

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

TESE

Doutoranda: Msc. Maria Joyce dos Santos Silva

Orientadora: Prof.^aDr.^a Kelly Cristina da Silva Brabes

Co-orientador: Prof. Dr. Evaristo Alexandre Falcão

Programa: Ciência e Tecnologia Ambiental

**ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E DE INFRAVERMELHO POR
TRANSFORMADA DE FOURIER NA RÁPIDA DIFERENCIAÇÃO DE CEPAS DE**
Alkalihalobacillus clausii e Bacillus thuringiensis.

Dourados, 2023

MARIA JOYCE DOS SANTOS SILVA

Orientadora: Prof.^aDr.^a Kelly Cristina da Silva Brabes

Co-orientador: Prof. Dr. Evaristo Alexandre Falcão

**ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E DE INFRAVERMELHO POR
TRANSFORMADA DE FOURIER NA RÁPIDA DIFERENCIAÇÃO DE CEPAS DE
Alkalihalobacillus clausii e *Bacillus thuringiensis*.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia Ambiental na Área de Concentração em Ciência Ambiental.

DOURADOS– MS

2023

Peço, Entrego, Confio, Aceito e Agradeço.

“Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.”

(O pequeno príncipe)

A Deus, por ter me guiado até aqui, em todos os momentos de minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS A CAPES

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES).

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio, sustento e fortaleza, por ter me guiado, amparado, protegido e iluminado até aqui, em todos os momentos de minha vida, no meu caminhar sempre. Peço que continue sendo o centro da minha vida, pois só dependo de ti para viver. Tuas mãos me sustentaram e sou eternamente grata por essa grande graça recebida. Minha eterna adoração a ti. Obrigada meu Deus. Te amo.

À minha Santa Mãe Maria, por toda intercessão e mediação, obrigada minha Nossa Senhora, por me sustentar em todas as situações. Ao meu santo de devoção São Padre Pio de Pietrelcina, por me auxiliar quando mais precisei e me aceitar como filha espiritual. A vocês, minha eterna veneração.

Gratidão a mim mesma, por nunca ter pensado em desistir, pelas incontáveis horas de experimento e escrita onde sempre me mantive firme, apesar de todo estresse, cansaço físico e psicológico, altos e baixos, choros e risos sempre acreditei na minha capacidade e força. Eu fui, sou e sempre serei capaz, pois muitas vezes as coisas acontecem paralelamente a importância que damos a elas. Eu acreditei neste grande sonho.

Aos meus pais, pelos valores e ensinamentos dedicados. Agradeço por estarem ao meu lado sempre, por não me deixarem desistir diante dos obstáculos e estarem sempre acreditarem na minha capacidade.

Ao amor da titia, minha bebê tão doce, calma e linda, como sou grata a Deus por ter recebido você, meu presente maravilhoso, que delícia que é te amar, minha joia. Tia te amo infinitamente. Isis, você é dona do meu coração.

Àqueles que não mais presentes nesta vida, mas que fizeram parte da minha história, meus avôs Euclides Alves, Irene Lima e Elio Ferreira e meus grandes amigos Pedro Lucas, Ivan Andrade e Reginaldo Nascimento que vocês estejam com Deus! Em Paz!

Aos meus bichos, Paçoca e Pudim, meus gatos que tanto amo, por fazerem parte da minha vida e me ajudam tanto emocionalmente em momentos repletos de carinho, brincadeiras e descontração. Eu amo infinitamente vocês!

Aos meus amigos/irmãos/amores de alma e coração Marco Antonio Cabrera, Thais André, Wellington Rodrigues e Val Lima (titia) por todas as conversas, palavras de apoio, de

ajuda e motivação, pelos momentos incríveis vivenciados durante estes anos. Sou e sempre serei eternamente grata a Deus por ter me dado vocês. Com certeza, vocês fazem parte desta conquista. Amo vocês.

À minha família, avó, irmão, sobrinho de coração, cunhada, tios e tias, primos e primas pelas palavras de apoio e incentive que sempre me motivaram a seguir.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade da realização deste curso e pelo aprendizado.

À secretaria da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados, pela ajuda com todos os documentos facilitando toda parte burocrática do mestrado.

À Profª Drª Kelly Cristina da Silva Brabes, com muita gratidão, por ter me recebido e acreditado na minha capacidade. Pela amizade, paciência e todo conhecimento transmitido. Obrigada por ter confiado em mim! Xu, você mora no meu coração.

O Prof. Dr. Evaristo Falcão meu coorientador, por ter acreditado nos meus sonhos. Pela parceria e todo conhecimento transmitido em aula e nas técnicas de espectroscopia. Gratidão.

Ao colega de Doutorado e amigo de laboratório Domingos Ferreira pela troca de conhecimento, apoio mútuo e momentos compartilhados. À minha amiga de rolês e escrita Michele Barbosa por toda ajuda na interpretação e discussão dos resultados, pela cumplicidade e parceria. Gratidão amiga. Você faz parte dessa conquista.

À todas as técnicas da Faculdade de Ciências da Saúde. Sentirei, imensamente, saudade de cada um de vocês. A todos os colegas do LPCS pela parceria no horário de almoço, nos momentos de descontração, momentos como estes foram fundamentais nos dias cansativos de análises.

Aos técnicos do Laboratório de Óptica aplicada por toda ajuda nos Análises de Fluorescência e FT-IR, foi de grande aprendizado as semanas que passamos juntas! Grata!

Ao técnico William Falco, pela paciência e toda ajuda com as análises de fluorescência e absorção de UV-Vis. Meu muito obrigada.

À todas as pessoas que, de alguma forma, nos momentos serenos e apreensivos, fizeram parte dessa trajetória. Agradeço de coração. Que sejam recompensados a altura.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S586e Silva, Maria Joyce Dos Santos
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E DE INFRAVERMELHO POR
TRANSFORMADA DE FOURIER NA RÁPIDA DIFERENCIAÇÃO DE CEPAS DE
Alkalihalobacillus clausii e Bacillus thuringiensis. [recurso eletrônico] / Maria Joyce Dos Santos
Silva. -- 2024.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Prof.a Dr.a Kelly Cristina da Silva Brabes .
Coorientador: Prof. Dr. Evaristo Alexandre Falcão .
Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da Grande
Dourados, 2023.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Fluorescência. 2. FT-IR. 3. Caracterização Bacteriana. I. Brabes, Prof.a Dr.a Kelly Cristina
Da Silva. II. Falcão, Prof. Dr. Evaristo Alexandre. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

UV-vis	–	Ultravioleta visível
FT-IR	–	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
°C	–	grau Celsius
NaCl	–	Cloreto de sódio
pH	–	Potencial Hidrogenio
H ⁺	–	Hidrogenio
OH ⁺	–	íons hidróxidos
DNA	–	cido Desoxirribonucléico
RNA	–	cido Ribonucléico
UFC	–	Unidade Formadora de Colnia
(S ₀)	–	Estado eletrônico fundamental de energia
(S ₁ e S ₂)	–	Estado eletrônico excitado singlete
(T ₁)	–	Triplete
(R ₁)	–	Intensidade do feixe de referência
nm	–	Nanmetro
T%	–	Transmitância
A	–	Absorvncia
<i>I</i> _o	–	Intensidade da luz incidente
<i>I</i>	–	Intensidade da luz transmitida
Cm	–	Centímetro
Mm	–	Micrmetro
3D	–	Tridimensional
Trp	–	Triptofano
MEE	–	Matriz de Excitação-Emissão.

LISTA DE FIGURAS E TABELA.

Figura 1: Análise de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis).	24
Figura 02: A) Diagrama parcial de energia para um sistema fotoluminescente. B) Estados eletrônicos dos spins nas moléculas.....	26
Figura 03: Emissão de Fluorescência de Bactéria em 266 nm de excitação.....	28
Figura 04: Efeito da diferença de pH (A) e temperatura (B) na emissão espectral do triptofano.....	30
Figura 05: Tempo de vida de fluorescência de rotâmetros do Triptofano.....	31
Figura 06: Diagrama esquemático de um espectro de FT-IR.....	33
Figura 07: Espectro típico de 5 espécies de <i>Bacillus</i> com regiões de maior interesse na identificação e análise microbiológica.....	34
Figura 8: Análises por FT-IR (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier) de a) <i>A. clausii</i> e b) <i>B. thuringiensis</i>	35
Figura 9: Fluorescência do Triptofano de <i>A. clausii</i> and <i>B. thuringiensis</i>	35
Tabela 1: Correspondência entre os picos de emissão das espécies <i>A. clausii</i> e <i>B. thuringiensis</i>	36
Tabela 2: Análise das Regiões Espectrais entre <i>A. clausii</i> e <i>B. thuringiensis</i>	40

RESUMO

A busca por metodologias de identificação microbiológica mais rápidas, econômicas e de alta especialidade tem feito pesquisadores buscarem na espectroscopia um potencial método. Este trabalho teve como objetivo encontrar na espectroscopia de fluorescência e na espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) uma metodologia alternativa de análise na identificação de compostos orgânicos das espécies analisadas. As análises partiram de uma diluição definida através do *Cell Density Meter* e da Escala de Mac Farland. Os resultados obtidos na espectroscopia de fluorescência na região espectral analisada podem apresentar sobreposição de modulações relacionadas a diversos compostos como o triptofano, além de compostos que fazem parte do processo de esporulação visto que pode conter bastonetes em sua fase vegetativa e/ou esporulada nas amostras analisadas. Já os resultados da espectroscopia de infravermelho permitiram concluir a presença de aminoácidos, proteínas e peptídeos nos espectros de FT-IR na faixa de 1540 a 1660 cm^{-1} estes resultados evidenciaram a semelhança da composição orgânica dos grupos funcionais (Amidas I e II) entre as espécies estudadas. Nos mapas 3D gerados é possível observar uma intensidade de fluorescência na região de 300 - 400 nm nos espectros MEEs, além disso, observa-se que na análise do *Alkalihalobacillus clausii* essa intensidade é maior quando comparada com o mapa da análise do *Bacillus thuringiensis*. O presente estudo permitiu concluir que há uma maior concentração do composto investigado (o triptofano) nos resultados da análise do *A. clausii* quando comparado a análise do *B. thuringiensis*, através dos espectros MEEs." "Dessa forma, é evidenciada uma proximidade nos resultados presença de triptofano com uma diferença entre as espécies (concentração do composto), permitindo assim, a utilização da técnica para caracterização do triptofano na rápida identificação de *Bacillus*."

Palavras-chave: Fluorescência; FT-IR; Caracterização Bacteriana;

ABSTRACT

The search for faster, more economical, and specialized methodologies for microbiological identification has led researchers to explore spectroscopy as a potential method. This study aimed to find an alternative methodology for analyzing the identification of organic compounds in the analyzed species using fluorescence spectroscopy and Fourier-Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. The analyses started from a defined dilution through the Cell Density Meter and the Mac Farland Scale. The results obtained in the fluorescence spectroscopy in the spectral region analyzed may show overlapping modulations related to various compounds such as tryptophan, as well as compounds that are part of the sporulation process since it can contain rods in its vegetative and/or sporulated phase in the analyzed samples. The results of the infrared spectroscopy allowed to conclude the presence of amino acids, proteins, and peptides in the FT-IR spectra in the range of 1540 to 1660 cm^{-1} . These results highlighted the similarity of the organic composition of functional groups (Amides I and II) among the studied species. In the generated 3D maps, it is possible to observe a fluorescence intensity in the region of 300 - 400 nm in the MEE spectra, and it is also observed that in the analysis of *Alkalihalobacillus clausii*, this intensity is higher when compared to the analysis map of *Bacillus thuringiensis*. The present study allowed us to conclude that there is a higher concentration of the investigated compound (tryptophan) in the results of the *A. clausii* analysis compared to the *B. thuringiensis* analysis through the MEE spectra. Thus, the presence of tryptophan is evidenced with a difference between the species (concentration of the compound), allowing the use of the technique for the characterization of tryptophan in the rapid identification of Bacillus.

