



## EXPLORAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E RADIAÇÃO GAMA PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES

Fabiane M. Garbim<sup>1\*</sup>, Marcela R. de Lima<sup>1</sup>, Giulianna S. Pereira<sup>1</sup>, João N. C. Bandeira<sup>1</sup>, Nadja F. G. Serrano<sup>2</sup>, Álvaro J. Boareto-Mendes<sup>1</sup> e Fernando M. Araújo-Moreira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Militar de Engenharia (IME) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Nuclear (PPGEN), Praça General Tibúrcio, 80 – Urca, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec), Rod. Washington Luís, s/n - Monjolinho, São Carlos - SP, Brasil.

\*fabiane.garbim@gmail.com

**Palavras-Chave:** Biotecnologia, Radiação Gama, Peptídeo Antimicrobiano, Biossensor.

### RESUMO

A crescente evolução tecnológica e os desafios na área nuclear exigem abordagens inovadoras que integrem conhecimentos de diferentes áreas. O presente estudo propõe uma pesquisa unindo a ciência nuclear à biotecnologia na investigação do potencial de peptídeos antimicrobianos (PAMs) derivados da bactéria *Paenibacillus polymyxa* como materiais sensíveis à radiação ionizante gama. A pesquisa se baseou em uma revisão bibliográfica abrangente e na avaliação experimental da atividade de peptídeos antimicrobianos (PAMs) derivados da bactéria *Paenibacillus polymyxa* antes e após a exposição à radiação gama. Os PAMs selecionados foram expostos a diferentes doses de radiação gama (0,5, 1,0, 4,0 e 10,0 Gy) utilizando um irradiador Gamacell 220 com fonte de Co-60. A atividade antimicrobiana dos peptídeos foi avaliada por meio do teste de difusão em agar, utilizando uma variedade de microrganismos de relevância clínica e ambiental, incluindo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans*. Estes microrganismos foram selecionados com base em sua importância médica como agentes causadores de infecções, e por representarem diferentes classes de patógenos (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas). Os resultados obtidos por meio da revisão bibliográfica e testes preliminares permitiram avaliar o potencial dos PAMs como elementos detectores em biossensores e como agentes antimicrobianos em ambientes contaminados por radiação, devido a sua capacidade de gerar variações detectáveis em suas propriedades físico-químicas quando expostos à radiação ionizante gama, permitindo a detecção rápida e precisa de níveis de radiação gama. Essa abordagem inovadora visa superar as limitações dos métodos tradicionais de detecção, que podem ser lentos, caros e complexos. A pesquisa fundamentou-se na revisão da literatura que identificaram peptídeos promissores com atividade antimicrobiana significativa em *Paenibacillus polymyxa* e a resistência desses PAMs à radiação ionizante, avaliando seu limiar de eficiência após a exposição. A capacidade dos PAMs de apresentar um limiar à radiação e manter sua atividade antimicrobiana os torna candidatos ideais para o desenvolvimento de biossensores portáteis e de resposta rápida, com custo acessível, de fácil reprodutibilidade, alta sensibilidade e outras características que espera-se de um biossensor eficiente, que podem ser aplicados em diversas áreas desde monitoramento, tais como ambiental, proteção civil, segurança pública e defesa nacional.

### 1. INTRODUÇÃO

O rápido avanço tecnológico e os desafios na área nuclear exigem soluções inovadoras que integrem conhecimentos de diversas disciplinas. A radiobiologia, por exemplo, é essencial para entender os efeitos da radiação ionizante em organismos vivos, o que é crucial tanto para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer quanto para a proteção de indivíduos expostos à radiação. Ao mesmo tempo, a biotecnologia tem alcançado progressos significativos



na manipulação de organismos e moléculas para diversas aplicações, incluindo o desenvolvimento de biossensores, que vem mostrando um grande potencial em diversas áreas, como medicina, meio ambiente e outros [1].

Detectar radiação ionizante, especialmente a radiação gama, é extremamente importante para a segurança nuclear, monitoramento ambiental e radioproteção. No entanto, métodos tradicionais de detecção, como dosímetros termoluminescentes e detectores *Geiger-Müller*, podem ser lentos, caros e complexos, o que limita sua aplicação em algumas situações. Os biossensores são dispositivos que utilizam componentes biológicos para detectar e quantificar substâncias específicas [2].

