UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO DEPARTAMENTO DE SEMICONDUTORES, INSTRUMENTOS E FOTÔNICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Efeitos do Campo Eletromagnético em Células e Bactérias

Márcia Regina Lombardo Amaduci Orientador: Prof. Dr. Vitor Baranauskas

> Campinas, SP – Brasil Abril - 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO DEPARTAMENTO DE SEMICONDUTORES, INSTRUMENTOS E FOTÔNICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

<u>Efeitos do Campo Eletromagnético em Células e</u> <u>Bactérias</u>

Márcia Regina Lombardo Amaduci

Tese apresentada na Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de <u>Mestre em Engenharia Elétrica</u>

Orientador: Prof. Dr. Vitor Baranauskas

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Tomomasa Yano Dr. Alfredo Carlos Peterlevitz Dr. Helder José Ceragioli Prof. Dr. Vitor Baranauskas (presidente)

> Campinas, SP – Brasil Abril - 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -UNICAMP

 Amaduci, Márcia Regina Lombardo
 Am92e Efeitos do Campo Eletromagnético em Células e Bactérias / Márcia Regina Lombardo Amaduci. --Campinas, SP: [s.n.], 2007.

> Orientador: Vitor Baranauskas Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Campos eletromagnéticos. 2. Eschericha coli. 3. Microscopia eletrônica de varredura. 4. Microscopia eletrônica. I. Baranauskas, Vitor. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. III. Título.

Título em Inglês: Effects of Electromagnetic Field in Cells and Bacteria Palavras-chave em Inglês: Electromagnetic field, Escherichia coli, Transmission electronic microscopy (TEM), Scanning electronic microscopy (SEM) Área de concentração: Eletrônica, Microeletrônica e Optoeletrônica Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica Banca examinadora: Tomamasa Yano, Alfredo Carlos Peterlevitz, Helder José Ceragioli Data da defesa: 27/04/2007 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

Candidata: Márcia Regina Lombardo Amaduci

Data da Defesa: 27 de abril de 2007

Título da Tese: "Efeitos do Campo Eletromagnético em Células e Bactérias"

and the second
Prof. Dr. Vitor Baranauskas (Presidente):
Prof. Dr. Tomomasa Yano: Mayee
Dr. Helder José Ceragioli: Holler for Pussiole
Dr. Alfredo Carlos Peterlevitz: - Hutering

"Celebrai com júbilo ao Senhor, todas as terras". "Servir ao Senhor com alegria, e entrai diante dele com cânticos". Salmo, 100:1

Ao meu marido Klaus, aos meus irmãos, por terem confiado em mim.

Agradecimentos

Aos meus pais em memória, pelo amor, dedicação, ensinamentos sem os quais eu não teria chegado aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vitor Baranauskas, pela paciência, orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. César Lattes em memória, pela amizade, criatividade e compreensão.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela confiança, ensinamentos e convivência.

Ao Prof. Dr. Carlos Murari, pela colaboração, correções, sugestões e a arte em lecionar.

Ao Dr. Helder Ceragiolli e ao Dr. Alfredo Peterlevitz pela amizade e incentivo, (Lab. da Engenharia Elétrica - DSIF/FEEC).

Aos meus amados Anderson, Mara, Gisele, D. Toninha, Samuel e Matheus pelo amor e orações.

A Mami Else e ao Papi Harald, pela confiança e carinho.

A UNICAMP e a Capes pelos recursos financeiros à pesquisa.

A todos os meus amigos, pelo carinho e convivência, em especial a família Babel.

A Prof. Dr^a. Maria Alice da Cruz Höfling e ao Prof. Dr. Paulo P. Joazeiro pela colaboração. As técnicas que muito me auxiliaram neste trabalho, a Estela (Lab. de Antígenos Bacterianos), a Marta (Lab.de Histologia / IB), a Antonia e a Adriane (Lab.de Microscopia / IB).

A todos os funcionários da UNICAMP, em especial a Giane, a Noêmia e a Cristina.

Ao meu marido Klaus, ao meu filho Johann e ao mais novo Kumpart, aos quais dedico o meu amor e este trabalho.

Resumo

Este trabalho refere-se a alguns efeitos de um campo eletromagnético aplicados em colônias bacterianas. A bactéria escolhida é bastante conhecida no mundo científico e tratase da *Escherichia coli (E. coli)*. A parte experimental divide-se entre a análise quantitativa, qualitativa e morfológica sobre o ciclo de vida da *E. coli*. O circuito eletromagnético foi gerado a partir de uma freqüência de 60Hz. Durante um período de 18h, as bactérias acopladas ao circuito eletromagnético se proliferaram em meio aquoso e a cada fase do ciclo de vida da *E. coli*, foram realizadas diluições em tubos de ensaio para a análise da absorbância e contagem de bactérias viáveis. Ao mesmo tempo foram colocados em uma estufa, na mesma temperatura do circuito, tubos contendo a mesma amostra em quantidade e qualidade, para uma análise paralela do seu ciclo de vida. O trabalho inclui análise morfológica, com a utilização da microscopia eletrônica de transmissão (MET) e da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Palavras chaves: Campo eletromagnético, *Escherichia coli*, microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de Varredura (MEV).

Abstract

This research work studies some effects of an electromagnetic field applied on bacteria. The chosen bacterium is quite known in the scientific world, the *Escherichia coli* (*E. coli*). The experimental part was divided into the quantitative, qualitative and morphologic analysis on the life of bacterium *Escherichia coli*. The electromagnetic circuit was generated from a frequency of 60Hz. During a period of 18h, the bacteria connected to the electromagnetic circuit proliferated in watery way, and for each phase of the life cycle of E. coli LT1, dilutions in test tube were performed for the analysis of the absorbancy and counting of viable bacteria. At the same time, other test tubes holding the same sample in amount and quality were placed in a incubator, at the same temperature of the circuit, for a parallel analysis of its cycle of life. The work includes morphologic analysis, with the use of transmission electronic microscopy (TEM), and scanning electronic microscopy (SEM).

Keywords: Electromagnetic field, *Escherichia coli*, Transmission Electronic Microscopy (TEM), Scanning Electronic Microscopy (SEM).

<u>CONTEÚDO</u>

CAPÍTULO I		
INTRO	DUCÃO	1
1	Oroanização da Tese	2
2.	Referência	2
CAPÍTI		
	US DU CAMPU ELE I KUMAGNE I ICU EM BAC I EKIAS	
1.	Prefacio	
2.	Revisao Bibliografica	
5. 1	Parle Experimental	14
4. 5	Resultados e Discussoes	22 5 <i>1</i>
5.	Kejerencius	
CAPÍTU	ILO III	55
MI	CROSCOPIA DE TRANSMISSÃO (MET) EM CÉLULAS DA BA	CTÉRIA
ESCUI	ENOLUTIA COLI	CTERM 55
	Prefázio	
1. 2	Povisão Riblioaráfica	
2. 3	Parte Experimental	
5. 4	Resultados e Discussões	
CAPITU	LO IV	
M	ICROSCOPIA DE VARREDURA (MEV) EM CÉLULAS DA BA(CTÉRIA
ESCHI	ERICHIA COLI	
1.	Prefácio	76
2.	Revisão Bibliográfica	77
3.	Parte Experimental	81
4.	Resultados e Discussões	83
5.	Referências do Capítulo III e IV	91
CAPÍTU	JLO V	92
CONSI	IDERAÇÕES FINAIS	
1.	Conclusões Gerais	
2.	Sugestões para trabalhos futuros	

Capítulo I

Introdução

A religião, a sociedade e a natureza, tais são as três lutas do homem. Estas três lutas são ao mesmo tempo as suas três necessidades; precisa crer daí o tempo; precisa criar daí a cidade; precisa viver daí a tecnologia.

O resultado do desenvolvimento tecnológico da humanidade é a construção de determinadas técnicas, as quais nascem da observação dos fenômenos e nas realizações experimentais.

Estabelecer leis, imaginar hipóteses, testar a hipótese escolhida e criar uma nova teoria, foram feitos de grandes nomes, como Galileo Galilei, Pitágoras, entre outros.

Alguns trabalhos já foram realizados a fim de compreender a interação de campos eletromagnéticos em materiais biológicos, sendo um ponto chave na identificação de efeitos possíveis induzidos. Desde o começo, a maioria da atenção destas pesquisas, focalizaram os efeitos em sistemas nervosos. A importância deste alvo tem aumentado recentemente devido à larga difusão de terminais móveis usados perto da cabeça. Muitos trabalhos com o objetivo de verificar os possíveis perigos a saúde humana, analisaram especificamente os efeitos térmicos, [1].

Após muitos anos do estudo, há muitos interesses e controvérsias que cercam os efeitos de campos eletromagnéticos e da radiação de baixo nível, [2]. Um outro trabalho, estudou a exposição de ovos férteis do *Paracentrotus lividus*, o Ouriço-do-mar a um campo eletromagnético na freqüência 75Hz, o qual conduziu a formação de embriões anômalos, [3].

O desafio deste trabalho é elaborar um circuito eletromagnético gerado por uma freqüência de 60 Hz, cujo procedimento está na observação, análise e correlação dos efeitos deste campo sobre o ciclo de vida da bactéria *Escherichia coli*, bactéria esta bastante conhecida em trabalhos científicos publicados.

1. Organização da Tese

Esta dissertação está organizada em cinco capítulos, sendo este o capítulo I de introdução.

O capítulo II abrange o estudo da proliferação bacteriana sob e sem o efeito do campo eletromagnético, utilizando á técnica de contagem de bactérias viáveis e massa espectral, dividido em:

- Testes de 18h do ciclo de vida da Bactéria *Escherichia coli*, utilizando uma bobina de 1000 espiras / 1A para a elaboração do circuito,
- Testes de 1h e 3h de exposição da colônia bacteriana, utilizando bobinas de 1500 espiras / 1A e 1000 espiras / 1A;
- Testes de quatro gerações expostas ao circuito eletromagnético gerado por uma bobina de 1000 espiras / 1A.

O capítulo III trabalha com a microscopia de transmissão (MET), utilizada por possibilitar a análise da estrutura interna das colônias bacterianas. O circuito elaborado utilizou a bobina de 1000 espiras / 1A, o cultivo bacteriano segue o procedimento do capítulo II, e foram obtidas imagens da bactéria *Escherichia coli* sob e sem a exposição ao campo eletromagnético gerado. O microscópio utilizado foi o modelo LEO 906, do LME/IB – UNICAMP.

O capítulo IV apresenta a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual analisa e compara a morfologia das colônias bacterianas, também sob e sem os efeitos do campo eletromagnético gerado. Segue o mesmo circuito elaborado no capítulo III, assim como o procedimento da cultura bacteriana. Foi utilizado o microscópio eletrônico de Varredura JSM – 5800LV, instalado no LME/IB – UNICAMP.

Finalmente o Capítulo V apresenta as conclusões finais e recomendações para futuros trabalhos.

2. Referência

[1] IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques, Vol. 48, (2000) 2082-2093.

- [2] Measurement + Control. Vol. 31, no. 6, (1998), 166-9.
- [3] Engineering Science and Education Journal. Vol. 7, (1998), 127-34.

