

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES

FERNANDO MACHADO DOS SANTOS

**EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS EM
DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS DESCARTÁVEIS DE POLIÉSTER-
TONER (PT)**

ANÁPOLIS-GO

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES

FERNANDO MACHADO DOS SANTOS

**EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS EM
DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS DESCARTÁVEIS DE POLIÉSTER-
TONER (PT)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares, da Universidade Estadual de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte.

* Bolsista CAPES

ANÁPOLIS-GO

2013

EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS EM DISPOSITIVOS
MICROFLUÍDICOS DESCARTÁVEIS DE POLIÉSTER-TONER (PT)

FERNANDO MACHADO DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

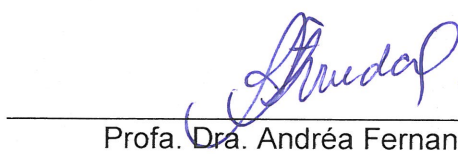
Aprovada por:



Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (UFG)



Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão (UFG)



Profa. Dra. Andréa Fernandes Arruda (UFG)

ANÁPOLIS, GO - BRASIL
NOVEMBRO 2013

*“Bem-aventurado aquele que teme ao
Senhor e anda nos seus caminhos.”
(Salmos 128:1)*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela oportunidade de estudo e por todas as bênçãos derramadas em minha vida.

Agradeço a força, amizade, carinho, conselhos e incentivos proporcionados pelos meus amigos e familiares. Ao amor e compreensão de meus pais (Domingos e Teresinha) e irmãos (Juliano e Ludmila).

Agradeço à minha orientadora, Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte, pela amizade, orientação e ensinamentos transmitidos sempre com muita ética, seriedade e sabedoria. Obrigado pela orientação!

Enfatizo em agradecer a professora, Dra. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet, pelo espaço concedido a mim no laboratório e por toda contribuição na realização deste trabalho. Agradeço também ao “mano”, Fênix Araújo de Oliveira, por todo suporte e prestatividade quando precisei.

Agradeço ao professor, Dr. Emanuel Carrilho, pelo acesso aos laboratórios do Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo (USP). Expresso aqui também minha gratidão aos colegas de laboratório do IQSC, em especial a Thiago Segato, por todo apoio.

Sou grato ao professor, Dr. Alexandre Melo Bailão, por toda ajuda e pelo material biológico fornecido para realização deste trabalho.

Agradeço a Arlete pela amizade e hospitalidade ao me receber em São Carlos-SP em minhas viagens.

Fico grato por toda colaboração e esforço por parte dos funcionários e corpo docente do programa de Mestrado em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. <i>Importância do tema: A transposição das análises de DNA para dispositivos microfluídicos</i>	3
2.2. <i>Miniaturização</i>	5
2.3. <i>Extração de DNA</i>	8
2.4. <i>Amplificação de DNA por meio da PCR</i>	11
2.5. <i>Separação Eletroforética de DNA</i>	15
2.6. <i>Bactérias</i>	18
2.6.1. <i>Azospirillum brasilense</i>	20
2.6.2. <i>Escherichia coli</i>	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. <i>Objetivos Gerais</i>	23
3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	23
4. METODOLOGIA	24
4.1. <i>Material Biológico</i>	24
4.2. <i>Antibiogramas</i>	24
4.3. <i>Produção de dispositivos microfluídicos</i>	25
4.4. <i>Extração de DNA em escala convencional</i>	26
4.5. <i>Extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE) em microchip de PT</i>	27
4.6. <i>Amplificação de DNA por meio da PCR em escala convencional</i>	29
4.7. <i>Amplificação de DNA em microchip de PT mediada por aquecimento infravermelho (IV)</i>	30
4.8. <i>Separação de DNA por eletroforese</i>	32

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. <i>Antibiogramas</i>	34
5.2. <i>Produção dos dispositivos microfluídicos de PT</i>	35
5.3. <i>Extração de DNA</i>	36
5.3.1. <i>Eficiência de Extração e Perfil de Eluição</i>	37
5.3.2. <i>Concentrações de DNA nas frações eluídas</i>	39
5.3.3. <i>Avaliação da qualidade e pureza do DNA extraído</i>	39
5.4. <i>Amplificação de DNA através da PCR mediada por aquecimento IV (IV-PCR) em microchip de PT</i>	43
5.4.1. <i>Perfil dos ciclos de aquecimento mediado por radiação IV na PCR realizada em microchip de PT</i>	44
5.4.2. <i>Passivação dinâmica da superfície</i>	45
5.4.3. <i>Amplificação dos fragmentos de 1150 pb e 1500 pb a partir das bactérias Azospirillum brasilense AbV5 e Escherichia coli BL21 respectivamente</i>	46
6. CONCLUSÃO	51
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
9. ANEXO	62
9.1. <i>Preparo dos meios de cultura</i>	62
9.2. <i>Classificação dos antibióticos quanto aos halos de inibição</i>	63
9.3. <i>Protocolo de separação de DNA em Bioanalyzer</i>	63

LISTA DE ABREVIações

- BSA** – Albumina sérica bovina
- CE** – Eletroforese Capilar (*Capillary Electrophoresis*)
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- dNTP's** – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- dSPE** – Extração Dinâmica em Fase Sólida (*dynamic Solid Phase Extraction*)
- EDTA** – Ácido Etilenodiaminotetracético
- EOF** – Fluxo Eletrosmótico (*Electroosmotic Flow*)
- CH₅N₃.HCl** – Hidroclorato de Guanidina
- IV** – Infravermelho
- K₂HPO₄** – Fosfato de Potássio Dibásico
- LB** – Lúria-Bertani broth
- LIF** – Fluorescência Induzida a Laser (*Laser Induced Fluorescence*)
- ME** – Eletroforese em Microchip (*Microchip Electrophoresis*)
- MgCl₂** – Cloreto de Magnésio
- MgSO₄.7H₂O** – Sulfato de Magnésio Heptahidratado
- NaCl** – Cloreto de Sódio
- pb** – Pares de bases
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- PDMS** – Polidimetilsiloxano
- PEG** – Polietilenoglicol
- PET** – Tereftalato de Polietileno (*Polyethylene Terephthalate*)
- PMMA** – Polimetilmetacrilato
- PT** – Poliéster-Toner
- SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
- SiO₂** – Dióxido de Silício
- SPE** – Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)
- Fe₃O₄** – Tetróxido de Triferro
- Tris** – Tris[hidroximetil]aminometano
- μTAS** – Microsistemas de Análises Totais (*Micro Total Analysis Systems*)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema das principais etapas de uma análise genética. As células são primeiramente cultivadas em meio sólido ou líquido. Em seguida as células são isoladas e após a lise, os ácidos nucleicos são purificados e separados dos outros componentes celulares. Após serem amplificadas, as moléculas de DNA são finalmente separadas e detectadas por eletroforese. Todo procedimento pode durar 8 ou mais horas, sem levar em conta a etapa de cultura de células.4
- Figura 2** – Esquema das etapas principais do processo de microfabricação utilizando uma única camada de toner. I, tampa de poliéster perfurada; II, base de poliéster impressa (a, camada de toner); III, tampa (I) e base (II) laminadas juntas; IV, dispositivo final (b, reservatórios de líquidos).7
- Figura 3** – Perfil de extração de DNA a partir de uma matriz de partículas de sílica. .9
- Figura 4** – Representação do perfil de aquecimento dos ciclos durante a PCR. 12
- Figura 5** – Amplificação exponencial do DNA por PCR. 13
- Figura 6** – Equipamento para realizar eletroforese em gel. 16
- Figura 7** – Esquema dos componentes básicos de um equipamento de eletroforese capilar. 17
- Figura 8** – (a) Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies®); (b) Microchip de vidro (Agilent Technologies®). 18
- Figura 9** – Representação das etapas do processo de microfabricação. (I) Filme de poliéster, (II) filme de poliéster recoberto com toner nos dois lados, (III) canal recortado com a cortadora a laser, (IV) alinhamento e laminação das quatro camadas de poliéster (base, tampa com dois furos para acesso aos reservatórios e os dois filmes do meio com os canais recortados).26
- Figura 10** – Etapas da extração dinâmica em fase sólida de DNA em microchip de PT.28
- Figura 11** – Sistema completo de PCR com aquecimento IV.30
- Figura 12** – (a) mini termopar tipo T; (b) microchip de PT utilizado em IV-PCR com o termopar inserido na câmara de referência.31
- Figura 13** – (a) microchip posicionado no sistema de aquecimento por radiação IV; (b) conversor analógico com termopar conectado e sistema de aquecimento por radiação IV com lâmpada de tungstênio em funcionamento.32
- Figura 14** – (a) microchip de eletroforese utilizado no Bioanalyzer; (b) Bioanalyzer com o microchip posicionado para análise.33

Figura 15 – Placas de Petri do teste de antibiograma com a bactéria <i>E. coli</i> transformada com o plasmídeo pGEX-4T-3.....	35
Figura 16 – Perfil de eluição de DNA em microchip de PT a partir das bactérias (a) <i>A. brasilense</i> e (b) <i>E. coli</i>	38
Figura 17 – Gel de eletroforese mostrando as bandas referentes à extração de DNA em microchip de PT. Linha 1 – 1kb DNA Ladder; Linhas 2 a 17 – Dezesesseis frações coletadas.....	40
Figura 18 – Gel de eletroforese mostrando as bandas referentes à amplificação do fragmento de 1500 pb do DNA extraído da bactéria <i>A. brasilense</i> em microchip de PT. Linha 1 – 1kb DNA Ladder; Linha 2 – Controle negativo de amplificação; Linhas 3 a 7– Cinco frações coletadas.	41
Figura 19 – Gel de eletroforese mostrando as bandas referentes à amplificação do fragmento de 1150 pb do DNA extraído da bactéria <i>E. coli</i> em microchip de PT. Linha 1 – 1kb DNA Ladder; Linhas 2 a 6 – Cinco frações coletadas; Linha 7 – Controle negativo de amplificação.	41
Figura 20 – Perfil dos ciclos de aquecimento para a IV-PCR realizada nos microchips de PT (a) para o fragmentos de 1150 pb da bactéria <i>A. brasilense</i> e (b) para o fragmento de 1500 pb da bactéria <i>E. coli</i>	45
Figura 21 – (a) Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 1500 pb da bactéria <i>A. brasilense</i> em microchip de PT, (b) controle positivo em termociclador e (c) controle negativo em termociclador.	47
Figura 22 – (a) Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 1150 pb da bactéria <i>E. coli</i> em microchip de PT, (b) controle positivo em termociclador e (c) controle negativo em termociclador.....	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores da razão A260/280 nm para a extração de DNA em microchip de PT a partir das culturas das bactérias *A. brasilense* e *E. coli*.42
- Tabela 2** – Comparação entre resultados obtidos em microchip e método convencional em relação à extração de DNA.43
- Tabela 3** – Número de cópias iniciais e após a PCR para os fragmentos de DNA amplificados a partir das bactérias *A. brasilense* e *E. coli* e eficiência da PCR em microchip de PT.49
- Tabela 4** – Classificação dos antibióticos utilizados no antibiograma quanto aos seus respectivos valores de halos de inibição.633

RESUMO

EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS EM DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS DESCARTÁVEIS DE POLIÉSTER-TONER (PT). A microfluídica possibilita a manipulação de pequenos volumes de fluidos em canais com dimensões micrométricas proporcionando diversas vantagens analíticas e aplicações em diferentes áreas do conhecimento. A evolução das análises envolvendo DNA em microescala busca revolucionar as técnicas analíticas e as manipulações convencionais de laboratório. No presente trabalho, foram construídos dispositivos microfluídicos de poliéster-toner (PT) para realizar a extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE) com partículas de sílica magnéticas e a amplificação de longos segmentos de DNA através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das bactérias *Azospirillum brasilense AbV5* e *Escherichia coli BL21* transformada com plasmídeo pGEX-4T-3. Por meio da quantificação das frações eluídas na extração da DNA foram elaborados os gráficos do perfil de eluição para avaliação da quantidade de DNA extraído antes e após a agitação das partículas magnéticas de sílica e o cálculo da eficiência de extração. A amplificação de DNA pela PCR foi realizada em sistema *homemade* por meio de aquecimento mediado por radiação infravermelha (IV) sendo a temperatura controlada por um termopar com o auxílio do *software* LabVIEW. A extração de DNA realizada em microchips de PT mostrou-se um método rápido, com alta eficiência de extração e pureza, podendo ser amplificado posteriormente pela PCR. Foram obtidos produtos amplificados pela PCR em dispositivos microfluídicos de PT utilizando o par de *primer* Y1 e Y3 corresponde ao gene 16S rDNA do DNA da bactéria *A. brasilense AbV5* e o par de *primer bla_{TEM} forward* e *bla_{TEM} reverse* correspondente ao gene codificador de resistência a antibióticos do DNA da bactéria *E. coli BL21*. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese no Bioanalyzer apresentando picos de fluorescência correspondentes a 1500 e 1150 pares de bases para as bactérias *A. brasilense AbV5* e *E. coli BL21*, respectivamente. Os resultados demonstraram pela primeira vez o sucesso do uso de microchips de PT para as análises de DNA de bactérias.

Palavras-chave: microfluídica, análise genética e poliéster-toner.

ABSTRACT

EXTRACTION AND AMPLIFICATION OF DNA FROM BACTERIA IN DISPOSABLE POLYESTER-TONER (PT) MICROFLUIDIC DEVICES. The microfluidic enables the manipulation of small volumes of fluids in micrometer channels providing several analytical advantages and applications in different areas. The evolution of microscale analysis seeks to revolutionize the analytical techniques and the conventional laboratory manipulations. In this work, polyester-toner (PT) microfluidic devices were constructed to perform dynamic solid phase DNA extraction (dSPE) with magnetic silica beads and amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR) from *Azospirillum brasilense* AbV5 and *Escherichia coli* BL21 transformed with pGEX-4T-3 plasmid. By the eluted fractions quantification in the DNA extraction were elaborated the graphics of the elution profile for evaluation of the amount of DNA extracted before and after the magnetic silica beads agitation and the calculation of extraction efficiency. The DNA amplification by PCR was performed on a homemade system by heating mediated by infrared radiation (IR) and temperature controlled by a thermocouple with the aid of LabVIEW software. The DNA extraction performed in PT microchips showed to be fast, with high efficient extraction and purity, that can be amplified in downstream PCR amplification. Amplified products were obtained by PCR using the primer pair Y1 and Y3 correspond to the 16S rDNA gene of the DNA of *A. brasilense* AbV5 bacteria and the primer pair *bla*_{TEM} forward and *bla*_{TEM} reverse correspond to the antibiotic resistance encoding gene of the DNA of *E. coli* BL21 bacteria. The amplified products were separated by electrophoresis on Bioanalyzer showing fluorescence peaks corresponding to 1500 and 1150 base pairs for the *A. brasilense* AbV5 and *E. coli* BL21 bacteria, respectively. The results demonstrate for the first time the successful use of PT microchips for DNA analysis from bacteria.

Keywords: microfluidics, genetic analysis and polyester-toner.

1. INTRODUÇÃO

A microfluídica é a ciência e tecnologia de sistemas que possibilita a manipulação de pequenos volumes de fluidos, em canais com dimensões de dezenas a centenas de micrômetros. Suas aplicações já demonstraram diversas vantagens como: utilização de quantidades bastante reduzidas de reagentes e amostras, baixo custo e menor tempo de análise. Na microfluídica são exploradas desde suas características mais óbvias, trabalho em pequena escala, bem como suas características mais complexas, como fluxo laminar. Isto oferece melhores condições de controle da amostra no espaço e tempo (WHITESIDES, 2006).

Nas últimas décadas os avanços na química e biologia direcionados a miniaturização de análises ocorreram de forma similar à evolução dos circuitos integrados da indústria de computadores. Estes avanços garantem para a microfluídica, também chamada de Microsistemas de Análises Totais (μ TAS), um promissor potencial em tecnologias de desenvolvimento de dispositivos microfluídicos (FIORINI *et al.*, 2005).

A microfluídica vem apresentando aplicações nas áreas de engenharia, química, física, biologia, farmácia, medicina e biotecnologia. Laboratórios de análises clínicas, por exemplo, necessitam diariamente de dispositivos simples que realizem análises rápidas, precisas e pouco dispendiosas. A prevenção ou tratamento de doenças por meio de diagnósticos clínicos é uma área importante que pode ser muito beneficiada com a microfluídica (SRINIVASAN *et al.*, 2004).

