

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO RÁPIDA DE IMUNOCOMPLEXOS A BASE DE CRISTAIS LÍQUIDOS

Luciana Ribeiro Monteiro¹; Erika Tiyoko Hordiuche²; Emilly Cristina Bulhões³; Prof. Dr. Fabio Henrique Kwasniewski⁴; Prof. Dr. Jean-Jacques Bonvent⁵

Estudante do Curso de Medicina; e-mail: monteiro.luciana@uol.com.br¹

Estudante do Curso de Medicina; e-mail: erikahordiuche@yahoo.com.br²

Estudante do Curso de Medicina; e-mail: millycristina@hotmail.com³

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fhlkwas@umc.br⁴

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: bonvent@umc.br⁵

Área do Conhecimento: Bioengenharia

Palavras-chaves: Cristal líquido; Salmonella; Detecção; microscopia óptica

INTRODUÇÃO

Os métodos geralmente utilizados para detecção de patógeno requerem que o material seja colocado em meio de cultura, onde após aproximadamente 72 horas as bactérias que se proliferaram podem ser expostas a vários testes como coagulase, sacarose, bioquímica e bacterioscópico. No caso específico da *Salmonella*, existem várias técnicas de detecção; a técnica convencional, preconizada pela Food and Drug Administration (FDA – USA) e reconhecida internacionalmente, envolve as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos e identificação por meio de testes bioquímicos e sorológicos. Esta metodologia requer um desprendimento grande de recursos e de tempo [1].

Recentemente, vários trabalhos publicados mostraram a possibilidade de fabricação de biossensores a base de cristais líquidos [2-4]. Os biossensores são dispositivos que permitem a detecção e a análise qualitativa e/ou quantitativa de biomoléculas com características singulares. O desenvolvimento de biossensores com alta sensibilidade, cada vez menores, baratos e de fácil operação é de grande interesse, pela potencialidade de aplicação em diferentes áreas como diagnóstico clínico, monitoramento intensivo da saúde, indústria de alimentos, controle do meio ambiente, controle de infecções hospitalares e na defesa da população civil. Os biossensores a base de cristal líquido (CL) vêm sendo investigados pela simplicidade de fabricação do dispositivo como também da rapidez na detecção da biomolécula.

Cristal líquido é a denominação para um estado intermediário da matéria entre o sólido cristalino, que confere propriedades anisotrópicas, e o estado líquido que possui pela fluidez [5]. Uma das fases mais simples dos cristais líquidos é a fase nemática, que apresenta uma ordem orientacional de longo alcance das moléculas. Quando um CL nemático está em contato com um substrato, as suas moléculas tendem a adotar um alinhamento específico que depende fortemente da superfície do substrato. Este alinhamento na superfície se propaga para o volume por interações elásticas entre as moléculas. Existem vários métodos de tratamento de superfície para induzir um alinhamento num nemático, que pode ser paralelamente (planar), perpendicular (homeotrópico) ou oblíquo à superfície [5].

OBJETIVOS

O objetivo principal deste projeto é desenvolver um dispositivo a base de cristais líquidos termotrópico para a detecção rápida de bactéria. Focaremos a nossa atenção na detecção da bactéria patogênica *Salmonella sp* em baixas concentrações.

METODOLOGIA

Lâminas de vidro, com área aproximada de 25mm x 15 mm e espessura de cerca de 1,1 mm, foram utilizadas como substrato para a montagem das celas de cristal líquido. As lâminas foram limpas segundo as seguintes etapas: lavagem com água contendo detergente neutro, a 60° C numa cuba a ultra-som; em seguida, enxaguadas sob fluxo de água destilada, antes de passar em “solução piranha” durante 20 s. Foi então feita uma limpeza por diferentes solventes (acetona, álcool isopropílico, água e clorofórmio), numa cuba de ultra-som por 15 min. Finalmente a secagem das lâminas foi feita por um fluxo de ar quente.

Para produzir um alinhamento homeotrópico das moléculas de CL (perpendicular à superfície) sobre as lâminas de vidro limpas, foi empregada a lecitina. Uma massa de 0,2 g de lecitina foi dissolvida em 10 ml de clorofórmio, sob agitação magnética, resultando numa solução de 2%. As lâminas foram então mergulhadas na solução de lecitina, por 10 min; em seguida, foram então lavadas com água destilada, para remoção do excesso da lecitina, e finalmente secas a uma temperatura de 100° C.

O cristal líquido utilizado em nosso trabalho foi o pentil-ciano-bifenil; um cristal líquido termotrópico conhecido como 5CB produzido pela *Merck*, que apresenta uma fase nemática à temperatura ambiente.

Para a montagem das celas, duas lâminas com lecitina foram mantidas pressionadas e coladas utilizando-se uma resina fotopolimerizável (da *3M*), cuja secagem foi obtida pela irradiação de luz ultravioleta durante 40 s.

A fim de analisar a influência do formato da bactéria sobre o defeito produzido no cristal líquido, alguns testes foram feitos inicialmente utilizando *E.coli* e *S.aureus*; uma alça da bactéria foi misturada em 10 µl de cristal líquido; foi feita ainda uma mistura de bactéria a uma amostra de urina não contaminada.