Keywords: Fluorescence; FT-IR; Bacterial Characterization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. JUSTIFICATIVA.....	17
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
4.1 <i>Alkalihalobacillus clausii</i>	18
4.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
4.3 Composição da célula bacteriana	18
4.4 Técnicas convencionais e técnicas alternativas	20
4.5 Breve história da espectroscopia associada a biologia	21
5. TURBIDIMETRIA.....	23
6. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	24
6.1 Potencialidade da técnica de Fluorescência na identificação de compostos.....	27
6.2 Luminescência.....	28
6.3 Mapas 3D.....	31
7. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER FT-IR.....	32
7.1 Potencialidade da técnica de FT-IR na identificação de compostos.....	34
8. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
8.1 Análise das espécies.....	37
8.2 Análise das Regiões Espectrais.....	39
9. CONCLUSÃO.....	41
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Há diferentes formas de identificação bacteriana, dentre elas a identificação bioquímica e molecular, no entanto, estas são técnicas muitas vezes demoradas e onerosas. Sugiro: Técnicas envolvendo espectroscopia estão em constante aprimoramento e com aplicabilidade na identificação e na enumeração de espécies microbianas nas mais diversas amostras. A interação entre a radiação eletromagnética e a matéria possui alta correlação estatística com técnicas convencionais como as bioquímicas e principalmente as moleculares, destacando ainda como justificativa o tempo rápido de resposta e por não serem invasivas, além de não afetar ou destruir as amostras (KAROUI, et al., 2020)."

A contaminação microbiológica é um problema para diversas áreas, médica, farmacêutica, tecnologia de processamento de alimentos dentre outras. Para todos esses campos, a identificação de micro-organismos patogênicos e não-patogênicos é de grande necessidade. As técnicas convencionais baseiam-se em avaliações morfológicas e na capacidade de desenvolvimento dos micro-organismos (BIZZINI et al., 2010).

O uso das tecnologias para a detecção, identificação e quantificação da microbiota denominada métodos microbiológicos rápidos, quando comparada com os métodos de referência por apresentarem resultados em menor tempo e tem chamado atenção de pesquisadores. Em razão disso, além de diminuir o tempo de análises, a metodologia pode antecipar a tomada de decisão, além de apresentar precisão e sensibilidade nos resultados. Contudo, as dificuldades em analisar, validar e obter a aprovação destas novas técnicas junto aos órgãos regulatórios tem atrasado suas implantações, pois, as equivalências diante de métodos oficiais precisam ser correlacionadas estatisticamente (HILINSKI, et al., 2020).

O ramo de estudo da microbiologia vai além do estudo dos micro-organismos microscópicos e sua capacidade em causar infecções e intoxicações, mas considera também as inúmeras formas de identificação e quantificação dos agentes etiológicos (MARANNI, et al., 2019).

Espectroscopia é aplicada a métodos analíticos de diversos materiais, a partir da interação de radiações eletromagnéticas com a matéria gasosa, sólida ou líquida, variando no espectro eletromagnético nas faixas do ultravioleta, do visível e infravermelho. A espectroscopia oferece alta sensibilidade à presença de moléculas fluorescentes em matrizes orgânicas e inorgânicas. Além disso, permite a investigação de fluoróforos (RAMONA, et al., 2023).

Logo, a interação ocorre por absorção, espalhamento, emissão e reflexão da radiação incidente. O espectro formado mostra através de gráficos a interação de espalhamento, absorção ou emissão da radiação em decorrência do comprimento de onda da radiação (MOURA, 2017).

A técnica de espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier FT-IR complementarmente tem contribuído na identificação e caracterização de micro-organismos de relevância para saúde pública, alimentar dentre outras áreas. Objetivamente a espectroscopia de infravermelho estuda a interação da radiação da interação infravermelha com a matéria e essa interação entre energia e as moléculas presentes na amostra fornecem informações sobre os grupos funcionais a compõem. Considerada uma técnica não destrutiva, que com pouca massa celular é possível a investigação rápida e precisa. (CARVALHO, et al, 2013).

Muitas moléculas endógenas, como proteínas, vitaminas, coenzimas de bactérias são fluorescentes, tornando a espectroscopia de fluorescência uma técnica valiosa para a determinação de deterioração microbiana. Essa análise também é bem conhecida por sua excelente sensibilidade, seletividade e rapidez. Na atualidade existem vários tipos de espectroscopias combinadas a outros métodos, cada uma com suas compatibilidades em aplicações e amostras específicas (MERICI, 2014).

Técnicas de diluições seriadas da massa celular retirada do desenvolvimento microbiano ou do ambiente como a escala de Mc Farland e/ou a Técnica de UV-VIS também tem se

mostrado necessária e funcional em análises de espectroscopia, visto que os valores quantitativos são de interesse e colaboram com o melhor qualidade dos resultados, além de auxiliar no desenvolvimento da técnica que necessita de uma melhor absorvência ou transmitância da amostra em análise e por fim evitando o saturamento dos resultados finais.

O desenvolvimento de técnicas que possibilitam uma varredura da composição química e estrutural do micro-organismo e que permita uma comparação das semelhanças (gêneros) e diferenças (espécies) destas amostras auxiliará em diagnóstico, em aplicações de determinados micro-organismos, compostos ou enzimas, dentre diversas outras atividades. Técnicas de espectroscópicas tendem a oferecer resultados precisos e em curto tempo, além de baixo custo e confiabilidade.

As buscas por novas metodologias de processamento de imagens resultam em grandes aplicações nos aspectos da tecnologia e da ciência. O processamento dessas imagens são ferramentas de recursos específicos que podem ser usados para fins de classificação e de identificação de espécies (WOZNIAKA, et al., 2018).

Culturas com pequeno número de células e com pouco tempo de cultivo, entre 12 a 14 horas podem ser analisadas e identificadas de forma segura, permitindo diversos estudos. Essas informações se dão a partir de um espectro correlacionando as vibrações moleculares dos compostos celulares (proteínas, lipídios e carboidratos, por exemplo) fornecendo assim, valores quantitativos e qualitativos sobre a composição química do micro-organismo estudado. A interpretação dos resultados para uma correta identificação e caracterização se dá a partir de uma avaliação completa dos espectros observando suas similaridades e diferenças da composição química dos micro-organismos verificados e os dados de alta qualidade são pré-requisito para análises computacionais complementares.

Com isso, este trabalho teve como objetivo analisar os resultados das técnicas de Espectroscopia de Fluorescência e Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier FT-IR em análises microbiológicas para identificação de grupos funcionais presentes na constituição química e molecular observando suas similaridades e diferenças entre as espécies, buscando a possível identificação dos micro-organismos estudados e a validação das técnicas espectroscópicas na identificação de compostos orgânicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Correlação de métodos na rápida identificação de *Alkalihalobacillus clausii* isolados de Enterogermina® e *Bacillus thuringiensis* isolados de inseticidas biológicos por análises de Espectroscopia de Fluorescência e Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier FT-IR.

2.2 Objetivos Específicos

- Utilização da Escala de McFarland e da Técnica de UV-VIS para determinação da melhor concentração da população microbiana das espécies estudadas;
- Diferenciação da composição orgânica de *Alkalihalobacillus clausii* e *Bacillus thuringiensis* por Espectroscopia de Fluorescência;
- Comparação dos mapas 3D de *Alkalihalobacillus clausii* e *Bacillus thuringiensis*;
- Diferenciação da composição orgânica de *Alkalihalobacillus clausii* e *Bacillus thuringiensis* por Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier FT-IR;

3. JUSTIFICATIVA

Os métodos clássicos de identificação microbiana através de análises morfológicas e bioquímicas e as identificações moleculares, são técnicas demoradas e onerosas. Desta forma, a busca por novas metodologias de identificação microbiológicas mais rápidas, com custos menores e que possibilite uma identificação precisa, com pouca quantidade de massa celular trazem maior eficiência ao trabalho.

Estes métodos de identificação da composição química e molecular dos microorganismos e o isolamento destes compostos podem ser aplicados em diversas áreas como: medicina, construção civil, além da intervenção rápida em casos de surtos de infecção e/ou intoxicação alimentar oriunda de bactérias patogênicas relacionadas a contaminação de alimentos por saúde pública.

Os casos citados acima despertam o interesse na investigação da composição através das análises de espectros oriundos de pesquisas realizadas com bactérias patogênicas ou não-patogênicas por técnicas espectroscópicas e a possível comparação destes resultados na busca por semelhanças e diferenças podendo assim relacionar gêneros e distinguir espécies dos microorganismos com uma avaliação completa dos espectros, observando os dados de alta qualidade e posteriormente uma análise computacional complementar por meio de softwares.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 *Alkalihalobacillus clausii*

Alkalihalobacillus clausii é uma bactéria móvel flagelada, Gram-positiva, formadora de endósporo, aeróbio facultativo e catalase-positiva, não patogênica, que tolera meios alcalinos, possui um crescimento na faixa de 30 a 50°C, em ambientes de salinidade de até 10% de NaCl e em pH de 7 a 10,5. É frequentemente encontrada como componente da microbiota do solo e algumas de suas propriedades utilizadas para a aplicação em campos industriais e biotecnológicos (BREED, et al., 1957). A bactéria *Alkalihalobacillus clausii* anteriormente conhecida como *Bacillus clausii* teve seu nome alterado em 2022 (MAITY, et al., 2022).

A. clausii (basiônimo *B. clausii*) restabelece o equilíbrio da microbiota residente e pode, conseqüentemente, ser usada para o tratamento e prevenção da disbiose intestinal, como observada durante o tratamento com antibióticos ou quimioterapia, ou em pacientes com avitaminose endógena (NAVARRA, 2021) como é resistente à maioria dos antibióticos, sua eficácia não é alterada pela antibioterapia concomitante. Atualmente, as cepas de diferentes formulações (frascos líquidos ou cápsulas liofilizadas) contém as cepas derivadas da ATCC 9799 e apresentam resistência a condições físicas e químicas e a antibióticos (CASTRO, et al 2019).

4.2 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é um bastonete, Gram-positivo, formador de endósporos, é considerado um entomopatógeno de grande sucesso econômico, devido sua atividade

biopesticida (BREED, et al., 1957; FUENTES, et al., 2021). Apresenta uma grande capacidade de produzir cristas parasporais, que são compostos de proteínas Cry e Cyt tóxicas contra um número crescente de espécies de insetos (ARRIZABALAGA, et al., 2020). Isso justifica a utilização em grande escala deste micro-organismo como bioinseticida na agricultura.

A identificação de *B. thuringiensis* é altamente necessária, visto que, há uma grande semelhança genética com outras espécies do gênero *Bacillus* (ALKASSAB, et al., 2022).

4.3 Composição da célula bacteriana

Bactérias podem ser encontradas isoladas ou em associação. Sua morfologia é classificada em quatro tipos básicos: células esféricas ou cocos, células em forma de vírgulas ou vibriões, células em forma de espiral ou espirilos e células em forma de bastonetes ou bacilos. Bacilos podem apresentar-se em pares conhecidos como os diplobacilos ou em cadeias, os estreptobacilos (SANTOS, 2021).