Os dispositivos microfluídicos apresentam excelentes desempenhos como ferramentas na manipulação precisa de pequenos volumes de amostras, e nos μ TAS, também conhecidos como *lab on a chip*, um procedimento analítico pode ser realizado por completo, desde o pré-tratamento da amostra até sua detecção (PAMME, 2007).

Como o desenvolvimento dos sistemas miniaturizados proporciona uma diversificada gama de aplicações, a escolha do material e as técnicas de fabricação destes dispositivos são constantemente estudadas e avaliadas por comunidades industriais e acadêmicas (ZHANG *et al.*, 2006). Vários materiais são utilizados na fabricação dos microchips, alguns exemplos são o vidro, o quartzo, o silício e alguns materiais poliméricos, como o polidimetilsiloxano (PDMS) e polimetilmetacrilato

(PMMA). Inicialmente, os principais materiais utilizados para fabricação de dispositivos microfluídicos foram o silício, quartzo e vidro, no entanto, novos tipos de materiais oferecem possibilidades para se trabalhar com dispositivos de fácil fabricação, baixo custo e descartáveis. O desenvolvimento de microchips de Poliéster-Toner (PT) proposto por Lago *et al.* (2003) trata-se de um dos processos mais simples e de baixo custo na produção de plataformas microfluídicas.

O preparo de amostra biológica quando realizados em dispositivos miniaturizados e integrados, reduzem as possibilidades de perdas e contaminação e produzem amostras adequadas (em relação a volume e concentração) para etapa de separação. Esses processos normalmente incluem o isolamento das células de interesse a partir de uma mistura e quase que universalmente envolve a extração de DNA a partir de uma matriz, seguido pela amplificação de DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Os dispositivos descartáveis de PT, que são de fabricação simples e custo quase zero (~R\$ 0,20 por microchip), representam uma alternativa adequada para realizar a extração e amplificação de DNA a partir de células bacterianas, o que futuramente proporcionará o desenvolvimento de metodologias completas para detecção e identificação de bactérias em microchips através da caracterização de genes específicos ou segmentos de genes. Neste sentido, os microchips de PT tem potencial para produção de dispositivos descartáveis completamente integrados para detecção e identificação de bactérias para diferentes aplicações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Importância do tema: A transposição das análises de DNA para dispositivos microfluídicos*

Uma análise genética convencional, que envolve técnicas de biologia molecular, pode ser dividida em três principais etapas (extração, amplificação e separação/identificação de DNA) como mostra a Figura 1. Em cada etapa na Figura 1 estão descritos o tempo e os volumes típicos utilizados na análise em escala convencional. Em análises que envolvem micro-organismos, a primeira etapa é a cultura das células, que proporciona o crescimento das células de interesse em uma densidade suficiente para análise seguida do isolamento das células que serão utilizadas nas etapas subsequentes. Na etapa de preparo de amostra os ácidos nucleicos são tradicionalmente extraídos de amostras como sangue total, líquido amniótico, soro, plasma, micro-organismos, urina, tecidos parafinados, raspados bucais, cervicais, e uretrais. A extração de DNA é realizada, na grande maioria das vezes com sílica convencional ou sílica magnética de forma manual ou automatizada. Após a extração, a mistura complexa de ácidos nucleicos extraída é pesquisada pela sequência alvo que se deseja detectar (amplificação via Reação em Cadeia da Polimerase). A sequência amplificada é então analisada diretamente por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida ou por eletroforese capilar (LAGALLY *et al.*, 2004).

Embora as técnicas de biologia molecular estejam bem estabelecidas, quando realizadas em escala convencional apresentam alguns problemas. Primeiramente, as análises genéticas tradicionais requerem múltiplas etapas de centrifugação e transferências, e com isso consomem muito tempo, além de utilizar diferentes instrumentos. A manipulação manual das soluções entre as etapas proporciona diversas oportunidades de contaminação ou até perda da amostra (EASLEY *et al.*, 2006).

Com o intuito de contornar os problemas existentes em escala convencional, cada vez mais as comunidades clínicas buscam novos caminhos para melhorar as análises de DNA para diagnósticos, de forma que se torne mais rápida, eficiente e confiável (YEO *et al.*, 2011).

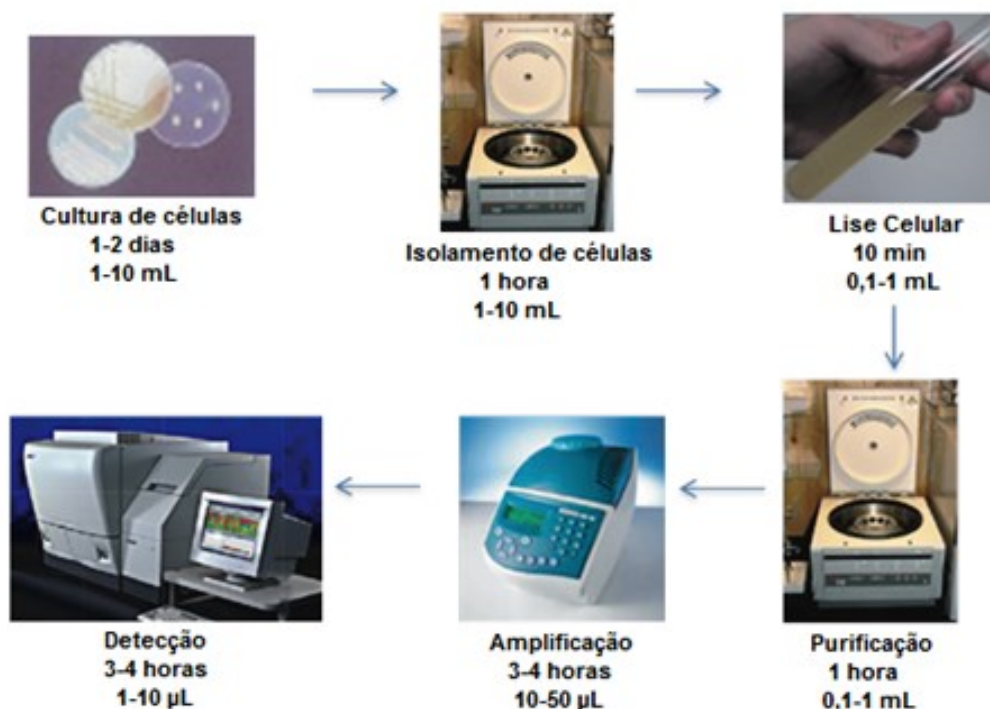


Figura 1 – Esquema das principais etapas de uma análise genética. As células são primeiramente cultivadas em meio sólido ou líquido. Em seguida as células são isoladas e após a lise, os ácidos nucleicos são purificados e separados dos outros componentes celulares. Após serem amplificadas, as moléculas de DNA são finalmente separadas e detectadas por eletroforese. Todo procedimento pode durar 8 ou mais horas, sem levar em conta a etapa de cultura de células.

Fonte: Adaptado de Lagally *et al.* (2004)

Nesse contexto, plataformas microfluídicas oferecem soluções para muitos problemas da análise genética tradicional. Sistemas microfluídicos apresentam a oportunidade de automatização da manipulação das soluções, reduzindo o contato manual com a amostra, evitando assim as contaminações. Além da redução do tempo e custo necessário para realizar todas as etapas em dispositivos microfluídicos, a redução da quantidade de amostra necessária para análise é uma das grandes vantagens, inerente ao uso de plataformas miniaturizadas. Com todas essas vantagens, as análises químicas realizadas em microchips apresentam como mais importante característica a possibilidade de integração entre diversas etapas analíticas, sendo possível desta forma a obtenção de dispositivos totalmente integrados, conceito atualmente chamado de “*lab on a chip*”. Enquanto uma análise genética convencional pode demorar 8 horas ou mais, uma análise genética realizada em um microchip totalmente integrado pode demorar cerca de 30 minutos (EASLEY *et al.*, 2006).

2.2. *Miniaturização*

A miniaturização de dispositivos para análises químicas revolucionou a química analítica nos últimos anos. A princípio, o foco principal na miniaturização era conseguir um melhor desempenho analítico e não só reduzir a escala de análise. Porém, algumas vantagens, como baixo custo de fabricação, menor tempo de análise e redução no gasto de reagentes e amostras, tornaram-se possíveis devido justamente à redução de escala. Na década de 70 foi criado o primeiro dispositivo analítico miniaturizado, este dispositivo que foi um sistema de cromatografia em fase gasosa, e devido ao pouco desenvolvimento tecnológico da época em métodos de separação, acabou não sendo bem aceito pela comunidade científica. Desta forma, as pesquisas com sistemas miniaturizados ficaram limitadas na década de 80. Somente na década de 90 que surgiram novas pesquisas com dispositivos miniaturizados, com a criação de um microsistema de cromatografia em fase líquida e o surgimento do conceito de μ TAS (COLTRO *et al.*, 2007).

Os primeiros dispositivos microfluídicos foram fabricados utilizando silício e, em seguida, o vidro. Com isso, dispositivos passaram a ser produzidos em vidro de sílica comum e quartzo, nos quais os canais eram gravados usando metodologias semelhantes aos utilizados para o silício. Isto levou à combinação de silício/vidro, oferecendo robustez química, possibilidade de integração de peças mecânicas com sistemas fluídicos para controle de fluidos e transparência óptica. A fabricação destes sistemas podem ser tecnicamente exigentes e dispendiosas, e por este motivo, surgiu um crescente interesse no uso de novas técnicas de fabricação. Essas novas técnicas devem idealmente oferecer simplicidade, rapidez e baixo custo de produção, o que levou ao aumento da utilização de sistemas à base de polímeros, tais como o PDMS e o PMMA. Esta tendência pode ser medida pelo número crescente de publicações em que são utilizados microchips à base de materiais poliméricos (ZHANG *et al.*, 2006).

Existem vários métodos utilizados para fabricar dispositivos microfluídicos, tais como, a fotolitografia, a moldagem por injeção, a estampagem a quente, a gravação por plasma e a ablação por laser. O material do substrato desejado, custo, velocidade e as capacidades de fabricação, são, por exemplo, alguns fatores que

contribuem para a escolha da melhor opção de método de fabricação (FIORINI *et al.*, 2005).

Ao selecionar o material mais adequado na fabricação dos microchips, algumas propriedades devem ser previamente conhecidas, tais como, estabilidade térmica, inércia química, isolamento elétrico, resistência mecânica, transmissão óptica, propriedades dielétricas e de superfície. Além disso, os parâmetros operacionais, como a escolha dos reagentes, da temperatura e pressão precisarão estar de acordo com a escolha do substrato adequado (ZHANG *et al.*, 2006).

Um importante fator na produção de dispositivos microfluídicos é a área superficial dos microcanais, podendo variar de acordo com o *design* do microchip. Além disso, pode-se também utilizar superfícies quimicamente ou biologicamente modificadas, tornando possível um melhor controle dos processos em termos de espaço e tempo em um dispositivo microfluídico, além de oferecer novos caminhos para processamento químico e biológico (ZHANG *et al.*, 2006).

O vidro foi inicialmente muito utilizado para a produção de plataformas microfluídicas por ser um material inerte e biologicamente inativo, no entanto, a fabricação de microchips de vidro requer instrumentação de alto custo, sala limpa e profissionais capacitados para o uso dos equipamentos (CHEN *et al.*, 2001), portanto, a produção destes dispositivos é limitada a grupos de pesquisas com grandes centros de pesquisa.

Para sobrepor estes problemas em relação ao custo de fabricação, a busca por novos materiais e métodos mais simples de produção de microdispositivos tem sido cada vez maior. Nesta procura por novos processos de microfabricação, Lago *et al.* (2003) propuseram um método alternativo, simples e de baixo custo para a fabricação de microchips. Este método baseia-se na utilização de uma camada de toner, tradicional de impressora, depositada em filmes de poliéster (transparência de retroprojeção) definindo os microcanais além de servir como substrato de vedação dos dispositivos quando laminados a quente.

O método de produção de dispositivos microfluídicos proposto por Lago *et al.* (2003) baseia-se na impressão direta de padrões de imagem em um filme de poliéster usando uma impressora a laser. A configuração do microdispositivo (*layout* dos canais no chip), desenhada previamente com o uso de um *software* gráfico, é impressa no filme de poliéster pela deposição seletiva de uma camada de toner,

produzindo canais microfluídicos que são definidos pelas regiões onde não houve deposição do toner (ausência de toner). A vedação ocorre quando o filme com a imagem impressa é laminado junto com outro filme de poliéster ou com uma imagem especular do padrão, conforme mostrado na Figura 2.

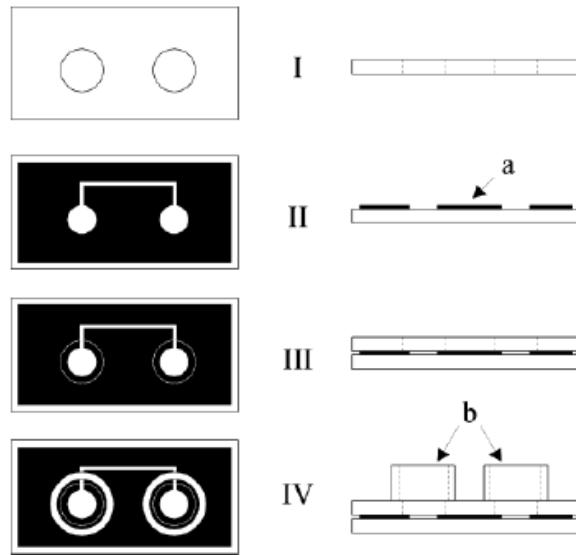


Figura 2 – Esquema das etapas principais do processo de microfabricação utilizando uma única camada de toner. I, tampa de poliéster perfurada; II, base de poliéster impressa (a, camada de toner); III, tampa (I) e base (II) laminadas juntas; IV, dispositivo final (b, reservatórios de líquidos).

Fonte: Lago *et al.* (2003)

Os microchips produzidos segundo o método proposto por Lago e colaboradores produzem dispositivos com canais de profundidade máxima de 12 μm , quando o chip é produzido com dupla camada de toner (DCT), ou seja, toner depositado na base e no topo do dispositivo, uma vez que cada camada de toner possui uma altura de 6 μm . A limitação do uso dos dispositivos fabricados segundo este método é justamente a profundidade dos canais, pois para algumas aplicações esta profundidade não é suficiente. Por exemplo, para realizar a extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE), é necessário inserir as partículas de sílica magnéticas no canal microfluídico além de ser necessário espaço para elas se movimentarem, e em um canal com 12 μm isso não é possível. Para contornar este problema, Duarte *et al.* (2011) propuseram a produção de dispositivos de PT com canais mais profundos. Para isto, ao invés de dois utilizaram quatro filmes de poliéster e produziram canais com 272 μm de profundidade. Nesta configuração, os canais são definidos por uma cortadora a laser. Estes microchips com canais

profundos já demonstraram serem capazes de extrair e amplificar DNA a partir de amostras de sangue. (DUARTE *et al.*, 2011).

Além das aplicações com DNA, os microchips de PT vêm sendo utilizados por diferentes grupos de pesquisa para diversas aplicações como: separação de compostos inorgânicos (GABRIEL *et al.*, 2012), separação de compostos farmacêuticos (LIU *et al.*, 2006), determinação de pesticidas (DA SILVA *et al.*, 2013), diagnósticos clínicos (DE SOUZA *et al.*, 2012) e imunoenaios (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

2.3. Extração de DNA

Amostras biológicas possuem além de DNA, outras substâncias celulares que podem atrapalhar as etapas de análises subsequentes e por isso deve-se isolar e purificar as moléculas de DNA para posteriormente proceder sua análise. Proteínas celulares, por exemplo, empacotam e protegem o DNA no meio celular impedindo a análise do mesmo. No entanto, o desenvolvimento de métodos de extração de DNA busca eliminar estes materiais celulares de modo a se obter um DNA purificado, ou seja, obter um DNA em quantidade e qualidade satisfatória para análises posteriores (BUTLER, 2001).

São várias as metodologias já descritas para extração do DNA genômico de bactérias, porém as mesmas são normalmente demoradas e com muitas etapas, aumentando a probabilidade de falhas devido à excessiva manipulação. Para bactérias, um fator que proporciona complexidade na extração do DNA são as diferenças quanto à composição da parede celular (ROSA, 2008). Alguns procedimentos de extração conseguem um isolamento rápido e de baixo custo, porém, sem conseguir quantidade suficiente de DNA purificado, enquanto que outros conseguem resultados satisfatórios, mas com custo elevado (NOGUEIRA *et al.*, 2004).

