquanto que no caldo EC foram necessárias 20,0 horas para a cepa H2/11 e 14,0 horas para H3C2/12. Além da composição química dos meios, outro fator que contribuiu para a discrepância no tempo de crescimento foi a temperatura ambiente. O procedimento com caldo nutriente foi realizado quando a temperatura externa estava em média 22°C e com caldo EC a temperatura média era de 15°C. Mesmo com climatização fixa no laboratório, a baixa temperatura externa inibiu o crescimento inicial das bactérias quando retirada uma alíquota da amostra do banho térmico (37°C) para as medições óticas.

Apesar da dificuldade em deixar a fase de crescimento lag, as cepas medidas em caldo EC atingiram a fase estacionária em um tempo comum, até 21 horas, para trabalhos que acompanham os parâmetros de crescimento por turbidez. Com exceção da cepa H2/11 que precisou de 22 horas.

O cálculo indireto do tempo de geração, através da curva de crescimento, mostrou que as cepas estudadas em caldo EC podem ser de diferentes sorotipos. Crescendo nas mesmas condições, a amostra H2/11 possui um tempo de geração de 0,46 horas, ao passo que as amostras H3C2/12 e 109 o tempo foi de 0,7 horas. A amostra 110 obteve um tempo de geração de 1,2 horas, resultado que deve ser observado com cautela, na medida em que foi obtido com apenas dois pontos da reta. Assim, essa medida teve uma taxa de amostragem não adequada à taxa de crescimento.

As cepas estudadas em caldo nutriente alcançaram a fase estacionária com 9,0 horas (H2/11) e 6,0 horas (H3C2/12) na curva de crescimento. Os tempos de geração calculados foram valores próximos (0,47 horas e 0,49 horas, respectivamente). Esse resultado também precisa ser observado com precaução, pois

a turbidez máxima ficou abaixo do esperado e somente dois pontos determinou a inclinação da reta.

As amostras de *E. coli* exibiram alteração de intensidades nos espectros Raman ao longo do tempo do experimento quando crescido em meio de cultura caldo EC. Essas variações espectrais correlacionam-se com as alterações metabólicas que as células experimentam durante as fases de crescimento. Tal resultado não foi notado nas amostras crescidas em meio de cultura caldo nutriente. Provavelmente, esse meio não forneceu nutrição suficiente para que o aumento na microcolônia e consequentemente, na intensidade de sinal fossem significativos.

Foi possível correlacionar algumas bandas Raman específicas (Tabela 2) aos constituintes presentes nas bactérias, mostrando que foi uma ferramenta adequada para a identificação das amostras. O pico 4 (1086 cm^{-1}) teve a maior variação de intensidade, essa banda foi atribuída a informação genética da célula de *E. coli*. Esse resultado está em grande concordância com a variação da turbidez (quantidade de células) e de acordo com previsões.

Os espectros Raman, para as amostras do protocolo 2, podem ser utilizados para identificar o estado metabólico das células. O método estatístico multivariado PCA indicou que os espectros podem ser agrupados de acordo com estados metabólicos ou fases de crescimento, corroborando com os resultados obtidos para as espectroscopias de absorção UV-VIS e Raman.

Esses resultados sugerem que existe uma relação entre as variações dos espectros Raman e a concentração de microrganismos em meio líquido. Os picos característicos identificados da bactéria, em especial os que obtiveram maior intensidade, podem ser empregados para essa finalidade, uma vez que, a espectroscopia de absorção UV-VIS e outros métodos de contagem não fazem distinção entre células vivas e mortas na amostra.

A variação espectral e a concentração de bactérias em função do tempo foram observações importantes para que, em trabalhos futuros, seja realizada a observação em tempo real da ação de antibióticos para a inativação da *E. coli*.

5.1 TRABALHOS FUTUROS

- Empregar novas ferramentas estatísticas de análise dos dados;
- Estudo de um número maior de cepas de *E. coli*;
- Sorotipagem das cepas para comparação com medidas de diferenças espectroscópicas;
- Utilizar outras composições para meios de cultura;
- Fazer contagem do número de espécies bacterianas em placa.

REFERÊNCIAS

ALUPOAEI, C. E.; GARCÍA-RUBIO, L. H. **Growth Behavior of microorganisms Using UV-Vis Spectroscopy: *Escherichia coli***. Biotechnology and bioengineering, vol:86 iss:2 pg:163 -167, 2004.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004). Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicos/medicina/microbiologia/mod_4_2004.pdf> Acessado em: 15 de junho de 2015.