Capítulo II

Efeitos do Campo Eletromagnético em bactérias

1. Prefácio

Este capítulo envolve a elaboração do circuito eletromagnético, a descrição e a proliferação da bactéria *Escherichia coli* em laboratório, e os resultados de alguns efeitos ou não sobre as colônias bacterianas expostas ao campo eletromagnético.

Alguns trabalhos já foram realizados relacionando o crescimento bacteriano sob a ação de determinadas drogas aplicadas ou campos magnéticos, podendo-se citar, como exemplo, o ácido tânico como inibidor em organismos aquáticos, [6]; as características de colônias de bactérias magnetotácitas, as quais respondem à presença campos magnéticos, [7]; a exposição da bactéria *Escherichia coli* durante 30 minutos em um campo eletromagnético gerado por uma freqüência de 50 Hz [8]; entre outros trabalhos.

O procedimento experimental deste capítulo é dividido em três etapas: testes de 18 horas com a bactéria *Escherichia coli* - LT1; testes de 1h e 3h com a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 e testes de gerações utilizando a bactéria *E.coli* LT1.

Nos resultados e discussões apresentam-se gráficos sobre a contagem de bactérias viáveis e a absorbância, os quais comparam os dados das amostras sob o efeito do campo eletromagnético (campo) e sem o efeito do campo eletromagnético (estufa).

2. Revisão Bibliográfica

A revisão Bibliográfica apresenta duas considerações gerais, o item 2.1 sobre o campo Magnético e o 2.2 sobre a bactéria *Escherichia coli*.

2.1. Campo Magnético

A primeira referência que se tem sobre Magnetismo remete a Tales de Mileto. No entanto, somente com a invenção da bússola houve maior interesse em estudar o assunto. Porém, foi no século XIX, com as equações de Maxwell e as teorias de Faraday, Àmpére, Laplace e Biot-Savart, que esta ciência obteve seu desenvolvimento máximo.

O Campo Magnético pode ser gerado através de um imã natural ou então a partir de cargas em movimento, por exemplo, uma corrente elétrica percorrendo um fio.

2.1.1. Linhas de Indução do Campo Magnético

O Campo Magnético, em cada ponto em cima dessas linhas de Indução pode ser encontrado traçando um vetor tangente a elas na direção Norte-Sul, observe a figura II-1.



Figura II-1. Formação de Linhas de Indução saindo do Norte indo para o Sul do imã.

Em um fio longo atravessado por determinada corrente elétrica constante, o Campo Magnético é ortogonal à direção da corrente. Isso se determinou experimentalmente no século XVIII por Orsted, [5].

O Campo no fio retilíneo depende basicamente da intensidade da corrente e da distância ao fio: quando maior o valor da corrente e mais próximo dele, maior será a intensidade do campo e vice-versa.

No Sistema Internacional, a unidade para o Campo Magnético é o Tesla, [T] e geralmente adota-se a letra B para representá-lo.



Figura II-2. Campo Magnético formado a partir da passagem de corrente por um condutor.

A influência do meio recebe um nome especial: permeabilidade magnética. Para o vácuo, o valor é $4\pi \times 10-7$ N/A2. Esse valor é bem aproximado também para o ar.

Lei de Bio-Savart

$$d\vec{B} = \frac{\mu_o}{4\pi} \frac{i \, (d\vec{s} \times \vec{r})}{r^3}$$

Equação II-1. Lei de Bio-Savart.

Sendo: μ_o a permeabilidade magnética no vácuo; i a corrente percorrida pelo fio; r a distância entre o fio e a o ponto a ser analisado; ds a parte infinitesimal do fio.

2.1.2. Bobina

Uma bobina consiste em um longo fio, enrolado segundo uma hélice de passo pequeno, a qual conduz uma corrente i, [1].

Os pontos de cada espira, em uma bobina estão muito próximos, e não se percebe a curvatura do fio. Desta forma, a bobina comporta-se magneticamente, como se fosse um

longo fio retilíneo, e as linhas de B, devidas a cada espira, são circunferências aproximadamente concêntricas [1].

O campo da bobina é igual à soma vetorial dos campos produzidos por todas as espiras que o constituem [1].

À proporção que a bobina se torna ideal, isto é, à medida que se aproxima da configuração de uma folha cilíndrica infinitamente longa e condutora de corrente, o valor do campo de indução em pontos exteriores tende para zero.



Figura II-3. Uma bobina de comprimento finito. Extremidade da direita de onde emergem as linhas de B comporta-se como Pólo norte de um imã, e a da esquerda, como um pólo sul, [1].

É possível considerar para uma bobina real que o campo externo seja nulo, somente se, seu comprimento for muito maior que o seu diâmetro; deve-se considerar também que os pontos exteriores estão afastados de suas extremidades [1]. Levando em consideração este fator de maior concentração do campo magnético, o circuito utilizado na parte experimental, foi elaborado de tal maneira, que a colônia de bactérias *E. coli* ficasse localizada na região central da bobina.



Figura II-4. Uma seção de uma bobina ideal, constituído de espiras adjacentes, de seção reta quadrada, equivalente a uma lâmpada cilíndrica infinitamente longa, condutora de corrente, [1].

Ao igualar a integral $\int \beta$. dl à soma de quatro integrais, têm-se;

$$\int \mathcal{B} \, d\mathbf{l} = \int_a^b \beta \, dl + \int_b^c \beta \, dl + \int_c^d \beta \, dl + \int_d^e \beta \, dl$$

Equação II-2. Somatória dos campos magnéticos de uma bobina.

A primeira integral da direita vale β h, onde β é a intensidade da indução magnética dentro da bobina e, h o comprimento (arbitrário) do segmento ab. Note-se que o percurso ab, embora paralelo ao eixo da bobina, não precisa ser coincidente com ele. A Segunda e Quarta integrais são nulas porque, para todos os elementos desses trajetos de integração, β é perpendicular aos mesmos. Isto torna β .dl igual à zero, bem como as respectivas integrais. A terceira, se refere à parte do retângulo que está fora da bobina, anular-se-á, também, pois consideramos β igual à zero em todos os pontos externos de uma bobina ideal [1].

Portanto, $\int \beta dl$, para o caminho retangular completo, vale β h. A corrente i resultante, que atravessa a área limitada pelo percurso de integração, não é idêntica à corrente i₀ da bobina, porque esse caminho corta mais de uma espira. Sendo n o número de espiras por unidade de comprimento, teremos [1]:

A lei de Ámpére torna-se:

$$1 = 1_0 (n \cdot h)$$

$$\beta h = \mu_0 i_0 \cdot nh$$

$$\beta = \mu i_0 \cdot n$$

Equação II-3. Cálculo do Campo Magnético.

Embora a equação acima tenha sido deduzida para uma bobina ideal, infinitamente longa, vale com boa aproximação, para pontos internos, próximos do centro de bobinas

reais. Mostra, além disso, que β é o mesmo em todos os pontos da seção reta da bobina, não dependendo nem do diâmetro, nem do comprimento deste [1].

A bobina foi escolhida para este trabalho devido, a praticidade física de inserir um campo eletromagnético nos tubos de ensaio, contendo meio líquido de nutrientes e da colônia bacteriana utilizada.

2.1.3. Determinação das características magnéticas do núcleo

A curva de magnetização (c.c.) do núcleo passa pêlos vértices dos laços de histerese (c.a.), quando se varia gradualmente a amplitude da tensão aplicada, conforme ilustrada na figura abaixo, [2].



Figura II-5. Intensidade de campo magnético

Usando o método de integração de tensão, com o auxílio de um circuito RC, observa-se que o laço de histerese é composto dos seguintes sinais [2]:

No eixo x:	$ H = NI = N V_X \\ ln \qquad ln R_{SH} $	$V_{X:}$ valor de pico
No eixo y:	$B = 1 \int e dt = RC V_Y$ NA NA	V_Y : valor de pico
	Equação II-4. Densidade d	o fluxo magnético.

No vértice do laço (HP, BP) tem-se a relação de permeabilidade magnética, [2]. $\mu \sim B_P = \mu 0 \ \mu_R$ H_P Equação II-5. Estimativa da permeabilidade relativa do núcleo (μ_R), em relação ao ar.

2.1.4. Efeito do entreferro sobre o campo magnético

Através das relações eletromagnéticas representadas pelas equações (7-10), podemse calcular os valores H, B e ϕ para uma dada corrente e condições de entreferro [2].

T = fmm = NI[A] (Aesp)Equação II-6. Força magnetomotriz

φ = BA [Wb] Equação II-7. Fluxo magnético

 $B = \mu H$ [T] (Wb/m²) Equação II-8. Densidade de fluxo magnético

H = NI/1 [A/m] Equação II-9. Intensidade de campo magnético

2.1.5. Cálculo das relutâncias

A relação da equação abaixo, deve ser aplicada a cada trecho do circuito magnético que contém diferentes características magnéticas, resultando relutâncias em série para um caminho magnético fechado. Circuitos magnéticos com ramificações produzem relutâncias, nas ligações em paralelo. A associação série – paralela das relutâncias é similar à de resistências elétricas [2].

 $R = 1 / \mu A$ [A-esp/Wb] Equação II-10. Relutância do circuito magnético

Sendo: l = comprimento médio do caminho;

A = área transversal do condutor magnético

 μ = permeabilidade magnética

Este item apresentou alguns conceitos sobre campo magnético e bobina, fatores imprescindíveis para a elaboração do circuito. A seguir estão alguns conceitos sobre bactéria, e em especial a *Escherichia coli* escolhida para a realização deste trabalho.

2.2. Bactéria Escherichia coli

A células se dividem em Eucarióticas que abrangem as algas, fungos, protozoários, vegetais e animais; e Procarióticas as bactérias e algas verdes azuis.

As bactérias possuem seu sistema genético localizado no material nuclear; sua estrutura do núcleo não é limitada por membrana; há um cromossomo circular; sua parede celular é formada por peptidioglicano; e sua multiplicação é realizada através da divisão binária simples, [4].

Este trabalho utiliza a bactéria *Escherichia coli* em seu procedimento experimental, faz parte da micróbiota intestinal de mamíferos, caracteriza-se por ser um bacilo gramnegativo, não esporulado, anaeróbico facultativo, cuja maioria é móvel, podendo causar infecções intestinais e extra-intestinais [3].

A *E.coli* foi identificada pela primeira vez por Theodor Von Escherich em 1885 sendo denominada inicialmente de bacterium coli. Em função de fazer parte da microbiota da maioria dos animais, por muito tempo foi considerada não patogênica. No entanto, ao longo de anos de pesquisas esta enterobactéria vem sendo associada a infecções localizadas e sistêmicas tanto em seres humanos quanto em animais, não se restringindo apenas ao sistema digestório, [4].

A seguir alguns conceitos de meio de cultura, contagem de bactérias viáveis em placa de petri, e a absorbância medida através do aparelho espectrofotômetro. Conceitos utilizados para realizar a parte experimental deste capítulo.