A purificação e pré-concentração do DNA são passos fundamentais no preparo da amostra para análises clínicas, além de serem requisitos para a maioria de aplicações em análises genéticas. A miniaturização na etapa de extração pode trazer diversas vantagens às análises genéticas, como a redução do consumo de

amostra e reagentes, diminuição do tempo e etapas de transferência e centrifugação, além de proporcionar frações altamente concentradas (PRICE *et al.*, 2009).

Os métodos que utilizam sílica como fase sólida para purificação de DNA encontram-se bem estabelecidos em escala convencional (macroescala) e foram adaptados com sucesso para microescala. Estes métodos consistem normalmente de um protocolo de adsorção-lavagem-eluição, pelo qual se procede a adsorção do DNA na sílica na presença de um agente caotrópico, seguido da lavagem com etanol ou isopropanol para remover as proteínas e outros restos e remanescentes celulares e, por fim, a eluição do DNA com uma solução tampão apropriada (WEN *et al.*, 2008). Um perfil de extração de DNA em microchip mostra que se tem uma perda mínima nas etapas de adsorção e lavagem e que a maior parte do DNA é recuperada na etapa de eluição (Figura 3).

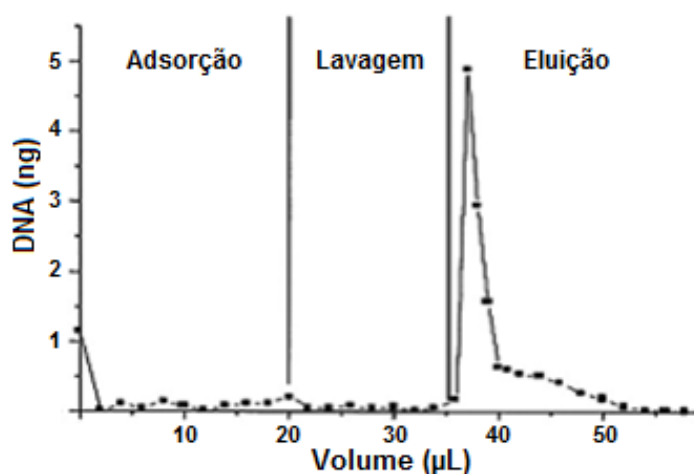


Figura 3 – Perfil de extração de DNA a partir de uma matriz de partículas de sílica.
Fonte: Adaptado de Price *et al.* (2009)

Para análises genéticas em dispositivos microfluídicos, a etapa de purificação é de fundamental importância para que se obtenha um DNA de qualidade para análises subsequentes. A amostra purificada deve estar com uma alta concentração de DNA para que nas etapas posteriores em um processo integrado, no qual se trabalha com volumes muito pequenos, se tenha maiores condições de sucesso na análise. Diferentemente dos métodos convencionais que não se pode trabalhar com sistemas integrados, pois envolvem etapas de centrifugação, a extração em fase

sólida com partículas de sílica adaptou-se perfeitamente para as análises em microdispositivos integrados (PRICE *et al.*, 2009).

A primeira SPE de DNA em microchip utilizando sílica foi desenvolvida por Christel *et al.* (1999). Este dispositivo foi capaz de realizar a purificação e concentração de DNA, porém, tornou-se limitado devido às dificuldades encontradas no intuito de aumentar a superfície de contato e proporcionar maior adsorção das moléculas de DNA. A partir dos resultados obtidos através deste primeiro microchip para extração de DNA, várias pesquisas de desenvolvimento e inovação foram realizadas para a criação de novas plataformas microfluídicas. Cady *et al.* (2003) propuseram um conceito para produção de microdispositivos de extração baseado no aumento da área superficial interna por meio de pilares microfabricados nos canais, com objetivo de aumentar a capacidade de adsorção de DNA.

Diferentes amostras biológicas, como culturas de células, sangue total e células brancas, apresentaram resultados satisfatórios nas extrações em fase sólida executadas em microchip de vidro (TIAN *et al.*, 2000; WOLFE *et al.*, 2002).

Duarte *et al.* (2010) desenvolveram, em microchip de vidro, um método de extração que utiliza partículas magnéticas de sílica que são controladas magneticamente garantindo um movimento dinâmico durante a extração, tornando desnecessário o empacotamento da fase sólida no canal microfluídico. Estas partículas magnéticas possuem grande afinidade a ácidos nucleicos e são compostas de dióxido de silício (SiO_2) e tetróxido de triferro (Fe_3O_4). Esta técnica de extração, chamada de extração dinâmica em fase sólida (dSPE), foi posteriormente adaptada, para os microchips de PT para realizar a extração de DNA de sangue humano (DUARTE *et al.*, 2011).

Até o presente momento, a única fonte biológica utilizada para realizar extração dinâmica de DNA em fase sólida em microchip foi o sangue humano (DUARTE, 2010). Neste trabalho será utilizada pela primeira vez esta metodologia em plataforma de PT para extração de DNA de bactérias.

2.4. Amplificação de DNA por meio da PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi descrita pela primeira vez por Mullis *et al.* (1986) abordando a amplificação enzimática específica do DNA *in vitro*. Os laboratórios de análises clínicas e ciências forenses foram favorecidos com a descoberta da técnica de PCR. Por meio desta técnica consegue-se fazer milhões de cópias de uma região específica do DNA em poucas horas e, isto revolucionou o campo da biologia molecular (BUTLER, 2001). O estudo de genética molecular, o sequenciamento de genomas, a expressão de genes recombinantes, o diagnóstico rápido de doenças infecciosas e a determinação rápida de paternidade são exemplos do desenvolvimento científico proporcionado pela descoberta da PCR (NOVAIS, 2004).

Na tentativa de buscar métodos mais rápidos e sensíveis para detecção de micro-organismos, diversos métodos já foram desenvolvidos. Ensaio rápido que utilizam técnicas imunoquímicas, hibridização e amplificação de ácidos nucleicos oferecem maior sensibilidade e especificidade que métodos baseados em culturas de células, além de permitir a redução do tempo para obtenção dos resultados. A técnica mais utilizada que atende às exigências descritas acima é a PCR (NORTON, 2002).

A PCR se desenvolve por meio de um processo enzimático, em que uma região alvo do DNA é replicada produzindo, teoricamente, após 30 ciclos, cerca de dois bilhões de cópias a partir de uma cópia inicial. Este processo envolve aquecimento e resfriamento da amostra por meio de um controle preciso de temperatura. Cada ciclo opera em três patamares de temperatura, por exemplo, a desnaturação do DNA a 94 °C, o anelamento dos *primers* a 60 °C e a extensão do fragmento a 72 °C (Figura 4) (BUTLER, 2001).

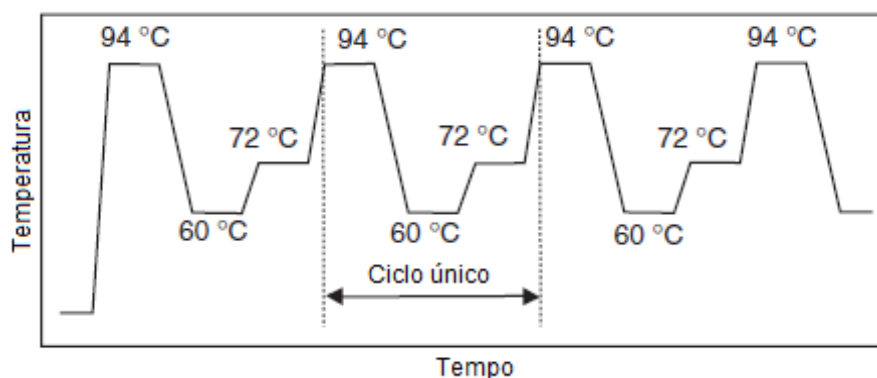


Figura 4 – Representação do perfil de aquecimento dos ciclos durante a PCR.
Fonte: Adaptado de Butler (2001)

A mistura de reação de PCR é composta pela adição de diferentes reagentes que possuem cada um sua importância específica, seguido da adição de água deionizada de modo a obter a concentração final desejada. *Kits* comerciais previamente misturados também são bastante utilizados para PCR. Geralmente se realiza PCR em tubos de polipropileno com volumes de 5-100 μL , pois volumes menores que 5 μL podem acarretar na evaporação da água ou tornar difíceis as pipetagens, e por outro lado, volumes maiores que 100 μL , diminuem a estabilidade térmica para a mistura de reação, ou seja, será preciso mais tempo para que a amostra se estabilize com precisão em cada temperatura do ciclo. Grande parte dos protocolos de PCR trabalha com volumes entre 20-50 μL (BUTLER, 2001).

A amplificação por PCR ocorre de forma exponencial na região específica que se deseja copiar, produzindo a cada final de ciclo o dobro de moléculas da região de interesse (Figura 5). É importante que a amostra de DNA a ser amplificada esteja livre de contaminantes, tais como proteínas e materiais celulares, pois estes inibem a ação da enzima *Taq polimerase* evitando que a PCR ocorra, portanto, deve-se garantir que a etapa de purificação do DNA seja eficiente (DUARTE, 2010).

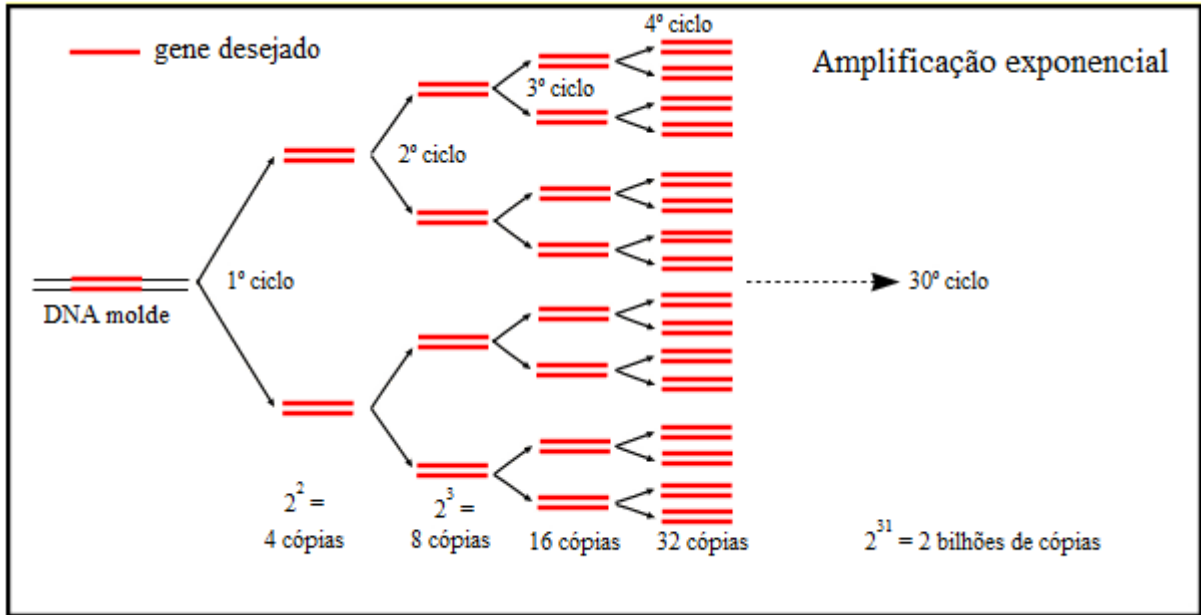


Figura 5 – Amplificação exponencial do DNA por PCR.
Fonte: Adaptado de Vierstraete (1999)

No formato convencional, os ciclos de aquecimento da PCR são controlados por um bloco metálico presente no termociclador de bancada. Neste caso, o bloco metálico é aquecido e resfriado para gerar os patamares de temperatura necessários para realizar a PCR. A desvantagem desta configuração é que as fontes de aquecimento e resfriamento são as mesmas, ou seja, o mesmo bloco metálico precisa aquecer e depois resfriar e, para tanto, um tempo razoavelmente longo é necessário (IORDANOV *et al.*, 2003).

Embora a PCR tenha representado enorme avanço para as técnicas para amplificação de DNA, o formato convencional requer longos tempos para realização dos ciclos de aquecimento, pelo motivo de as fontes de aquecimento e resfriamento serem as mesmas, mas também devido ao elevado volume que trabalham os típicos sistemas termocicladores, o que dificulta a homogeneidade da temperatura da amostra tanto no aquecimento quanto no resfriamento. Sendo assim, este fato levou a pesquisadores buscarem por adaptações da técnica de PCR em dispositivos microfluídicos, que operam com menor volume de amostra e permitem que as fontes de aquecimento e resfriamento sejam desvinculadas. A miniaturização da PCR proporciona diversas vantagens ao processo, como uma melhor transferência de calor devido ao aumento da razão área/volume da superfície, ocasionando um

menor tempo de reação de amplificação. Os dispositivos são aquecidos e resfriados rapidamente realizando a amplificação em menor tempo comparado ao método convencional em termocicladores. Há também outras vantagens associadas à miniaturização, tais como a economia de espaço e de amostra, bem como o menor consumo de energia (IORDANOV *et al.*, 2003).

Os ciclos de aquecimento no microchip podem ser realizados tanto no modo com contato quanto no modo sem contato. O modo de aquecimento com contato é aquele onde a fonte de aquecimento foi fabricada diretamente no microchip ou encontra-se em contato direto com a superfície do dispositivo. Já no modo sem contato, a fonte de aquecimento não se encontra em contato físico direto com o dispositivo microfluídico (HÜHMER *et al.*, 2000).

O primeiro relato da transposição da PCR para o microchip foi em 1994 (WILDING *et al.*, 1994) em um trabalho que usou um microchip híbrido de silício/vidro com uma câmara reacional de 10 μ L e os ciclos de aquecimento foram realizados utilizando um bloco metálico externo. Neste mesmo trabalho, o grupo de pesquisa enfatizou a necessidade de passivação da superfície da câmara e para tanto concluíram que a silanização da câmara proporciona o melhor resultado.

O primeiro trabalho de PCR em microchip com aquecimento sem contato foi realizado pelo grupo do professor Landers (GIORDANO *et al.*, 2001) utilizando um microchip de poliimida com aquecimento mediado por radiação infravermelha (IV) e o resfriamento com um minicirculador de ar.

O aquecimento por IV contribuiu para uma análise mais eficiente da PCR em microchips. Este método de aquecimento sem contato se baseia na excitação das moléculas de água através da radiação IV, e, no entanto, consegue aumentar e estabilizar a temperatura da solução em menor tempo, pois não há necessidade de aquecer o microchip antes que a solução seja aquecida (HÜHMER *et al.*, 2000; GIORDANO *et al.*, 2001; ODA *et al.*, 1998).

Vários substratos podem ser utilizados para produção de dispositivos microfluídicos para amplificação de DNA através da PCR, dos quais os principais são o vidro, o silício e polímeros. O vidro é o material mais popular usado em microfabricação, porém, sua utilização exige maior custo e tempo, além da necessidade da passivação da superfície para evitar a adsorção da enzima (*Taq* DNA polimerase) na PCR. Devido às limitações do uso do vidro para fabricar

dispositivos microfluídicos, pesquisadores têm buscado materiais alternativos e novos métodos de fabricação de microchips para PCR (DUARTE *et al.*, 2011).

Os microchips de PT representam um método simples e rápido de fabricação para a produção de dispositivos para PCR. Microchips de PT são uma excelente opção para reações de PCR, pois não precisam de uma etapa prévia de passivação da superfície, e tanto a extração de DNA quanto a PCR podem ser realizadas em um único dispositivo descartável. Neste sentido, os microchips de PT já demonstraram ser uma plataforma adequada para a realização da PCR, pois tanto o poliéster quanto o toner são compatíveis com todos os reagentes da PCR (DUARTE *et al.*, 2011).

2.5. Separação Eletroforética de DNA

O resultado final de um diagnóstico molecular envolve a separação eletroforética dos fragmentos de DNA amplificados na reação de PCR. O processo de eletroforese se baseia na migração diferenciada de espécies eletricamente carregadas, por meio da ação de um campo elétrico (GERVASIO *et al.*, 2003). As moléculas de DNA, carregadas negativamente, migram do eletrodo negativo em direção ao eletrodo positivo sob a influência de um campo elétrico. Quanto maior a tensão de corrente aplicada, maior será a força incidente sobre as moléculas de DNA e conseqüentemente mais rápido estas se deslocarão, porém, o calor gerado pela ação de altos campos elétricos deve ser dissipado, pois caso contrário, o sistema absorve este calor e pode ocorrer a formação de bandas irregulares ou até mesmo a própria desintegração do gel (BUTLER, 2001).