A família *Bacillaceae* tem como característica principal produção de endósporos circulares, ovalados (elipsóide) ou cilíndrico, estruturas que ao serem expostas a luz apresentam alto índice de refração. Gram-positivas, a grande resistência não usual do endósporo desperta grande interesse sobre o estudo do gênero. Além da gama de características do gênero ser expressiva, algumas espécies são produtoras de antibióticos, heterotróficas nitrificantes, desnitrificantes e precipitadoras de íons de ferro, quimiolitotróficas facultativas, alcalófitas, psicrófilas dentre outras características. Quanto mais se estuda sobre o gênero *Bacillus*, mais se descobre a diversidade. Pesquisas mostram que há uma grande variabilidade molecular entre os gêneros, inclusive entre cepas de uma mesma espécie. Na atualidade, apenas o sequenciamento do DNA a forma mais precisa de identificação e classificação desses micro-organismos (SANTOS, 2021).

A água desempenha papel fundamental pois compõe de 65 a 75% da célula, por ser uma molécula polar e coesiva exerce funções químicas e físicas fundamentais na célula, além de separar e dissociar outras moléculas, ela tem o papel de reagente em reações químicas recombinando o hidrogênio (H^+) e íons hidróxidos (OH^+). A presença de pontes de hidrogênio na água faz com que ela interaja com macromoléculas. Dentre as macromoléculas presentes na célula bacteriana estão as proteínas, o DNA e o RNA (ABREU, et al., 2012).

A Composição bioquímica da célula bacteriana apresenta os seguintes valores de macromoléculas em peso seco, 55% de proteínas, 21% de RNA, 9% de lipídios, 5% de polissacarídeo e 3% de DNA e lipopolissacarídeos. A grande quantidade de proteína em Bactérias se dá pela presença das proteínas em diversas organelas como membranas biológicas, enzimas, hormônios dentre outros. Células bacterianas apresentam uma diversidade biológica decorrente de sua diversidade bioquímica. Grupos funcionais, átomos, moléculas, íons, compostos orgânicos e inorgânicos estão distribuídos em grupos ou isolados oferecendo assim diferenças e semelhanças entre os seres vivos (SANTOS, et al., 2019).

As macromoléculas identificadas nas células se dão a partir da associação química de grupos funcionais e compostos químicos de várias naturezas e ricos em carbono. Dentre os grupos funcionais de importância bioquímica estão o ácido carboxílico, aldeído, álcool, a amina, o éster e o fosfato (SANTOS, et al., 2019).

4.4 Técnicas de identificação microbiana aprovadas e técnicas alternativas

O cultivo microbiológico tradicional é o método mais utilizado no Brasil para detecção de patógenos bacterianos, que inclui o enriquecimento em caldos seletivos, isolamento em meios sólidos e identificação de colônias por testes sorológicos e bioquímicos. Em diagnósticos clínicos e pesquisas acadêmicas, a identificação e isolamento de bactérias estão baseados nas características fenotípicas, como a coloração de Gram. Com isso, são rotulados como análises caras e que demandam bastante tempo para identificação de gêneros ou espécies. No geral são técnicas que permitem a identificação bacteriana com precisão (REIS, et al., 2021; BIZZINI et al., 2010).

Na microbiologia, métodos de coloração são usados para diferenciar os dois grandes grupos de bactérias, gram-positivas e negativas, sem identificação de espécies. Os meios cromogênicos, por exemplo, isolam e identificam alguns dos micro-organismos relacionados a patologia humana, porém não conseguem identificar a nível de espécies. A grande dificuldade que ainda existe é o tempo de identificação solicitando no mínimo cinco dias, onde as técnicas de espectroscopia realizariam esta identificação em um tempo muito menor, cerca de 26 horas (GIANA et al., 2003).

Estudos embasados por técnicas genômicas e moleculares têm demonstrado um novo olhar para composição química e estrutural de micro-organismos. Porém, não elimina a

necessidade de métodos habituais baseados na morfologia das bactérias analisadas e suas características nutricionais e bioquímicas para identificação e caracterização (ABREU, 2012).

Métodos de identificação deveriam ser mais rápidos, já que um único organismo patogênico pode ser uma dose infecciosa. Novas metodologias como as espectroscopias de FT-IR e de fluorescência estão sendo estudadas e avaliadas quanto a capacidade de identificação rápida e confiável (ROSCH et al., 2005). A técnica de espectroscopia é a emissão de luz em determinados comprimento de onda sob a excitação de luz ultravioleta ou visível, que possui alta sensibilidade em comparação com outros métodos não destrutivos (WANG, et al., 2023).

Muitas técnicas e métodos para avaliação e detecção de micro-organismos são consideradas tradicionais, demoradas, tediosas e trabalhosas. As técnicas espectroscópicas superaram algumas destas desvantagens, podendo suplementá-las ou substituí-la. Características como alta especificidade, custo-efetivo, não invasivo, não destrutivo e resposta rápida explicam o crescente interesse por técnicas espectroscópicas, que vem mostrando grande potencial para a detecção de patógenos e contaminação externa (CHENG et al, 2013).

4.5 História da espectroscopia associada a biologia

Há 200 anos, aproximadamente, iniciou-se as pesquisas com espectroscopia de infravermelho, quando William Herschel descobriu a região do infravermelho no espectro eletromagnético em 1800 (PYLE, et l., 1999).

Porém, só após 100 anos que Coblenz (1911) juntamente com Stair (1935) fizeram várias publicações que seguiram na identificação de compostos biológicos até que Andall et al., (1951, 1952), Stevenson e Bolduan (1952), Levine et al., (1953) entre outros, observaram diferenças significativas nos espectros de absorção no infravermelho de várias bactérias (ROSELLE, et al., 1998). Eles evidenciaram a possibilidade de identificação de materiais biológicos através da espectroscopia de infravermelho, uma grande descoberta para a época (PYLE, et l., 1999).

A espectroscopia de infravermelho se encaixa nas análises espectroscópicas na identificação e classificação de bactérias como uma das mais inovadoras e eficientes ferramentas nos últimos anos, devido seu alto nível de sensibilidade e precisão nos resultados, possibilitando a identificação de compostos biológicos (NAUMANN, 1984). Posteriormente,

diversos pesquisadores embasaram suas pesquisas com a análise para identificação e classificação de micro-organismos, em especial bactérias (BEATTIE, 1998).

Outros trabalhos relacionados com a identificação de bactérias (Ammor et al., 2004; Leblanc et al., 2002) foram realizados com a separação de bactérias a partir de uma cultura pura de leveduras, enfatizando que metodologias tradicionais e convencionais da microbiologia podem levar a erros de taxonomia. Também ocorreram diferentes estudos sobre identificação entre espécies de micro-organismos pertencentes a diferentes famílias taxonômicas (GIANA, et al., 2003).

No entanto, somente nas duas últimas décadas que a técnica tem sido estudada e utilizada para classificação, identificação e caracterização de amostras microbiológicas e isso só tem se tornado possível devido ao método de Transformada de Fourier poder associar-se a técnicas computacionais. Hoje existem vários tipos de análises que são utilizadas na identificação de compostos biológicos, como a ressonância magnética nuclear, técnicas fotométricas como Raman, de massa dentre outras (ABREU, et al., 2012).

Embora a FT-IR tenha sido usada na década de 80 como ferramenta analítica para compreensão das características estruturais em biomoléculas, foi apenas na década de 90 que ela foi usada pela primeira vez na tentativa de identificação de bactérias (GHOSH, 2015).

Nelson (1985), em alguns estudos propôs o uso de fluorescência como uma rápida identificação bacteriana. O uso de espectroscopia de fluorescência multiexcitação seria de grande utilidade na microbiologia, pois, ela permitiria a seleção do melhor comprimento de onda de excitação e, conseqüentemente, a excitação seletiva dos grupos moleculares, para melhor identificação de espécies bacterianas. Roselle et al., 1998 ao investigarem as diferenças nos espectros de bactérias viáveis, comparando cultiváveis e não cultiváveis, descreveram alterações no espectro de fluorescência de *E. coli* após 210 dias mantidos em solução salina.

Ivnitski et al., (1999) revisaram diferentes técnicas utilizadas para identificação de bactérias e os efeitos diretos e indiretos, como fluorescência e infravermelho espectroscopia, citometria de fluxo, cromatografia e quimioluminescência, para construção de biossensores bacterianos. Hill et al., (1999), expuseram um método para medir a fluorescência induzida por laser de micropartículas biológicas em aerossóis constituídos por compostos orgânicos e

inorgânicos, bactérias, fumaça, alérgenos e outros, evidenciando a possível diferenciação espectral de fatores biológicos e aerossóis não biológicos gerados na atmosfera de laboratório.

Cheng et al., (1999), descreveram a implementação de um aparelho para a investigação de bioaerossóis utilizando espectroscopia de fluorescência no ultravioleta. Assim, verificou-se que os espectros de fluorescência de quatro bactérias, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis*, obtido com esse dispositivo, foi muito semelhante.

Análises microbiológicas enfrentam desafios de variabilidade na busca por resultados representativos. Identificar e quantificar fontes de imprecisão analítica é fundamental para resultados confiáveis. Procedimentos em ensaios microbiológicos devem minimizar incertezas e otimizar recursos, com avaliação estatística dos fatores contribuintes para a incerteza. Isso porque, erros na quantificação de microrganismos incluem falhas na amostragem, diluição e recuperação inadequada, exigindo controles de qualidade, como homogeneização, treinamento, calibração e preparo adequado dos meios de cultura. (JARVIS, 1989 apud. SUTTON, 2010; ISO, 2006 apud. INMETRO, 2014).

5. TURBIDIMETRIA

A concentração, o coeficiente de absorção molar da espécie que absorve e o percurso óptico da radiação, influenciam diretamente na absorção de luz de um feixe de radiação monocromática. O estudo da concentração possibilita a quantificação de substâncias químicas e biológicas, assim como a determinação de curvas de titulação e o estudo cinético de reações lentas em soluções (SKOOG et al., 2014).

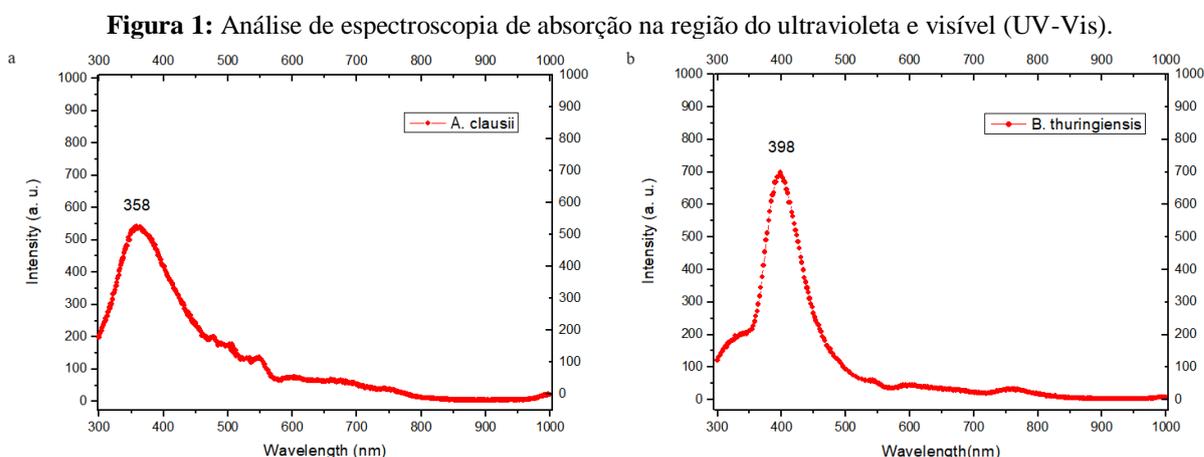
Ao atravessar um meio que contenha espécies absorventes, a intensidade de um feixe de ondas eletromagnéticas é reduzida, isso se dá pelos diversos processos de absorção, da reflexão da parede celular e também pelo fenômeno de espalhamento. A turbidimetria é um exemplo de método indireto de contagem de bactérias. Nela, as bactérias são transferidas para um meio de cultura líquido, causando a turvação do meio. A quantidade de massa pode ser medida por variância da quantidade de luz absorvida, transmitida ou espalhada (SKOOG et al., 2014).