2.2.1. Meio de Cultura

O preparo do material nutriente para o crescimento de microorganismos em laboratório, é chamado de meio de cultura. Algumas bactérias precisam de nutrientes apropriados para seu crescimento, assim como o pH, nível de oxigênio, esterilização e temperatura apropriada. Quando desejável o crescimento bacteriano num meio sólido, utiliza-se ágar, um complexo derivado da alga marinha, sua composição possui propriedades importantes ao cultivo de bactérias [3].

O ágar é muito utilizado na alimentação humana, no preparo de sorvetes e gelatinas. A solução com ágar é preparada, e após a esterilização, ainda quente, é colocada nas placas de petri, próxima a chama azul, temperatura apropriada. Depois as placas são levadas à geladeira numa temperatura que inibe o crescimento da *E. coli* [3].

2.2.2. Contagem em Placa de Petri

O procedimento indireto é feito numa série de diluições. Cada diluição em tubo possui um décimo do tubo antecedente, então a amostra da diluição é usada para inocular a placa de petri. Nas placas, as colônias crescem em tamanho e são contadas. As amostras utilizadas são bem pequenas e os cálculos determinam o tamanho da população total [3].

A vantagem é a contagem do número de células criáveis (vivas), porém uma desvantagem é o tempo necessário para as colônias se tornarem visíveis a olho nu, às vezes em torno de 24h. Há três suposições, a bactéria cresce, se divide, e se reproduz em uma colônia independente, idêntica ao inoculo original.

É importante, que somente um número limite de células, seja desenvolvido na placa, pois algumas superlotam a superfície e não se desenvolvem. Para assegurar a contagem, o inoculo original é diluído diversas vezes; num processo chamado de diluição serial.

Reitera-se, que no meio aquoso as colônias bacterianas se proliferam em quantidade, e no meio sólido em tamanho. Por isso, após um determinado tempo, é possível visualizar a olho nu as colônias, e realizar a contagem em placas.

Neste trabalho realizou-se a diluição de 3µl da amostra em 3ml de salina 0.15M, em três diluições sucessivas como está apresentado na figura acima.



Figura II-6. Diluição da amostra na Placa Petri



Figura II-7. Diluição Serial

2.2.3. Turvação

A turvação é uma maneira de monitorar o crescimento bacteriano. Meio turvo é quando múltiplas bactérias estão num meio líquido. O instrumento para medir a turvação é o espectrofotômetro. Funciona da seguinte maneira, o feixe de luz é todo transmitido sobre uma colônia de bactérias em suspensão, para uma célula fotoelétrica [3].

O número de bactérias faz diminuir a intensidade de luz, que atravessa a célula fotoelétrica. A intensidade da luz é registrada numa escala do instrumento.

O equipamento indica a porcentagem de transmissão e fornece o registro de uma escala logarítmica, denominada absorbância ou densidade óptica (DO) [3].

A absorbância é usada para delinear o crescimento bacteriano. Quando a bactéria está em um crescimento logarítmico ou declínio, um gráfico de absorbância versus o tempo forma uma linha estreita. Se a absorbância lida é correspondente a contagem de placas da mesma cultura, esta correlação pode ser usada em futuras estimativas. Mais de um milhão de células/ml podem estar presentes na primeira observação do meio turvo, aproximadamente dez a cem milhões de células/ml, necessárias para realizar a leitura no espectrofotômetro [3].

No laboratório de Antígenos Bacterianos, do Depto. De Microbiologia e Imunologia do IB, na UNICAMP, há uma série de tubos contendo uma seqüência de diluições, designadas Escala Macfarland. A experiência toma como referência à turvação da Escala1 Macfarland, para a elaboração do inoculo original (bactéria mãe).



Figura II-8. Aparelho espectrofotômetro com o elemento salina para obtenção do zero.

A figura II-8 demonstra a incidência do feixe de luz, do aparelho espectrofotômetro, sob um tubo contendo salina. Através desta incidência o instrumento obtém o zero ou o chamado branco.



Figura II-9. Aparelho espectrofotômetro com a colônia bacteriana.

Na figura II-9, ocorre o registro da absorbância na amostra bacteriana, através da incidência do feixe de luz sob o tubo contendo o meio de cultura.

3. Parte Experimental

- 3.1. Lista de Material Elétrico
 - 01 Fonte ca ajustável (Gerador)
 - 01 Amperímetro
 - 01 Voltímetro
 - 01 Bobina de 1000 /1A espiras
 - 01 Bobina de 1500 /1A espiras
 - 01 Bobina de 600 /2A espiras
 - fios de ligação
 - 01 Bússola
- 3.2. Circuito Elétrico



Figura II –10 Circuito elétrico

3.3. Lista do Material Microbiológico - Amostra

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- ✤ Escherichia coli LT1

3.4. Equipamento

- 01 Espectrofotômetro
- 01 Esterilizador por vapor de água sob pressão (autoclave)
- Micropipetas de volume variável de 100-1000µl; 10-100µl; 1-10 µl.
- Placas de Petri para o cultivo em meio sólido
- Tubos de ensaio
- 01 Estufa
- 01 Balança Analítica
- 01 Espátula
- 01 Sistema de purificação de água Milli-Q, Millipore.
- Papel alumínio
- Algodão e gases
- 01 Becker
- 01 Alça de Drigalski
- Swab

3.5. Meio de Cultura

- Meio Rico em TSB / Tryptone
- Meio Rico em TSA / Tryptic Soy Agar
- Salina Fisiológica 0,15M
- Água deionizada purificada em sistema Milli-Q

3.6. Procedimento

O procedimento em laboratório divide-se entre a elaboração do circuito eletromagnético, o preparo da amostra, a junção do circuito com o material biológico, o tempo de exposição e crescimento bacteriano em cada etapa, e os testes realizados para a contagem de bactérias viáveis e absorbância.

3.6.1. Circuito Elétrico

O circuito elétrico foi elaborado a partir de alguns testes, que utilizaram a montagem do circuito da figura II-11, onde a partir de um valor mínimo de corrente, ia-se aumentando gradativamente o valor até que a agulha magnética se alinhasse com o eixo magnético da bússola. Originalmente a agulha da bússola estava posicionada a 90° do eixo magnético da bobina, ou seja, alinhada com o campo magnético terrestre.

As colônias bacterianas foram submetidas a um campo eletromagnético, cuja intensidade era suficiente para alinhar a agulha da bússola com o eixo magnético da bobina.



Figura II-11. Testes utilizando a bússola e as Bobinas

A figura acima é a conexão de um gerador com uma bobina, em série com um amperímetro e em paralelo com um voltímetro. O gerador é alimentado pela rede elétrica, na freqüência de 60 Hz, e a tensão varia de 127Vac a 135Vac.

Ressalta-se que este procedimento foi adotado, por não se dispor do equipamento adequado para medir a intensidade do campo eletromagnético, (eletromagnético, pois sua origem é gerada por uma corrente elétrica).



Figura II-12. Circuito elétrico-biológico

3.6.2. Preparo do Material Microbiológico

No laboratório microbiológico há tubos de ensaio contendo bactérias armazenadas em meios solidificados. Nesta experiência os tubos utilizados são referentes à bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E.coli* K12) e a LT1.

A elaboração de novas colônias bacterianas é realizada através da reprodução em meio líquido; com o auxílio de uma alça Drigalski, esta é colocada no tubo solidificado, (tomando o cuidado de escolher visualmente o local de maior área de concentração bacteriana). O material colhido é adicionado a um tubo contendo o meio líquido TSB.

Este procedimento é realizado somente em uma região próxima a uma chama azul, tendo eficácia somente em torno de uma área de 25cm.

O tubo esterilizado contendo o meio TSB é passado ao fogo ao ser aberto e fechado. Este tubo contém a amostra que dará origem a quantidade da amostra de referência (bactéria mãe) a ser utilizada neste trabalho. Será levado à estufa a temperatura de 37°C durante 24 horas para o crescimento em condições normais.

Após o tempo de crescimento, em torno de 200 ml da colônia cultivada foi diluída em um tubo de ensaio contendo 3ml de salina 0,15M. A turvação do tubo diluído em salina é comparada com a turvação do tubo padrão da Escala1 de Macfarland.

A escala1 Macfarland é uma referência de quantidade de colônias bacterianas utilizadas em laboratório microbiológico, uma maneira de padronizar a quantidade inicial de bactérias da experiência.

3.6.3. Amostra do Campo e da Estufa

Após a comparação é retirado um 1ml da solução elaborada e adicionado a um tubo de ensaio contendo 1ml do meio de cultura TSB (nutriente para o crescimento dos microorganismos em meio aquoso).

Dois tubos foram preparados nas mesmas condições e quantidades, um levado para a exposição ao campo eletromagnético e o outro para o crescimento em estufa (piloto).

Após o tempo determinado para cada experiência, o tubo de ensaio sob o efeito do campo (campo) e o tubo piloto (estufa), são levados a uma região próxima da chama para o processo de diluições.

3.6.3.1. Absorbância

Estas diluições são necessárias para medir a quantidade de massa espectral (absorbância). Toma-se inicialmente 3 µl de bactéria do tubo acoplado ao circuito (campo) e adiciona-se ao tubo de 3ml de salina 0.15M. São realizadas mais duas diluições em seqüência, diluição-1 e diluição-2. O mesmo processo de diluições devem ser realizadas com as bactérias do tubo piloto (estufa).

É importante esclarecer que a quantidade de massa espectral obtida através do espectrofotômetro inclui tanto bactérias vivas como mortas.

3.6.3.2. Bactérias viáveis

Para a contagem de bactérias viáveis toma-se 200 µl de cada diluição acima descrita e adiciona-se à placa de Petri, cultivada com o meio de cultura TSA.

Há uma técnica para espalhar as bactérias na placa de Petri, demonstrada a seguir:





Figura II-13. Espalhamento na placa de Petri

Depois do espalhamento as placas são levadas para a estufa a 37° (uma temperatura ótima de crescimento bacteriano), num período de 24h.

É importante esclarecer que, no meio aquoso, as colônias bacterianas se proliferam em quantidade e no meio sólido em tamanho das colônias. Por isso após um determinado tempo, é possível a olho nu, realizar a contagem de colônias nas Placas de Petri.

3.7. Elementos do circuito



Tubo de ensaioTermômetroIsoporA figura II-14. Elementos do circuito elétrico e biológico utilizados.

O material biológico foi posicionado na região interna central da bobina, onde a concentração do campo eletromagnético é mais intensa. O termômetro acoplado ao tubo permite um controle constante da variação de temperatura.

A fixação do tubo acoplado ao termômetro, foi realizada através de um material isopor, por ter a propriedade de isolamento térmico.



Figura II-16. Piloto

Figura II-15. Bobina contendo o material biológico

3.8. Etapas dos testes realizados

3.8.1. 1ª Etapa – Testes de 18 horas com a bactéria Escherichia coli - LT1

O circuito utilizado é o da figura II-17, a bobina é de 1000 espiras / 1A.

O preparo da amostra biológica está explicado no item 3.6.2. e 3.6.3. acima descritos.

