XXV Congresso de Iniciação Científica da Unicamp

18 a 20 Outubro Campinas | Brasil

Identificação e classificação de bactérias do gênero *Gordonia* empregando espectroscopia Raman intensificada por superfície e ferramentas quimiométricas

João P. F. Bertacchi*, Javier L. Villa, Ronei J. Poppi.

Resumo

Um aprimoramento nos métodos de identificação de bactérias é de vital importância quando se deseja criar novos métodos de bioprospecção e proteção ambiental. Atualmente há uma ampla variedade de testes biológicos disponíveis para a identificação de bactérias; no entanto, muitos destes são demorados, laboriosos e requerem equipamentos de alto custo e pessoal bem treinado. Além disso, a identificação de bactérias de um mesmo gênero pode envolver um grande desafio devido às suas similaridades genéticas. Este projeto visa identificar e classificar bactérias de um mesmo gênero (*Gordonia*) empregando espectroscopia Raman-SERS aliada a ferramentas quimiométricas como PCA, HCA e MCR-ALS.

Palavras-chave: SERS, Bactérias, Quimiometria

Introdução

O gênero *Gordonia*, pertencente ao filo dos actinomicetos, possui uma grande diversidade de espécies e grande variabilidade metabólica e tem demonstrado potenciais aplicações biotecnológicas^{1,2}. A espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS, do inglês *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) apresenta-se como excelente alternativa às limitações da espectroscopia Raman normal, uma vez que é capaz de incrementar a eficiência do espalhamento inelástico da radiação de moléculas adsorvidas na superfície de nanoestruturas metálicas (substratos SERS), comumente de ouro ou prata³. Apesar da especificidade do SERS, os espectros provenientes de sistemas biológicos são de alta complexidade, dificultando a identificação das bactérias e necessitando da utilização de ferramentas quimiométricas. Assim, métodos de classificação bem estabelecidos tais como a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) ou a análise de agrupamentos hierárquico (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) podem ser utilizados para este propósito^{6,7}. Este projeto teve como objetivo a identificação e classificação de bactérias do gênero *Gordonia* utilizando espectroscopia Raman intensificada por superfície. Tendo sido finalizado em seu primeiro semestre, com a entrega do relatório parcial, não permitiu que os resultados das análises fossem replicadas para análise quimiométrica.

Resultados e Discussão

Foram realizadas as culturas das células em diferentes meios, visando a caracterização das possíveis diferenças nos espectros SERS devidas às diferenças na disponibilidade de nutrientes. Para a obtenção dos espectros Raman-SERS, amostras de 1-5 mg foram retiradas das placas de cultura (após dois dias de crescimento), diluídas em 50 µL de água Milli-Q e a esta amostra, 5 µL de ouro coloidal pré-concentrado (50x) foram ressuspensos. As amostras ressuspensas foram depositadas para secagem sobre placa de alumínio. A análise Raman foi realizada no equipamento *Perkin Elmer RamanStation 400F Series* com uma fonte de excitação laser (infravermelho próximo, 785 nm e potência máxima de 250 mW), resolução mínima de 2 cm⁻¹ e um detector CCD operando a -50°C. Os espectros

pontuais foram obtidos entre 400-2200 cm⁻¹ por 10 exposições ao laser de 10 segundos cada. À partir dos espectros obtidos (Figura 1) pode-se observar a presença de regiões específicas dos espectros que permitem a diferenciação das bactérias. Ex: 800-1200 cm⁻¹ e 1400-1800 cm⁻¹.

Figura 1. Espectros Raman-SERS obtidos para bactérias cultivadas nos meios: (a) Oatmeal-Agar e (b) Yeast extract-malt extract-agar. Os espectros mostrados referem-se de cima para baixo às espécies *Gordonia rhizosphaera*, *Gordonia bronchialis*, *Gordonia lacunae* e *Gordonia terrae*.

Conclusões

Observou-se à partir dos experimentos realizados que há a possibilidade de identificação de regiões dos espectros Raman-SERS onde seria possível diferenciar as espécies de bactérias do gênero *Gordonia*, entretanto, não foram realizadas as análises quimiométricas que permitiriam identificar e classificar essas bactérias.

Agradecimentos

Agradecemos à Dra. Fabiana F. Garboggini do CPQBA pelo fornecimento das bactérias da CBMAI, à professora Dra. Anita J. Marsaioli pelo fornecimento da infraestrutura do LaBioSin para o cultivo das bactérias e o financiamento do CNPq.

¹ A. Linos, A. Steinbuchel, C. Sproer and R. M. Kroppenstedt, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, **49**, 1785–1791.

² K. T. Thompson, F. H. Crocker, H. L. Fredrickson and a P. P. L. E. N. M. Ierobiol, *Appl. Environmental Microbiol.*, 2005, **71**, 8265–8272.

³ W. E. Doering, M. E. Piotti, M. J. Natan and R. G. Freeman, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 3100–3108.

⁶ S. Stöckel, J. Kirchhoff and U. Neugebauer, *J. Raman Spectrosc.*, 2016, **47**, 89–109.

⁷ I. S. Patel, W. R. Premasiri, D. T. Moir and L. D. Ziegler, *J. Raman Spectrosc.*, 2008, **39**, 1660–1672.