A eletroforese para separação de DNA pode ser realizada na forma de placa de gel ou em capilares. As placas de géis são formadas por uma matriz sólida porosa que atuam como “peneiras”, ou seja, os fragmentos menores passarão com maior facilidade que os fragmentos maiores, ocasionando a separação unicamente pelo tamanho. A concentração do gel deve ser estabelecida de acordo com a faixa de tamanho dos fragmentos de DNA que se está trabalhando, e o tempo de corrente aplicada deve proporcionar a separação das bandas no gel. O gel preparado é vertido em um molde, que define seu formato de placa, com um “pente” colocado de

forma que seus dentes entrem na matriz do gel, em seguida, espera-se sua solidificação. Ao retirar o “pente” do gel, têm-se os poços nos quais as amostras serão colocadas para ser iniciado o processo de separação eletroforética. Na Figura 6 está ilustrado um equipamento para realizar eletroforese em gel (BUTLER, 2001).

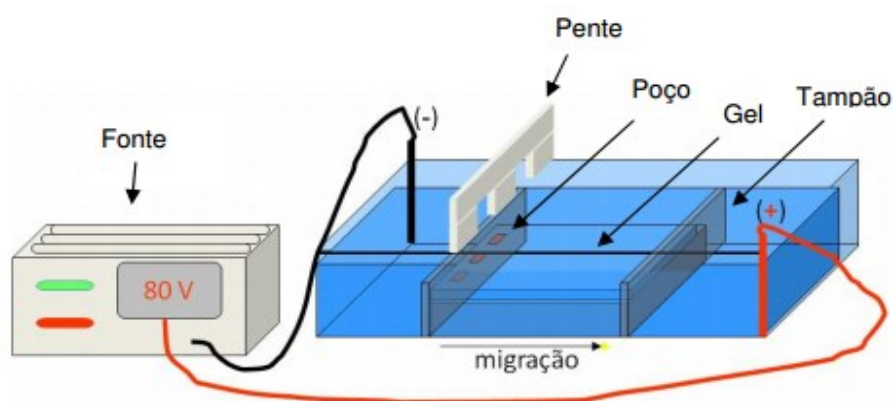


Figura 6 – Equipamento para realizar eletroforese em gel.
Fonte: Corrêa *et al.* (2004)

A eletroforese em gel apresenta algumas desvantagens, como o tempo que se gasta no preparo dos géis e o longo tempo de separação devido ao baixo campo elétrico aplicado. Com isso, a eletroforese capilar (CE) tem ganhado ênfase de forma a eliminar algumas destas desvantagens (GERVASIO *et al.*, 2003; BROCKE *et al.*, 2001).

Um sistema de CE é composto basicamente por um capilar de sílica, dois recipientes contendo tampão e dois eletrodos ligados a uma fonte de alta tensão, como mostrado na Figura 7. O capilar é preenchido com a matriz polimérica e os fragmentos de DNA são separados pelo mesmo princípio da eletroforese em placa de gel. Os fragmentos menores se deslocam com maior facilidade que os maiores pela matriz polimérica até chegarem a uma região do capilar que possui uma janela de detecção. Nesta janela de detecção, os fragmentos de DNA são captados por um detector, como por exemplo, de Fluorescência Induzida a Laser (LIF) (BUTLER, 2001; DUARTE, 2010). Os picos gerados no eletroferograma são proporcionais à intensidade relativa da fluorescência observada a partir dos fragmentos de DNA que passam pelo detector.

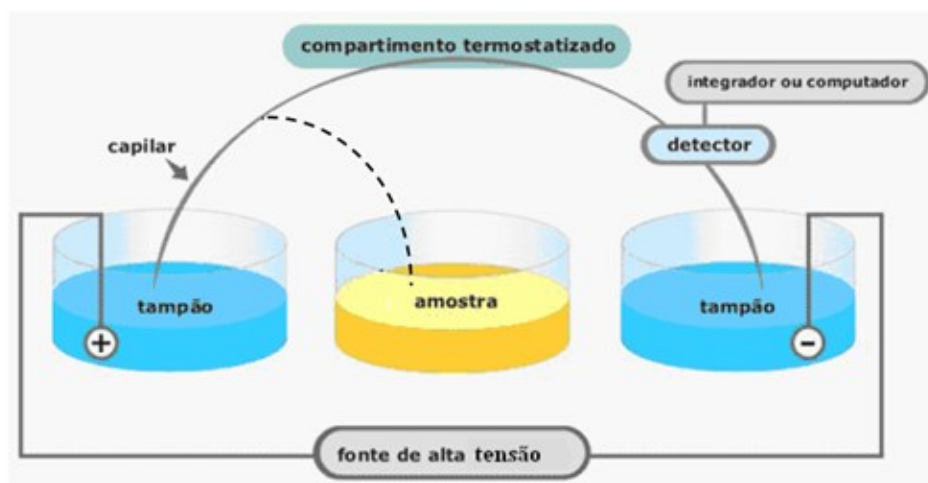


Figura 7 – Esquema dos componentes básicos de um equipamento de eletroforese capilar.

Com o avanço da microfluídica, novos sistemas miniaturizados para separação eletroforética de DNA foram desenvolvidos (MANICA *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2002). Algumas vantagens da eletroforese em microchip (ME) incluem a miniaturização, a integração, alta velocidade de análise e o reduzido consumo de reagentes (LI *et al.*, 2006; GAWRON *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002).

A introdução de sistemas automatizados e de elevado rendimento torna a tecnologia de eletroforese em microchip amplamente útil em laboratórios de pesquisa e análises clínicas. Várias empresas passaram a fornecer microchips prontamente fabricados, o que facilita a aplicação de dispositivos microfluídicos para eletroforese (LI *et al.*, 2006).

O Bioanalyzer 2100 (Figura 8A), equipamento fabricado pela Agilent Technologies®, é o primeiro sistema comercial que utiliza microchips para separação eletroforética de DNA. Ele representa uma nova geração de equipamentos que realiza separação de DNA baseados em microfluídica. O microchip fabricado em vidro (Figura 8B) possui microcanais interconectados que são preenchidos com a solução polimérica e corante para marcar fluorescentemente as moléculas de DNA que são posteriormente detectados através de um detector de Fluorescência Induzida a Laser (LIF). Uma série de eletrodos independentemente conectados a uma fonte de alimentação é utilizada para aplicar o potencial elétrico na etapa de injeção e na separação das moléculas de DNA durante a eletroforese. Assim que uma diferença de potencial é aplicada, as moléculas de DNA de tamanhos diferentes

são separadas de acordo com seu tamanho molecular e detectadas finalmente pelo LIF. Os microchips são adquiridos nos *kits* vendidos pela empresa, que incluem além dos microchips a matriz polimérica, o corante fluorescente, os marcadores de tamanho de DNA para delimitar o início e o fim da eletroforese e o *ladder* (padrão que contém uma série de DNA de tamanhos diferentes que servirão de parâmetro na comparação do tamanho e concentração do DNA na amostra). O microchip possui doze canais de separação independentes, o que permite que doze amostras de DNA sejam separadas e quantificadas simultaneamente em um intervalo de 30 minutos (PANARO *et al.*, 2000).

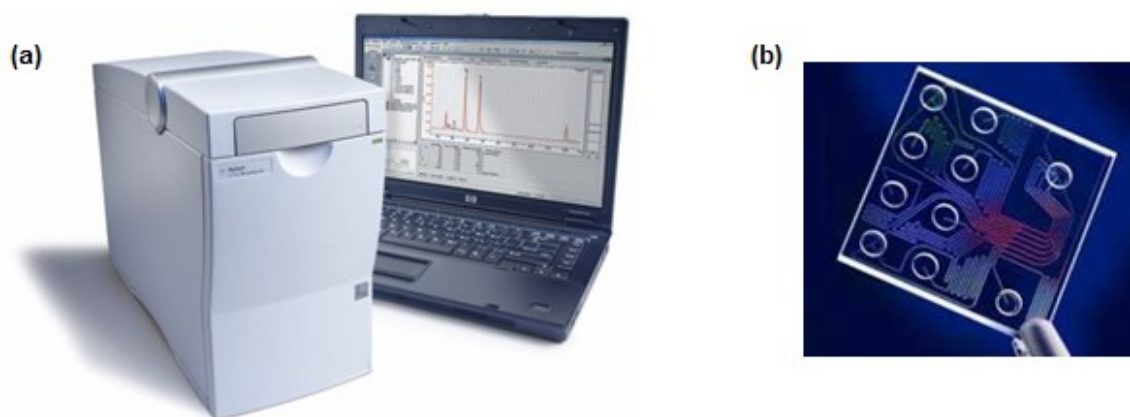


Figura 8 – (a) Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies®); (b) Microchip de vidro (Agilent Technologies®).

2.6. Bactérias

Bactérias são micro-organismos unicelulares, procariontes, apresentam tamanhos médios que variam de 1-10 μm e podem ser encontradas na forma isolada ou em colônias. As bactérias podem viver na presença de ar (aeróbias), na ausência de ar (anaeróbias) ou ainda, serem anaeróbias facultativas. Sua classificação morfológica é feita de acordo com a forma e com o grau de agregação das células (JUNIOR *et al.*, 1996; PEREIRA *et al.*, 2002).

As bactérias ocupam uma variedade de nichos, desde aqueles que oferecem condições ótimas para os seres vivos, até ambientes de condições extremas de sobrevivência para algumas formas de vida. São comumente encontradas em ambientes ricos em nutrientes, em solos, lagos, oceanos, hospedeiros e outros

organismos, mas também podem ser encontradas em ambientes extremos, como em nascentes de águas quentes, no gelo antártico e quilômetros abaixo da superfície da Terra (HORNER-DEVINE *et al.*, 2003).

Técnicas baseadas em análises de DNA, permitem a detecção de espécies não-cultiváveis e uma visão detalhada das comunidades de estudo de bactérias a serem desenvolvidas. A mais comum destas técnicas usa sequências de genes ribossomais como indicadores de diversidade bacteriana, entre outras sequências de genes que também têm sido utilizadas, como as que codificam proteínas de resistência bacteriana (HORNER-DEVINE *et al.*, 2003; WINTZINGERODE *et al.*, 1997).

Desde a descoberta e primeiras utilizações dos antibióticos, a resistência já se apresentava em alguns casos impactando no tratamento de doenças infecciosas. Atualmente, as bactérias resistentes a antibióticos são consideradas um dos principais problemas para o tratamento de doenças em hospitais e clínicas (WRIGHT, 2005).

Bactérias resistentes são as que reduzem ou eliminam os efeitos de um antibiótico, e assim, garantem sua sobrevivência e multiplicação, continuando a causar danos. A resistência de bactérias a antibióticos pode ser caracterizada por quatro principais mecanismos: (1) pelo bloqueio da entrada do antibiótico na célula; (2) pela produção de enzimas inativadoras de antibióticos, que atuam promovendo a transferência de grupamentos químicos descaracterizando a função dos antibióticos; (3) pela modificação da estrutura da célula alvo do antibiótico; (4) efluxo do antibiótico, ou seja, expulsão do antibiótico pelas células (WRIGHT, 2005).

A importância da biologia molecular para identificar a presença de bactérias resistentes vem crescendo à medida que as doenças infecciosas continuam a desafiar com o aparecimento de novos agentes etiológicos ou de um novo fenótipo de resistência aos antimicrobianos usuais. Estudos comparando as técnicas convencionais com as moleculares comprovam a rapidez e acurácia da PCR na identificação de determinados perfis genéticos de expressão de resistência bacteriana. Desta forma, a saúde pública pode dar um importante salto qualitativo pelo uso de ferramentas poderosas desenvolvidas na última década com o emprego de técnicas da biologia molecular. A caracterização dos genes responsáveis pela resistência, assim como sua localização e diversidade são de grande importância

para o entendimento dos fatores envolvidos na resistência (REMUALDO *et al.*, 2007).

2.6.1. *Azospirillum brasilense*

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) constituem um grupo de micro-organismos benéficos às plantas devido à capacidade de colonizar a superfície de raízes e tecidos internos das plantas (KLOEPPER *et al.*, 1989). Estas bactérias podem estimular o crescimento de plantas por meio da capacidade de fixação biológica de nitrogênio, pela produção de hormônios como auxinas, citocininas e giberilinas, pela solubilização de fosfato e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos. O crescimento das plantas é beneficiado por estas bactérias por meio da combinação destes mecanismos (HUERGO *et al.*, 2008; CASSÁN *et al.*, 2008; TIEN *et al.*, 1979; BOTTINI *et al.*, 1989). As bactérias diazotróficas mais estudadas como BPCPs associativas são as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* (PORTUGAL *et al.*, 2012).

O gênero *Azospirillum* abrange um grupo de bactérias promotoras de crescimento de plantas encontrado em quase todos os lugares da terra. Hoje estão descritas 14 espécies no gênero (HUERGO *et al.*, 2008).

Existem vários trabalhos confirmando que o gênero *Azospirillum* produz fitohormônios que induzem o crescimento das raízes de diversas espécies de plantas. Tien *et al.* (1979) verificaram que os componentes responsáveis pelo estímulo do crescimento de raízes liberados por *Azospirillum brasilense* eram o ácido indol-acético (AIA), giberilinas e citocininas. A inoculação com *Azospirillum* ocasionando maior desenvolvimento das raízes das plantas pode aumentar a absorção de água e minerais, resultando em uma planta vigorosa. O maior crescimento radicular e melhor nutrição das plantas também proporcionam maior tolerância a agentes patogênicos de plantas (BASHAN *et al.*, 2004; CORREA *et al.*, 2008).

As bactérias do gênero *Azospirillum* estimulam o crescimento e a produtividade de várias espécies de plantas de grande relevância ecológica e agrônômica (OKON *et al.*, 1994; BASHAN *et al.*, 2004). Okon *et al.* (1994)

mostraram que em ensaios realizados e acompanhados durante 20 anos foram obtidos, em 60 a 70% dos experimentos, aumentos estatisticamente significativos na ordem de 5 a 30% na produtividade devido à inoculação.

Um importante fator para o sucesso da inoculação com *Azospirillum* é a seleção de estirpe, pois mesmo que ainda não esteja claramente evidenciada a especificidade entre plantas e bactérias, relatos mostram que existem afinidades entre algumas plantas e bactérias (PENOT *et al.*, 1992).

Muitos estudos abordam o isolamento e identificação de bactérias utilizando métodos tradicionais, como características morfológicas e bioquímicas, porém o estudo molecular, como PCR, vem tomando importância pela sua eficácia na determinação da diversidade observada no gênero *Azospirillum*. Esta técnica tem permitido a identificação taxonômica e a identificação da ecologia deste gênero (XIA *et al.*, 1994).

2.6.2. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bacilo de Gram negativo que pertence à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbica facultativa e habita predominante o sistema gastrointestinal dos seres humanos e de diversos animais. Esta espécie foi identificada pela primeira vez, em 1885, pelo pediatra alemão Theodor Escherich (TODAR, 2002; RAMOS, 2002). As enterobactérias representam 80% ou mais de todos os Gram negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica. Muitas espécies de enterobactérias são patogênicas para o homem causando vários tipos de doenças.

Essas incluem doenças diarreicas, infecções em feridas e queimaduras, infecção no trato urinário e respiratório, septicemia e meningite, sendo responsáveis por cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias (ANVISA, 2013).

A *E. coli* possui múltiplos flagelos peritricos dispostos em volta da célula e possui fímbrias que permitem a sua fixação ao tecido do hospedeiro, impedindo o arrastamento pela urina ou diarreia (TOMA, 2004).

Dentro da família *Enterobacteriaceae*, a *E. coli* é a espécie de maior relevância clínica, sendo o principal agente de infecções urinárias baixas (> 80%)

devido à proximidade entre o trato gastrointestinal e trato urinário. Está também associada a pneumonias em ambiente hospitalar, septicemias, abscessos e a gastroenterites (TUMBARELLO *et al.* 2008).

A espécie *E. coli* apresenta diversas resistências a fatores ambientais, contaminando a água e alimentos, tornando-se um indicador modelo de contaminação fecal (MADIGAN *et al.*, 2000). Esta bactéria desempenha um papel protetor do intestino contra infecções, pois compete com outras bactérias patogênicas intestinais como, por exemplo, *Shigella* e *Salmonella*. As estirpes patogênicas de *E. coli* apresentam comumente uma série de fatores de virulência que, usualmente, não são encontrados em bactérias comensais (SÁENZ, 2004).

Foram declaradas cinco classes de *E. coli*, que provocam doenças entéricas, dependendo do tipo de fatores de virulência que estas possuem: as enterotoxigênicas, as enteroinvasivas, as enterohemorrágicas, as enteropatogênicas e as enteroagregativas (TODAR, 2002; SÁENZ, 2004).