Esta etapa possui 18h de duração, sendo a cada três horas a realização de diluições, para análise da massa espectral e contagem de bactérias vivas, nas placas de Petri. Reiterase que os testes realizados foram das colônias da estufa e do campo. Estes dados possibilitam a análise do crescimento bacteriano sob e sem a exposição ao campo eletromagnético.

3.8.2. 2ª Etapa – Teste de 1h e 3h com a bactéria Escherichia coli ATCC 25922



Figura II-17. Circuito Elétrico

O período de teste nesta etapa é de 1h e 3h, e as bobinas utilizadas são de 1000 espiras /1A e 1500 espiras /1A.

Ressalta-se a observação que após algum tempo do circuito ligado, ocorre dissipação térmica na bobina, levando a um aumento da temperatura da amostra acoplada. Para eliminar este inconveniente, manter constante a temperatura da amostra biológica, e também para maior segurança da vida útil da bobina, o circuito elétrico foi colocado em uma sala isolada, com o ar condicionado entre 15°C e 19°C. Esta variação é devida às condições internas e externas ao circuito, em cada experiência. Reitera-se que a temperatura da amostra na estufa durante toda a experiência foi mantida igual a da amostra no campo.

A questão "variação de temperatura" é um dos parâmetros mais difíceis a serem controlados.

3.8.3. 3ª Etapa – Teste de Gerações com a bactéria Escherichia coli - LT1

Este trabalho utiliza a mesma metodologia de preparo de materiais e circuito utilizado nas etapas anteriores.

Primeiramente coloca-se uma amostra de quantidade similar no circuito e na estufa.

Após o período de teste, mínimo de 18h de crescimento, retira-se o caldo e efetua-se à análise de massa espectral e quantidade de bactérias vivas.

Uma amostra é guardada, e colocada em um novo processo, sendo analisada a secunda geração, terceira geração e quarta geração de bactérias expostas ao campo eletromagnético e da amostra crescida em estufa.

4. Resultados e Discussões

1ª ETAPA - Testes de 18 horas com a bactéria Escherichia coli - LT1.

O procedimento deste trabalho encontra-se no capítulo II, Parte Experimental, item 3.8.1. Abaixo seguem todos os gráficos sobre a contagem de bactérias viáveis e absorbância desta etapa, utilizando bobina de 1000 espiras



Gráfico II-1. 1^a Experiência do número de bactérias viáveis, mostrando as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II-2. 1^a Experiência da Absorbância, referentes as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II-3. 2ª Experiência do número de bactérias viáveis, mostrando as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II-4. 2^a Experiência da Absorbância, referentes as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).





Gráfico II-5. 3ª Experiência do número de bactérias viáveis, mostrando as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II-6. 3ª Experiência da Absorbância, referentes as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II-7. 4^a Experiência do número de bactérias viáveis, mostrando as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II-8. 4^a Experiência da Absorbância, referentes as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).

5ª Experiência 18 horas



Gráfico II-9. 5^a Experiência do número de bactérias viáveis, mostrando as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II-10. 5^a Experiência da Absorbância, referentes as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).
6ª Experiência 18 horas



Gráfico II-11. 6ª Experiência do número de bactérias viáveis, mostrando as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II-12. 6^a Experiência da Absorbância, referentes as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II-13. 7^a Experiência do número de bactérias viáveis, mostrando as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II- 14. 7^a Experiência da Absorbância, referentes as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).

8ª Experiência 18 horas



Gráfico II-15. 8ª Experiência do número de bactérias viáveis, mostrando as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II- 16. 8ª Experiência da Absorbância, referentes as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).

9ª Experiência 18 horas



Gráfico II-17. 9^a Experiência do número de bactérias viáveis, mostrando as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II- 18. 9^a Experiência da Absorbância, referentes as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo). Gráfico Comparativo



Gráfico II- 19. Gráfico comparativo entre o crescimento bacteriano na estufa e no campo, num período de 18 horas, utilizando a bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 20. Gráfico comparativo entre a absorbância verificada na estufa e no campo, num período de 18 horas, utilizando a bobina de 1000 espiras.

Discussões – 1^a ETAPA: Testes de 18 horas com a bactéria *Escherichia coli* - LT1

Esta 1^a Etapa apresenta as experiênicas sobre o crescimento bacteriano, no período de dezoito horas sob as seguintes análises: a contagem de bactérias viáveis (contagem de colônias de bactérias vivas, em placas de petri), e a Absorbância (a medida da massa espectral no aparelho espectrofotômetro).

Os comentários a seguir referem-se a contagem de bactérias viáveis.

A amostra inicial utilizada foi a mesma em quantidade e qualidade tanto para a cultura realizada em estufa (Estufa), como na cultura colocada na região central da bobina (Campo).

Os tempos marcados para as análises foram de 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h.

Os gráficos II-1; II-3; II-5; II-7; II-9; II-11; II-13; II-15, e II-17 apresentam os resultados obtidos nas nove experiências realizadas no período de 18h.

O gráfico II-19 é um levantamento estatístico da porcentagem do crescimento em placa de petri (contagem de bactérias viáveis), desta etapa. Este gráfico permite verificar que nas primeiras três horas, 70% do cultivo das bactérias sob o efeito do campo eletromagnético (Campo), apresentou em torno de 20% de resistência ao crescimento, devido a adaptação das colônias bacterianas a um novo meio.

No tempo de 6h, 70% das experiências apresentaram uma superioridade em torno de 38%, da cultura exposta ao campo eletromagnético em relação a cultura na estufa.

No período de 9h, 70% das experiências demonstraram que o cultivo na estufa é em média 26% maior em relação ao campo.

No tempo de 12h, os valores medidos para o campo e estufa não apresentaram variações significativas.

No período entre 15h e 18h, respectivamente 70% e 90% das experiências apresentaram um crescimento superior no campo eletromagnético. Este valor em média é de 28% para as experiências no período de 15h, e 48% no período de 18h. Foi notória a superioridade do crescimento de bactérias viáveis no campo em relação à estufa, justamente na fase de declínio e morte bacteriana.

Seguem abaixo os comentários sobre a absorbância medida.

No tempo de 3h e 6h respectivamente, 70% e 90% das experiências realizadas apresentaram uma massa espectral superior na estufa em relação ao campo.

No período de 9h, os valores medidos para o campo e estufa não apresentaram variações significativas.

Entre 12h, 15h e 18h, respectivamente 70%, 80% e 100% das experiências realizadas apresentaram valores superiores no cultivo em estufa.

2ª ETAPA - Teste de 1h e 3h com a bactéria Escherichia coli ATCC 25922.

O procedimento deste trabalho encontra-se no capítulo II, Parte Experimental, item 3.8.2. Abaixo seguem todos os gráficos sobre a contagem de bactérias viáveis e absorbância desta etapa, mostrando as bactérias de controle (Estufa) e as expostas ao campo eletromagnético (Campo).



Gráfico II-21. 1ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 1 hora, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 22. 1ª Experiência de 1 hora sobre absorbância, utilizando bobina de 1000 espiras.

2ª Experiência – Bobina 1000 espiras / 1 hora





Gráfico II-23. 2ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 1 hora, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 24. 2ª Experiência de 1 hora sobre absorbância, utilizando bobina de 1000 espiras.

3ª Experiência – Bobina 1000 espiras / 1 hora



Gráfico II-25. 3ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 1 hora, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 26. 3ª Experiência de 1 hora sobre absorbância, utilizando bobina de 1000 espiras.

1ª Experiência – Bobina 1500 espiras / 1 hora



Gráfico II-27. 1ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 1 hora, utilizando bobina de 1500 espiras.



Gráfico II- 28. 1ª Experiência de 1 hora sobre absorbância, utilizando bobina de 1500 espiras.

2ª Experiência – Bobina 1500 espiras / 1 hora



Gráfico II-29. 2ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 1 hora, utilizando bobina de 1500 espiras.



Gráfico II- 30. 2ª Experiência de 1 hora sobre absorbância, utilizando bobina de 1500 espiras.

3ª Experiência – Bobina 1500 espiras / 1 hora



Gráfico II-31. 3ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 1 hora, utilizando bobina de 1500 espiras.



Gráfico II- 32. 3ª Experiência de 1 hora sobre absorbância, utilizando bobina de 1500 espiras.

1ª Experiência – Bobina 1000 espiras / 3 horas



Gráfico II-33. 1ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 3 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 34. 1ª Experiência de 3 horas sobre absorbância, utilizando bobina de 1000 espiras.

2ª Experiência – Bobina 1000 espiras / 3 horas



Gráfico II-35. 2ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 3 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 36. 2ª Experiência de 3 horas sobre absorbância, utilizando bobina de 1000 espiras.

3ª Experiência – Bobina 1000 espiras / 3 horas



Gráfico II-37. 3ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 3 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 38. 3ª Experiência de 3 horas sobre absorbância, utilizando bobina de 1000 espiras.

1ª Experiência – Bobina 1500 espiras / 3 horas



Gráfico II-39. 1ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 3 horas, utilizando bobina de 1500 espiras.



Gráfico II- 40. 1ª Experiência de 3 horas sobre absorbância, utilizando bobina de 1500 espiras.

2ª Experiência – Bobina 1500 espiras / 3 horas



Gráfico II-41. 2ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 3 horas, utilizando bobina de 1500 espiras.



Gráfico II- 42. 2ª Experiência de 3 horas sobre absorbância, utilizando bobina de 1500 espiras.

3ª Experiência – Bobina 1500 espiras / 3 horas



Gráfico II-43. 3ª Experiência do número de bactérias viáveis, no período de 3 horas, utilizando bobina de 1500 espiras.



Gráfico II- 44. 3ª Experiência de 3 horas sobre absorbância, utilizando bobina de 1500 espiras.

Discussões – 2ª ETAPA: Teste de 1h e 3h com a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922.

Esta 2^a Etapa apresenta as experiências sobre o crescimento bacteriano realizadas nos períodos de 1h e 3h, sob as seguintes análises: contagem de bactérias viáveis (contagem de colônias de bactérias vivas, em placas de petri), e a Absorbância (medida da massa espectral no aparelho espectrofotômetro).

O circuito eleaborado para esta etapa gerou um campo eletromagnético (ϕ) de 2,42µT com a utilização da bobina de 1000 espiras / 1 A; e 3,59µT utilizando a bobina de 1500 espiras / 1 A.

Os resultados das experiências de 1h foram apresentados através dos gráficos II–21; II-23 e II-25 com a utilização da bobina de 1000 espiras / 1 A; e os gráficos II-27; II-29 e II-31 utilizando a bobina de 1500 espiras / 1 A.

No período de 3h apresentou-se os gráficos II-33, II-35 e II-37 resultados das experiências com a bobina de 1000 espiras / 1 A; e os gráficos II-39; II-41 e II-43 resultados das experiências com a bobina de 1500 espiras / 1 A.

Nos testes de 1h e 3h considerando valores médios, a contagem de bactérias viáveis em placa de petri é 100% superior na estufa (Estufa), em relação ao crescimento sob o efeito do campo eletromagnético (Campo).

Os testes sobre a absorbância não apresentaram diferenças entre as colônias cultivadas sob o campo eletromagnético (Campo), e em estufa (Estufa) .

