

1.05.07 - Física / Física da Matéria Condensada.

ESPECTROSCOPIA ÓPTICA APLICADA PARA DIFERENCIAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS

Ana C. Maranni¹*, Cícero R. Cena²

1. Estudante do Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso no Sul (INFI-UFMS)
2. Professor do INFI-UFMS – Instituto de Física/Orientador

Resumo

A identificação de bactérias como gram-negativas ou gram-positivas é essencial para a microbiologia, uma vez que este é um dos primeiros passos para determinar o melhor tratamento contra infecções causadas por tais microrganismos. Técnicas como a coloração de gram, altamente empregada na área de análise clínica, distinguem estes seres de forma simples porém com certas limitações, logo, este trabalho descreve o estudo de cultura de bactérias *Staphylococcus* e *Escherichia coli* aplicado a distinção de gram por meio de imagens obtidas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e aplicação de análise das componentes principais (PCA) para formação de clusters. Através dos resultados conclui-se que: (1) os padrões espectrais de FTIR obtidos em conjunto com a aplicação do método de avaliação PCA realizam a diferenciação de gram; (2) a eficácia do PCA associado aos resultados do FTIR apresentam um potencial de alta aplicabilidade na diferenciação de microrganismos.

Autorização legal: Amostras provenientes da coleção bacteriológica do LABAC/FAMEZ/UFMS que se encontra cadastrada no SISGEN sob o número C69392D.

Palavras-chave: Identificação; FTIR; microrganismos.

Introdução

O ramo de estudo da microbiologia inclui não apenas o estudo dos organismos microscópicos, suas atividades e a propensão em causar infecções, mas também considera a existência de inúmeras formas de diagnósticos e identificação dos agentes etiológicos. A diferenciação entre bactérias gram-negativas e gram-positivas tem grande importância clínica já que as respostas a tratamentos de infecção destas são totalmente diferentes, enquanto as bactérias gram-positivas possuem uma parede celular mais espessa, porém mais simples, as gram-negativas contêm uma estrutura muito mais complexa já que sua parede é envolta por uma membrana externa com proteínas específicas que realizam a difusão seletiva com o ambiente, impedindo a permeabilidade de alguns antibióticos.

Desta forma, técnicas de caracterização de gram em bactérias são as primeiras aplicadas em amostras coletadas, como é o caso da coloração de gram, a qual consiste na pigmentação de bactérias para possibilitar a identificação de diferentes estruturas em paredes celulares uma vez que estas reagem de formas diferentes ao tratamento com agentes químicos específicos. Como forma alternativa para esse tipo de identificação pode-se aplicar a espectroscopia de infravermelho na região de 600 a 4000 cm^{-1} , a qual apresenta maior possibilidade de interação com compostos moleculares orgânicos, para obter espectros das bactérias, uma vez que estes assemelham-se a impressões digitais pois são altamente reprodutíveis e típicos de diferentes bactérias, e assim diferenciá-las.

Para potencializar o método de identificação obtido pelo FTIR pode-se associar a este a análise de componentes principais em grupos de amostras de bactérias gram-negativas e gram-positivas, a união de tais técnicas possibilita a coleta de inúmeras informações, através do FTIR, e a redução da dimensionalidade dos dados em um conjunto menor, mas que apresente a variação do sistema, aplicação do PCA. Desta forma há a possibilidade da formação de cluster, aglomerados de pontos que caracterizam um tipo de amostra. Estes métodos caracterizam-se por serem pouco invasivos e apresentarem alta precisão e eficácia.