Os diferentes nichos ecológicos em que a *E. coli* pode ser encontrada, como a microflora entérica de humanos e animais, amostras ambientais como a água e os alimentos e, também, em ambientes clínicos, fazem com que esta espécie encontre diversas situações de stress devido ao uso de antibióticos, o que lhe proporciona a seleção e disseminação de genes que lhes conferem a resistência a esses agentes (SÁENZ, 2004).

A *E. coli* é uma excelente bactéria para realizar estudos sobre o impacto do uso de antibióticos em humanos e animais. Este micro-organismo permite monitorizar o nível da resistência aos antibióticos e, desta forma, procurar resoluções contra o seu aumento (SÁENZ, 2004). O estudo da resistência antimicrobiana em *E. coli* permite obter informações antecipadas sobre a sua emergência em bactérias potencialmente patogênicas (SCHROEDER *et al.*, 2004).

É importante mencionar que a *E. coli* possui uma capacidade exímia para adquirir e transmitir genes de resistência, tal como no caso dos enterococos (MARTEL *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Utilizar os microchips descartáveis de PT para realizar a extração de DNA e a amplificação de longos segmentos de DNA através da PCR a partir dois tipos diferentes de bactérias: uma bactéria de importância ambiental (*Azospirillum brasilense*) e outra bactéria de importância clínica (*Escherichia coli*).

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE) em microchip de PT com partículas magnéticas de sílica a partir das bactérias *A. brasilense* AbV5 e *E. coli* BL21 em termos de:
 - Eficiência de extração;
 - Perfil de eluição;
 - Concentração das frações eluídas;
 - Qualidade e pureza do DNA recuperado.

- Avaliar a amplificação de longos segmentos de DNA de bactérias (*A. brasilense* AbV5 e *E. coli* BL21) em microchip de PT por meio da PCR mediada por aquecimento infravermelho em termos de:
 - Estabilidade dos microchips de PT frente ao aquecimento mediado por radiação IV para amplificação de longos segmentos de DNA (1500 pb para *A. brasilense* e 1150 pb para *E. coli*);
 - Passivação dinâmica da superfície do microchip utilizando BSA (albumina sérica bovina) e PEG (polietilenoglicol);
 - Eficiência da PCR;
 - Tempo da reação comparado com a PCR convencional realizada em tubos.

4. METODOLOGIA

4.1. *Material Biológico*

Foram utilizadas bactérias *Azospirillum brasilense* AbV5 fornecidas pelo Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos da Universidade Estadual de Goiás (UEG), UnUCET, Anápolis, GO e bactérias *Escherichia coli* BL21 transformada com plasmídeo pGEX-4T-3 (GE HEALTHCARE) que apresentam resistência a antibióticos da classe dos β -lactâmicos fornecidas pelo Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Samambaia, Goiânia, GO.

4.2. *Antibiogramas*

As bactérias *E. coli* BL21 foram primeiramente cultivadas em frascos de penicilina no meio de cultura LB líquido e mantidas em agitação de 120 rpm por 24 horas à temperatura ambiente.

As placas de Petri para os antibiogramas foram preparadas com 20 mL do meio de cultura para crescimento das bactérias.

Foram utilizados os antibióticos: ácido nalidíxico (Quinolonas), amoxicilina (β -lactâmicos), amoxicilina + ácido clavulânico (β -lactâmicos), ampicilina + sulbactam (β -lactâmicos), aztreonam (β -lactâmicos) e ceftazidima (β -lactâmicos). Todos os antibióticos utilizados foram da marca CEFAR®.

As culturas de células das bactérias foram diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até que se obteve uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala *Mac Farland* (1×10^6 UFC.mL⁻¹). Para esta etapa foi utilizado um tubo aferido na escala 0,5 de *Mac Farland* para comparação (MDLC, 1983).

Foram aplicados 100 μ L da solução bacteriana no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura sólido e, com o auxílio de um *swab* estéril, a solução foi espalhada de forma suave em todas as direções da placa procurando abranger toda a superfície.

Utilizando uma pinça flambada e resfriada, os discos de antibióticos foram colocados sobre a superfície do meio exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos. As placas com os discos foram incubadas em estufa bacteriológica a 36 °C por 24 horas.

Com auxílio de uma régua, os diâmetros dos halos inibitórios foram medidos e analisados de acordo com a literatura que classifica as bactérias em resistentes, intermediárias ou sensíveis (em anexo) aos antibióticos por meio do tamanho do halo inibitório formado (CLSI, 2007).

4.3. Produção de dispositivos microfluídicos

As etapas do processo de microfabricação do microchip de PT utilizado para extração dinâmica em fase sólida (dSPE) estão representadas na Figura 9. Os dispositivos para dSPE e amplificação por meio da PCR foram construídos do mesmo modo, utilizando quatro filmes de poliéster, de forma a obter canais mais profundos em cada microchip de PT. Segundo o método descrito por Duarte *et al.* (2011) dois dos quatro filmes foram cobertos totalmente com três camadas toner dos dois lados do filme de poliéster com auxílio de uma impressora a laser. A geometria dos canais foram desenhados com o auxílio do *software* CorelDraw 11.0 e recortados com o auxílio de uma cortadora a laser de CO₂ de 50W (VersaLaser 350, Universal Laser Systems).

Os filmes que possuem toner e os microcanais recortados ficaram na parte intermediária dos microchips, enquanto que os filmes somente de poliéster ficaram na base e no topo do microchip. No filme de poliéster do topo foram feitos dois furos para os acessos de entrada e saída ao canal microfluídico (reservatórios). Para finalizar a construção do microchip, os filmes foram alinhados e laminados, em laminadora comum de escritório, a 120 °C, formando assim a plataforma microfluídica.

Cada filme de poliéster tem em média 100 µm de espessura e cada camada de toner depositada pela impressora a laser tem cerca de 6 µm, portanto, a profundidade do canal no microchip com duas camadas intermediárias de poliéster-toner foi de 272 µm. As dimensões do canal recortado para o microchip utilizado na

extração dinâmica em fase sólida foram 14 mm x 1,2 mm, produzindo um canal com volume (14 mm x 1,2 mm x 272 μm) de 4 μL e para a PCR as câmeras foram construídas para uma capacidade de 2 μL cada.

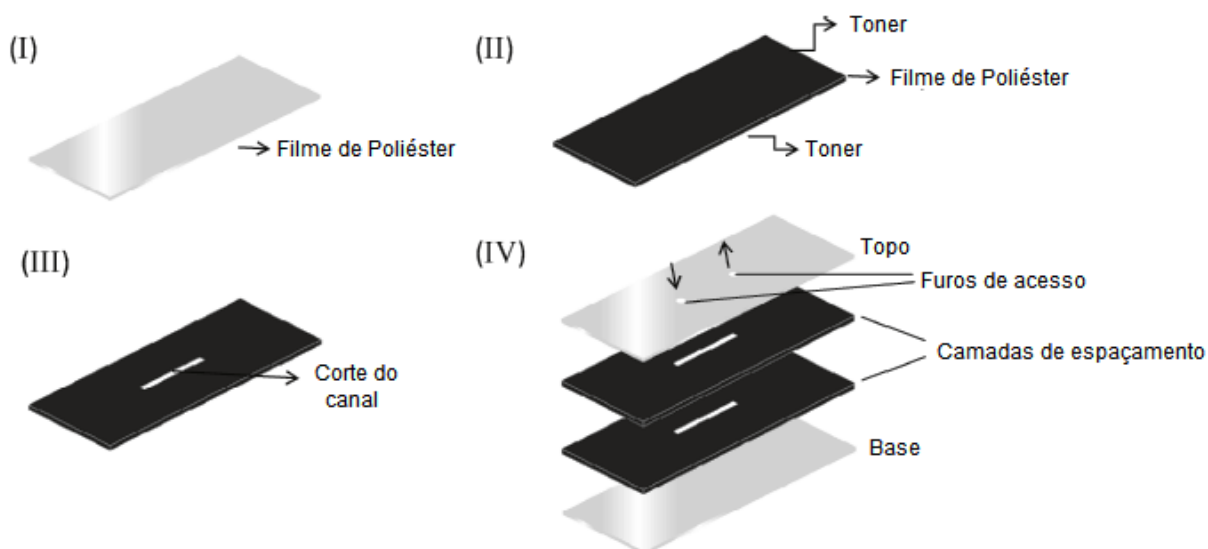


Figura 9 – Representação das etapas do processo de microfabricação. (I) Filme de poliéster, (II) filme de poliéster recoberto com toner nos dois lados, (III) canal recortado com a cortadora a laser, (IV) alinhamento e laminação das quatro camadas de poliéster (base, tampa com dois furos para acesso aos reservatórios e os dois filmes do meio com os canais recortados).

Fonte: Adaptado de Duarte *et al.* (2011)

4.4. Extração de DNA em escala convencional

Foi utilizado 1 mL da cultura bacteriana e centrifugado a 13.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi eliminado e foram adicionados 600 μL de solução de lise de DNA (50 μM Tris pH 7,6; 20 mM de EDTA; 400 mM NaCl; 1% SDS) e incubados por 10 minutos a 80 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida a amostra foi transferida para o banho de gelo por 5 minutos e adicionado 3 μL de RNase (24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Foram adicionados 200 μL de NaCl 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ na mistura que foi homogeneizada por inversão e a solução foi levada ao banho de gelo por 5 minutos. A solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo já contendo 600 μL de isopropanol P.A. à temperatura ambiente e novamente levado ao banho de gelo por 10 minutos. A solução foi centrifugada a 13.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante descartado, em seguida ressuspensa em 600 μL de etanol 70% e centrifugada a 13.000 rpm por 2

minutos sendo o etanol descartado. O precipitado foi seco à temperatura ambiente durante 24 horas, em seguida, ressuspenso em 30 μL de água ultrapura e estocado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para ser utilizado em análises posteriores.

4.5. Extração dinâmica de DNA em fase sólida (dSPE) em microchip de PT

Para preparar a amostra lisada de cada bactéria, foi utilizado 1 mL da cultura bacteriana e centrifugado a 13.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e a lise celular foi realizada adicionando 5 μL de proteinase K ($20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 9 μL de hidrocloreto de guanidina ($\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{HCl}$) $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,6 + 1% Triton X-100 ao *pellet* de células bacterianas, fazendo um total de 20 μL . A solução foi homogeneizada e incubada em banho maria a $56\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos.

Dois microlitros da amostra lisada das células bactérias foram utilizados para a extração de DNA em microchip. A Figura 10 representa as etapas da extração dinâmica de DNA em fase sólida realizada em microchip de PT. Para iniciar a extração, o canal do microchip foi preenchido com 4 μL de hidrocloreto de guanidina ($\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{HCl}$) 8 mol/L pH 7,6 (1), seguido da adição de 1,5 μL de partículas magnéticas de sílica (MagneSil®) com o auxílio de um ímã para prender as partículas no interior do canal (2). Com o mesmo ímã prendendo as partículas no interior do canal, foram adicionados os 2 μL da amostra lisada (3).

Após a adição da amostra, o microchip foi colocado em um agitador magnético e as partículas magnéticas iniciaram o movimento devido a dois campos magnéticos, um gerado pelo agitador e o outro pelo ímã posicionado acima do microchip (4). Esta etapa é caracterizada pela adsorção do DNA na fase sólida, e a agitação foi mantida por 5 minutos.

Em seguida, foi feita a etapa de lavagem das partículas com adição de 6 μL (3 frações de 2 μL) de isopropanol 80%, agitou-se magneticamente por mais 1 minuto, e as partículas foram lavadas novamente com mais 6 μL (3 frações de 2 μL) de isopropanol 80% (5).

Após a lavagem com o isopropanol, as partículas foram lavadas com o tampão 0,1 x Tris-EDTA (TE) para garantir a retirada de todo isopropanol, o qual é inibidor da PCR. Desta forma, foram coletadas 6 frações de 2 μL de tampão 0,1 x TE

sem agitação magnética (6). Antes de coletar a sétima fração (primeira fração após o movimento das partículas na etapa de eluição do DNA), o microchip foi colocado novamente no agitador magnético para agitar as partículas por 5 minutos, e então, foi feita a coleta de 2 μ L (7). Foram coletadas mais 9 frações de 2 μ L intercaladas com agitação magnética de 2 minutos, totalizando 16 frações coletadas, 6 antes da agitação magnética das partículas (etapa de lavagem) e 10 após a agitação (etapa de eluição do DNA) (8 e 9).

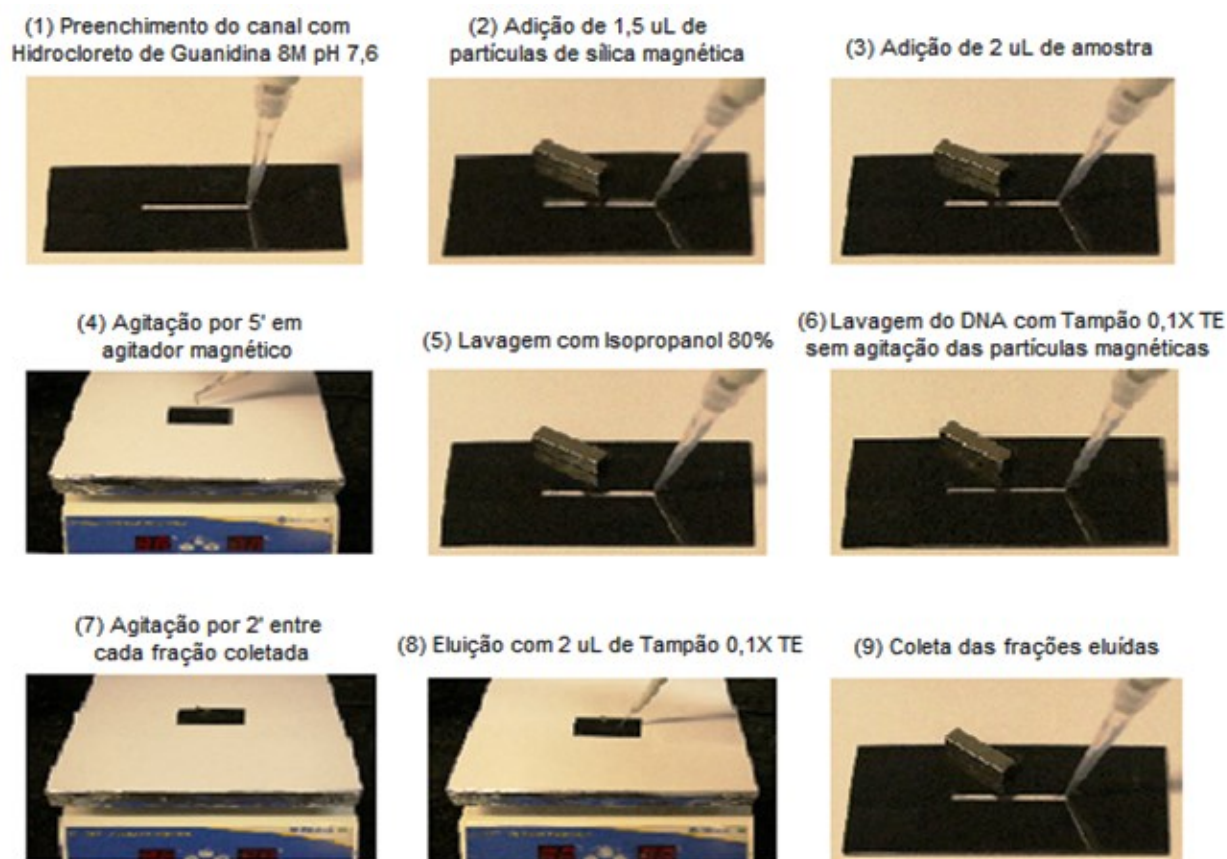


Figura 10 – Etapas da extração dinâmica em fase sólida de DNA em microchip de PT.

As frações foram armazenadas em diferentes tubos Eppendorf® e em cada uma delas foram adicionados 18 μ L de tampão 0,1 x TE e realizado a quantificação do DNA extraído utilizando o NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific). Com o valor total do DNA recuperado calculou-se a eficiência de extração.

4.6. Amplificação de DNA por meio da PCR em escala convencional

Na etapa de amplificação de DNA por meio da PCR foram utilizados os *primers* Y1 (5'- TGGCTCAGAACGAACGCTGG -3') e Y3 (5'- TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC -3') para a amplificação do gene 16S rDNA do material genético extraído da bactéria *A. brasilense* (CHUEIRE *et al.*, 2003), e foi utilizado para amplificação do gene codificador de resistência a antibióticos os *primers* *bla*_{TEM} *forward* (5'- ACGCTCAGTGGAACGAAAAC -3') e *bla*_{TEM} *reverse* (5'- TTCTTGAAGACGAAAGGGC -3') do material genético extraído da bactéria *E. coli* transformada com plasmídeo pGEX-4T-3 (BELAAOUAJ *et al.*, 1994). Os *primers* Y1 e Y3 amplificam uma região do gene em que se obtém um *amplicon* com 1500 pares de bases (pb) e com os *primers* para amplificação do gene *bla*_{TEM} se obtém um *amplicon* com 1150 pb.