A análise de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) baseia-se na medida de absorbância ou transmitância de soluções contidas em células transparentes, com caminho óptico de comprimento específico, da ordem de cm. Onde, um

feixe (monocromático) de radiação com intensidade I_0 é incidido sobre uma cubeta contendo uma determinada solução, fenômenos como reflexão, ou mesmo o espalhamento pelas paredes da cubeta de quartzo podem ocorrer dependendo da transparência e homogeneidade da amostra (FIGUEIRÓ, 2016).

A avaliação da turbidez de uma cultura microbiana constitui um método rápido. Um feixe de luz focado numa suspensão microbiana é parcialmente desviado (dispersão da luz) pelas células, e a porcentagem de luz não desviada (transmitância, T) é medida por recurso a um espectrofotômetro. A quantidade de luz que atravessa a suspensão celular depende da concentração de células na suspensão e do tamanho destas, do comprimento de onda e da intensidade (I_0) da luz incidente e do diâmetro do tubo que contém a suspensão celular (SKOOG et al., 2014).

A absorvância é determinada com base na expressão $D.O. = \log(I_0/I)$, onde I_0 é a intensidade da luz incidente e I é a intensidade da luz transmitida através da suspensão de células, o que corresponde a densidade óptica (D.O.) da cultura. Há uma relação linear entre a absorvância ou D.O. da cultura (dentro de certos limites) e o número total de células por mililitro de suspensão, ou seja, a concentração celular.



Fonte: Autora, (2023).

6. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Espectroscopia é o estudo da interação de qualquer tipo de radiação eletromagnética com a matéria, em função do comprimento de onda ou frequência. É uma técnica analítica cuja teoria e metodologia têm sido exploradas para diversos estudos de materiais biológicos. Ela tornou-se popular como uma ferramenta em ciência relacionada à tecnologia (FIGUEIRÓ, 2016; KAROUI et al, 2017).

Fluorescência e fosforescência são fenômenos baseados na absorção e emissão de energia, a diferença está nas transições eletrônicas. A fluorescência não envolve alteração no spin eletrônico já a fosforescência envolve. Veja, quando uma molécula está no seu estado eletrônico fundamental de energia, que é chamado de (S_0), ela encontra-se no estado singlete, neste estado os spins eletrônicos estão emparelhados. Após uma incidência luminosa, esta molécula é excitada e pode passar para um estado eletrônico excitado singlete (S_1 e S_2) após essa passagem se os elétrons no orbital excitado permanecerem emparelhados temos o fenômeno denominado fluorescência, porém, se houver o desemparelhamento dos spins, o estado eletrônico excitado passa a se chamar tripleto (T_1), e o fenômeno fosforescência (CARVALHO, 2019).

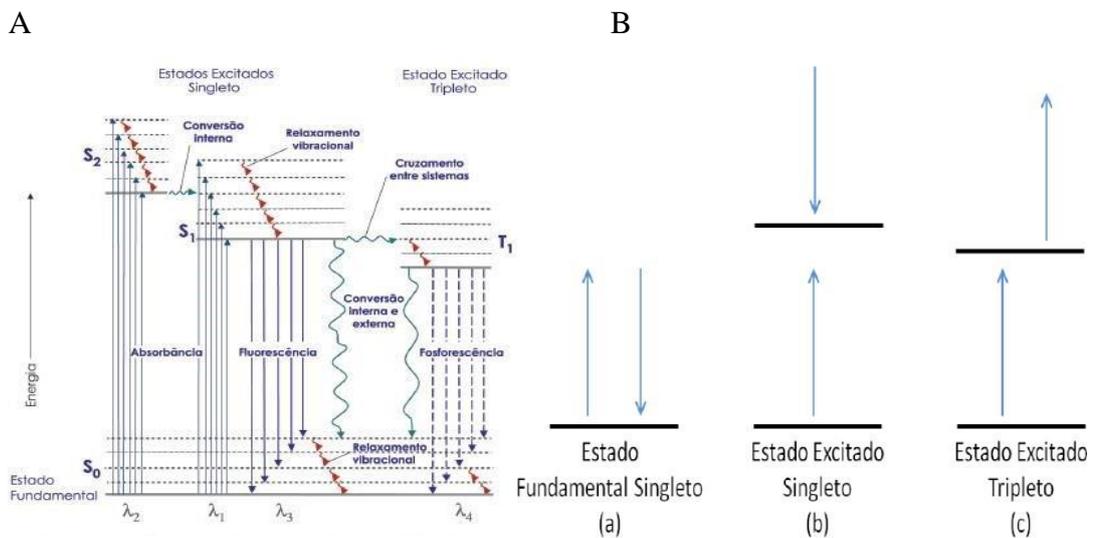
A molécula é promovida do seu estado fundamental para qualquer um dos níveis vibracionais associados com os dois estados eletrônicos excitados, através da absorção de energia de uma fonte de excitação. Ao retornar ao estado fundamental a molécula emite radiação na forma de fluorescência. A vida útil de um átomo ou molécula excitada pela absorção de radiação é rápida, pois existem diversos processos de relaxamento como mostra na Figura 01 que possibilitam o retorno ao estado fundamental competindo então com o fenômeno de fluorescência (CARVALHO, 2019).

A emissão de energia pode ocorrer sem mudança de frequência comparada com a radiação absorvida, e é denominada como fluorescência de ressonância. No entanto, o tempo de vida dos estados vibracionais excitados é na ordem de 10^{-15} s, menor que os estados eletrônicos excitados 10^{-8} s, o que leva a ocorrência da relaxação vibracional antes da relaxação eletrônica. Em razão disso normalmente a banda de fluorescência é deslocada para uma frequência mais baixa ou comprimento de ondas maiores em relação à absorção esse fenômeno é denominado deslocamento de Stokes (CARVALHO, 2019).

As análises de fluorescência são feitas a partir de espectrofluorímetros e fluorímetros. Os espectrofluorímetros são formados por dois monocromadores, enquanto os fluorímetros são constituídos de filtros. A lâmpada de excitação da amostra pode ser de xenônio ou de vapor de mercúrio. A fonte de radiação é dividida em dois feixes, um que passa por um seletor de comprimento de onda de excitação e outro na amostra. Na técnica de fluorescência a emissão é feita em todas as direções pela amostra, mas geralmente é analisada em ângulo reto para evitar o espalhamento da luz. Separada por outro seletor de comprimento de onda de emissão, a fluorescência é enviada a um transdutor que converte o sinal para um sinal elétrico. O feixe de

referência é moderado antes de chegar ao transdutor. Quando os sinais chegam ao sistema computacional é feito o cálculo da razão entre a fluorescência (S_1) e a intensidade do feixe de referência (R_1), para eliminar possíveis efeitos de variações da fonte de excitação no espectro final (CARVALHO, 2019).

Figura 02: A) Diagrama parcial de energia para um sistema fotoluminescente. B) Estados eletrônicos dos spins nas moléculas.



Fonte: Skoog; Holler; Crouch, (2009).

A energia absorvida pelas moléculas é dissipada por processos de decaimento radiativo e/ou não radiativo, permitindo assim que os elétrons voltem para seus estados normais. Quando este processo se dá de forma não-radiativa, eles geram meios de rotações, modos vibracionais e as colisões entre as moléculas, mas quando se dá de forma radiativa envolve várias reações incluindo a fluorescência, objeto de estudo neste trabalho (NEVES, 2020).

A fluorescência ocorre em uma molécula após a incidência de luz, onde a energia luminosa é absorvida pela estrutura eletrônica elevando assim a energia dos elétrons da

molécula a estados quânticos menos estáveis e excitados, o mesmo ao retornar ao nível fundamental de energia gera a emissão de uma radiação eletromagnética de acordo com as características da molécula (MAZZUCATO, 2013).

Segundo Michels et al, 2017 dentre as várias técnicas a espectroscopia de fluorescência tem sido destacada para monitoramento on-line e *in situ* de amostras, a técnica pode fornecer informações precisas, rápidas e de baixo custo, muitas vezes as análises são realizadas por dispositivos portáteis e ainda sem preparação de amostra.

6.1 Potencialidade da técnica de fluorescência na identificação de compostos

O tempo consideravelmente longo para obtenção dos resultados analíticos pelos métodos convencionais tem levado à busca de métodos microbiológicos alternativos que permitam resultados em menor tempo reduzido e que, assim, auxiliem na agilidade de investigações e tomadas de decisões. Dentre as técnicas, a fluorescência na análise microbiológica caracteriza-se como uma atrativa possibilidade pela capacidade de investigação com uma redução do tempo analítico, à facilidade de execução do ensaio e à precisão dos resultados. Contudo, a validação de métodos alternativos depende de demonstração da equivalência quando comparados aos métodos oficiais para justificar a implementação da tecnologia no monitoramento da qualidade microbiológica das amostras estudadas (HILINSKI, et al., 2020).

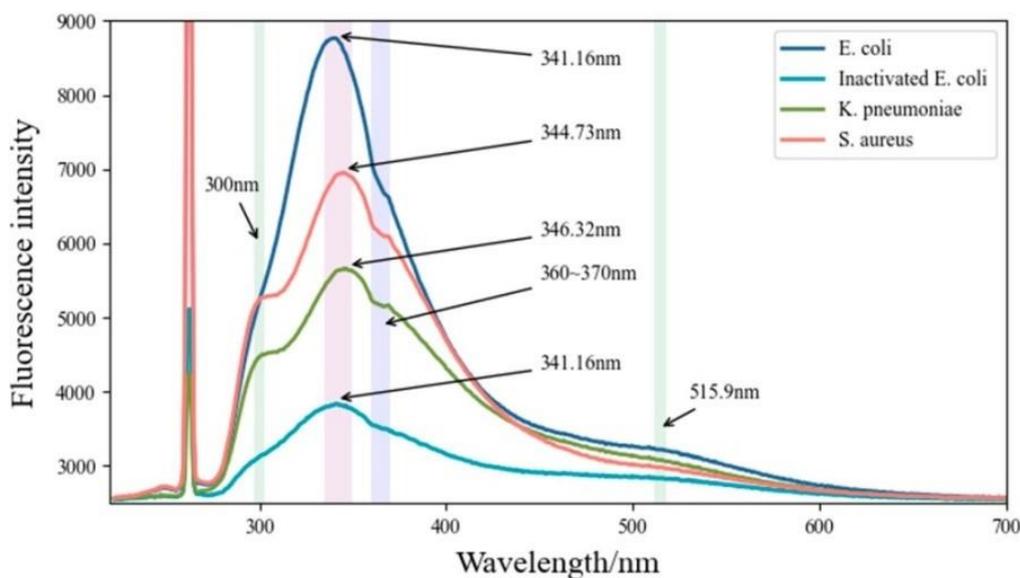
A espectroscopia de fluorescência é estudada há alguns anos para estudos relacionados à função e estrutura molecular. Entretanto, a eficiência da técnica na identificação e caracterização de microbiotas vem sendo reconhecida recentemente. Bactérias possuem numerosas moléculas intracelulares, estas estão associadas a reações de produção de energia. Determinados fluoróforos dessas moléculas fluorescem em comprimentos de onda específicos como, por exemplo, triptofano da proteína, ácidos nucléicos e coenzimas, isso torna-os muito atraentes para detecção e caracterização biológica (AMMOR, 2007).