Os resultados para a bobina de 1000 espiras e 1500 espiras são semelhantes.

3ª ETAPA - Testes de Gerações com a bactéria Escherichia coli - LT1

Os gráficos abaixo são resultados do cultivo de quatro gerações da bactéria *Escherichia coli* – LT1 sob (campo) e sem (estufa) o efeito do campo eletromagnético aplicado neste trabalho. Este procedimento encontra-se no Capítulo II, Parte Experimental, item 3.8.3.



Gráfico II-45. Geração 01, resultado do número de bactérias viáveis em um período de 18 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 46. Geração 01, resultado da absorbância, em um período de 18 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.





Gráfico II-47. Geração 02, resultado do número de bactérias viáveis em um período de 18 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 48. Geração 02, resultado da absorbância, em um período de 18 horas, utilizando bobina de 1000 espiras. Geração -03-



Gráfico II-49. Geração 03, resultado do número de bactérias viáveis em um período de 18 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 50. Geração 03, resultado da absorbância, em um período de 18 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II-51. Geração 04, resultado do número de bactérias viáveis em um período de 18 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 52. Geração 04, resultado da absorbância, em um período de 18 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II-53. Gráfico comparativo das quatro gerações, entre o crescimento bacteriano na estufa e no campo, num período de 18 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.



Gráfico II- 54. Gráfico comparativo das quatro gerações, sobre a absorbância verificada na estufa e no campo, num período de 18 horas, utilizando bobina de 1000 espiras.

Discussões - 3ª ETAPA: Testes de Gerações com a bactéria *Escherichia coli* - LT1

A 3^a Etapa deste capítulo apresenta quatro gerações sucessivas do crescimento bacteriano da *Escherichia coli*, em um período de dezoito horas, sob as seguintes análises: contagem de bactérias viáveis e Absorbância.

Os gráficos II-45, II-47, II-49, e II-51 aprentam os resultados da contagem de bactérias viáveis em placa de petri, em função do tempo para cada geração.

O gráfico II-53 apresenta à análise comparativa da contagem de bactérias viáveis, entre as quatro gerações medidas, obtendo-se os seguintes resultados: o cultivo na primeira geração é 40% maior no campo em relação a estufa; na segunda geração não ocorreu variação significativa entre o cultivos; na terceira geração o cultivo no campo foi 59% menor em relação ao cultivo na estufa; e na quarta geração o cultivo no campo foi 19% menor em relação ao cultivo na estufa.

Ressalta-se que os gráficos II-46, II-48, II-50 e II-52 apresentam os resultados da absorbância medida, em função do tempo para cada geração.

O gráfico II-54 apresenta à análise comparativa da absorbância medida nas quatro gerações, obtendo-se os seguintes resultados: na primeira geração, a medida na amostra da estufa (Estufa) é 36% maior em relação à medida na amostra retirada do campo (Campo); na segunda geração esta diferença diminui para 30%; a terceira e a quarta geração não apresentam variações significativas entre os valores de massa espectral, para as amostras retiradas do campo e da estufa.

Cálculo do Campo Eletromagnético

Força Magnetomotriz Fluxo magnético Densidade de fluxo magnético Intensidade de campo magnético	$ \begin{aligned} \mathbf{F} &= \mathbf{fmm} = \mathbf{NI} \\ \mathbf{\phi} &= \mathbf{BA} \\ \mathbf{B} &= \mathbf{\mu}\mathbf{H} \\ \mathbf{H} &= \mathbf{NI} \end{aligned} $	[A] (A6 A H 1/1	esp) [Wb] [T] (Wb/m ²) [A/m]
Área transversal do condutor magnét	ico	$A = 0,0004 \text{ m}^2$	
comprimento médio do caminho mag	gnético	$\ln = 0.0 \ 7m$	
permeabilidade do meio (adotou-se em relação ao ar)		$\mu = 4. \pi. 10^{-7}$	[H/m]
$Rsh = 1\Omega$			
$R = 139,26.10^{6}$ [A/Wb] $T = R. \phi$			
N.I N H = $\frac{N.I}{\ln .Rsh}$ N v pelo gráfico gerado em laboratório: Vx = 132mv ln .Rsh ln.Rsh			
H _{B1000esp} = 1928,57 [A/m] [μWb]	$T_{B1000esp} = 133$	5 [A]	$\phi_{B1000esp} = 0,969$
H _{B1500esp} = 3107,14 [A/m]	$T_{B1500esp} = 21$	7,5 [A]	$\phi_{B1500esp} = 1,56 [\mu Wb]$
$B_{1500esp} = 2,42 \ [\mu T] \ ou \ (\mu Wb/m^2)$		$B_{1500esp} = 3.9$	[μT] ou (μWb/m ²)

O φ gerado no circuito utilizando a bobina de 1000 espiras / 1A é de 2,42 µT, e na bobina de 1500 espiras / 1A é de 3,59 µT.

5. Referências

- [1] Euclides Cavallari, Bento Afinini Júnior, Física Parte II, (1970), 960-963.
- [2] P.C.SE.N, Principles of Electric Machines and Power Electronics, 9-20.
- [3] Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case, Microbiology, (1998), 113-206.
- [4] Pelczar, Microbiologia, Vol.1, (1981), 8-15.
- [5] Orsted e descoberta do eletromagnetismo, Cadernos da História da Ciência, Vol.
- 10, (1986), 89-114.
- [6] Journal of Marine Biotechnology , Vol. 6, nº 2, (1998), 111-115.

[7] Wanderley de Souza, Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica aplicada às ciências biológicas, (1998), 161-177.

[8] Comparison of the low –frequency magnetic field effets on bactéria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata and Staphylococcus aureus*, Science Direct, Bioelectrochemistry, (2004), 337-341.

Capítulo III

Microscopia de Transmissão (MET) em células da bactéria *Escherichia* <u>coli</u>

1. Prefácio

O microscópio eletrônico de transmissão foi introduzido como instrumento de pesquisa por volta de 1950. Sua utilização trouxe contribuições marcantes ao conhecimento humano ao mostrar detalhes jamais antes visualizados na área biológica e das ciências de materiais. Na biologia celular proporcionou detalhes da membrana plasmática, núcleo, nucléolo, cromossomo, cloroplasto, mitocôndria, centro celular entre outros componentes, [1].

Atualmente a microscopia caminha lado ao lado com uma gama de técnicas imunológicas de biologia molecular, o que amplia tremendamente as informações obtidas ao microscópio. O sucesso desta união de técnicas resulta na possibilidade de detecção específica da bactéria, ou de seus componentes estruturais bem como componentes do tecido vegetal, enriquecendo sobremaneira as informações de morfologia e ultra-estrutura, [5].

Entre trabalhos realizados utilizando a microscopia de transmissão em culturas bacterianas, cita-se a exposição de colônias da bactéria *Escherichia coli* durante 12h a uma água ácida (AMW), e examinada no MET, apresentando diferenças significativas no volume, comprimento e na largura das bactérias expostas, o que demonstra as mudanças morfológicas ocorridas, [9].

Este capítulo apresenta o resultado da microscopia de transmissão realizada na bactéria *Escherichia coli* sob e sem o efeito do campo eletromagnético, gerado pelo circuito elétrico demonstrado no capítulo II, Figura II –12.

Para a realização da MET, este trabalho obteve a colaboração do laboratório de Antígenos Bacterianos, onde as colônias bacterianas foram proliferadas e fixadas; do laboratório da Histologia Celular, para o preparo da amostra; e do laboratório de Microscopia Eletrônica, onde foi realizada a captação das imagens.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

No início do século 20 a descoberta que elétrons acelerados comportam-se no vácuo de modo semelhante à luz, com um deslocamento em linha reta e comprimento de onda (λ) cerca de 100.000 vezes menor, possibilitou a construção de microscópios eletrônicos, [1].

A aplicação do MET tem limitações impostas pela necessidade do alto vácuo na coluna e pelo baixo poder de penetração do feixe de elétrons. Assim a microscopia em células pode ser realizada apenas em seções ultrafinas (50-100nm de espessura) o que dificulta a visualização da organização tridimensional. A voltagem para a aceleração necessária deslocar um feixe de elétrons é da ordem de 90.000 Volts, e sua resolução limita-se em torno de 0,1 - 0,2 nm, [1].



Figura III-1. Esquema do microscópio eletrônico de transmissão.

2.1.1. Preparo da Amostra

2.1.1.1. Fixação Química

Durante os primórdios do desenvolvimento do microscópio eletrônico (1930-1940), as observações eram limitadas a materiais muito pequenos ou naturalmente finos. Com a necessidade de maiores conhecimentos sobre o funcionamento e localização de organelas e compostos celulares, técnicas de preparo básico de materiais biológicos foram desenvolvidas, tais como fixação e ultramicrotomia, [5].

A função da solução fixadora é imobilizar a estrutura celular o mais próximo do estado natural e funcional da célula / tecido, paralisando o metabolismo celular e impedindo o ataque microbiano. Um fixador deve criar várias ligações estáveis e ter a capacidade de penetrar rapidamente na amostra, [6].

Sob a ação dos fixadores, como os aldeídos fórmicos e glutárico, a acroleína e o tetróxido de ósmio, as proteínas assumem o aspecto de um gel transparente, isto porque ocorre estabilização estrutural através de uma amarração que as moléculas fixadoras fazem sobre as macromoléculas sem distorcer-las muito, [2].

2.1.1.2. Conduta para boa fixação

Uma seqüência de fixação bastante aceita para células vegetais, com boa preservação ultra-estrutural consta da fixação primária com o aldeído glutárico, que fixa principalmente proteínas pelo estabelecimento de ligações divalentes com agrupamento amino, seguida de pós-fixação em tetróxido de ósmio, que reage com os lipídeos, [5].

Os fatores que afetam a velocidade de penetração dos fixadores nos diferentes tecidos de um órgão são vários, e dependem das características físico-químicas da molécula do fixador, da concentração desta, da temperatura de fixação e da textura do órgão a ser fixado, [2].

A velocidade de penetração do Aldeído Glutárico é da mesma ordem de grandeza do tetróxido de Ósmio (0,2mm – 0,6mm/hora) podendo conforme o órgão ser ligeiramente superior ou inferior. No geral o aldeído glutárico tem velocidade de penetração maior que a do tetróxido de Ósmio. O formaldeído penetra cerca de 5 a 10 vezes mais rapidamente que

qualquer dos dois fixadores citados. Além da penetração é importante considerar a velocidade de reação do fixador com as biomacromoléculas, [2].

2.1.1.3. Formaldeído

É um pó solúvel em meio aquoso ligeiramente alcalino. A solução de formaldeído preparada a partir do paraformaldeído deve ser feita extemporaneamente em capela.

O formaldeído preserva menos a estrutura celular. É utilizado porque atividades enzimáticas e propriedades imunogênicas são menos prejudicadas pelo formaldeído que por outros fixadores, [2].

2.1.1.4. Ácido Tânico

A adição de Ácido Tânico à solução fixadora visa aumentar a dispersão eletrônica dos componentes do envoltório bacteriano, facilitando suas identificações ultra-estruturais mesmo que em pequenas quantidades [14].