A mistura reacional para amplificação do material genético da bactéria *A. brasilense* foi preparada com a seguinte composição: 10 mM de tampão Tris pH 8,3, 50 mM de KCl; 2,4 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP's; 0,3 µM de cada *primer* (Y1 e Y3); 0,15 unidades/µL da *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA *polimerase* *Invitrogen*[®]; 0,24 mg.mL⁻¹ de albumina sérica bovina (BSA); 2,5% (v/v) de polietilenoglicol (PEG) (MM = 200). Após retirar uma alíquota para controle negativo, o DNA foi adicionado na mistura gerando uma concentração final de 4,2 ng.µL⁻¹.

A mistura reacional para amplificação do fragmento de 1150 pb do material genético da bactéria *E. coli* em microchip de PT foi preparada de forma similar à mistura reacional utilizada para a *A. brasilense*, com exceção do DNA, que foi adicionado na mistura gerando uma concentração final de 4,6 ng.µL⁻¹.

O protocolo de aquecimento utilizado para a amplificação do gene 16S rDNA do material genético extraído da bactéria *A. brasilense* possui os seguintes parâmetros: pré-desnaturação (95 °C por 4 minutos); 30 ciclos de: desnaturação (95 °C por 40 segundos), anelamento (62 °C por 40 segundos) e extensão (72 °C por 1 minuto e 20 segundos); pós-extensão (72 °C por 10 minutos).

O protocolo de aquecimento utilizado para a amplificação do gene codificador de resistência a antibióticos do material genético extraído da bactéria *E. coli* resistente possui os seguintes parâmetros: pré-desnaturação (94 °C por 3 minutos);

30 ciclos de: desnaturação (94 °C por 1 minuto), anelamento (60 °C por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto); pós-extensão (72 °C por 10 minutos).

As amplificações foram realizadas em termociclador (Biocycler®, MJ96+/MJ96G) e os fragmentos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose e no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies®).

4.7. Amplificação de DNA em microchip de PT mediada por aquecimento infravermelho (IV)

O sistema completo de amplificação (Figura 11) utilizando aquecimento mediado por radiação infravermelho (IV) desenvolvido pelo grupo do Prof. James P. Landers é um sistema de fabricação própria que dispõe de um computador, uma lâmpada de tungstênio, um mini circulador de ar, um mini termopar tipo T, um conversor analógico e uma fonte de alimentação.

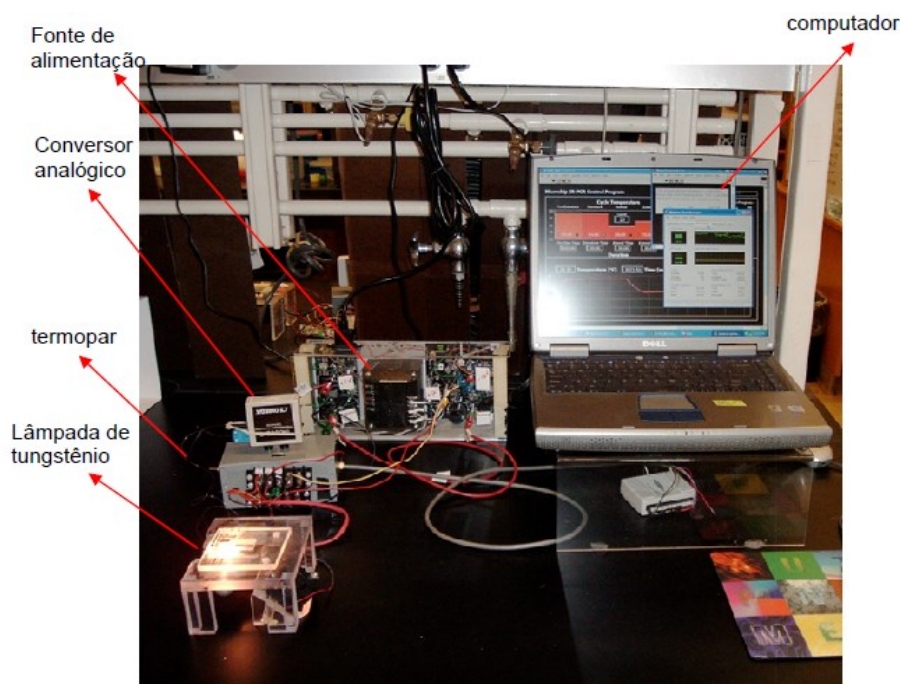


Figura 11 – Sistema completo de PCR com aquecimento IV.
Fonte: Duarte (2010)

O sistema de IV-PCR emprega o programa LabVIEW para coletar o sinal do mini termopar tipo T (Figura 12A) que é inserido na câmara de referência (Figura

12B). O sinal é então transmitido ao conversor analógico do termopar e em seguida amplificado 25 vezes e coletado por uma interface de controle de aquisição de dados. Em resposta a mudança de temperatura, a lâmpada de tungstênio e o mini circulador de ar são alternados e controlados pelo programa LabVIEW para proporcionar o aquecimento e resfriamento da solução.

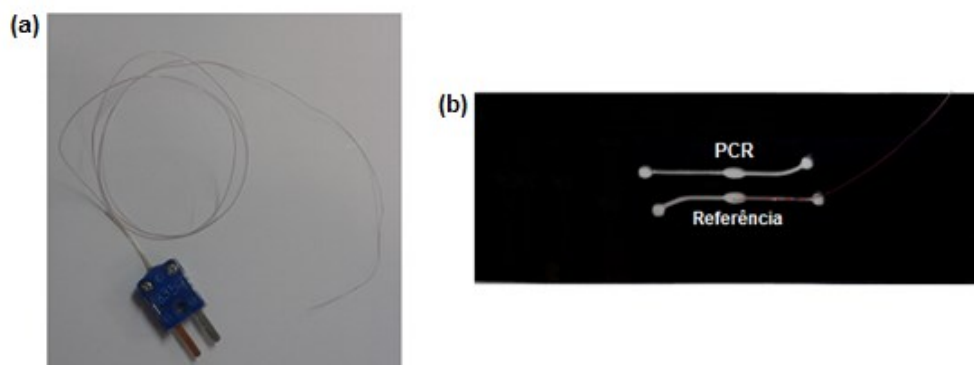


Figura 12 – (a) mini termopar tipo T; (b) microchip de PT utilizado em IV-PCR com o termopar inserido na câmara de referência.

Para realizar a PCR em microchip tanto para *E. coli* quanto para *A. brasilense*, a câmara reacional foi preenchida com a mistura da PCR preparada como descrita anteriormente para termociclador (item 4.6.) e a câmara de referência preenchida com tampão 10 mM Tris/50mM KCl e em seguida, inseriu-se o termopar na câmara de referência. Após o preenchimento das câmaras, adicionou-se óleo mineral em todos os reservatórios para evitar a evaporação da solução. Em seguida, o microchip foi levado ao sistema de aquecimento por radiação IV (Figura 13A), o termopar foi conectado ao conversor analógico e o programa LabVIEW foi utilizado para controlar a potência da lâmpada de tungstênio (Figura 13B) para realizar os ciclos de aquecimento da PCR nas seguintes condições:

- *A. brasilense*: 95 °C por 240 segundos, 30 ciclos de (95 °C por 40 segundos, 62 °C por 40 segundos e 72 °C por 80 segundos) e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

- *E. coli*: 94 °C por 180 segundos, 30 ciclos de (94 °C por 60 segundos, 60 °C por 60 segundos e 72 °C por 60 segundos) e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Após o final da reação, o produto da PCR foi coletado e analisado no Bioanalyser para detecção do produto amplificado. Controles positivos e negativos foram realizados simultaneamente em termociclador de bancada.

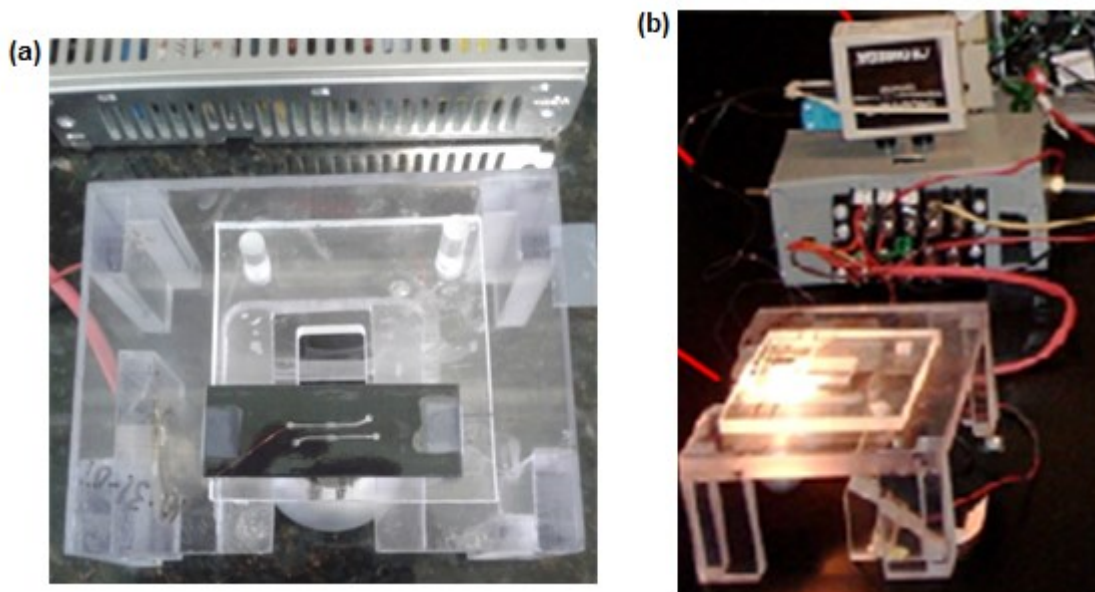


Figura 13 – (a) microchip posicionado no sistema de aquecimento por radiação IV; (b) conversor analógico com termopar conectado e sistema de aquecimento por radiação IV com lâmpada de tungstênio em funcionamento.

4.8. Separação de DNA por eletroforese

A eletroforese para análise do DNA obtido nas extrações e a detecção dos fragmentos amplificados pela PCR foi realizada de duas formas, em gel de agarose e no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies®).

A eletroforese em gel foi realizada utilizando agarose a 0,8% em tampão TBE 1X. O tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, SDS 0,1%, Ficoll® 20% em tampão TE 1X) foi adicionado às amostras de DNA na proporção de 5:3 (FSUDS:DNA) e em seguida aplicadas nos poços do gel. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o 1kb DNA Ladder® (BIOLABS). A separação eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X nas condições de 90 V, 300 mA, 19 W e 40 minutos.

Após a separação eletroforética o gel de agarose foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 20 minutos e lavado em água destilada por 10 minutos. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador UV acoplado a um sistema de fotodocumentação *MultiDoc-it*® (UVP).

Algumas separações de DNA foram realizadas no equipamento Bioanalyzer 2100. Este equipamento realiza a separação dos fragmentos de DNA em microchips

comerciais de vidro. A detecção do DNA analisado é feita por Fluorescência Induzida a Laser, gerando os eletroferogramas. Cada chip para análise de DNA possui 12 poços que podem ser utilizados para separações independentes (Figura 14A). Na Figura 14B temos o equipamento com o chip já posicionado. A metodologia de análise utilizada foi de acordo com o protocolo do fabricante (em anexo).

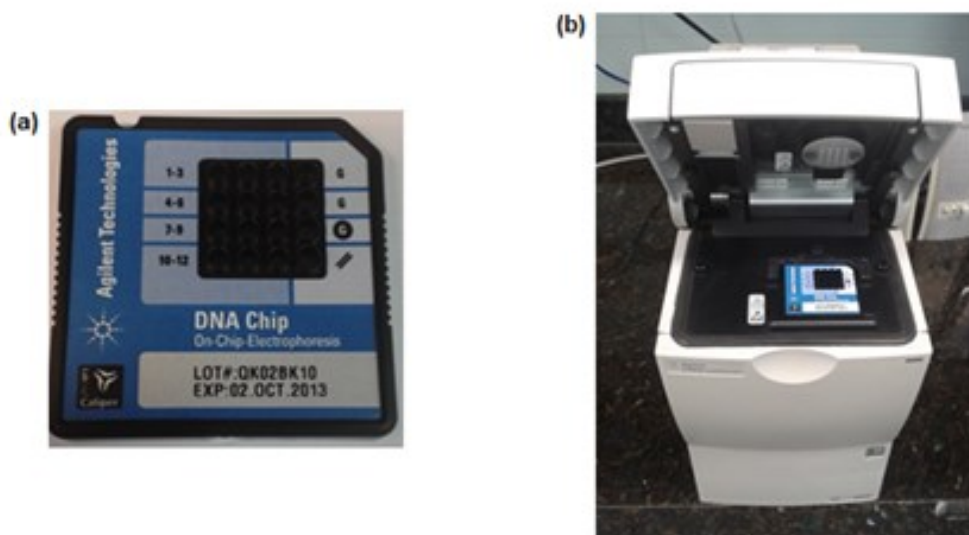


Figura 14 – (a) microchip de eletroforese utilizado no Bioanalyzer; (b) Bioanalyzer com o microchip posicionado para análise.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os microchips de PT foram utilizados com sucesso neste trabalho para realizar a extração de DNA e a amplificação de longos segmentos de DNA através da PCR a partir de dois tipos diferentes de bactérias: *A. brasilense* AbV5 e *E. coli* BL21. Para esta última bactéria, a intenção foi amplificar um gene que caracteriza a resistência da bactéria a antibióticos (*bla*_{TEM}) para que futuramente possam ser desenvolvidos métodos para detecção de bactérias resistentes a antibióticos em microchips de PT. Para comprovar a resistência da bactéria *E. coli* aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos foram realizados os antibiogramas que são apresentados a seguir.

5.1. Antibiogramas

Foram realizados os antibiogramas para avaliar a sensibilidade da bactéria *E. coli* aos antibióticos: ácido nalidíxico, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina + sulbactam, aztreonam e ceftazidima. Os antibióticos da classe dos β -lactâmicos são o grupo de antibióticos mais utilizados em tratamentos de infecções, e incluem a Penicilina e seus derivados, como Amoxicilina e Ampicilina (GUIMARÃES *et al.*, 2010). A resistência da bactéria aos antibióticos β -lactâmicos no antibiograma justificam a utilização do *primer* que amplifica o gene *bla*_{TEM} na reação de amplificação por PCR, uma vez que este gene possui uma sequência codificadora de resistência comum em bactérias resistentes a antibióticos β -lactâmicos.

O antibiograma apresentou, de acordo com os halos formados, resistência da bactéria *E. coli* transformada com o plasmídeo pGEX-4T-3 frente ao ácido nalidíxico (0 mm), à amoxicilina (0 mm) e à ampicilina + sulbactam (0 mm), sensibilidade intermediária ao antibiótico amoxicilina + ácido clavulânico (14 mm), e sensibilidade aos antibióticos aztreonam (46 mm) e ceftazidima (42 mm) (Figura 15).