A microbiologia além de estudos de micro-organismos microscópicos e suas atividades, considera as diferentes formas de identificação e diagnósticos dos agentes etiológicos. A

diferenciação de espécies tem uma grande importância, pois a partir disso medidas podem ser tomadas. Utilizar de técnicas que permitem uma rápida identificação contribuiria significativamente na rapidez destas respostas (MARANNI, et al., 2019).

Porém, os desafios em obter a aprovação dos órgãos de regulamentação, para validação destas tecnologias em análises microbiológicas, têm atrasado a implementação de novas técnicas de trabalho, pois, é preciso a comprovação da equivalência frente aos métodos oficiais. A figura 03 mostra um espectro de fluorescência de alguns micro-organismos com as principais regiões utilizadas na interpretação dos resultados.

Figura 03: Emissão de Fluorescência de Bactéria em 266 nm de excitação.



Fonte: Du *et al.*, (2022).

Cada vez mais técnicas baseadas em espectroscopia de fluorescência vêm mostrando eficiência em diversas áreas do conhecimento. O fenômeno se dá a partir da interação de fótons que são absorvidos pelas moléculas da amostra. Com isso os elétrons da molécula mudam seu estado quântico de menos excitado para mais excitado, permanecendo neste novo estado por um curto intervalo de tempo (SANTOS, 2021).

6.2 Luminescência

A luminescência compreende duas categorias fundamentais: fluorescência e fosforescência, determinadas pelo estado excitado. Na fluorescência, a emissão de luz ocorre a partir de um estado excitado singlete, em que o elétron excitado mantém a orientação de spin sem alterações, permanecendo desemparelhado. Isso propicia um retorno rápido ao estado fundamental através da emissão de um fóton, com uma taxa típica de 10^8 s^{-1} e um tempo de vida de aproximadamente 10^{-9} s para o fluoróforo. O tempo de vida (t) representa a média de permanência do fluoróforo no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Para contextualizar a escala de nanossegundos dos tempos de vida dos fluoróforos, é relevante considerar que a luz percorre 30 cm em 1 ns (VALEUR, 2002; LAKOWICZ, 2006).

A fosforescência, por sua vez, refere-se à emissão de luz a partir de um estado excitado tripleto, onde o elétron excitado muda a orientação de spin, emparelhando-se com o elétron que permaneceu no orbital fundamental. Tal configuração proíbe as transições para o estado fundamental, resultando em taxas de emissão mais lentas, geralmente entre 10^3 e 10^0 s^{-1} . O tempo de vida da fosforescência varia de milissegundos a segundos, possibilitando tempos de vida mais extensos. Contudo, a emissão de fosforescência é menos observada em soluções fluidas à temperatura ambiente devido à competição com diversos processos de desativação, como decaimento não radioativo e processos de supressão (VALEUR, 2002; LAKOWICZ, 2006).

A técnica óptica de imagens de fluorescência, escolhida para investigar biomoléculas, destaca-se pela capacidade de observar a dinâmica das proteínas, especialmente aquelas contendo resíduos de triptofano. Esses resíduos exibem propriedades de fluorescência variáveis, dependendo do ambiente proteico, o que possibilita a interpretação dessas propriedades em termos de parâmetros estruturais. O triptofano, sendo um aminoácido essencial envolvido em processos bioquímicos, é empregado na caracterização de espécies bacterianas, como *Alkalihalobacillus clausii* e *Bacillus thuringiensis* (HIXON & RES-HETNYAK, 2009).

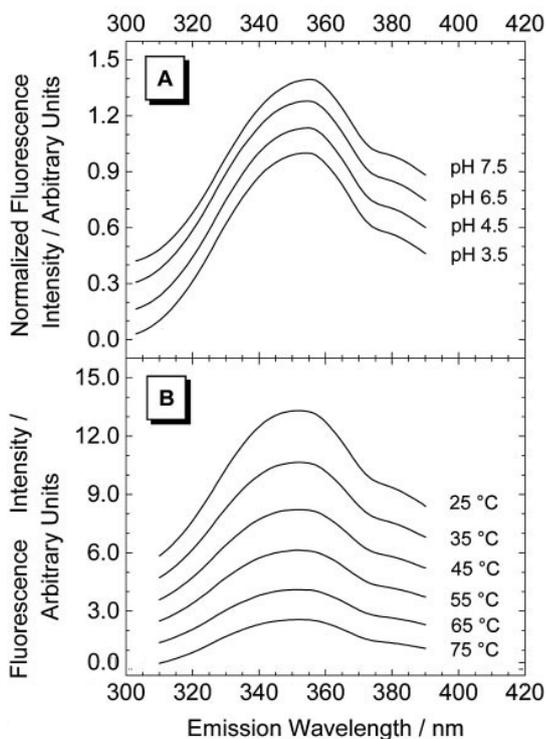
A caracterização por fluorescência revela-se uma abordagem versátil e poderosa, permitindo a investigação detalhada de diversos aspectos da célula bacteriana através da microscopia de fluorescência. Nos compostos orgânicos, a fluorescência é um fenômeno prevalente em estruturas aromáticas. Em proteínas, o grupo de triptofano é o fluoróforo preponderante, absorvendo em torno de 280 nm e emitindo próximo a 340 nm. O triptofano, em particular, oferece potencial na identificação de espécies, pois sua síntese é exclusiva de

bactérias, plantas e fungos. Parâmetros espectrais, refletindo a fluorescência do triptofano, são estabelecidos como método de classificação, com ênfase na sua intensidade (GARIDEL, 2008).

O triptofano emerge como um cromóforo dominante para a emissão de fluorescência, destacando-se pela sensibilidade à polaridade do solvente e às mudanças conformacionais no microambiente. Estudos de fluorescência de triptofano proporcionam informações valiosas sobre a localização espacial do fluoróforo em estruturas macromoleculares (HIXON & RESHETNYAK, 2009). Mudanças na intensidade de fluorescência, influenciadas pelo ambiente próximo aos resíduos de triptofano, oferecem uma análise de alterações conformacionais e micro ambientais (GARIDEL, 2008).

Para garantir a confiabilidade dos resultados, é crucial discriminar as condições do meio onde o micro-organismo se encontra, considerando interferências como temperatura e pH da amostra, que afetam a disponibilidade do triptofano, conforme ilustrado na Figura 04.

Figura 04: Efeito da diferença de pH (A) e temperatura (B) na emissão espectral do triptofano.

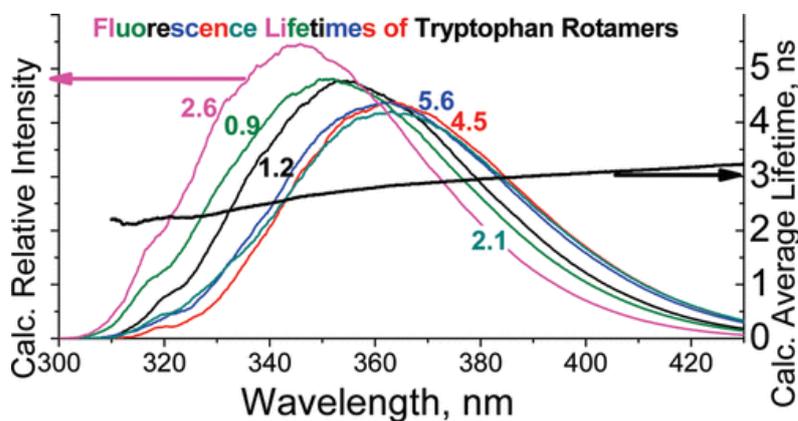


Fonte: Adaptado de Garidel (2008).

A fluorescência do triptofano destaca-se como ferramenta essencial em estudos biomoleculares, proporcionando uma visão detalhada da estrutura, dinâmica e interações em

sistemas biológicos. A sensibilidade única do triptofano ao ambiente micro ambiental contribui significativamente para a compreensão dos processos na biologia molecular. Sua capacidade de refletir mudanças ambientais é crucial para elucidar nuances na estrutura e dinâmica das proteínas, enriquecendo a compreensão dos processos biológicos em níveis moleculares. A presença de múltiplos resíduos de triptofano amplia significativamente as possibilidades de estudo de interações intermoleculares, proporcionando uma análise biomolecular mais abrangente, reforçando a importância do triptofano como ferramenta valiosa em estudos científicos (CHEN, 2008). A Figura 04 exibe o tempo de vida de fluorescência de rotâmetros do triptofano.

Figura 05: Tempo de vida de fluorescência de rotâmetros do Triptofano.



Fonte: Garidel (2008).

A Espectroscopia de Fluorescência, sendo uma ferramenta direta, rápida, simples, de baixo custo e confiável, tem se mostrado eficaz na identificação de compostos orgânicos. A análise de espécies de *Bacillus* associadas a probióticos e insumos agrícolas, com base em semelhanças de modulação, apresentou proximidade nos valores. Resultados de turbidimetria foram cruciais na preparação da amostra para análises espectroscópicas, evitando a saturação devido a amostras excessivamente turvas. A escala de Mac Farland e UV-vis foram utilizadas

como parâmetros para analisar os níveis de turbidez da amostra inicial, com a menor diluição da escala aplicada (5×10^7).

6.3 Mapas 3D

Com a espectroscopia de fluorescência utilizando a Matriz de Excitação-Emissão (MEE) é possível analisar as mudanças conformacionais nas estruturas das proteínas durante a complexação com pequenas moléculas, isso faz com que os comprimentos de onda de excitação e emissão sejam alterados simultaneamente (SILVA, 2020). Cruz (2022), explica que a técnica gera mapas 3D com uma série de espectros de emissão e excitação coletadas em diferentes comprimentos de onda da amostra. Isso mostra a amplitude da técnica em analisar a composição do material estudo além de analisar as interações que ali ocorrem.

Segundo Menezes (2022), a fluorescência 3D tem como finalidade a análise multicomponente, onde em um gráfico há a relação de comprimento de onda de excitação e emissão, além da intensidade de fluorescência. Segundo a autora, esta técnica vem sendo muito utilizada na investigação do mecanismo de interação de bio macromoléculas ligantes, com a finalidade de monitorar alterações no microambiente dos fluoróforos.

Matrizes excitação-emissão (EEMs) são classificados com um conjunto de dados produzidos por varreduras tridimensionais. Estes são uma ferramenta comum para estudos de monitoramento ambiental, apresentam vantagens dentre elas por não serem destrutivas, são de rápida obtenção de dados e requerem amostras mínimas de preparação. As EEMs, ao produzirem matrizes em 3D fornecem informações precisas da composição da amostra (HUIZENGA, et al., 2023).

7. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER FT-IR

Uma das técnicas analíticas disponíveis na atualidade, capaz de analisar amostras em praticamente qualquer estado físico, por meio de processos não destrutivos, tornando-se uma grande vantagem, dependendo apenas da escolha criteriosa da metodologia e de sua preparação.