O Ácido Tânico serve como "mordente" para o Tetróxido de Ósmio, melhorando sua impregnação e aumentando a emissão de elétrons secundários pela superfície, [1].

2.1.1.5. Solução Tampão

Um dos requerimentos básicos para uma boa fixação de amostras de material biológico para microscopia eletrônica é a manutenção do pH das soluções fixadoras. Sabese que tecidos fixados em soluções fixadoras não tamponadas, sofrem profundas alterações uma vez que a acidificação da amostra precede sua fixação. Esta acidificação é responsável por modificações na estrutura de proteínas, como exemplo a dissociação de macromoléculas em peptídeos de menor peso molecular. Através do tamponamento de soluções fixadoras, a acidificação pode ser neutralizada ou progredir lentamente, diminuindo assim o dano sobre a amostra a ser processada, [2].

Para que um tampão seja considerado um "bom tampão", as seguintes exigências devem ser satisfeitas, [3]:

 pH entre 6.0 e 8.0, uma vez que a maioria das funções biológicas ocorre dentro desta faixa de pH;

- solubilidade máxima em água e mínima em outros solventes;
- penetração reduzida em membranas biológicas.
- efeito reduzido com íons para que alguns possam ser introduzidos na solução fixadora final;
- ausência de aminas primárias que possam reagir com o glutaraldeído interferindo assim com a fixação;
- pouca dissociação do tampão em relação à temperatura, concentração e composição iônica;
- resistência à oxidação;
- fácil de preparar.

2.1.1.6. Tampão Fosfato

É considerado o tampão mais fisiológico porque é encontrado em células na forma de fosfatos inorgânicos e éster de fosfato, não sendo tóxico para o crescimento de células em cultura. O pH dos tampões fosfato apresenta pouca variação em diferentes temperaturas. Pode produzir artefatos na forma de partículas eletrondensas de diferentes tamanhos em vários tipos de material. Na prática a utilização do tampão fosfato para a fixação pelo tetróxido de ósmio reduz a extração de componentes tissulares. Na prática o tampão fosfato é excelente para os resultados de fixação primária com aldeídos ou na fixação secundária com tetróxido de ósmio, [5].

Na parte experimental foi utilizado o Tampão fosfato 0,2M – pH 7,4 e o Tampão Maleato.

2.1.1.7. Tetróxido de Ósmio

Utilizado como fixador secundário, possui efeito oxidante drástico, assim pode destruir muita das enzimas celulares. Em reação de imunocitoquímica, a pós-fixação em ósmio é frequentemente omitida por causar substancial redução no reconhecimento do anticorpo, tendo em vista a destruição de estrutura terciária das proteínas. É muito utilizado em MET devido seu poder de preservação da integridade da membrana plasmática da célula e das organelas, [2].

Os primeiros investigadores da estrutura subcelular utilizaram tetróxido de ósmio (OSO4) para fixar os tecidos, porque a maioria dos citologistas já havia reconhecido nessa substância um bom preservador dos pormenores citológicos. Foi inicialmente usado em microscopia eletrônica por Palade em 1952. O OsO4 protege as lipoproteínas naturais dos tecidos evitando sua ruptura e coagulação, [2].

2.1.1.8. Desidratação

Praticamente todos os meios de inclusão usados em microscopia eletrônica não são miscíveis com água. Consequentemente torna-se necessário retirar toda a água do sistema biológico, o que deve ser feito de maneira gradual. Modificações bruscas podem levar ao colabamento de finas projeções citoplasmáticas, afetando a estrutura celular. Após a fixação, o material deve ser bem lavado, iniciando-se em seguida a desidratação por banhos sucessivos de concentrações crescentes de um agente adequado que substitua a água e a elimine do espécime. Os agentes desidratantes mais usados são o etanol e a acetona. Ao utilizar o etanol é aconselhável usar como etapa intermediária o óxido de propileno. As resinas são miscíveis com etanol se for feita uma agitação mais vigorosa. Os banhos seguem as concentrações de 30, 50, 70, 95 e 100%, sendo duas vezes o agente puro, [2].

O tempo em cada banho depende do tamanho do espécime, variando de 5 a 15 minutos ou até 30 minutos em células de paredes espessas, [2].

2.1.1.9. Óxido de Propileno

O poli (óxido de propileno) não é solúvel em água em condições ordinárias, líquido incolor, inflamável, reativo e tóxico. Pode polimerizar-se com a evolução do calor quando em contato com superfícies cataliticamente ativos, [4].

Muito utilizado no procedimento de desidratação, em microscopia eletrônica.

2.1.2.0. Inclusão

2.1.2.0.1. Resinas

Após a desidratação o espécime deve ser incluído em um material que permita a posterior obtenção de cortes ultrafinos. Este material deve apresentar boa estabilidade quando submetido ao feixe eletrônico e permitir uma contrastação adequada.

Utilizadas como meio de inclusão das estruturas fixadas, dando sustentação e rigidez para obtenção dos cortes semi e ultrafinos. A resina Epon é preferida por ser mais pérvia, ou seja, o corante penetra na amostra com mais eficácia, [1].

2.1.2.1. Ultramicrotomia

Os cortes semi-finos são necessários para uma triagem do material antes da visualização ao microscópio eletrônico. Esses cortes são feitos em ultramicrotomo utilizando-se facas de vidro, colocados em lâminas sob água, secos em chapa quente, e corados normalmente em azul de toluidina. Após essa triagem, troca-se a espessura de corte de 1µm para 50-70nm (cortes ultrafinos) utilizando-se facas de vidro ou de forma preferencial, (como utilizado neste trabalho), facas de diamante. Esses cortes são coletados usualmente em grades de cobre cobertas com formvar, carbono ou colodium e vistos diretamente em microscópio eletrônico. O tamanho e forma das grades variam de acordo com o fabricante, [5].

2.1.2.2. A Grade

Os cortes são colhidos sobre uma grade em geral de cobre, mas pode ser de níquel ou ouro (sendo estes dois últimos usados em citoquímica, quando houver tratamento com reagentes que ataquem o cobre), [2]. Neste trabalho foi utilizada a grade de cobre de 200 mesh.

2.1.2.3. Contrastação

Os corantes e contrastantes são utilizados para aumentar o contraste das estruturas celulares, que é pobre em cortes semi e ultrafinos de estruturas quimicamente fixadas. Para MET, normalmente utiliza-se corantes à base de metais pesados como, por exemplo,

acetato de uranila (utilizado neste trabalho), ouro, platina, ácido fosfotungístico (PTA) etc., que facilitam a visualização morfológica dos componentes celulares, [2].

2.1.2.4. Tampão Maleato

É utilizado nesta contrastação, e normalmente possui uma pequena capacidade tamponante, abaixo de pH 7.5. Este tampão parece reagir com o glutaraldeído de modo que este agente fixador deve ser evitado quando for necessário o uso do Tampão Maleato, [2].

2.1.2.5. Citrato de Chumbo (Reynolds, 1963).

Os cortes ultrafinos são contrastados normalmente com corantes à base de metais pesados como o citrato de chumbo, pois facilita a visualização morfológica dos componentes celulares, examinados em microscópio eletrônico de transmissão.

É convencional preparar uma solução com a metade da concentração original.

3. Parte Experimental

3.1. Material e Métodos

- 3.1.1. Equipamentos
- 01 circuito elétrico-biológico, Capítulo II 3.1.2.
- 01 centrífuga
- ependorfes
- Pipetas
- geladeira
- estufa
- Ultra Micrótomo Semi-Fino
- Ultra Micrótomo Ultrafino
- Microscópio Eletrônico de Transmissão marca Carlzeiss modelo LEO 906 MT
- Phmetro
- Pomens
- Agitador magnético
3.1.2. Reagentes Materiais

- Fixador: gluteroldéido, Formaldeído e Ácido Tânico;
- Tetróxido de Ósmio;
- Álcool a 30%, 50%, 70%, 95% e 100%;
- Óxido de Propileno;
- Resina Epon (E.M.S. USA);
- Acetato de Uranila 1%;
- Citrato de Chumbo
- Azul Toluidina

3.1.3. Solução Tampão

No preparo de todas as soluções utilizou-se água desionizada purificada em sistema Milli – Q.

- Tampão fosfato 0,2M - pH 7,4;

- Tampão Maleato de Sódio 0,05M - pH 5,2;

- Tampão Borato de Sódio.

3.2. Procedimento

O procedimento para a preparação das amostras inclui a fixação, a desidratação, a colocação da resina, os cortes realizados no equipamento ultramicrótomo e as etapas da utilização do MET. As amostras foram fixadas e colhidas no tempo de 0h, 9h e 15h.

3.2.1. Crescimento bacteriano e fixação química

O circuito elétrico utilizado nesta experiência é demonstrado no capítulo II, Figura II –12.

As amostras foram colhidas no tempo 0h, 9h e 15h. Reitera-se, que a amostra do tempo 0h é a mesma tanto para o tubo levado ao circuito (Campo), quanto ao tubo levado à estufa (Estufa).

Dois tubos (C-9) e (C-15) contendo 1ml de TSB e 1ml E.Coli LT1, foram submetidos ao campo eletromagnético gerado pelo circuito, e outros dois tubos (E-9) e (E-15) nas mesmas condições e ao mesmo tempo, foram levados à estufa.

A amostra no tempo 0h (I –0), foi a primeira a receber a solução fixadora.

Após 9h, foi realizada a fixação química em um dos tubos da estufa (E-9), e também em um dos tubos do circuito (C-9).

Os dois tubos (E-9) e (C-9) permaneceram sob as mesmas condições durante mais três horas, tempo estimado para garantir a boa fixação dos agentes químicos.

A solução fixadora elaborada utilizou os seguintes agentes químicos nas proporções: 5% de Glutaraldeído, 5% de Formaldeído e 0,2% de Ácido Tânico, capítulo III, item 2.2.

O volume da solução fixadora utilizado foi de 2ml, ou seja, o dobro do volume total de cada tubo.

Após 15h, o outro tubo da estufa (E-15) e o segundo tubo colocado no circuito elétrico (C-15) foram submetidos à fixação química. Para garantir uma boa fixação, permaneceram sob as condições iniciais da experiência durante mais três horas, completando 18h de crescimento e fixação.

Uma solução tampão foi adicionada a cada tubo, após retirá-los da estufa e do circuito elétrico, em quantidade dez vezes superior ao volume final da fixação, capítulo III, item 2.3.

Os tubos foram colocados na geladeira a uma temperatura de 6°C, até o próximo procedimento.

Após retirar os tubos da geladeira, as amostras foram colocadas em mini tubos chamados de Ependorf, e centrifugados em quatro sessões de 5 minutos em uma velocidade de 1500rpm.

Todo o sobrenadante é retirado, permanecendo apenas o Pellet (amostra), na parte inferior do Ependorf.

O crescimento bacteriano, a fixação química, a adição do Tampão Fosfato, o descanso na geladeira e a centrifugação foram procedimentos realizados no Laboratório de Antígenos Bacterianos.

3.2.2. Pós-fixe em Tetróxido de Ósmio

As cinco amostras, (I-0), (C-9), (C-15), (E-9), (E-15) foram levadas ao laboratório da Histologia, após a centrifugação nos ependorfes.