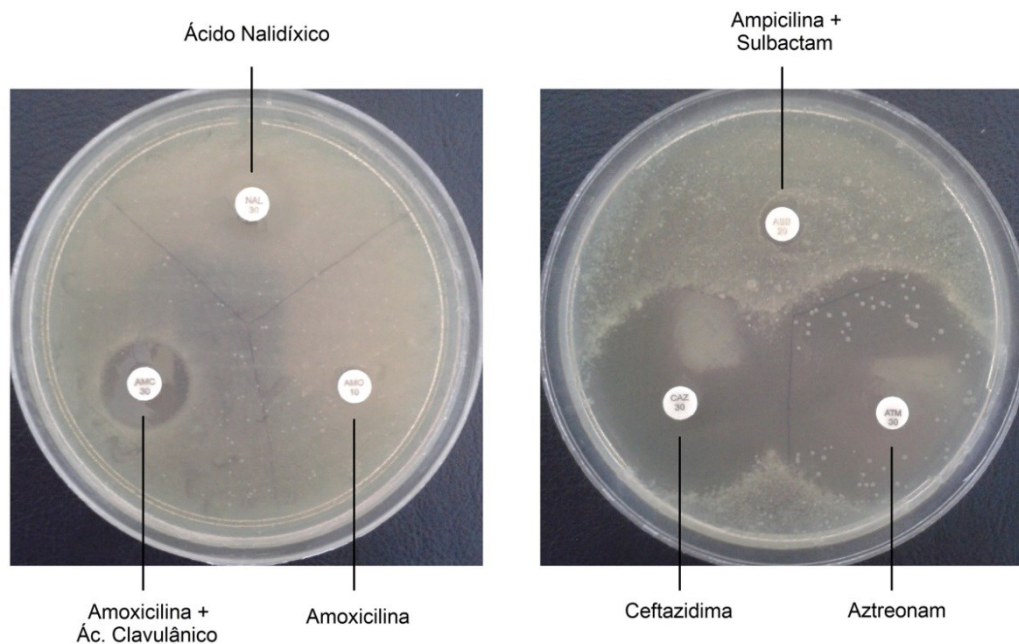


Figura 15 – Placas de Petri do teste de antibiograma com a bactéria *E. coli* transformada com o plasmídeo pGEX-4T-3.

Como esperado, os resultados dos antibiogramas indicaram que a bactéria *E. coli* transformada com o plasmídeo pGEX-4T-3 apresenta em seu gene uma sequência de ácidos nucleicos que caracteriza resistência à alguns antibióticos da classe dos β -lactâmicos, portanto, a utilização do *primer* que amplifica o gene *bla*_{TEM} na reação de PCR representa uma boa escolha para a detecção de bactérias que apresentam resistência a esta classe de antibióticos.

5.2. Produção dos dispositivos microfluídicos de PT

Os materiais utilizados para a produção dos dispositivos microfluídicos de PT foram somente transparência para impressão e toner, e os equipamentos utilizados foram: impressora, cortadora a laser e laminadora. Uma grande vantagem deste processo de fabricação é a possibilidade de desenvolver dispositivos microfluídicos em menos de 10 minutos, além de ser um processo simples e de baixo custo tanto em relação a matéria prima quanto aos equipamentos. O único equipamento caro é a cortadora a laser, com custo em torno de R\$ 10.000,00, porém é possível fazer os cortes dos canais com equipamentos mais baratos como uma *ploter* de corte, que

custa em torno de R\$ 500,00. A facilidade e rapidez para a fabricação dos microchips de PT fazem com que esses dispositivos tenham grande potencial para produção em massa.

Foram fabricados dispositivos microfluídicos com quatro filmes de poliéster de modo a produzir canais profundos. No caso da extração de DNA, canais profundos garantem maior liberdade de movimento das partículas magnéticas sob a ação do campo magnético e, conseqüentemente, melhor adsorção e dessorção de DNA durante a extração. Dispositivos microfluídicos de PT fabricados com três filmes de poliéster apresentaram menor eficiência de extração comparada aos dispositivos com quatro filmes de poliéster (DUARTE, 2010).

Para a amplificação de DNA em dispositivos microfluídicos de PT, também é necessário que se trabalhe com canais profundos, para facilitar a inserção do termopar na câmara de referência.

5.3. Extração de DNA

A etapa de extração de DNA é uma etapa de grande importância para as análises genéticas, uma vez que a quantidade e a qualidade do DNA extraído terá influência nas etapas posteriores, especialmente na PCR, onde componentes celulares e extracelulares podem inibir a reação de PCR. Atualmente, existe a grande necessidade de se obter técnicas baratas, rápidas e eficientes para obtenção de DNA purificado, visto que técnicas de identificação e detecção de patógenos por PCR vêm se popularizando cada vez mais. Neste sentido, a extração de DNA em microchip surgiu como uma excelente alternativa aos métodos convencionais de extração de DNA que são demorados, consomem grande quantidade de reagentes, além de requererem muitas etapas de centrifugação e transferências.

A extração de DNA em microchip está bem estabelecida para os dispositivos de vidro, o qual já demonstrou ser eficiente para extrair DNA de diferentes fontes biológicas, como sangue (BREADMORE *et al.*, 2003), saliva (CHEN *et al.*, 2007), urina (BOOM *et al.*, 1990) e líquido seminal (BIENVENUE *et al.*, 2006). Recentemente, os microchips descartáveis de PT surgiram como uma alternativa de plataforma mais simples para extração de DNA (DUARTE, 2011). Duarte *et al.*

(2010) demonstraram que os microchips de PT são capazes de extrair DNA a partir de uma amostra de sangue com uma eficiência de 69,7% e que o DNA extraído nesta plataforma pode ser amplificado, ou seja, tanto o toner quanto a transparência são compatíveis com todos os reagentes da PCR.

Neste trabalho, a extração de DNA a partir de células bacterianas foi realizada pela primeira vez em microchip de PT por meio da extração dinâmica em fase sólida (dSPE). A dSPE é similar a SPE convencional, porém a fase sólida neste caso encontra-se em constante movimento durante as etapas de adsorção de DNA na fase sólida, lavagens e eluição de DNA. Desta maneira, além de ser mais simples, uma vez que não é necessário empacotar o canal microfluídico com a fase sólida, o movimento das partículas magnéticas de sílica proporciona maior interação das moléculas de DNA com a fase sólida, além de facilitar na etapa de dessorção.

Neste trabalho, avaliou-se a extração de DNA em microchip de PT a partir de células bacterianas em relação à eficiência de extração, concentração das frações eluídas, qualidade e pureza do DNA extraído na referida plataforma, a partir de dois tipos diferentes de bactérias: *Azospirillum brasilense* AbV5 e *Escherichia coli* BL21.

5.3.1. Eficiência de Extração e Perfil de Eluição

Em relação à recuperação do DNA, as extrações de DNA no microchip de PT a partir das duas culturas bacterianas apresentaram alta eficiência de extração: 74,6% para *A. brasilense* e 82,1% para *E. coli* partindo de 100 µL das culturas que apresentavam $3,1 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ e $4,7 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, respectivamente. As eficiências das extrações de DNA realizadas em microchip de PT foram superiores as eficiências das extrações de DNA realizadas convencionalmente em tubos a partir de 1 mL das culturas bacterianas nas mesmas condições. As extrações convencionais de DNA realizadas em tubos apresentaram eficiência de 64,1% para *A. brasilense* e 61,7% para a cultura de *E. coli*. As eficiências de extração foram determinadas ao se comparar a quantidade de DNA na amostra que se iniciou a extração à quantidade de DNA obtido ao final da extração.

Na extração realizada em microchip, a etapa de eluição foi feita coletando frações de 2 µL a cada 2 minutos de agitação das partículas magnéticas. Em relação

ao perfil de eluição do DNA, boa parte do DNA recuperado (~32%) foi extraída nas duas primeiras frações após o início do movimento das partículas, e cerca de 50% do total recuperado foram extraídos nas quatro primeiras frações após o início do movimento das partículas. As seis primeiras frações antes do início do movimento das partículas magnéticas correspondem às etapas de lavagem para retirada das proteínas e outros dejetos celulares. As Figuras 16A e 16B apresentam o perfil de eluição de DNA extraído no microchip de PT para as bactérias *A. brasilense* e *E. coli*, respectivamente.

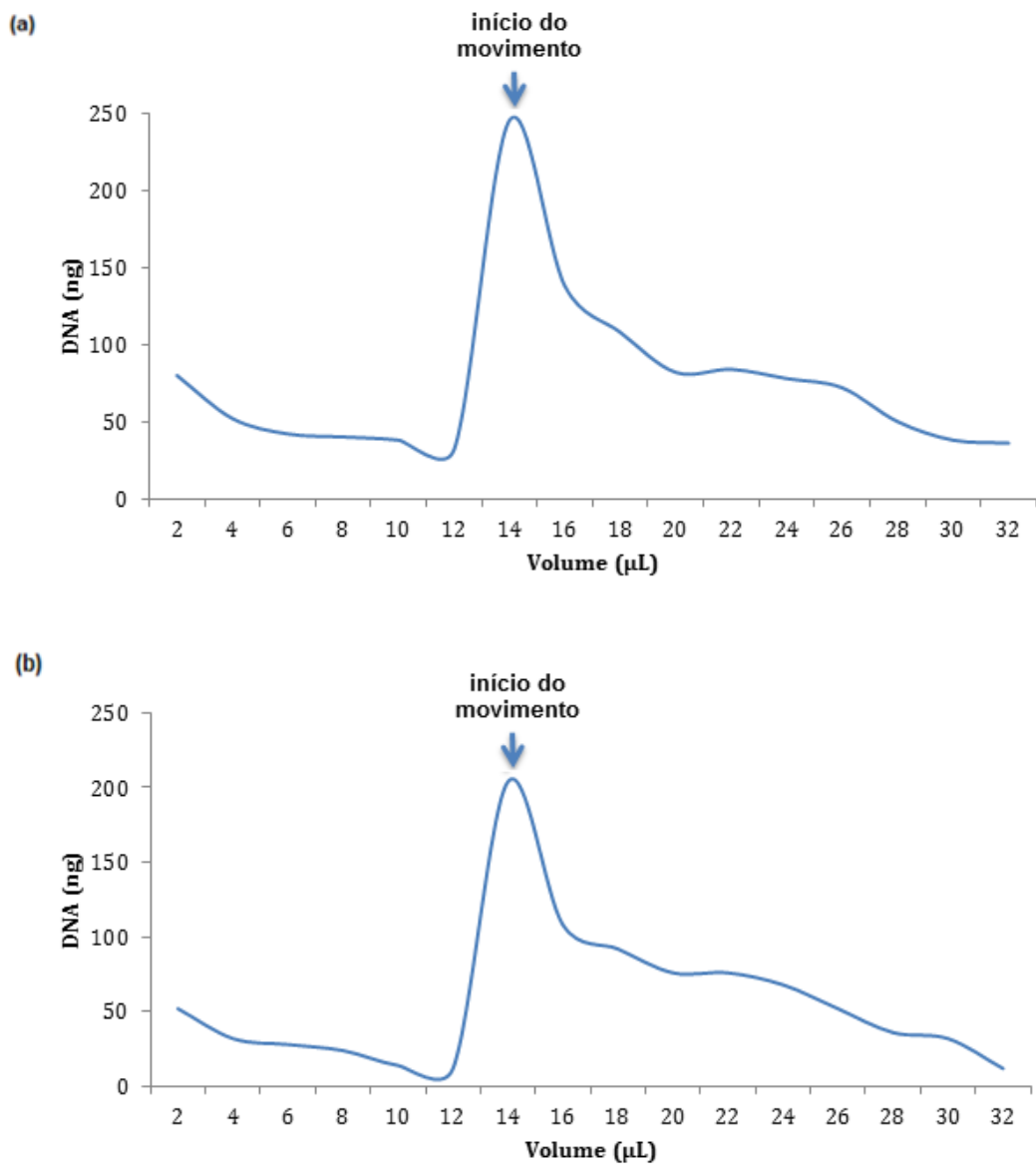


Figura 16 – Perfil de eluição de DNA em microchip de PT a partir das bactérias (a) *A. brasilense* e (b) *E. coli*.

5.3.2. Concentrações de DNA nas frações eluídas

A extração de DNA em microchip apresentou frações altamente concentradas de DNA comparadas ao processo convencional de extração, considerando as primeiras frações coletadas após o início do movimento das partículas magnéticas. Para as duas primeiras frações eluídas (4 μL) a concentração de DNA foi de 104 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ para a extração de DNA a partir da bactéria *A. brasilense* e 78 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ para a extração de DNA a partir da bactéria *E. coli*. Esses valores são bem superiores às concentrações de DNA obtidas a partir da extração convencional, que apresentaram concentrações de DNA de 41,8 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ para *A. brasilense* e 46 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ para *E. coli*. É importante ressaltar que a concentração de DNA nas frações eluídas no microchip foi mais que o dobro (para a *A. brasilense*) do que no método convencional partindo de uma quantidade de amostra dez vezes menor. Enquanto que no método convencional partiu-se de 1 mL de cultura bacteriana, no microchip partiu-se de 100 μL de cultura bacteriana.

5.3.3. Avaliação da qualidade e pureza do DNA extraído

Embora exista uma grande diversidade de técnicas de extração de DNA, a maioria das técnicas apresenta uma necessidade comum: que o material genético dos organismos em questão tenha qualidade suficiente para que possa ser utilizado em reações posteriores. Alguns autores (ALJANABI *et al.*, 1997; PATERSON *et al.*, 1993) consideram avaliar a qualidade do DNA extraído submetendo o mesmo a reação de PCR. Se o DNA extraído for amplificado, considera-se que o mesmo possui qualidade suficiente para ser submetido às análises subsequentes. Para estimar a pureza das amostras de DNA é comum medir a absorção da amostra em um espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 nm (comprimento de onda que é absorvido pelo DNA) e 280 nm (comprimento de onda que é absorvido pelas proteínas). A razão entre 260/280 nm é utilizada para estimar a pureza do DNA extraído. Uma amostra de DNA é considerada pura quando apresenta razão entre 1,8 e 2,0. Se esta razão for menor do que estes valores possivelmente há contaminação com proteínas, ou outros contaminantes que absorvem fortemente em

280 nm. (LEHNINGER *et al.*, 2004). Para tanto, foi utilizado o espectrômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) que é capaz de medir volumes pequenos como 2 µL de solução, sem a necessidade de cubetas ou outros porta-amostras, e fornecer a concentração de DNA na amostra, bem como sua pureza.

Primeiramente, para avaliar a qualidade do DNA nas frações eluídas durante a extração em microchip foi realizada a eletroforese em gel referente às 16 frações coletadas durante a extração de DNA da bactéria *E. coli* em microchip de PT (Figura 17). Pôde-se observar que em todas as frações eluídas em microchip o DNA encontrava-se íntegro, ou seja, não foi observado produtos de degradação ao longo da eletroforese.

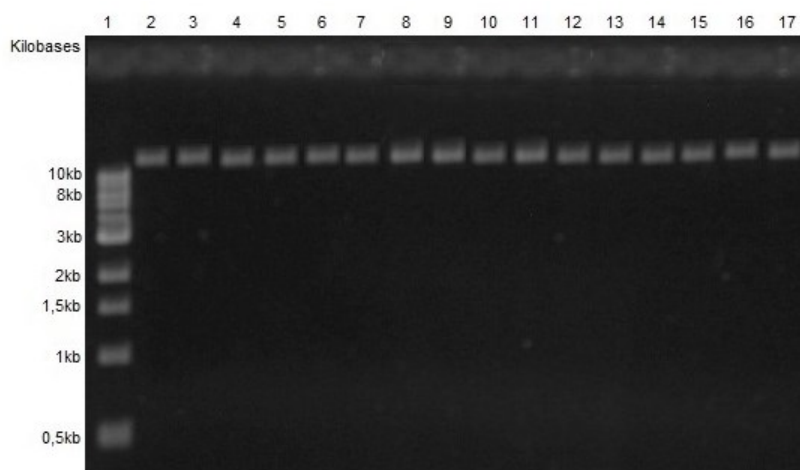


Figura 17 – Gel de eletroforese mostrando as bandas referentes à extração de DNA da bactéria *E. coli* em microchip de PT. Linha 1 – 1kb DNA Ladder; Linhas 2 a 17 – Dezesseis frações coletadas.

Outro parâmetro utilizado para avaliar a qualidade do DNA extraído em microchip de PT foi desenvolver a PCR nas frações eluídas na extração. Desta forma, avaliou-se a qualidade do DNA extraído a partir da bactéria *A. brasilense* no microchip de PT por meio da amplificação do fragmento de 1500 pb, provenientes das cinco primeiras frações de DNA eluídas no microchip de PT. A PCR neste caso foi desenvolvida em termociclador de bancada. O DNA extraído em microchip de PT mostrou ser um DNA de qualidade, uma vez que pode ser amplificado. O gel de eletroforese, contendo as bandas referentes à amplificação do fragmento de 1500 pb, provenientes de cinco primeiras frações coletadas após agitação das partículas magnéticas durante a extração de DNA em microchip de PT, está representado na Figura 18.

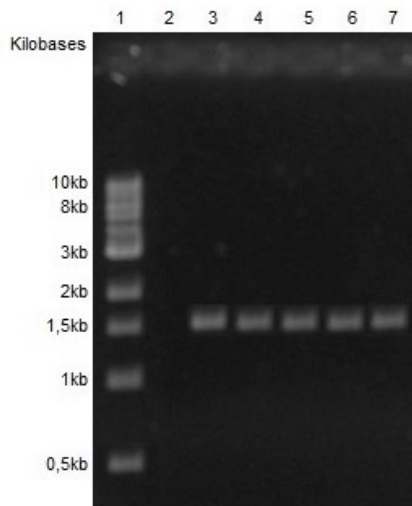


Figura 18 – Gel de eletroforese mostrando as bandas referentes à amplificação do fragmento de 1500 pb do DNA extraído da bactéria *A. brasilense* em microchip de PT. Linha 1 – 1kb DNA Ladder; Linha 2 – Controle negativo de amplificação; Linhas 3 a 7– Cinco frações coletadas.