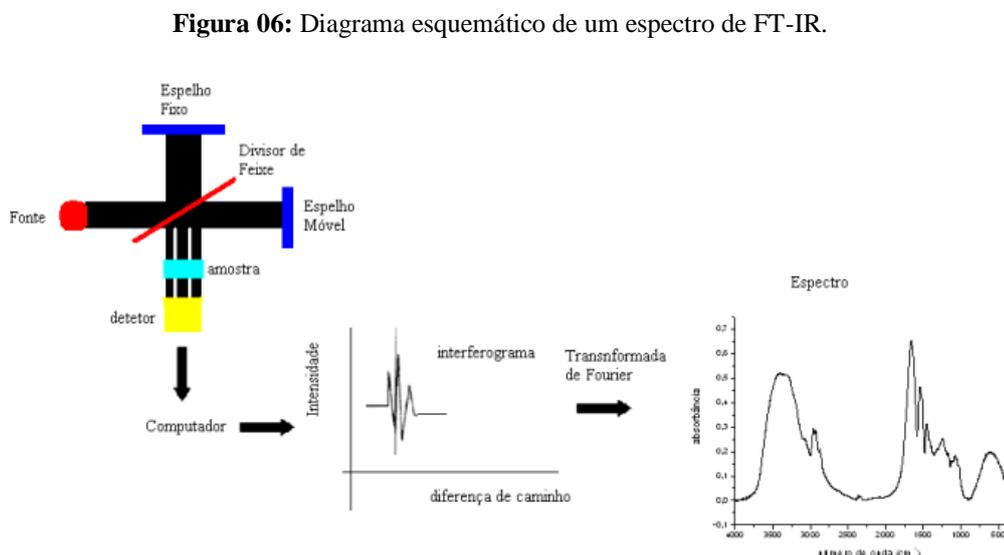
A técnica de espectroscopia de infravermelho consiste na avaliação da interação entre fótons na região do infravermelho e os estados vibracionais da molécula. O espectro no

infravermelho se dá pela passagem de radiação pela mostra e a determinação da radiação incidente que é absorvida em cada comprimento de onda ou cada frequência (energia) (CARVALHO, et al., 2019).

A Transformada de Fourier com o infravermelho torna possível obter dezenas de interferogramas para uma mesma amostra em menos de um segundo, e através do cálculo da média gerar um espectro com alta razão sinal/ruído. Cada frequência identificada em um espectro infravermelho está relacionada com a frequência de vibração de uma parte da molécula de uma amostra. (CARVALHO, et al., 2013).

Com a introdução da técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier FT-IR, a qualidade dos espectros no infravermelho melhora significativamente bem como o tempo necessário para análises diminuiu consideravelmente. A região de maior utilização nas análises e identificação de matérias está localizada entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} ($2,5\text{ }\mu\text{m}$ e $2,5\text{ }\mu\text{m}$) o chamado infravermelho médio, localizado na região do visível e do micro-ondas (BURGULA, 2007).

As bandas podem ser apresentadas em comprimento de ondas (μm) ou números de ondas (cm^{-1}), e as intensidades das bandas em porcentagem de transmitância (%T) ou absorbância (A). A transmitância refere-se a energia radiante transmitida pela amostra e a energia radiante que nela incide. A absorbância refere-se ao logaritmo decimal do inverso da transmitância, onde $A = \log_{10} (1/T)$ A figura 06 a seguir mostra um diagrama esquemático de um espectrômetro de FT-IR simples (BURGULA, 2007).



Fonte: Carvalho, (2013).

Após a absorção da radiação infravermelha as moléculas se deslocam para estados de energia mais excitados, esse processo é quantificado e então os espectros aparecem em diversas bandas ao invés de linhas, pois a cada mudança na energia vibracional há mudanças também na energia rotacional. O número de onda bem como a frequência de absorção de uma radiação depende da força das ligações, da massa relativa dos átomos e da geometria dos átomos/moléculas (MORAIS, et al., 2016).

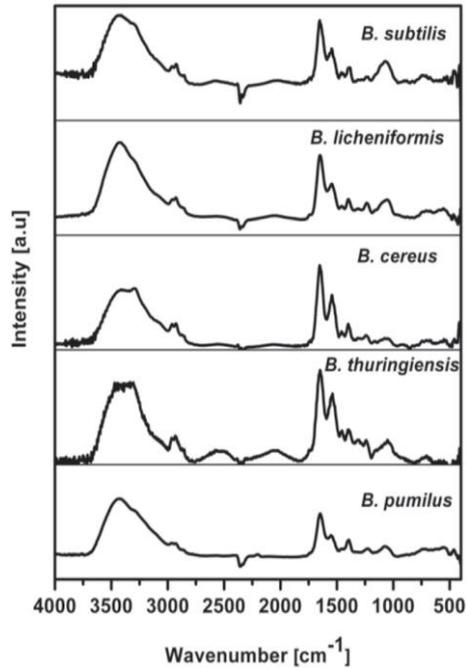
As vibrações moleculares podem ser classificadas de duas formas. O modo de estiramento, onde o movimento é periódico ao longo do eixo da ligação fazendo com que a distância interatômica aumente e diminua regularmente. E o modo de deformação que apresenta as variações periódicas de ligações em que um átomo comum ou o movimento de um grupo de átomos em relação a molécula sem que as posições relativas se alterem (LASCH, P., 2012).

A caracterização e identificação de compostos biológicos como membranas biológicas, proteínas, carboidratos, metabólitos dentre outras estruturas por FT-IR tem tornado a técnica uma importante ferramenta. A análise consiste na interação da radiação com a amostra, que fornece informações sobre a presença de grupos funcionais no material analisado. Através do estudo destes grupos funcionais é possível muitas vezes a identificação da amostra (ABREU, et al., 2012).

7. 1 Potencialidade da técnica de FT-IR na identificação de compostos.

Os grupos funcionais dos compostos moleculares orgânicos e as moléculas orgânicas tendem a absorver a radiação num determinado comprimento de onda específico, excitando modos vibracionais (LASCH, P., 2012). Com isso, algumas regiões ou bandas (picos) são de grande relevância para interpretação e compreensão da composição e estrutura das amostras analisadas. Com isso, a análise de espectros com grupos funcionais bioquímicos já estudados comparado com as análises atuais poderia levar a interpretação dos resultados (SILVERSTEIN, R. M., & WEBSTER, F. X., 2014). A figura 07 mostra um espectro no infravermelho de alguns micro-organismos com as principais regiões utilizadas na interpretação dos resultados.

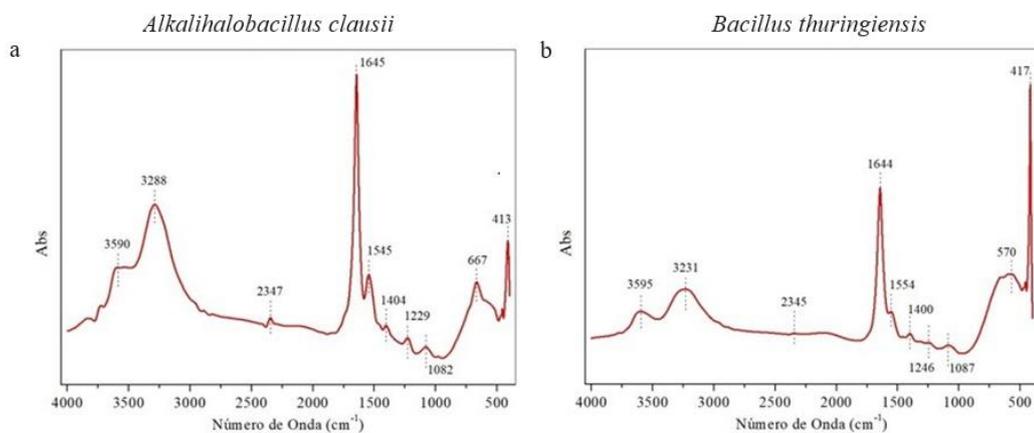
Figura 07: Espectro típico de 5 espécies de *Bacillus* com regiões de maior interesse na identificação e análise microbiológica.



Fonte: Abreu et al., (2012).

Cada região espectral demonstra picos distintos referentes a compostos funcionais de cada espécie. A comparação destes valores (picos) permite diferenciar a composição e também as espécies, levando em consideração preparação da amostra e a sensibilidade da técnica. Com base na literatura é possível identificar e classificar diversos picos em seus respectivos comprimentos de ondas.

Figura 8: Análises por FT-IR (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier) de a) *A. clausii* e b) *B. thuringiensis*.



Fonte: A autora (2023).

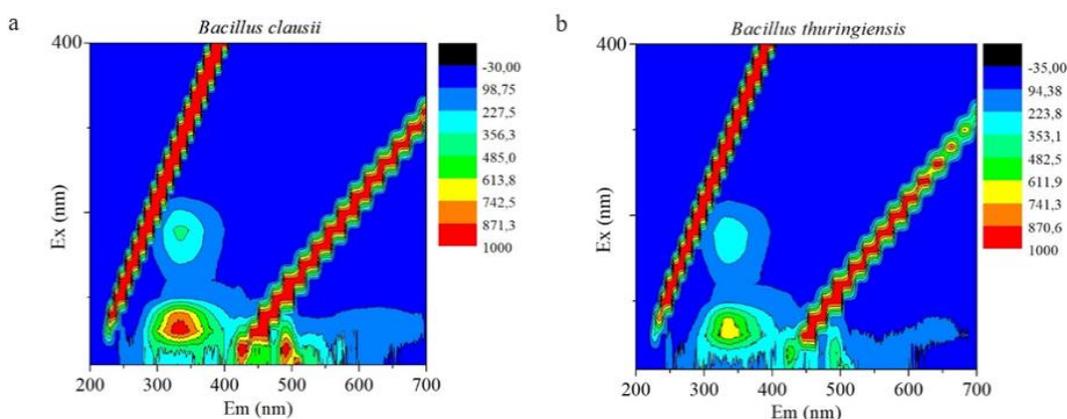
A Figura 8 apresenta o espectro no infravermelho (FT-IR) com destaque para as principais regiões utilizadas na interpretação dos resultados. A análise de espectros com grupos

funcionais bioquímicos já estudados permite a comparação com as análises atuais e a interpretação dos resultados.

8. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ao analisar os espectros de fluorescência das espécies de *Alkalihalobacillus* e *Bacillus* estudadas, observou-se proximidade na frequência dos picos formados, conforme a figura 05 a seguir:

Figura 09: Fluorescência do Triptofano de *A. clausii* and *B. thuringiensis*.



Fonte: A autora (2023).

Para identificar a melhor correspondência entre os picos de emissão das duas espécies, devemos analisar alguns fatores:

- Proximidade dos comprimentos de onda: identificar os pares de picos com a menor diferença de comprimento de onda entre as duas espécies.
- Similaridade de intensidades: avaliar a similaridade das intensidades de fluorescência para cada par de picos.
- Considerações bioquímicas: analisar o conhecimento bioquímico sobre as espécies de *Alkalihalobacillus* e *Bacillus* para determinar a plausibilidade das correspondências.

Tabela 1: Correspondência entre os picos de emissão das espécies *A. clausii* e *B. thuringiensis*.

Espécie	Pico de Excitação (nm)	Pico de Emissão (nm)	Intensidade de Fluorescência (RU)	Correspondência	Observações
<i>Alkalihalobacillus clausii</i>	280	340	100	P1	Principal pico de emissão

<i>Alkalihalobacillus clausii</i>	330	420	80	P2	Possível pico de emissão de um fluoróforo diferente
<i>Bacillus thuringiensis</i>	280	345	90	P1	Boa correspondência com o P1 de Bacillus 1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	325	415	70	P2	Boa correspondência com o P2 de Bacillus 1

Fonte: Autora (2023)

As unidades de intensidade de fluorescência na tabela foram normalizadas para facilitar a comparação entre os picos de diferentes espécies. Isso significa que os valores na coluna "Intensidade de Fluorescência" são relativos e não absolutos. Essa normalização permite uma análise mais precisa das diferenças na intensidade de fluorescência entre as duas espécies, independentemente de fatores como a quantidade de células presentes na amostra ou a eficiência da detecção.

