

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio
Anais do V Workshop 2009**

Odílio Benedito Garrido de Assis
Wilson Tadeu Lopes da Silva
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Editores

Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Capa: Manoela Campos e Valentim Monzane
Imagem da Capa: Imagem de AFM de nanofibra de celulose - Rubens Bernardes Filho
Editoração eletrônica: Manoela Campos e Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 200

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

Anais do V Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao
agronegócio 2009 - São Carlos: Embrapa Instrumentação
Agropecuária, 2009.

Irregular
ISSN: 2175-8395

I. Nanotecnologia - Evento. I. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
II. Silva, Wilson Tadeu Lopes da. III. Mattoso, Luiz Henrique
Capparelli. IV. Embrapa Instrumentação Agropecuária

© Embrapa 2009



AVALIAÇÃO DA ADERÊNCIA BACTERIANA SOBRE FILMES ENZIMÁTICOS PROTÉLÍTICOS PARA APLICAÇÕES EM BIOSSENSORES

Luis C. Morais¹, Tatiane Duarte Mattos², Odilio B.G. Assis², Rubens Bernardes Filho²

¹Universidade Federal do Acre – UFAC, Rio Branco, AC.

²Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP. odilio@cnpdia.embrapa.br

Projeto Componente: PC2

Plano de Ação: 01.05.1.01.02.02

Resumo

Filmes enzimáticos multicamadas foram preparados pela técnica de auto-montagem. Soluções de pepsina, lisozima e tripsina na concentração de 10^{-5} M (em pH 6.4, pH 6.4 e pH 7.6 respectivamente) foram usados como precursores para a formação dos filmes. Os padrões de superfície foram examinados por microscopia de força atômica (AFM) sendo as características anteriores e posteriores a interação com a bactéria (*E. coli*) avaliada. Os resultados indicam que o grau hidrofobicidade tem papel fundamental na adesão da bactéria e que a rugosidade pode ser considerada um fator secundário. A avaliação objetiva usos na confecção de biossensores para alimentos.

Palavras-chave: filmes enzimáticos, proteases, auto-montagem, interação bacteriana.

Introdução

Biossensores podem ser definidos como dispositivos que utilizam um bioreceptor seletivo com afinidade com uma amostra ou analito de interesse. Os bioreceptores (geralmente uma espécie bioquímica tal como anticorpo, oligonucleotídeo ou enzima) são conectados a um transdutor que faz uso do sinal típico do reconhecimento bioquímico e converte o resultado da interação em um sinal mensurável. O uso de enzimas em associação com um eletrodo é um dos mais simples e eficiente tipo de biossensor. Essa configuração faz uso da especificidade de uma reação enzimática com a detecção de um sinal eletroquímico.

Proteases ou enzimas proteolíticas são indicadas para a interação com bactérias considerando que estas têm uma função catalítica que hidrolisa as ligações peptídicas destruindo as estruturas extracelulares das bactérias (BARRET et al., 2003), atividade essa que pode ser interpretada em termos do mecanismo de Phillips (PHILLIPS, 1996), envolvendo uma transferência iônica cujo

Padrão pode ser amplificado e reconhecido. Segundo a literatura a intensidade deste sinal está relacionada com o número de camadas (KOBAYASHI e ANZAI, 2001). A formação de filmes multicamadas sobre um substrato sólido pode ser conseguida pela técnica de auto-montagem (LVOV et al., 1995). Por sua vez, as interações entre filme e bactéria podem ser entendidas, em uma primeira análise, como um fenômeno superficial envolvendo a molhabilidade e adsorção, que são passíveis de avaliação por microscopia e demais técnicas. No presente estudo, três tipos de filmes formados por proteases globulares (lisozima, tripsina e pepsina) em formação multicamadas são caracterizados e suas interações com soluções contendo *E. coli*, são avaliadas usando AFM.

Materiais e métodos

Tripsina (EC 3.4.21.4), pepsina (EC 3.4.23.1) e lisozima (EC 3.2.1.47) foram adquiridas da Sigma-Aldrich Chemical Co. Laminas de vidro (5mm x 10mm x 2mm optical glass plates) foram

quimicamente funcionalizadas pelo método 'piranha' (KERN, 1993). Os filmes foram formados pela imersão direta dos slides tratados nas soluções enzimáticas (10^{-5} M) por 10 min. Os substratos foram então removidos e brevemente lavados em água destilada para a remoção de frações não-aderidas. Após secagem as lamínas foram novamente imersas nas soluções, cujos procedimentos foram repetidos até a formação de 10 camadas de cada material (cada imersão é assumida como formadora de uma camada). As soluções foram obtidas pela dissolução das proteínas em tampão fosfato e pHs ajustados a 7,6 para tripsina e 6,4 para lisozima e pepsina.