Posteriormente, no caso do estudo da detecção da *Salmonella spp* e do seu imunocomplexo, foram utilizadas misturas com maior diluição do material biológico (40 µl e 60 µl de cristal líquido), propiciando a detecção da bactéria e imunocomplexo mesmo em quantidades extremamente reduzidas. Foi também analisado o caso da *Salmonella spp* na presença de um anticorpo não-específico na matriz líquido cristalina. As misturas foram inseridas na cela de CL, por efeito de capilaridade, à temperatura ambiente, ou seja, na fase nemática.

Para analisar a perturbação introduzida pelo material biológico no meio líquido-cristalino, as texturas das celas foram observadas num microscópio óptico de luz polarizada (marca *Leica*, modelo *DMLP*), entre polarizadores cruzados. O uso de luz polarizada possibilita uma visualização simples e rápida da orientação das moléculas de cristal líquido como também a presença de defeitos produzidos localmente.

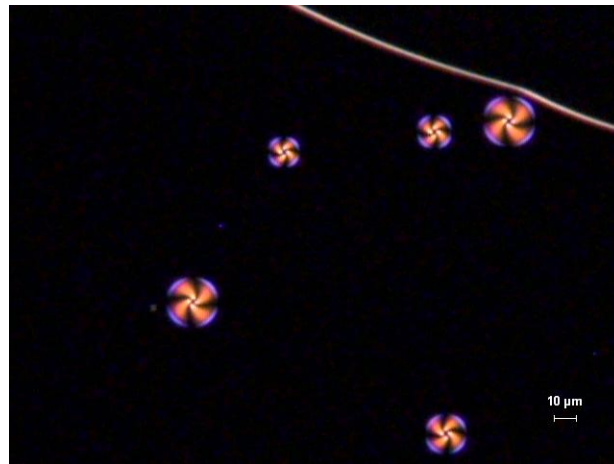
RESULTADOS E DISCUSSÃO

As imagens capturadas no microscópio óptico, com aumento de 200x, foram analisadas utilizando o software Image Pro Plus. Nas celas montadas com essencialmente o CL, foi verificada uma textura escura homogênea, indicando uma orientação homeotrópica uniforme das moléculas do CL ao longo da direção imposta pelas moléculas de lecitina.

Nas celas contendo o CL com bacilos de *E. coli*, foram observados defeitos, causados pela bactéria ou por pequenos agregados de bactérias, que apresentam um formato alongado, relacionado ao formato de bacilo.

No caso das celas de CL com cocos de *S. aureus*, aglomerado de bactérias foram observados, característico deste tipo de bactéria que tem tendência ao agrupamento.

O nosso grande objeto de estudo foi a bactéria *Salmonella*, com a qual foi feita uma série de experimentos incluindo a análise do imunocomplexo (*Salmonella* com o seu anticorpo específico), considerando também as situações da bactéria em meio salino (sem cristal líquido) e a mesma com um anticorpo não específico. No caso da bactéria inserida no cristal líquido, verificamos a presença de defeitos de forma alongada sugerindo uma relação direta com seu formato de bacilo. Nas celas sem o cristal líquido, ou seja, com a *Salmonella* numa solução salina, não foi observado a presença de defeitos. Este resultado mostra que a observação da bactéria, nas condições utilizadas, ocorre pela amplificação de uma deformação no meio líquido-cristalino. Nas celas com o imunocomplexo, observamos a presença de formação bem diferenciada e característica das encontradas anteriormente.



Fotomicrografia de cela de CL com imunocomplexo (Salmonella ssp+anticorpo)

Nas celas contendo a *Salmonella* e o anticorpo não-específico num meio de CL, foi observada essencialmente a presença de formação típica de bacilo e formação de alguns aglomerados, porém não constava nenhum tipo de defeitos característicos da formação de imunocomplexo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que é possível detectar a presença de bactéria, pela geração de defeitos numa matriz líquido-cristalina, através num microscópio óptico, entre polarizadores cruzados e com baixo aumento (200x).

Foi analisada a deformação causada pela bactéria *Salmonella* com seu anticorpo, ou seja, do imunocomplexo. A análise das imagens obtidas mostra que a formação do imunocomplexo provoca defeitos característicos, indicando uma boa seletividade do método de detecção investigado. Vale destacar que além da rapidez da detecção, os resultados obtidos utilizando baixas concentrações de bactéria indicam uma certa sensibilidade deste método.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

de Gennes P. G. ; ProsJ. t, “ *physics of liquid crystals*”, Clarendon Press, Oxford (1991).

Grolau S.; Abbott N.L.; de Pablo J.J., “*Dynamic interaction between suspended particles and defects in nematic liquid crystal*”, Phys. Rev. E **67**, 051703 (2003).

Helfinstine S.L.; Lavrentovich O.D.; Woolverton C.J. “*Lyotropic liquid crystal as a real-time detector of microbial immune complexes*”, Letters in Applied Microbiology **43** (1), 27–32 (2006).

Reis R.B.; Mamizuka E.M.; Franco B.D.G.M. “*Padronização de um teste imunoenzimático para detecção de Salmonella em alimentos*”, (2002).

Shiyanovskii S.V.; Schneider T.; Smalyukh I.I.; Ishikawa T.; Niehaus G.D.; Doane K.J.; Woolverton C.J.; O.D. Lavrentovich. “Real-time microbe detection based on director distortions around growing immune complexes in lyotropic chromonic liquid crystals”, Phys. Rev. E 71, 020702 (R) (2005).