ATHAMNEH, A. I. M.; ALAILOUNI, R. A.; WALLACE, R. S.; SELEEM, M. N.; SENGERRA, R. S. **Phenotypic Profiling of Antibiotic Response Signatures in *Escherichia coli* Using Raman Spectroscopy**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 58(3), p.1302, 2014.

BASSIRI, E. **BACTERIAL GROWTH CURVE**. Penn Stat University (2016). Disponível em: <http://www.sas.upenn.edu/LabManuals/biol275/Table_of_Contents_files/6-BacterialGrowthCurve.pdf> Acesso em: 16 maio de 2016.

BRASIL, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n.º 357 de 17 de março de 2005.

CHEN, B. **Raman spectroscopy studies of carbon nanotube-polymer composites**. Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, 2004.

CHOO-SMITH, L. P.; MAQUELIN, K. T.; VAN VREESWIJK, B.H.A.; PUPPELS, G.J.; KIRSCHNER, C.; NAUMANN, D.; AMI, D.; VILLA, A.M.; ORSINI, F.; DOGLIA, S.M.; LAMFARRAJ, H.; SOCKALINGUM, G.D.; MANFAIT, M.; ALLOUCH, P.; ENDTZ, H.P. **Investigating microbial (micro) colony heterogeneity by vibrational spectroscopy**. Appl. Environm. Microbiol. 67(4): 1461-1469, 2001.

CHOO-SMITH, L. P.; EDWARDS, H. G. M.; ENDTZ, H. P.; KROS, J. M.; HEULER, F.; BARR, H.; ROBINSON, J. S.; BRUINING, H. A.; PUPPELS, G. J. **Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation**. Biopolymers 67:1-9, 2010.

ESCHERICH, T. **Die darmbakterien des säuglings und ihre beziehungen zur physiologie der Verdauung**. Fortschritte der Medicin, 3, No. 16 und 17, S. 515-522 und 547-554, 1885.

FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN, C. W. **Introductory Raman Spectroscopy**. 2. Ed. Elsevier, 2003.

HAMASHA, K.; MOHAIDAT, Q.I.; PUTNAM, R.A. **Sensitive and specific discrimination of pathogenic and nonpathogenic Escherichia coli using Raman spectroscopy—a comparison of two multivariate analysis techniques**. Biomed Opt Express 4(4):481-489, 2013.

HANLON, E. B.; MANOHARAN, R.; KOO, T. W.; SHAFER, K. E.; MOTZ, J. T.; FITZMAURICE, M.; KRAMER, J. R.; ITZKAN, I.; DESARI, R. R.; FEND, M. S. **Prospects for in vivo Raman spectroscopy**. Physics in Medicine and Biology 45:R1-R59, 2000.

HARRIS, D. C.; BERTOLUCCI, M. D. **Symmetry and Spectroscopy: an introduction to vibrational and electronic spectroscopy**. Oxford University Press, 1978.

HUANG, W. E.; GRIFFITHS, R. I.; THOMPSON, I. P. **Raman microscopic analysis of single microbial cells**. Anal. Chem. 76(15):4452-8, 2004.

IBRAHIM, E. H.; SHERMAN, G.; WARD, S.; FRASER, V. J.; KOLLEF, M. H. **The Influence of Inadequate Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infections on Patient Outcomes in the ICU Setting**. Chest.;118(1):146-155, 2000.

KAYSER, F. H. Medical Microbiology. New York: Thieme, p. 698. 2005.

KERREMANS, J.J; VERBOOM, P.; STIJNEN, T.; HAKKAART, V.R.L.; GOESSENS, W.; VERBRUGH, H.A.; VOS, M.C. **Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use**. J. Antimicrob. Chemoth. 61: 428-435, 2008.

KOLLEF, M. H. **Inadequate antimicrobial treatment: An Important determinant of outcome for hospitalized patients**. Clinical Infectious Diseases, Vol.31(4), pp.S131-S138, 2000.

LANDAU, L. D.; LIFSHITZ, E. M. **Mechanics**. 3. Ed., Pergamon Press, 1976.

LINDQVIST, R. **Estimation of Staphylococcus aureus Growth Parameters from Turbidity Data: Characterization of Strain Variation and Comparison of Methods.** Appl. Environ. Microbiol.72 (7):4862–487, 2006.