Num procedimento em capela, as amostras acima citadas foram lavadas com Tampão Fosfato e depois fixadas em tetróxido de Ósmio 1%, durante o período de 1h a 4°C, capítulo III, item 2.3.1 e 2.4.

Segue a desidratação realizada em temperatura ambiente, 21°C, capítulo III, item 2.5 e 2.6.

3.2.3. Desidratação

- Álcool 30%, durante 10 minutos;
- Álcool 50%, durante 10 minutos;
- Álcool 70%, durante 10 minutos;
- Álcool 95%, durante 10 minutos;
- Álcool 100%, durante duas vezes de 10 minutos;

3.2.4. Óxido de Propileno e Resina Epon.

- Òxido de Propileno, durante duas vezes de 10minutos.

Depois as amostras devem ser embebidas em Resina Epon (E.M.S. USA).

Primeiro embeber em resina – Óxido de Propileno na proporção 1:1 durante 3h, e depois em Resina Pura – Overnight, capítulo III, item 2.7.

3.2.5. Corte Semi-fino

O corte Semi-fino é realizado em navalha de vidro a 0,5 µm, e posteriormente as amostras são coradas com Azul Toluidina, em Tampão Borato de Sódio a 5%, capítulo III, item 2.8.

3.2.6. Corte Ultrafino

Os cortes ultra-finos de aproximadamente 70nm são obtidos, com emprego de navalha de diamante em Ultra-microtomo modelo LAIKA.

Uma vez coletados em telas de cobre de 200mesh, os cortes foram contrastados em Acetato de Uranila a 0,5%, em Tampão Maleato de Sódio durante 20 minutos. Logo após as amostras são lavadas em água bidestilada.

Aguardar por 30 a 60 minutos para boa secagem e contrastar em Citrato de Chumbo (contrastante de Reynolds) durante 10 minutos.

Aguardar a secagem e efetuar a análise no Microscópio Eletrônico de Transmissão empregando 60-80 KV, capítulo III, item 2.8.1 à 2.10.3.

O corte Ultrafino e a análise foram realizados no Laboratório de Microscopía Eletrônica da Biologia, sendo os demais procedimentos deste item realizados no Laboratório da Histologia.

4. Resultados e Discussões

Imagens por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra da bactéria *Escherichia* coli.

Sendo E1 -15 a amostra inicial; E15 e E9 as amostras após 15h e 9h em estufa; C15 e C9 as amostras após 15h e 9h, sob o efeito do campo eletromagnético aplicado.



Figura III-1. Imagem da *E. coli* obtida por MET amostra E1 – 15, magnificação 46.460X.



Figura III-2. Imagem obtida por MET da *E.coli*, amostra E15, magnificação 46.460X.



Figura III-3. Imagem obtida por MET da *E.coli*, amostra C15, magnificação 46.460X.



Figura III-4. Imagem da *E.coli* obtida por MET, amostra E1 – 15, magnificação 16.700 X.



Figura III-5. Imagem da *E.coli* obtida por MET, Figura III-6. Imagem da *E.coli* obtida por amostra E15, magnificação 16.700 X.

MET, amostra C15, magnificação 16.700X.



Figura III-7. Imagem da *E.coli* obtida por MET, amostra E1 – 15, magnificação 16.700 X.



Figura III-8. Imagem da *E.coli* obtida por MET, amostra E9, magnificação 16.700 X.



Figura III-9. Imagem da *E. coli* obtida MET, amostra E1 - 15, magnificação 21.560 X.



Figura III-10. Imagem da *E. coli* obtida MET, amostra C9, magnificação 21.560 X.



Figura III-11. Imagem da *E. coli* obtida MET, amostra E9, magnificação 35.970X.



Figura III-12. Imagem da *E. coli* obtida MET, amostra C9, magnificação 35.970X.





Figura III-13. Imagem da *E. coli* obtida por por MET, amostra E9, magnificação 27.800 X.

Figura III-14. Imagem da *E. coli* obtida MET, amostra C9, magnificação 7.800X.



Figura III-15. Imagem da *E. coli* obtida por MET, amostra C9, magnificação 27.800 X.



Figura III-16. Imagem da *E. coli* obtida por MET, amostra C15, magnificação 35.970 X.



Figura III-17. Imagem da *E. coli* obtida por MET, amostra C15, magnificação 35.970 X.





Figura III-18. Imagem da *E. coli* obtida por por MET, amostra E15, magnificação 35.970 X. X.

Figura III-19. Imagem da *E. coli* obtida MET, amostra E15, magnificação35.970



Figura III-20. Imagem da *E. coli* obtida por MET, amostra E15, magnificação 35.970 X.

Discussões – Microscopia de Transmissão

Este capítulo apresenta as imagens por Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra da bactéria *Escherichia Coli*-LT1. As amostras foram preparadas segundo o procedimento descrito neste capítulo, item 3.2.

As figuras III-1, III-4, III-7, e III-9 apresentam à amostra inicial (E1-15), antes do cultivo bacteriano na estufa e sob o efeito do campo eletromagnético. Através destas imagens foi possível verificar a estrutura da bactéria *Escherichia coli*, e visualizar perfeitamente a divisão (reprodução) de uma célula bacteriana.

As figuras III-8, III-11, e III-13 representam as imagens da bactéria *E. coli* após 9h de cultivo em estufa (E9); e as figuras III-10, III-12, III-14, e III-15 representam as imagens do cultivo da bactéria *E. coli* durante 9h, sob a exposição de um campo eletromagnético (C9).

As figuras III-2, III-5, III-18, e III-20 representam as imagens da bactéria *E. coli* após 15h em crescimento na estufa (E15); e as imagens das figuras III-3; III-6; III-16; III-17 e III-19 apresentam o cultivo sob a exposição do campo eletromagnético após 15h, (C15).

Reitera-se que as amostras E1-15, E9, C9, E15 e C15 estavam sob as mesmas condições normais, ou seja, pH, pressão osmótica, temperatura e meio de cultura apropriados.

Para discutir e compreender o que aconteceu na estrutura bacteriana entre as imagens das amostras na estufa (Estufa), e sob o efeito do campo eletromagnético (Campo), ressalta-se a seguinte definição: um lise bacteriano ocorre inicialmente através da quebra de membrana, e a morte bacteriana propriamente dita é gerada pelo rompimento do núcleo (DNA). Através da análise das imagens acima citadas foi possível constatar que o lise bacteriano ocorreu em maior intensidade nas bactérias expostas ao campo eletromagnético, exemplo nítido entre as figuras III-13 (E9) e III-14 (C9); III-5 (E9) e III-6 (C9) deste capítulo.

Capítulo IV

Microscopia de Varredura (MEV) em células da bactéria Escherichia coli

1. Prefácio

A idéia inicial do microscópio eletrônico foi realizada por Knoll em 1935. Ele conseguiu a focalização do feixe eletrônico sobre a superfície de uma amostra e a gravação da corrente emitida em função da posição. Três anos mais tarde, Ardenne construiu o primeiro microscópio eletrônico por varredura que possuía duas lentes magnéticas que focalizavam o feixe eletrônico. Uma amostra submetida a um feixe de elétrons apresenta diversos tipos de sinais, propiciando para cada um deles um modo particular de operação. No caso particular do MEV, o princípio de operação baseia-se fundamentalmente na quantificação dos elétrons secundários emitidos por uma amostra como resposta a uma excitação eletrônica incidente. Esta medida de elétrons secundários (ES) permite uma definição qualitativa da morfologia, e topografia da amostra, [7].

Muitos trabalhos na área biológica utilizam a microscopia de varredura para a análise morfológica, entre eles pode-se citar a avaliação da ação antimicrobial de um novo material polímero, impregnado com nanoparticulas de prata testado sobre o crescimento de colônias da bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922. Através desta técnica de microscopia pode-se comprovar a sua eficácia apresentando a inibição do crescimento nas colônias bacterianas, [8].

Neste capítulo assim como no capítulo III, apresenta-se a análise das imagens morfológicas da bactéria *Escherichia coli* sob e sem o efeito de um campo eletromagnético.

Assim como o trabalho realizado no capítulo III (MET), para a realização da Microscopia de Varredura houve a colaboração do laboratório de Antígenos Bacterianos, do laboratório da Histologia Celular e do laboratório de Microscopia Eletrônica do IB.

2. Revisão Bibliográfica

- 2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura MEV
- 2.1.1. Microscópio de Varredura

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um equipamento versátil que permite a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas. Um feixe fino de elétrons de alta energia incide na superfície da amostra, onde ocorre uma interação. Parte do feixe é refletido e depois coletado por um detector, que converte este sinal em imagem de elétrons retro espalhados (ERE); ou nesta interação, a amostra emite elétrons produzindo a chamada imagem de elétrons secundários (ES).



Figura IV-1. Esquema do Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV.

Ocorre também a emissão de raios-X, que fornece a composição química elementar de um ponto ou região da superfície, possibilitando a identificação de praticamente qualquer elemento presente. O MEV destina-se basicamente ao exame de superfície das amostras, coletando-se elétrons retro espalhados. É também possível a verificação de superfícies internas, se fraturadas e expostas, utilizando-se principalmente de elétrons secundários, [1].

2.1.2. Preparo das Amostras

As dimensões da amostra a ser examinada depende do tamanho da câmara e do porta-espécime. Como a magnificação mínima é da ordem de 10X e o diâmetro do monitor, da ordem de 20 cm, a dimensão útil máxima da amostra seria em torno de dois cm. Embora não haja restrições quanto à espessura da amostra, em geral não deve ultrapassar a 1-2 cm, [1].

2.1.3. Amostras não Metálicas

Quando o espécime em estudo, embora rígido, não for metálico (plástico, minerais, material biológico rígido, etc.), se examinado diretamente, gerará imagens com problemas. Os elétrons incidentes e absorvidos, não tendo como fluir, se acumulam e são emitidos espontaneamente, causando um efeito conhecido como carregamento. Com este efeito, porções da superfície se tornam intensamente brilhantes. Para evitar isto, a superfície em estudo deve ser coberta com uma fina camada de metal. É possível evaporando-se o metal (em geral em ouro) a vácuo em um metalizador, estando a amostra em uma mesa rotativa para que o metal cubra todos os detalhes da superfície uniformemente. Uma maneira mais eficiente de proceder a esta deposição metálica é em um sistema conhecido como "sputtering", [1].

Conforme representado na figura IV-2, as amostras previamente aderidas aos "stubs", são colocadas sobre uma placa receptora (estágio), no interior de um cilindro de vidro de doze cm de diâmetro. Acima da placa, cerca de cinco cm, encontra-se uma placa de ouro (alvo do catodo). O cilindro de vidro forma uma câmara que é fechada hermeticamente e conectada a bomba a vácuo (bomba rotativa), que produz vácuo da ordem

de 0,1 mmHg. A câmara está em conexão com um reservatório de Argônio (gás de argônio) que substitui o ar e cria uma atmosfera, embora tênue, deste gás.