Os PAMs são pequenas proteínas ou pequenas cadeias de aminoácidos com atividade antimicrobiana produzidas por vários organismos, incluindo bactérias, fungos e plantas. A bactéria *Paenibacillus polymyxa* tem se destacado como uma fonte promissora de PAMs com diversas aplicações biotecnológicas. Entre os compostos produzidos por essa bactéria, destacam-se polimixinas, jolipeptina, polipeptins, gavaserin, saltavalin, gatavalin, fusaricidinas e polixina, que atuam contra uma variedade de bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e fungos [3][4]. A diversidade de PAMs produzidos por *P. polymyxa* demonstra o potencial biotecnológico dessa bactéria para o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos [5]. No entanto, a estabilidade desses peptídeos em condições adversas, como a exposição à radiação ionizante, ainda é pouco explorada. Um estudo preliminar sobre o efeito da radiação gama em PAMs [6], abre caminho para investigações mais aprofundadas sobre a utilização desses peptídeos em aplicações envolvendo radiação.

Com base na revisão bibliográfica a hipótese central é que os PAMs derivados de *Paenibacillus polymyxa*, devido à sua estrutura e propriedades físico-químicas, após a exposição à radiação ionizante gama, podem apresentar alterações detectáveis em suas propriedades as quais emergem como uma notável aplicação no desenvolvimento de biossensores para a radiação gama. Neste contexto, este estudo propõe uma pesquisa que integra ciência nuclear e biotecnologia para explorar o potencial de peptídeos antimicrobianos (PAMs) como materiais sensíveis à radiação gama e a potencial aplicação no desenvolvimento de biossensores.

## 2. METODOLOGIA

A metodologia deste estudo foi estruturada em etapas, detalhadas a seguir. Atualmente, o estudo ainda está em desenvolvimento, e as etapas seguintes estão planejadas para garantir o resultado satisfatório do estudo.

### 2.1. Seleção e obtenção de PAMs

A seleção dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) para este estudo foi precedida por uma revisão bibliográfica detalhada, envolvendo a análise de artigos científicos, livros e sites da área de radiobiologia, microbiologia e biotecnologia, publicados entre 2010 e a atualidade. O foco da revisão priorizou a identificação de PAMs com potencial para estabilidade frente à radiação ionizante, principalmente para aqueles produzidos por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas que formam endósporos resistentes ao estresse. Esses micro-organismos são encontrados em diversos ambientes, como o solo, a água e nas rizosferas de diferentes plantas [7].



## 2.2. Caracterização dos PAMs e atividade antimicrobiana

Após a seleção do peptídeo antimicrobiano, foi realizado a avaliação da atividade antimicrobiana dos PAMs contra diferentes microrganismos por meio de ensaios microbiológicos, como o teste de difusão em ágar e microdiluição em caldo, utilizando uma variedade de bactérias entre elas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25922), Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207, entre outras) e fungos (*Candida albicans* ATCC 10231). A atividade antimicrobiana dos PAMs foi avaliada utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, conforme as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* [8]. Após a irradiação, a atividade antimicrobiana do PAM será reavaliada para verificar possíveis alterações. A análise comparativa dos resultados pré e pós-irradiação permitirá avaliar a sensibilidade dos PAMs à radiação gama e identificar possíveis alterações em suas propriedades.

## 2.3. Irradiação dos Peptídeos Antimicrobianos.

Os peptídeos antimicrobianos obtidos foram irradiados com diferentes doses de radiação gama, variando de 0 a 10 Gy, conforme a Tab 1, utilizando uma fonte de Cobalto-60 do Laboratório de Centro de Radiações do IPEN/CNEN apresentado na Fig 1. As condições de irradiação foram controladas para garantir a reprodutibilidade dos experimentos, com atividade da fonte em Março de 2024 de 368,945 Ci, taxa de dose de 317, 88 Gy/h e temperatura de 26°C.

Tab. 1. Doses e tempo de irradiação.