MAQUELIN, K.; KIRSCHNER, C.; CHOO-SMITH, L.P.; VAN DEN BRAAK, N.; ENDTZ, H.P.H.; NAUMANN, D.; PUPPELS, G.J. **Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy.** J. Microbiol. Meth. 51, 255- 271. 2002.

MAQUELIN, K.; KIRSCHNER, C.; CHOO-SMITH, L.P.; NGO-THI, N.A.; VREESWIJK, T.S.M.; ENDTZ, H.P.; BRUINING, H.A.; NAUMANN, D.; PUPPELS, G.J. **Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures.** J. Clin. Microbiol. 41, 324-329, 2003.

MORITZ, T. J.; TAYLOR, D. S.; POLAGE, C. R.; KROL, D. M.; LANE, S. M.; CHAN, J. W. C. **Effect of cefazolin treatment on the nonresonant Raman signatures of the metabolic state of individual Escherichia coli cells.** Analytical chemistry vol:82 iss:7 pg:2703 -10, 2010.

NAUMANN, D.; BARNICKEL, G.; BRADACZEK, H.; LABISCHINSKI, H.; GIESBRECHT, P. **Infrared Spectroscopy, a tool for probing bacterial peptidoglycan. Potentialities of infrared spectroscopy for cell wall analytical studies and rejection of models based on crystalline chitin.** Eur. J. Biochem.125, 505-515, 1982.

PARET, M.L.; SHARMA, S.K.; GREEN, L.M.; AVAREZ, A.M. **Biochemical characterization of Gram-positive and Gram-negative plant-associated bacteria with micro-Raman spectroscopy.** Appl. Spectrosc. 64 (4): 433-441, 2010.

PELLETIER, M. J. **Introduction to Applied Raman Spectroscopy.** Blackwell Science Ltd, Oxford, 1-52, 1999.

PEARSON, K. **On lines and planes of closest fit to systems of points in space.** Philosophical Magazine 2:559-572, 1901.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** Pearson Makron Books, 2008.

POPP, J.; HARZ, M.; RÖSCH, P.; PESCHKE, K.D.; RONNEBERGER, O.; BURKHARDT, H. **Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions.** Analyst 130: 1543-1550, 2005.

PUPPELS, G.J.; MAQUELIN, K.; CHOO-SMITH, L.P.; VREESWIJK, T. V.; ENDTZ, H.P.; SMITH, B.; BENNETT, R.; BRUINING, H.A. **Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium.** Anal. Chem. 72: 12-19, 2000.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. **A new type of secondary radiation.** Nature 121: 501-502, 1928.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; WEST, D. M. **Fundamentos de Química Analítica.** 9. Ed. Trilha, 2014.

SMEKAL, A. **Zur quantentheorie der dispersion.** Naturwiss 11:873-875, 1923.

SOLÉ, J. G.; BAUSÁ, L. E.; JAQUE, D. **An Introduction to the optical Spectroscopy of Inorganic Solids.** John Wiley & Sons Inc., ISBN 0-470-86885-6, USA, 2005.

TAYLOR, P. D.; VINN, O.; KUDRYAVTSEV, A.; SCHOPF, J. W. **Raman spectroscopic study of the mineral composition of cirratulid tubes (Annelida, Polychaeta).** Journal of Structural Biology 171:402-405, 2010.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 5. Ed. Atheneu, 2008.

WALTER, A.; REINICKE, M.; BOCKLITZ, T.; SCHUMACKER, W.; RÖSCH, P.; KOTHE, E.; POPP, J. **Raman spectroscopic detection of physiology changes in plasmid-bearing *Escherichia coli* with and without antibiotic treatment.** Anal. Chem., 82, 2703–2710, 2011.

WIDDEL, F. **Theory and Mensurament of Bacterial Growth.** Grundpraktikum Mikrobiologie, Universität Bremen, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dados do Observatório Global de Saúde (GHO). The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012. (2014). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 12 dez. 2016.

ZU, T. N. K.; ATAMNEH, A. I. M.; WALLACE, R. S.; COLLAKOVA, E.; SENGER, R. S. **Near-Real-Time Analysis of the Phenotypic Responses of *Escherichia coli* to 1-Butanol Exposure Using Raman Spectroscopy**. *Journal of Bacteriology* p. 3983–3991, 2014.