Metodologia

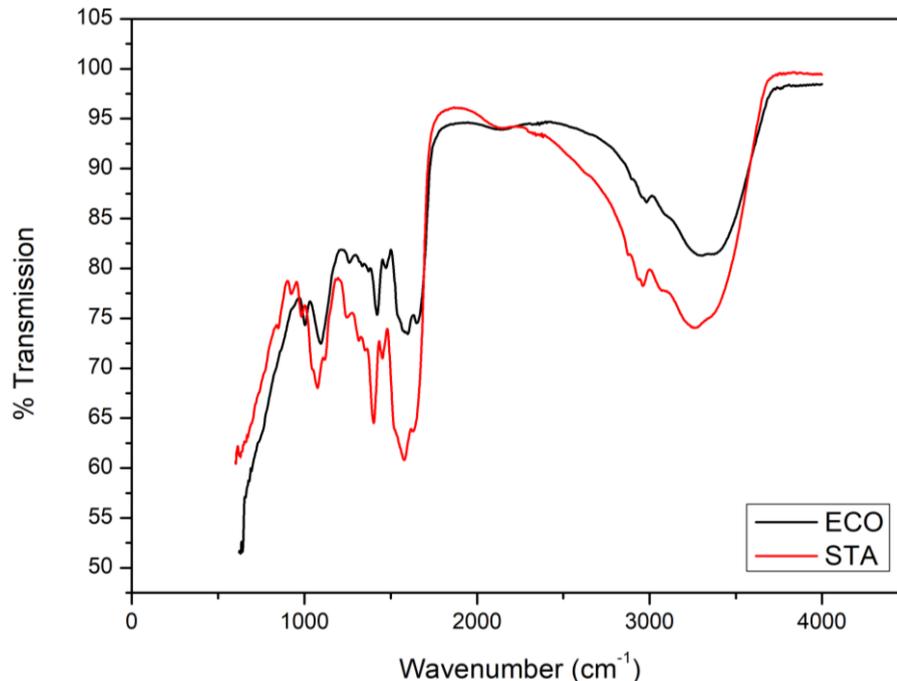
Amostras de bactérias *Staphylococcus* e *Escherichia coli* provenientes da coleção bacteriológica do LABAC/FAMEZ/UFMS cadastradas no SISGEN sob o número C69392D, as quais foram validadas anteriormente por PCR e se encontravam congeladas em caldo de infusão cérebro-coração (BHI) com glicerina, foram descongeladas e colocadas em um novo caldo BHI para crescimento durante o período de 48h. Após este intervalo de tempo utilizando o método de spin coating depositou-se camadas do caldo BHI contendo bactérias sob o substrato de óxido silício (SiO_2), com dimensão aproximada de 10x10 mm, sendo que entre cada deposição secou-se a amostra utilizando bico de Bunsen, para cada bactéria foi realizada a deposição em três placas de mesmo substrato.

Realizou-se a coleta de espectros de aproximadamente vinte pontos diferentes para *Staphylococcus* (STA) e *Escherichia coli* (ECO). Com os dados obtidos realizou-se uma análise com base nos métodos estatísticos de análise de componentes principais (PCA), para isso utilizou-se uma rotina desenvolvida no software MATLAB, no qual os pontos dos espectros serão transformados em matrizes para a leitura correta pelo programa. O estudo do PCA inicia-se com o com a geração do gráfico de Scree Plot o qual fornece a informação de quantos componentes principais (PCs) são relevantes para a análise, encaixam-se neste caso os PCs com

valores maiores ou próximos de 1%. Com os resultados do Scree Plot determinou-se a quais componentes principais deveriam ser analisados separadamente, gerou-se o gráfico dos PCs correspondentes para análise da formação de clusters específicos para as bactérias STA e ECO.

Resultados e Discussão

Através dos dados obtidos pelos espectros coletados no FTIR obteve-se o espectro médio das bactérias STA e ECO, através deste já é possível verificar uma diferença visual significativa entre os microrganismos, como pode-se perceber na Figura 1.



. Figura 1: Espectros médios das bactérias *Staphylococcus* (STA) e *Escherichia coli* (ECO)

Pode-se notar que há uma grande diferença em bandas próximas de 1800cm^{-1} e 1500cm^{-1} nas quais encontram os lipídeos associados aos lipopolissacarídeos presentes na membrana externa da bactéria gram-negativa (ECO), além disso no intervalo entre 1600 e 900cm^{-1} há a presença de carboidratos característicos da espessa parede celular das bactérias gram-positivas (STA).

Aplicando aos dados obtidos a rotina do PCA encontrou-se os valores de PCs relevantes para análise através do gráfico de Scree Plot.