<b>Dose (Gy)</b>	<b>Tempo (s)</b>
0,5	3,32
1,0	8,27
4,0	39,18
10,0	1102,00

As amostras foram irradiadas no volume de 1,5 ml em tubos *Eppendorf*, realizados em duplicatas conforme Fig. 1.



Fig. 1. Amostras no irradiador Co-60 - GamaCell 220.

## 3. RESULTADOS

Os resultados da revisão da literatura mostram que com base em [5][6], o peptídeo PpRNCD emergiu como candidato promissor. A escolha por este peptídeo específico foi fundamentada em suas características estruturais e físico-químicas únicas, as quais sugerem uma maior



estabilidade à radiação. Uma busca sistemática em bases de dados como PubMed e Scopus, nos últimos 10 anos, foi conduzida para identificar estudos que investigassem a resistência de PAMs à radiação ionizante. Os resultados dessa busca indicaram que o PpRNCD possui um limiar de eficiência relativamente alto após a exposição à radiação [6], o que o torna um candidato ideal para o desenvolvimento de biossensores. As propriedades físico-químicas do PpRNCD, como relatado em [5], aliadas à sua capacidade de possuir um limiar a radiação ionizante gama, sugerem um grande potencial para a aplicação proposta neste estudo.

Assim, até o momento os resultados indicam viabilidade na utilização de peptídeos antimicrobianos (PAMs) derivados de *Paenibacillus polymyxa* como base para o desenvolvimento de biossensores de radiação gama. Além disso, com base nos resultados da revisão bibliográfica, a Tab 2 apresenta uma avaliação detalhada da atividade antimicrobiana dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) derivados de *Paenibacillus polymyxa* contra diversos microrganismos, revelando que os PAMs apresentam atividade significativa contra bactérias Gram-positivas [5].

A avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos antimicrobianos, antes da exposição à radiação, será realizada com base na revisão bibliográfica e na Tab 2. Embora os peptídeos já tenham sido irradiados, os testes de avaliação antimicrobiana ainda não foram realizados, sendo essa a próxima etapa do estudo, que seguirá os dados de referência dos trabalhos [2][5][6]. Espera-se que os testes da avaliação antimicrobiana após a radiação ionizante apresentem estabilidade e manutenção da atividade biológica frente à irradiação. Esse limiar à radiação pode ser atribuído à sua estrutura molecular simplificada, composta por apenas cinco aminoácidos, que confere maior estabilidade estrutural apresentada no estudo [6].

Tab. 2. Avaliação antimicrobiana segundo o estudo [5].

<b>Microrganismo</b>	<b>Atividade antimicrobiana</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Não
<i>Listeria monocytogenes</i>	Não
<i>Escherichia coli</i>	Sim
<i>Enterococcus faecalis</i>	Sim
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sim
<i>Candida albicans</i>	Sim

A exposição dos peptídeos antimicrobianos à radiação gama pode sofrer alterações significativas em suas propriedades físico-químicas. A radiação ionizante, ao interagir com a água, gera espécies reativas de oxigênio (ROS) que, por sua vez, interagem com os PAMs, causando danos oxidativos e modificações estruturais [9][10]. Essas alterações resultam em modificações nas propriedades espectroscópicas e eletroquímicas dos peptídeos, tornando-os detectáveis por diversas técnicas analíticas corroborando com o estudo [11] que considera os conceitos de fotoluminescência em biomoléculas, sendo possível investigar a aplicação de diferentes técnicas utilizadas atualmente no desenvolvimento de biossensores, incluindo a imobilização dos PAMs em plataformas adequadas, como eletrodos ou fibras ópticas.

Com base nesses resultados e dando seguimento ao trabalho experimental, pretendemos demonstrar a potencialidade de aplicação do peptídeo antimicrobiano - objeto deste estudo - no desenvolvimento de biossensores de radiação gama além do fato de conseguir utilizá-los no processo de remediação microbiológica, devido o efeito antimicrobiano [12]. Imobilizado pode ser utilizado como um biossensor, de outra forma, como remediador controlando riscos, demonstrando a versatilidade. O foco nos biossensores é devido as suas principais características



em serem precisos, portáteis, rápidos e de baixo custo [13][14], superando as limitações dos métodos tradicionais de detecção. Os resultados preliminares deste estudo indicam que os PAMs derivados de *Paenibacillus polymyxa*, especialmente o peptídeo PpRNCD, são um possível e provável caminho para o desenvolvimento de biossensores de radiação gama.