A coluna "Correspondência" na tabela indica a melhor correspondência entre os picos de emissão das duas espécies de analisadas. Essa correspondência foi estabelecida com base em dois critérios principais:

- Proximidade dos comprimentos de onda de Emissão: Os picos foram considerados como correspondentes se seus comprimentos de onda de emissão fossem próximos (diferença menor que 5 nm); e
- Similaridade das intensidades de fluorescência: Os picos foram considerados como correspondentes se suas intensidades de fluorescência fossem semelhantes (diferença menor que 20%).

A identificação de correspondências entre os picos de emissão das duas espécies facilita a comparação entre as suas composições bioquímicas e os seus microambientes celulares.

A coluna "Observações" na tabela inclui comentários adicionais sobre cada pico, como sua possível origem e significado. Estas informações podem ser úteis para interpretar os dados e tirar conclusões sobre as diferenças entre as duas espécies de Bacillus.

8.1 Análise Individual das Espécies.

Alkalihalobacillus clausii

Pico 1:

- Pico de Excitação: 280 nm
- Pico de Emissão: 340 nm

Intensidade de Fluorescência: 100 RU

Este pico pode ser atribuído ao triptofano, um aminoácido presente em proteínas. A alta intensidade de fluorescência indica que há uma quantidade significativa de triptofano presente na célula ou que o triptofano está presente em um microambiente favorável à emissão de fluorescência.

Pico 2:

- Pico de Excitação: 330 nm
- Pico de Emissão: 420 nm

Intensidade de Fluorescência: 80 RU

Este pico pode ser atribuído a um fluoróforo diferente do triptofano, como NADH ou FAD, que são coenzimas importantes no metabolismo celular. A menor intensidade de fluorescência em comparação com o Pico 1 pode indicar que há uma quantidade menor desse fluoróforo presente na célula ou que o fluoróforo está presente em um microambiente menos favorável à emissão de fluorescência.

Bacillus thuringiensis

Pico 1:

- Pico de Excitação: 280 nm
- Pico de Emissão: 345 nm

Intensidade de Fluorescência: 90 RU

Este pico apresenta características semelhantes ao Pico 1 do Bacillus 1, sugerindo a presença de triptofano em ambas as espécies. A ligeira diferença no comprimento de onda de emissão pode ser atribuída a diferenças nos microambientes celulares.

Pico 2:

- Pico de Excitação: 325 nm
- Pico de Emissão: 415 nm

Intensidade de Fluorescência: 70 RU

Este pico também apresenta características semelhantes ao Pico 2 do Bacillus 1, reforçando a presença de um fluoróforo diferente do triptofano em ambas as espécies. A menor intensidade de fluorescência pode indicar diferenças na quantidade do fluoróforo ou no microambiente.

Ambas as espécies apresentam picos de emissão em torno de 340 nm e 420 nm, sugerindo a presença de fluoróforos similares (triptofano e outro fluoróforo). Pequenas diferenças nos comprimentos de onda de emissão podem indicar diferenças nos microambientes celulares. A intensidade de fluorescência pode indicar diferenças na quantidade de fluoróforos presentes nas células. As diferenças podem ser explicadas pela composição bioquímica diferente, visto que as duas espécies podem ter diferentes tipos e quantidades de fluoróforos. Além disso, os fluoróforos podem estar presentes em diferentes microambientes dentro das células, o que pode afetar a sua emissão de fluorescência e podem, também, estar interagindo com outras moléculas de forma diferente nas duas espécies.

A análise detalhada dos valores da imagem fornece informações sobre as diferenças entre as duas espécies de Bacillus. No entanto, para uma compreensão completa das diferenças, é necessário realizar estudos adicionais como identificar os fluoróforos presentes nas amostras, quantificar a quantidade de cada fluoróforo presente nas amostras e estudar os microambientes e as interações entre os fluoróforos.

8.2 Análise das Regiões Espectrais

Região 1: 3000-2800 cm^{-1} :

- Vinculação a grupos CH, CH₂ e CH₃ de lipídios e proteínas.
- Picos em 2922 e 2850 em ambas as espécies.
- Presença de lipídios e proteínas em ambas as espécies.
- Diferenças na intensidade dos picos podem indicar diferenças na quantidade ou tipo de lipídios e proteínas.

Região 2: 1800-1500 cm^{-1} :

- Amida I (1650-1640): Presença de proteínas (maioria das proteínas).
- Amida II (1540-1520): Presença de proteínas (deformação N-H).
- Picos em 1642 (Amida I) e 1548 (Amida II) em *A. clausii*.
- Picos em 1640 (Amida I) e 1542 (Amida II) em *B. thuringiensis*.
- Presença de proteínas em ambas as espécies.
- Pequenas diferenças na posição dos picos podem indicar diferenças na estrutura das proteínas.

Região 3: 1500-1200 cm^{-1} :

- Região complexa com diversos grupos funcionais.
- Picos em 1453 em *A. clausii* e 1456 em *B. thuringiensis*.
- Presença de grupos funcionais como ácidos graxos e polissacarídeos em ambas as espécies.
- Diferenças na intensidade dos picos podem indicar diferenças na quantidade ou tipo de grupos funcionais.

Região 4: 1200-900 cm^{-1} :

- Região com bandas de polissacarídeos e ácidos nucleicos.
- Picos em 1078 em ambas as espécies.
- Presença de polissacarídeos e ácidos nucleicos em ambas as espécies.
- Similaridade nos espectros indica similaridade na composição de polissacarídeos e ácidos nucleicos.

Região 5: 900-600 cm^{-1} :

- Região com bandas de "fingerprint" (impressão digital) de cada espécie.
- Possíveis diferenças na composição química e na estrutura molecular entre as duas espécies.

Tabela 2: Análise das Regiões Espectrais entre *A. clausii* e *B. thuringiensis*.

Região (cm^{-1})	Atribuição Principal	<i>B. clausii</i>	<i>B. thuringiensis</i>
3500-3000	Amidas I e II (Proteínas)	Picos em 3280, 3068 cm-1	Picos em 3275, 3075 cm-1

3000-2000	C-H Stretching (Lipídios e ácidos graxos)	Picos em 2922, 2852 cm-1	Picos em 2925, 2855 cm-1
1800-1000	"Fingerprint" da molécula	Diferenças na "fingerprint"	Diferenças na "fingerprint"
1000-500	Modos vibracionais de grupos funcionais específicos	Diferenças nos modos vibracionais	Diferenças nos modos vibracionais
358 nm (2800 cm-1)	Possíveis compostos aromáticos ou outros grupos funcionais com elétrons conjugados	Presença	Presença (possível diferença na quantidade ou tipo)

Fonte: Autora (2023).

A análise da Figura 8 fornece informações sobre a composição química e a estrutura molecular de *A. clausii* e *B. thuringiensis*. As diferenças nos espectros entre as duas espécies podem ser utilizadas para a sua diferenciação. Assim, a análise FT-IR pode ser utilizada como uma ferramenta para a identificação e caracterização de micro-organismos. É interessante que sejam realizados estudos adicionais para confirmar as identificações das espécies. Além disso, seria relevante a investigação das diferenças na composição química e na estrutura molecular entre as duas espécies, adicionalmente à utilização da análise FT-IR para a identificação e caracterização de outras espécies de micro-organismos.

9. CONCLUSÃO

A aplicação da técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) na análise de compostos moleculares orgânicos apresenta uma potencialidade significativa, especialmente na identificação de micro-organismos. A utilização da Transformada de Fourier no espectro infravermelho permite a obtenção de dados de forma rápida e eficiente, resultando em espectros de alta qualidade com uma excelente relação sinal/ruído.

A análise dos espectros de fluorescência das espécies de *Alkalihalobacillus clausii* e *Bacillus thuringiensis* revelou proximidade na frequência dos picos formados, indicando similaridades nas composições bioquímicas das duas espécies. A correspondência entre os picos foi estabelecida com base na proximidade dos comprimentos de onda e na similaridade

das intensidades de fluorescência, proporcionando uma compreensão detalhada das diferenças e semelhanças entre as espécies estudadas.

A análise individual das espécies evidenciou a presença de compostos como triptofano e outros fluoróforos, proporcionando uma observação sobre a composição bioquímica e os microambientes celulares. A interpretação das regiões espectrais, com destaque para a identificação de grupos funcionais e a análise de bandas específicas, permitiu uma caracterização mais detalhada das amostras.

As regiões espectrais analisadas, especialmente nas faixas de 3000-2800 cm^{-1} , 1800-1500 cm^{-1} e 900-600 cm^{-1} , revelaram a presença de lipídios, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos, contribuindo para uma compreensão da composição química e da estrutura molecular das espécies estudadas.

A eficácia da técnica FT-IR na identificação e caracterização de micro-organismos é apresentada, ressaltando a importância da interpretação criteriosa dos dados espectrais análises bioquímicas e estruturais. Recomenda-se a continuidade de estudos adicionais para explorar variações na composição química entre diferentes micro-organismos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, G, M, A. **Caracterização bioquímica de Bactérias anaeróbicas por Espectroscopia de Infravermelho**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica – Universidade do Vale da Paraíba – UNIVAP. São José dos Campos – RJ, 2012.

ALKASSAD, A, T. BEIMS, H. JANKE. M.PISTORIUS, J. **Determination, distribution, and environmental fate of *Bacillus thuringiensis* spores in various honeybee matrices after field application as plant protection product**. Revista Springer. Environmental Science and Pollution Research. v. 29. 2022.

AMMOR, S.; ARGYRI, A.; NYCHAS, G.J.E. **Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics**. Editora Elsevier. Meat Science. p. 507–514. Amesterdã – Holamda, 2007.

ARRIZABALAGA, M. D. VILLANUEVA, M. ESCRICHE, B. AZPILICUET C, A. **Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Proteins against Coleopteran Pests.** Revista Toxins. p. 12 v. 430. Navarra – Espanha, 2020.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO 17025:2014 - **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.** Rio de Janeiro: ABNT, 2014.

BEATTIE, S. H. **Discrimination among *Bacillus cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* and some other species of the genus *Bacillus* by Fourier transform infrared spectroscopy.** FEMS microbiology letters, v. 164, n. 1, p. 201-206, 1998.

BIZZINI, A.; DURUSSEL, C.; BILLE, J.; GREUD, G.; PROND'HOM, G. **Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory.** Journal of Clinical Microbiology. v.48, N°5. p. 1549–1554, 2010.

BREED, R, MURRAY, E. G. D, SMITH, N, R. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 7. ed. Filadélfia, PA, USA, The Williams and Wilkins Company, 1957.

BURGULA, Y. **Review of MID-infrared Fourier transform-infrared spectroscopy applications for bacterial detection.** Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, v. 15, n. 2, p. 146-175, 2007.

CARVALHO, A, M, B. **Análise do leite em pó de vaca e cabra por métodos físicos.** Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados - Universidade Federal de Juíz de Fora – UFJF. Juiz de Fora – MG, 2013.

CARVALHO, D. G. **Espectroscopia por Fluorescência Bidimensional e FT-IR aplicadas na quantificação de compostos fenólicos totais e cafeínas.** Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Porto Alegre - RS, 2019.

CASTRO, J. A. GUNO, M. J. V. PEREZ, M. O. ***Bacillus clausii* as adjunctive treatment for acute community-acquired diarrhea among Filipino children: a largescale, multicenter, open-label study (CODDLE).** Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines 5: 14. 2019.