Imagens topográficas foram avaliadas por AFM no modo contato (TopoMetrix 2010 Discover System). A avaliação da rugosidade se deu em 5 e 10 camadas em áreas de $3 \times 3 \mu\text{m}$. A espessura foi estimada como a diferença entre regiões do substrato com e sem depósito.

Cultura de bactérias *E.coli* (microorganismo teste) foi crescida a 37°C em meio LB e suspensão preparada com a média de $\sim 10^8$ células/mL, segundo determinação ótica (KOCH, 1994). A suspensão foi centrifugada e os microorganismos dispersos na solução tampão seguido de desagregação em sistema vortex. Depósitos com 10 camadas foram separadamente imersos na suspensão com bactérias por 30min. Após breve lavagem e secagem as lamínas foram analisadas por AFM.

Resultados e discussão

A adsorção de proteínas sobre superfície sólida é frequentemente modelada como uma formação bi-dimensional ordenada com arranjos paralelos à superfície. O principal mecanismo que rege a formação de filme é assumida como a interação eletrostática entre as moléculas das enzimas e a superfície (PASCHE et al., 2005). As propriedades finais de um filme de proteína dependem do volume de moléculas adjacentes à superfície (FIGUEIREDO et al., 2005) e da uniformidade com que essas moléculas ocupam os sítios na superfície. A Tabela 1 apresenta os dados obtidos por AFM. De um modo geral todas as superfícies aparentam estar completamente revestidas, cujos detalhes topográficos podem ser encontrados em MORAIS et al., 2009.

Proteínas globulares tendem a mudar a conformação quando adsorvidas na superfície, normalmente formando filmes de alta densidade (SETHURAMAN et al. 2004). O cálculo da rugosidade realizado sobre os filmes indica que a lisozima forma filmes menos rugoso que as demais. O caráter hidrofílico ou hidrofóbico da superfície é também fundamental na interação com microorganismos. Como registrado, a adesão bacteriana com uma superfície parece ser superior com o aumento do caráter hidrofóbico da superfície (GALLARDO-MORENO et al., 2002; SHENG et al., 2007). Em nossos filmes a superfície de tripsina mostrou ser a mais hidrofóbica (MORAIS et al.,

2009) e os resultados da interação com bactérias confirmam os dados da literatura.

Tabela 1. Dados obtidos para 5 e 10 deposições.

Enzima	5 depósitos		10 depósitos	
	Rugosidade RMS (nm)	Espessura (nm)	Rugosidade RMS (nm)	Espessura (nm)
Lisozima	1,21	17,0	1,06	40,0
Tripsina	1,32	28,0	2,10	40,0
Pepsina	4,25	28,0	5,26	40,0

A Figura 1 apresenta a aparência das superfícies após a interação com a *E.coli* nas quais duas características principais são notadas: regiões de intumescimento e bactérias aderidas à superfície (identificadas na superfície da lisozima, Fig. 1a). Uma contagem direta no número de bactérias aderidas por unidade de área indica para a pepsina $0,034 \pm 0,002$ organismos por μm^2 ; $0,038 \pm 0,005$ para lisozima e $0,097 \pm 0,011$ para a tripsina.