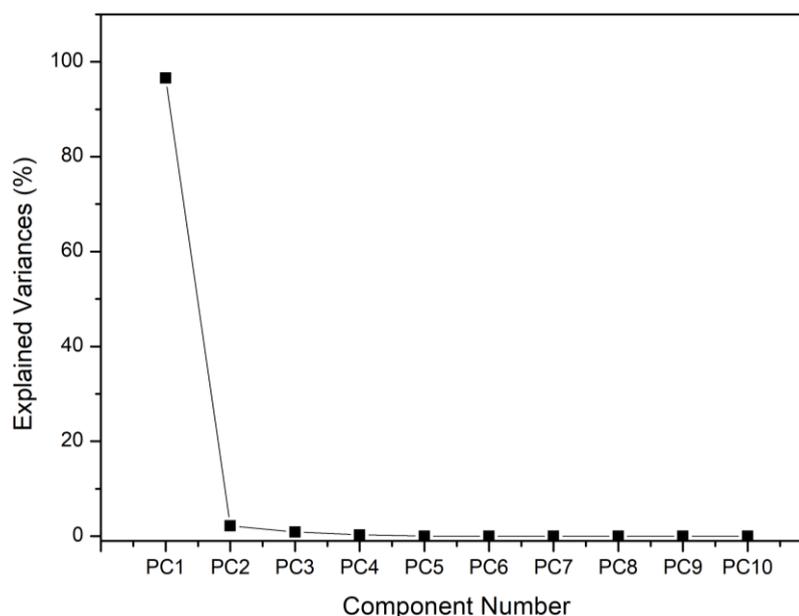


Figura 2: Scree Plot de bactérias STA e ECO

Com os resultados obtidos do Scree Plot, selecionou-se os PCs entre 1 e 3 para gerar o gráfico de PCA das bactérias gram-positivas e gram-negativas. Na Figura 3 é possível notar a formação de clusters

específicos para cada tipo de bactéria, realizando assim diferenciação entre gram.

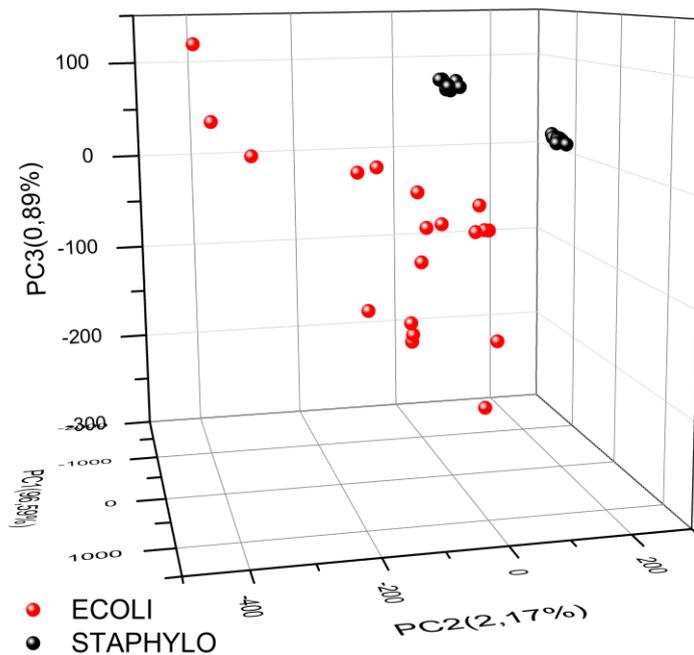


Figura 3: PCA apresentando variações de ECOLI (gram-negativa) e STAPHY (gram-positiva) e formação de clusters

Conclusões

Os resultados obtidos são conclusivos para a diferenciação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tal resultado fica explícito na Figura 3 em que há formação de clusters no gráfico, ou seja, cada bactéria se aloca em um dado espaço dentro do limite estipulado pelas dimensões dos PCs. Desta forma, a espectroscopia de infravermelha associada ao PCA gera resultados muito mais conclusivos com relação a identificação de gram do que apenas a análise dos espectros gerados pelo FTIR. Tais conclusões apresentam que o método aplicado possui um grande potencial de aplicabilidade em diferenciação de bactérias, podendo ser aplicada futuramente como forma mais rápida e precisa para identificação de patógenos.

Referências bibliográficas

J.M. LEGAL. Applications of FTIR spectroscopy in structural studies of cells and bacteria. Journal of Molecular Structure, 242 (1991) 397-407 Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

L. MARIETY. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. Vibrational Spectroscopy 26 (2001) 151-159