#### 4. CONCLUSÃO

Este estudo conclui que o peptídeo antimicrobiano PpRNCD, produzido por *Paenibacillus polymyxa*, possui características duais e promissoras para aplicação no desenvolvimento de biossensores de radiação gama. A continuidade do trabalho experimental deverá confirmar sua viabilidade, potencializando o uso de biossensores portáteis e rápidos para aplicações em segurança nuclear e monitoramento ambiental. Portanto, o estudo visa contribuir para o avanço do conhecimento nas áreas de radiobiologia, biotecnologia, segurança e instrumentação nuclear por meio da inovação no desenvolvimento de novos métodos de detecção mediante a investigação do potencial de peptídeos antimicrobianos como materiais sensíveis à radiação gama. Embora a resistência a microrganismos, que é funcionalização dos PAMs, e o desenvolvimento de biossensores possam parecer conceitos desconexos a princípio. No contexto da pesquisa, a capacidade dos PAMs de manter sua atividade antimicrobiana mesmo após a exposição à radiação é fundamental. Pois isso, garante que em ambientes com radiação, os peptídeos antimicrobianos continuem funcionando como elementos detectores no biossensor, sem que sua função seja comprometida pela presença de microrganismos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. M. Okarvi, e H. R. Maecke. Peptides for Nuclear Medicine Therapy: chemical properties and production, *Therapeutic Nuclear Medicine*, [S.L.], pp. 105-123, (2013).
- [2] A. A. S. Alfaya e L. T. Kubota. A utilização de materiais obtidos pelo processo de Sol-Gel na construção de biossensores, *Química Nova*, v. 25, n. 5, pp. 835 - 841, (2002).
- [3] S.K. Choi *et al.* Identification and functional analysis of the fusaricidin biosynthetic gene of *Paenibacillus polymyxa* E681, *Biochem Biophys Res Commun*, v. 365, pp. 89-95, (2007).
- [4] L. Gu *et al.* Production of a newly isolated *Paenibacillus polymyxa* biocontrol agent using monosodium glutamate wastewater and potato wastewater, *J Environ Sci*, v. 22, n. 9, pp. 1407-1412, (2010).
- [5] N. F. G. Serrano, Produção de compostos antimicrobianos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D: otimização das condições de cultivo, purificação e caracterização dos bioprodutos, 2014. 233 f. Tese, Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (2014).
- [6] M. R. De Lima *et al.*, Estudo do limiar da eficiência funcional de peptídeo antimicrobiano (PAM) sujeito a irradiação gama, *International Joint Conference Radio 2022*, Poços de Caldas, pp. 363- 364. (2022).
- [7] S. Lal, e S. Tabacchioni, Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview, *Indian Journal Microbiololy*, n. 49, pp. 2-10, (2009).
- [8] Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-first informational supplement, M100-S21, Wayne, pp. 23 (2011).
- [9] D. T. Nardi, Estudo dos efeitos da radiação gama na estrutura de alguns peptídeos de relevância biológica, 2009. 110 f. Tese, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, (2009).



- [10] X.Y. Huang *et al*, Exopolysaccharides of *Paenibacillus polymyxa*: a review, *International journal of biological macromolecules*, [S.L.], v. 261, pp. 129663, (2024).
- [11] B. S. Thomazini, Desenvolvimento de biossensor óptico para detecção de microrganismos patogênicos, 2016. 124 f. Tese, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, (2016).
- [12] G. B. De Cesare *et al*, Antimicrobial Peptides: a New Frontier in Antifungal Therapy, *mBio*, 11(6), 02123-20. (2020).
- [13] J. Wang, Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors And Bioelectronics*, [S.L.], v. 21, n. 10, pp. 1887-1892, Elsevier BV. (2006).
- [14] P. D'Orazio, Biosensors in clinical chemistry, *Clinica chimica acta, International journal of clinical chemistry*, pp. 1749–176. (2011).