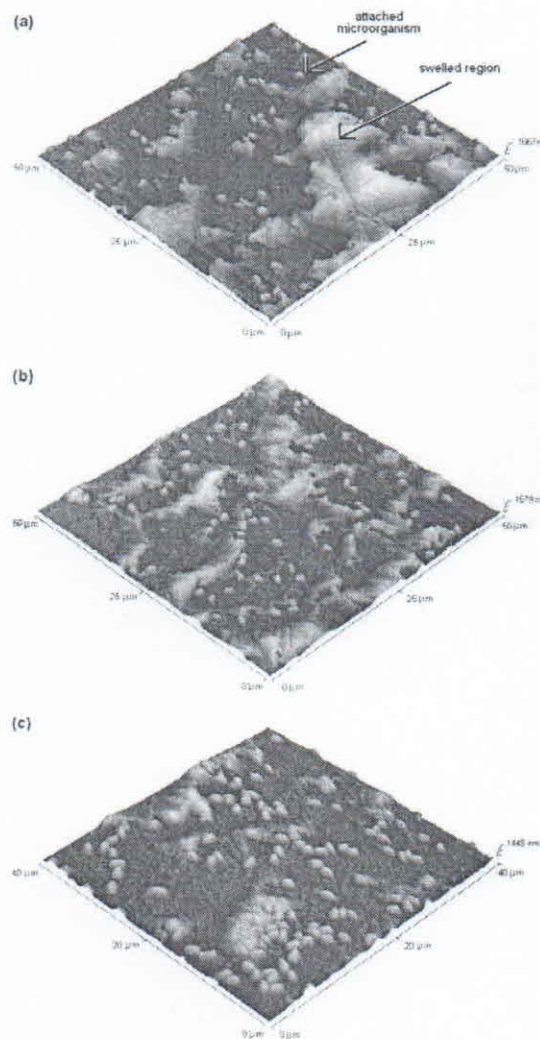


Fig. 1. Exemplos das superfícies enzimáticas após interação com solução contaminada com *E. coli*: (a) pepsina, (b) lisozima e (c) tripsina.

A tripsina é a enzima mais hidrofóbica na qual e a densidade de bactérias aderidas é aproximadamente 3 vezes superior as contadas nas superfícies de lisozima e de pepsina, o que confirma a afinidade de superfícies hidrofóbicas com a *E.coli*.

É importante observar que análises similares realizadas por Silva Jr e Teschke (2005), baseadas em imagens por AFM de *E.coli* imobilizadas sobre mica (suporte altamente hidrofílico) após interação com peptídeo antimicrobiano, observou-se que o rompimento da membrana exterior do microorganismo provoca uma redução da estabilidade de aderência à superfície o que pode interferir em uma contagem precisa sobre os filmes enzimáticos.

Conclusões

Filmes de enzimas proteolíticas como a lisozima, a tripsina e a pepsina podem ser facilmente formados por técnica de auto-montagem. A tripsina é a molécula mais hidrofóbica em comparação com as demais e apresenta comportamento distinto. Observações microscópicas revelam que a lisozima forma filmes menos rugosos enquanto a tripsina atinge uma melhor aderência bacteriana. Os resultados indicam boa relação entre propriedades físico-químicas e interação com *E.coli*, dados que podem ser úteis na seleção de materiais para a confecção de biossensores para a detecção de bactérias em meio aquosos. O próximo estágio deste trabalho é avaliar esses filmes como geradores de sinais quando depositados sobre superfície condutora.

Agradecimentos

CNPq, FINEP/MCT, EMBRAPA.

Referências

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. WOESSNER, J. F. **The Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2nd ed. London: Academic Press, 2003.
FIGUEIREDO, K. C. S.; SALIM, V. M. M.; ALVES, T. L. M.; PINTO, J. C. **Adsorption**, [S. l.], v. 11, p. 131-138, 2005.
GALLARDO-MORENO, A. M.; GONZALEZ-MARTÍN, M. L.; PÉREZ-GIRALDO, C.; BRUQUE, J. M.; GÓMEZ-GARCÍA, A. C. **Appl Environ Microbiol.**, [S. L.], v. 68, p. 5784-5787, 2002.
KERN, W. Overview and evolution of semiconductor wafer contamination and cleaning technology. In: KERN, W. (Ed.). **Handbook of Semiconductor Wafer Cleaning Technology**. New Jersey: [S. l.], 1993. p. 3-67
KOBAYASHI, Y.; ANZAI, J. J. **Electroanal. Chem.** Amsterdam, v. 507, p. 250-255, 2001.

KOCH, A. L. Growth Measurement. In: GERHARDT, P. et al. (Ed.). **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1994. p. 248-277.
LVOV, Y.; ARIGA, K.; ICHINOSE, I.; KUNITAKE, T. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 117, p. 6117-6123, 1995.
MORAIS, L. C.; BERNARDES-FILHO, R.; ASSIS, O. B. G. **World J. Microbiol., Biotechnol.**, Oxford, v. 25, p. 123-129, 2009.
PASCHE, S.; VÖRÖS, J.; GRIESSER, H. J.; SPENCER, N. D.; TEXTOR, M. **J. Phys. Chem. B.**, Washington, v. 109, p. 17545-17552, 2005.
PHILLIPS, D. C. **Sci. Am.**, New York, v. 215, p. 78-90, 1996.
SETHURAMAN, A.; HAN, M.; KANE, R. S.; BELFORT, G. **Langmuir**, Washington, v. 20, p. 7779-7788, 2004.
SHENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEN, S. O. **J Colloid Interface Sci.**, New York, v. 310, p. 661-669, 2007.
SILVA, JR., A.; TESCHKE, O. **World J. Microbiol., Biotechnol.**, Oxford, v. 21, p. 1103-1110, 2005.