Ao se atingir o vácuo requerido, em atmosfera de argônio, aciona-se o controle que fecha o circuito e estabelece-se entre as placas de ouro (alvo do catodo) e a da amostra (estágio) uma diferença de potencial suficiente para ionizar o pouco de gás, causando uma coloração violeta. Os íons positivos bombardearão a placa de ouro (que funciona como catodo) arrancando seus átomos que devido aos gases presentes caminham em zig-zag formando uma varredura nuvem (plasma) que se deposita sobre toda a superfície da câmara, inclusive na da amostra (que funciona como outro anodo).

A espessura do ouro depositado é em geral da ordem de 10-20 nm o que significa um período de "sputtering" de 2-3 min. Pode-se combinar uma evaporação prévia de carbono sobre a amostra com a de ouro, resultando numa economia da placa de ouro, [1].

Este trabalho utilizou a fixação com a adição de ácido tânico e a pós-fixação com o tetróxido de ósmio, pois para amostras biológicas estes agentes fazem com que espécimes passem a ser melhores emissores de elétrons (por causa de melhor impregnação com o ósmio) e assim necessitando "sputtering" de ouro.



Figura IV-2. Aparelho para cobertura metálica nas amostras por "sputtering".

2.1.4. Amostras Biológicas delicadas: Secagem ao ponto crítico

Quando se pretende examinar espécimes biológicos que apresentem detalhes delicados (cílios, dobras) na superfície ou ainda outras estruturas que se colapsam facilmente, há necessidade de se proceder à sua fixação para preservar a sua forma tridimensional. Em geral, o processo é similar ao usado para MET, nos estudos dos tecidos e células, envolvendo fixação com aldeídos e pós-fixação com tetróxido de ósmio dissolvidos em soluções tamponadas e isotônicas. Como o interior da coluna do MEV fica sob alto vácuo, a amostra deve ser desidratada, o que usualmente é feito em soluções de concentração crescentes de etanol ou acetona. Se a amostra tiver certa rigidez, pode-se fazer com que a acetona seque ao ar, seguida da montagem nos stubs e "sputtering". Porém, se a amostra for muito frágil, a tensão superficial da acetona ao final da secagem ao ar, pode destruir detalhes superficiais ou mesmo causar o colapso do espécime, resultando inúmeros artefatos. Este problema é usualmente contornado utilizando-se a secagem ao ponto crítico, [1].

O ponto crítico de uma substância é um conjunto de condições de temperatura e pressão, nas quais esta substância coexiste na forma gasosa e líquida, sem haver o menisco, uma interface entre elas. Quando a substância na forma líquida é aquecida em um reservatório fechado, à medida que a temperatura sobe parte do líquido se evapora e a pressão na fase gasosa aumenta, o que resulta no aumento da densidade do gás que a partir de um momento se iguala ao do líquido, deixando de existir uma separação entre elas, este é o Ponto Crítico (PC), [1]. As condições para se atingir o PC da água são muito severas para amostras biológicas, mas certas substâncias como gás carbônico (CO_2) tem PC próxima às condições normais (30°C a pressão de 80 kg/cm²), sendo utilizado rotineiramente, [1].



Figura IV - 5. Diferentes tipos de cestos de amostras, para o processo de secagem ao ponto crítico.

Os cestos devem manter a amostra em seu interior e ao mesmo tempo permitir livre fluxo dos líquidos durante a desidratação e secagem ao ponto crítico.

Alguns problemas podem surgir durante o procedimento, além de artefatos causados pelo mau preparo da amostra (deficiência de fixação ou de secagem, presença de contaminantes, etc.), [1].

O preparo da amostra para utilização do MEV é idêntico ao preparo da amostra para o MET, até a etapa da desidratação.

Concluída a desidratação o material é levado ao ponto crítico para completa secagem, colocado em suporte metálico e recoberto com ouro para a utilização do MEV.

3. Parte Experimental

- 3.1. Material e Métodos
- 3.1.1. Equipamentos
- 01 circuito elétrico-biológico, Capítulo II 3.1.2.
- 01 centrífuga
- ependorfes
- Pipetas
- geladeira
- estufa
- Microscópio Eletrônico de Varredura marca JEOL modelo JSM 5800LV

- Phmetro
- Pomens
- Agitador magnético
- 3.1.2. Reagentes Materiais
- Fixador: gluteroldéido, Formaldeído e Ácido Tânico;
- Tetróxido de Ósmio;
- Álcool a 30%, 50%, 70%, 95% e 100%;

3.1.3. Solução Tampão

No preparo de todas as soluções utilizou-se água deionizada purificada em sistema Milli –Q.

- Álcool Tampão fosfato 0,2M – pH 7,4.

3.2. Procedimento

Os itens 3.2.1. a 3.2.3. são idênticos ao Capítulo III.

3.2.4. Ponto Crítico

Reitera-se que as amostras devem estar desidratadas, contidas em "cestos" adequados ou em lamínula e mergulhadas na última solução 100% de desidratação, [1].

Este trabalho utilizou adesivos para realização do ponto crítico, necessários juntamente com papéis adequados para embalar as amostras, [1].

3.2.5. Sputtering

Após o ponto crítico o Sputtering é o último item para a análise das imagens no microscópio de varredura. As instruções de uso foram fornecidas pelas técnicas do laboratório de Microscopia.

4. Resultados e Discussões

Imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra da bactéria *Escherichia coli* – LT1.



Figura IV-1. Imagem típica de MEV da bactéria *Escherichia coli*. Amostra E1-15; amostra inicial antes do cultivo na estufa ou sob o efeito do campo eletromagnético aplicado.



Figura IV-2. Imagem típica de MEV da bactéria *Escherichia col*i. Amostra E-15; após 15h de cultivo na estufa.



Figura IV-3. Imagem típica de MEV da bactéria *Escherichia coli*. Amostra C-15; após 15h de cultivo sob o efeito do campo eletromagnético aplicado.



Figura IV-4. Imagem típica de MEV da bactéria *Escherichia coli*. Amostra E-15; após 15h de cultivo na estufa.



Figura IV-5. Imagem típica de MEV da bactéria *Escherichia coli*. Amostra E-15; após 15h de cultivo na estufa.



Figura IV-6. Imagem típica de MEV da bactéria *Escherichia coli*. Amostra C-15; após 15h de cultivo sob o efeito do campo eletromagnético aplicado.



Figura IV-7. Imagem típica de MEV da bactéria *Escherichia coli*. Amostra C-15; após 15h de cultivo sob o efeito do campo eletromagnético aplicado.

Discussões - Microscopia Eletrônica de Varredura

Este capítulo apresenta as imagens por Microscopia de Varredura (MEV) da amostra da bactéria *Escherichia Coli*-LT1, As amostras foram preparadas segundo o procedimento descrito neste capítulo, item 3.2.

A imagem E1-15 refere-se à amostra inicial; E-15 representa as imagens do cultivo em estufa após 15h; e C15 as imagens do cultivo bacteriano sob o efeito do campo eletromagnético, após 15h.

A figura IV-1 apresenta E1-15; as figuras IV-2, IV-4, IV-5 apresentam E-15; e as figuras IV-3, IV-6, IV-7 apresentam C15.

Através das imagens apresentadas neste capítulo, foi possível verificar que o tamanho das bactérias cultivadas sob o efeito do campo eletromagnético (C15), apresentam em sua morfologia uma diminuição de 50,81% em relação às cultivadas em estufa (E15) após 15h. Relação constatada entre as imagens IV-2 e IV-3 (na ampliação de 11000 vezes); e entre as imagens IV-4 / IV-5 e IV-6 / IV-7 (na ampliação de 13000 vezes).

Comparando os resultados das imagens C15 (sob efeito do campo eletromagnético) em relação as imagens E1-15 (amostra inicial), a diminuição foi de 18,18%.

5. Referências do Capítulo III e IV

[1] E. W. Kitajima, Mary Anne H. Dolder, Paulo P. Joazeiro, Microscopia eletrônica, (1999), 1-12.

[2] Wanderley de Souza, Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicada às Ciências
Biológicas, Sociedade Brasileira de Microscopia, (1998), 2 – 32.

[3] Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S. and Singh, R.M.M. Hidrogen ion buffers for biological research. Biochemistry (1996), 5:467-479.

[4] White Martins, catálogo.

[5] Baldani V. L. D., Olivares F. L., GOI S.R., Silva R. A. da, Baldani J. I., Döbereiner J., Técnicas microscópicas aplicadas na identificação e localização de bactérias fixadoras de nitrogênio e biomoléculas em tecidos vegetais: Embrapa Agrobiologia, Jul. (1998), 27.

[6] CL Woldringh, Effects of Toluene and Phenethyl Alcohol on the Ultrastructure of *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology, (1973).

[7] Scanning Electron Microscopy, Physics of Image Formation and Microanalysis, Ludwig Reimer., Springer-Verlag, (1985).

[8] Characterization of poly-{trans-[RuCl2(vpy)4]-styrene-4-vinylpyridine} impregnated with silver nanoparticles in non aqueous medium, Journal of the Brazilian Chemical Society, Vol.17, no.8., São Paulo Nov./Dec. (2006)

[9] Effect of acid mine water on *Escherichia coli*: Structural Damage, Journal Current Microbioly, Biomedical and Life Science, Vol. 14, nº 1, January (1996), 1-5.

Capítulo V

Considerações Finais

1. Conclusões Gerais

Este trabalho apresentou o cultivo da bactéria *Escherichia coli* sob e sem o efeito de um campo eletromagnético aplicado, realizando testes em um período de 18h de crescimento bacteriano, testes de gerações, e imagens realizadas por MET e MEV.

Durante as primeiras três horas de testes as colônias cultivadas sob o campo apresentaram uma resistência ao crescimento em relação às cultivadas em estufa, e nos testes finais (15,18h) ocorreu em média um aumento superior a 50%, no crescimento das bactérias cultivadas no campo.

A experiência de gerações sucessivas perimitiu a seguinte análise: o cultivo na primeira geração é 40% maior no campo em relação a estufa; na segunda geração não ocorreu variação significativa entre o cultivos; na terceira geração o cultivo no campo foi 59% menor em relação ao cultivo na estufa; e na quarta geração o cultivo no campo foi 19% menor em relação ao cultivo na estufa.

Através da análise das imagens realizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi possível verificar que o lise bacteriano ocorreu em maior intensidade nas bactérias expostas ao campo eletromagnético, exemplo nítido entre as figuras III-13 (E9) e III-14 (C9); III-5 (E9) e III-6 (C9).

Nas imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV), constatou-se que o tamanho das bactérias cultivadas sob o efeito do campo eletromagnético (C15), apresentam em sua morfologia uma diminuição de 50,81% em relação às cultivadas em estufa (E15) após 15h. Relação constatada entre as imagens IV-2 e IV-3 (na ampliação de 11000 vezes); e entre as imagens IV-4 / IV-5 e IV-6 / IV-7 (na ampliação de 13000 vezes).

2. Sugestões para trabalhos futuros

Uma das sugestões seria trabalhar com o cultivo de células e bactérias, expostas a um campo eletromagnético gerado por uma freqüência da ordem de GHz (microondas).