CHEN J, TOPTYGIN D, BRAND L, KING J. **Mechanism of the efficient tryptophan fluorescence quenching in human gammaD-crystallin studied by time-resolved fluorescence.** Biochemistry. 2008 Oct 7;47(40):10705-21. doi: 10.1021/bi800499k. Epub. Sep 17. PMID: 18795792; PMCID: PMC2758765, 2008.

CHENG, J. H.; DAI, Q.; SUN, D. W.; ZEG, X. A.; LIU, D.; PU, H. B. **Applications of non-destructive spectroscopic techniques for fish quality and safety evaluation and inspection.** Trends in Food Science & Technology, 34 p18-31. Dublin- China, 2013.

CHENG, Y. S.; BARR, E. B.; FAN, B. J.; HARGIS, P. J.; RADER, D. J.; O'HERN, T. J.; TORCZYNSKI, J. R.; TISONE, G. C.; PREPPERNAU, B. L.; YOUNG, S. A.; RADLOFF, R. J. **Detection of bioaerosols using multiwavelength UV fluorescence spectroscopy**. *Aerosol Science. Tech.* 31, 409–421. 1999.

CRUZ, V. S. C. FALL Y. M. ESPARZA, S. **Characterization of organic matter in the effluent from a nitrifying reactor using fluorescence spectroscopy**. *Revista de engenharia química*, v 13, n. 1, 279-289. 2022.

DU, R. YANG, D. YIN, X. **Rapid Detection of Three Common Bacteria Based on Fluorescence Spectroscopy**. *Sensors. Journal from MDPI*. p. 22. 2022.

FIGUEIRÓ, C. S. M.; **Utilização de técnicas espectroscópicas na avaliação da qualidade de água em piscicultura**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD. Dourados – MS, 2016.

FUENTES, J, L, J. HECKEL, D, G. FERRÉ, J. **Mechanisms of Resistance to Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis***. *Annual Review of Entomology*. 2021.

GARIDEL, P.; et al. **A rapid, sensitive and economical assessment of monoclonal antibody conformational stability by intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy**. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*. 3: 1201-1211, 2008.

GHOSH, S. B. BHAATTACHARYA, K. NAYAK, S. MUKHERJEE, P. SALASKAR, D. KALE, S. P. **Identification of different species of *Bacillus* isolated from Nisargruna Biogas Plant by FTIR, UV–Vis and NIR spectroscopy**. Editora Elsevier. *International Journal of Food Microbiology*. p.420-426. Trombay, - India, 2015.

GIANA, H. E.; JÚNIOR, L. S.; ZÃNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T. **Rapid Identification of Bacterial Species by Fluorescence Spectroscopy and Classification Through Principal Components Analysis**. VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. Vale do Paraíba – SP, 2003.

HILINSKI, E. G.; BUGNO, A.; SILVA, F. P. L.; ALMODOVAR, A. A. B. **Avaliação da técnica de detecção por fluorescência como alternativa para contagem de Bactérias heterotróficas em água de hemodiálise**. *Visa em debate*. 8, 94-105, São Paulo – SP, 2020.

HILL, S. C.; PINNICK, R. G.; NILES, S.; PAN, Y. L.; HOLLER, S.; CHANG, R. K. BOTTIGER, J.; CHEN, B. T.; ORR, C. S.; FEATHER, G. **Real-time measurement of fluorescence spectra from single airborne biological particles**. *Field Anal. Chem. Tech.* 3, 221–239. 1999.

HIXON, J. D., & RES-HETNYAK, J. **Microbial ecology in the built environment**. New York: Springer, 2009.

HIXON, J.; RESHETNYAK, Y.K. **Algorithm for the Analysis of Tryptophan Fluorescence Spectra and Their Correlation with Protein Structural Parameters.** Algorithms. 2, 1155-1176. <https://doi.org/10.3390/a2031155>. 2009.

HUIJUN, L. YONGHUI, L. X. HAO, Y. ZHOUQING, X. **Fluorophore molecule loaded in Tb-MOF for dual-channel fluorescence chemosensor for consecutive visual detection of bacterial spores and dichromate anion.** Journal of Alloys and Compounds. p. 944. Henan – China, 2023.

HUIZENGA, J. M. SEMPRINI, L. Fluorescent spectroscopy paired with parallel factor analysis for quantitative monitoring of phenanthrene biodegradation and metabolite formation. Revista Chemosphere. p. 316. Estados Unidos – EUA, 2023.

IVNITSKI, I. D.; HAMID, P. A. A.; WILKINS, E. **Biosensors for detection of pathogenic bacteria.** Biosens. Bioelectron. 14, 599–624. 1999.

JARVIS, B. W. **Clinical laboratory methods.** Philadelphia: F.A. Davis Company, 1989.

KAROUI, R.; HASSOUN, A.; ETHUIN, P. **Front face fluorescence spectroscopy enables rapid differentiation of fresh and frozen-thawed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) filets.** Journal of Food Engineering. p 89 e 98. Lens – França, 2020.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy** (3rd ed.). Springer, 2006.

LASCH, P. **Infrared spectroscopy in food science.** Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2012

MAITY, C.; BAGKAR, P; DIXIT, Y.; TIWARI, A. ***Alkalihalobacillus clausii* 088AE as a functional and medical food ingredient: assessment of in vitro protein digestibility and food calorie reduction.** International Journal of Food Science and Technology. v.57, p.3440 - 3455. Maharashtra – India, 2022.

MARANNI, A. C.; CENA, C. R. **Espectroscopia óptica aplicada para diferenciação de Bactérias gram-positivas e gram-negativas.** 71º reunião anual da SBPC. Campo Grande – MS, 2019.

MAZZUCATO, C.; **Caracterização do potencial de filmes de PVC dopado com óleo essencial de alecrim para o controle microambiental em embalagens de alimentos.** Dissertação - Ciências e Tecnologia Ambiental – FACET- Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados – MS, 2013.

MENEZES, T, M. **Potencial Reposicionamento de inibidores da tirosina quinase no tratamento da doença Alzheimer e efeitos no biotransporte associados à glicação de proteínas.** Tese - Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal de Pernambuco – UFP. Recife – PE, 2022.

MERICI, T. A. **Metodologias de Identificação de Bactérias do Solo da Restinga de Massambaba, localizada no município de Arraial do Cabo/RJ, utilizando técnicas que atuam na região visível do espectro eletromagnético.** Dissertação de Mestrado - Pós-graduação em Engenharia Ambiental - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense. Cabo Frio – Rio de Janeiro, 2014).

MICHELS, F. S.; TRINDADE, M. A. G.; FALCÃO, E. A.; GUIMARÃES, R. C. A. B.; OLIVEIRA, S. L.; CAIRES, A. R. L. **The effect of the excitation light intensity during on-line monitoring of biodiesel by fluorescence spectroscopy.** Editora Elsevier. Combustíveis. p 395-400. Amsterdã – Holanda, 2017.

MORAIS, G. R. **Espectroscopia vibracional para avaliação ex vivo da dinâmica das ações induzidas por fungos patogênicos em tecidos biológicos.** Tese - Programa de Pós-Graduação em Física - Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – PR, 2016.

MOURA, C. M. C. **Avaliação da Qualidade Microbiológica de Filés de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e do gelo durante a armazenagem.** Dissertação (Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí. Teresina – PI, 2017.

NAUMANN, D. **Some ultrastructural information on intact, living bacterial cells and related cell-wall fragments as given by FTIR.** Infrared Physics, v. 24, n. 2-3, p. 233- 238, 1984.

NAVARRA, P. **Kinetics of Intestinal Presence of Spores Following Oral Administration of *Bacillus clausii* Formulations: Three Single-Centre, Crossover, Randomised, Open-Label Studies.** European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, v. 46, n. 3, 2021.

NELSON, W. H. **Instrumental Methods for Rapid Microbiological Analysis.** VCH, p. 22. New York, 1985.

NEVES, R, F, O. **Ferramenta para diagnóstico de doenças em citros baseada na combinação de técnicas de espectroscopia de fluorescência somada a algoritmos de aprendizagem de máquina.** Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Física – Universidade de São Paulo – USP. São Carlos, 2020.

PYLE, B. H. BROADAWAY, S. C. FETERS, G. A. **Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Food and Water by Immunomagnetic Separation and Solid-Phase Laser Cytometry.** American Society for Microbiology. Applied and Environmental Microbiology. v.65. n°5. p. 1966–1972. Bozeman – 1999.

RAMONA, C, S. GUYON, F. MAGDAS, D, A. **Application of emission – excitation matrices in parallel with factor analysis with other chemometric techniques for honey classification.** Journal of Food Composition and Analysis. p. 107. Napoca – Romania, 2023.

REIS, C. M. F. RAMOS, G. L. P. A. SILVA, D. C. V. COSTA, L. E. O. **Métodos de identificação de patógenos: Desafios e aplicação em species do gênero *Listéria*.** Instituto

Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ). Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente, v.2, n.11, p.85-103, Rio de Janeiro – RJ, 2021.

ROSCH, P.; HARZ, M.; SCHITT, M.; PESCHKE, K. D.; RONNEBERGER, O.; BURKHARDT, H.; MOTZKUS, H. W.; LANKERS, M.; HOFER, S.; THIELE, H.; POPP, J. **Chemotaxonomic Identification of Single Bacteria by Micro-Raman Spectroscopy: Application to Clean-Room-Relevant Biological Contaminations.** Applied and Environmental Microbiology. p. 1626–1637. v.71, n°. 3. 2005.

ROSELLE, D. C.; SEAVER, M.; EVERSOLE, J. D. **Changes in intrinsic fluorescence during the production of viable but nonculturable Escherichia coli.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 20, 265–267. 1998.

SANTOS, D. F. AMÊNDOLA, I. SANTOS, S. S. F. **Bacillus clausii: Revisão de características e aplicações na medicina, biotecnologia e indústria alimentícia.** Revista Biociências, v. 25, n. 2. Taubaté – SP, 2019.

SANTOS, V. F. **Estudo da interação e efeito modulador da Lectina das sementes de Dioclea Violacea e o antibiótico Gentamicina em Bactérias multirresistentes.** Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal do Maranhão - UFMA. São Luiz – MA, 2020.

SILVA, M, M. **Estudos Biofísicos no mapeamento da interação entre compostos biologicamente ativos e macromoléculas.** Tese - Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia – Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Maceió - AL 2022.

SILVERSTEIN, R. M., & WEBSTER, F. X. (2014). **Spectrometric identification of organic compounds** (8th ed.). New York: John Wiley & Sons.

SKOOG, D. A. HOLLER, F. J. CROUCH, STANLEY, R. **Principles of Instrumental Analysis.** 6. ed. p. 73-79. 2014.

SMITH, B. C., & DENT, G. (2005). **Modern Raman spectroscopy: A practical approach** (2nd ed.). Chichester, UK: John Wiley & Sons.

SUTTON, S. **Microbiologia: princípios e aplicações.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications.** John Wiley & Sons, 2002.

WANG, B. SHEN, F. XUEMING, H. FANG, Y. QIUHUI, H. XINGQUAN, L. **Simultaneous detection of Aspergillus moulds and aflatoxin B1 contamination in rice by laser induced fluorescence spectroscopy.** Revista Food Control. p. 145. Nanjing – China, 2023.

WOZNIAKA, M.; POLAPA, D.; KOSMIBERD, L.; CLAPA, T. **Automated fluorescence microscopy image analysis of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in alive and dead stadium.** Engineering Applications of Artificial Intelligence Journal. Poznań – Polonia, 2018.