A qualidade do DNA extraído no microchip de PT da bactéria *E. coli* também foi avaliada por meio da amplificação em termociclador do fragmento de 1150 pb. O DNA extraído em microchip de PT mostrou ser um DNA de qualidade, podendo ser amplificado. A Figura 19 mostra a foto de um gel de eletroforese contendo cinco bandas referentes à amplificação do fragmento de 1150 pb provenientes de cinco primeiras frações coletadas após agitação das partículas magnéticas durante a extração de DNA em microchip de PT.

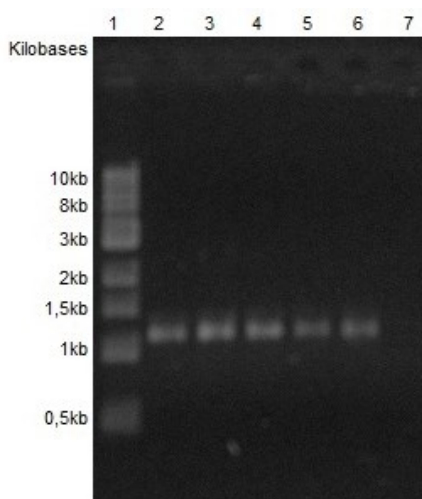


Figura 19 – Gel de eletroforese mostrando as bandas referentes à amplificação do fragmento de 1150 pb do DNA extraído da bactéria *E. coli* em microchip de PT. Linha 1 – 1kb DNA Ladder; Linhas 2 a 6 – Cinco frações coletadas; Linha 7 – Controle negativo de amplificação.

Em relação à pureza do DNA extraído em microchip de PT, a Tabela 1 apresenta os valores da razão A260/280 nm para as extrações de DNA em microchip de PT a partir da bactéria *A. brasilense* e *E. coli*. A Tabela apresenta as razões A260/280 nm somente para as frações eluídas após o início do movimento das partículas magnéticas na etapa de eluição, pois estas são as frações que efetivamente são coletadas e possuem o DNA purificado na etapa de extração. Considerando as cinco primeiras frações, que são as frações mais concentradas de DNA, os valores de A260/280 nm ficaram entre 1,51-1,81. Embora algumas frações tenham apresentado valores menores que 1,8, os valores obtidos foram similares a outros métodos de extração de DNA (ARRIEL *et al.*, 2002; ROSA, 2008). Para a extração convencional de DNA realizada neste trabalho, os valores da razão A260/280 nm foram de 1,72 para *A. brasilense* e 1,83 para *E. coli*.

Tabela 1 – Valores da razão A260/280 nm para a extração de DNA em microchip de PT a partir das culturas das bactérias *A. brasilense* e *E. coli*.

Fração após o início do movimento das partículas	A260/280 nm	
	<i>A. brasilense</i> AbV5	<i>E. coli</i> BL21
1	1,56	1,81
2	1,63	1,51
3	1,53	1,53
4	1,65	1,53
5	1,75	1,56
6	1,82	1,42
7	1,73	1,36
8	1,50	1,11
9	1,56	1,25
10	1,54	1,38

A Tabela 2 compara os resultados da extração de DNA das bactérias *A. brasilense* e *E. coli*. obtidos em microchip de PT com os resultados obtidos pelo método de extração convencional.

Tabela 2 – Comparação entre resultados obtidos em microchip e método convencional em relação à extração de DNA.

Parâmetros avaliados na extração	Microchip de PT		Convencional	
	<i>A. brasilense</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>E. coli</i>
Eficiência de extração (%)	74,6	82,1	64,1	61,7
Concentração de DNA nas frações eluídas (ng.µL ⁻¹)	104,0±0,24*	78,0±0,08*	41,8±0,33	46,0±0,41
A260/280 nm	1,60±0,04*	1,66±0,15*	1,72±0,16	1,83±0,02
Produto de amplificação pela PCR a partir do DNA extraído por cada um dos métodos	1500 pb	1150 pb	1500 pb	1150 pb

*Considerando as duas primeiras frações (4 µL) após o início da eluição

5.4. Amplificação de DNA através da PCR mediada por aquecimento IV (IV-PCR) em microchip de PT

Com os avanços e estudos de novas técnicas moleculares voltadas a detecção, identificação ou caracterização microbiológica, a tipagem molecular tem se difundindo amplamente e assim, metodologias baseadas em PCR para amplificação de DNA alvo foram desenvolvidas com sucesso, conduzindo uma revolução nas técnicas de diagnóstico laboratorial. Na grande maioria dos laboratórios, a PCR é conduzida tradicionalmente em tubos plásticos, utiliza volumes médios entre 20 µL e 50 µL e é realizada em termocicladores de bancada.

Este trabalho realiza a PCR em uma plataforma simples, descartável e de baixo custo. Enquanto os microchips de vidro necessitam de muita instrumentação para sua produção, os dispositivos de PT são fabricados com equipamentos simples e baratos, além de serem fabricados em poucos minutos (~10 minutos). Além disso, esse trabalho demonstra que os dispositivos de PT são compatíveis com aquecimento mediado por radiação IV, o que proporciona redução no tempo total da reação e facilita no futuro processo de integração da PCR com as outras etapas analíticas.

5.4.1. Perfil dos ciclos de aquecimento mediado por radiação IV na PCR realizada em microchip de PT

O aquecimento sem contato da solução foi realizado no microchip através da radiação IV que provoca a excitação vibracional das moléculas de água, por consequência aquecendo a solução. A maior vantagem deste tipo de aquecimento é que a solução é aquecida sem a necessidade de aquecer o recipiente em que se encontra. Desta forma, o aquecimento e o resfriamento da solução ocorrem mais rapidamente. Uma vez que o filme de transparência não absorve significativamente a radiação IV, a maior parte da radiação eletromagnética é transmitida através da câmara da PCR e seletivamente aquece a solução. Em contraste, o toner preto absorve significativamente a radiação IV, tornando-se um problema quando o chip de PT é colocado no sistema IV-PCR. Para solucionar este problema, uma máscara de papel alumínio foi utilizada para recobrir a parte do chip que é recoberta com toner, deixando apenas a câmara reacional e a câmara de referência expostas à radiação IV. O uso da máscara de papel alumínio permitiu o aquecimento uniforme da solução e que a temperatura desejada fosse atingida sem que houvesse um superaquecimento causado pela absorção da radiação IV pelo toner. Desta forma, foi possível obter ciclos de aquecimentos com temperaturas razoavelmente estáveis em cada um dos patamares. Na Figura 20 está representado o perfil dos ciclos de aquecimento gerados na amplificação do fragmento de 1500 pb da bactéria *A. brasilense*.

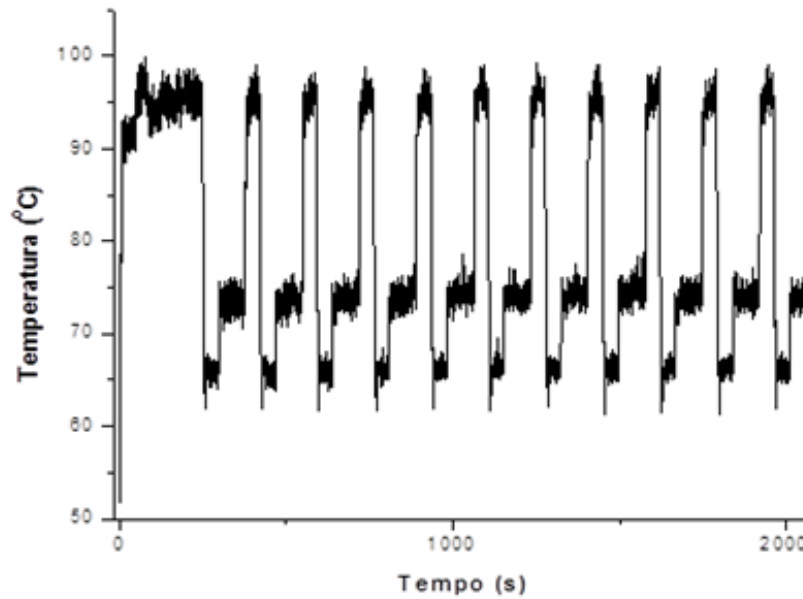


Figura 20 – Perfil dos ciclos de aquecimento para a IV-PCR realizada nos microchips de PT (a) para o fragmentos de 1500 pb da bactéria *A. brasilense* e (b) para o fragmento de 1150 pb da bactéria *E. coli*.

A taxa média de aquecimento de $10,1 \pm 0,7$ °C/s e de resfriamento de $12,1 \pm 0,9$ °C/s apresentada pelos microchips de PT foram similares às taxas apresentadas pelos microchips de vidro e poliméricos (GIORDANO *et al.*, 2001; LOUNSBURY *et al.*, 2013) demonstrando assim que é possível ciclos de aquecimentos mais rápidos em comparação a PCR convencional realizada em tubos, que apresenta uma taxa de aquecimento de $0,9$ °C/s e uma taxa de resfriamento de $3,9$ °C/s. A variação da temperatura observada em cada uma das temperaturas do ciclo de aquecimento foi em média de $1,2$ °C, o que representa uma estabilidade razoável da temperatura para a realização da PCR.

5.4.2. Passivação dinâmica da superfície

A razão área/volume da câmara reacional no microchip utilizado neste trabalho é de $9 \text{ mm}^2 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ sendo que 95% dessa área é composta apenas pelo filme de poliéster. Em contraste, a razão área/volume em um tubo plástico de $25 \mu\text{L}$ é de $1,6 \text{ mm}^2 \cdot \mu\text{L}^{-1}$. A elevada razão área/volume da câmara reacional no microchip pode provocar uma adsorção indesejada da enzima *Taq polimerase* na superfície da

câmara, e desta forma a PCR pode não ocorrer devido a menor quantidade de enzima disponível. Desta forma, a passivação da superfície para a realização da PCR é essencial no microchip, não só para o chip de PT, mas também para dispositivos fabricados em outros materiais (ROPER *et al.*, 2007). Para minimizar o efeito da adsorção da enzima na superfície da câmara reacional e consequente inibição da PCR, este trabalho utilizou a facilidade do recobrimento dinâmico da superfície, o que dispensa uma etapa adicional de passivação. Alguns trabalhos demonstram que a adição de BSA (albumina sérica bovina) e PEG (polietileno glicol) na mistura reacional da PCR reduz a adsorção da enzima na superfície, uma vez que estas substâncias preferencialmente se ligam a parede da câmara, prevenindo que a maior parte da enzima seja aderida na superfície da câmara, provocando uma melhoria da biocompatibilidade da PCR para esse tipo de dispositivo e melhorando a eficiência da PCR (DUARTE, 2010; GIORDANO *et al.*, 2001). Para os microchips de PT a PCR não funcionou sem adição desses dois reagentes, porém a sua adição foi suficiente para permitir que a PCR apresentasse uma eficiência razoável.

5.4.3. Amplificação dos fragmentos de 1150 pb e 1500 pb a partir das bactérias *Azospirillum brasilense* AbV5 e *Escherichia coli* BL21 respectivamente

A PCR realizada em microchips de PT havia sido demonstrada anteriormente apenas para o bacteriófago lambda, sendo amplificado o fragmento de 520 pb. (DUARTE *et al.*, 2011). Este trabalho demonstra pela primeira vez a amplificação de longos segmentos de DNA (1150 pb e 1500 pb) provenientes de bactérias, em microchips de PT.

O principal requisito para PCR é claro: criar um número adequado de cópias de uma sequência específica que possa ser detectado na etapa de separação através da eletroforese. A PCR de DNA de bactérias alcançou seu objetivo como pode ser visto nas Figuras 21 e 22, pois apresentou um pico do produto amplificado facilmente detectável na eletroforese.

A Figura 21 mostra a amplificação do fragmento de 1500 pb a partir do DNA da bactéria *A. brasilense* e a Figura 22 mostra a amplificação do fragmento de 1150 pb a partir do DNA da bactéria *E. coli*. A partir da concentração de DNA para cada

um dos picos obtida pelo eletroferograma (2,4 nmol.L⁻¹ e 1,50 nmol.L⁻¹, respectivamente) foi possível calcular a eficiência da PCR no microchip de PT.

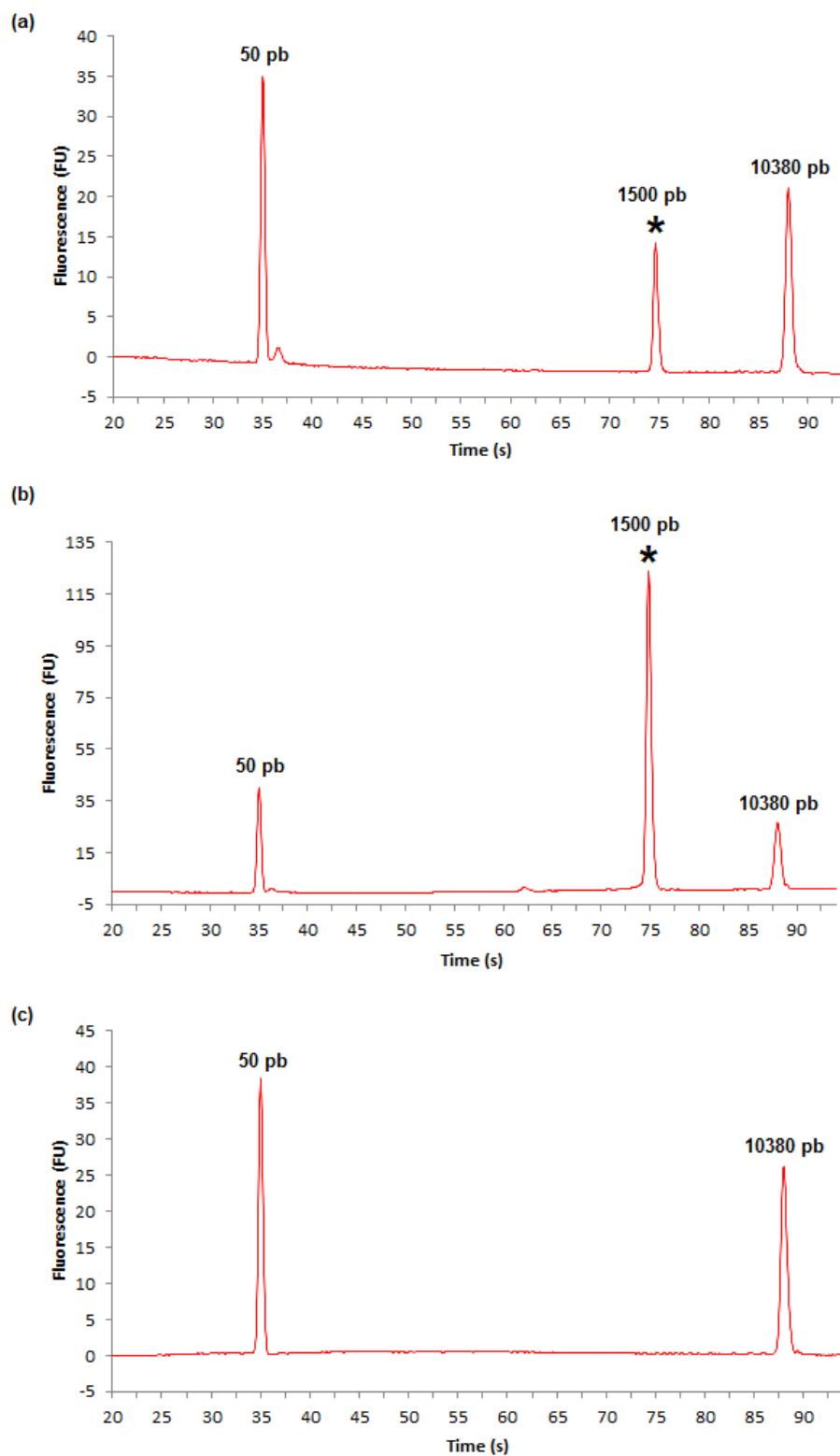


Figura 21 – (a) Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 1500 pb da bactéria *A. brasilense* em microchip de PT, (b) controle positivo em termociclador e (c) controle negativo em termociclador.

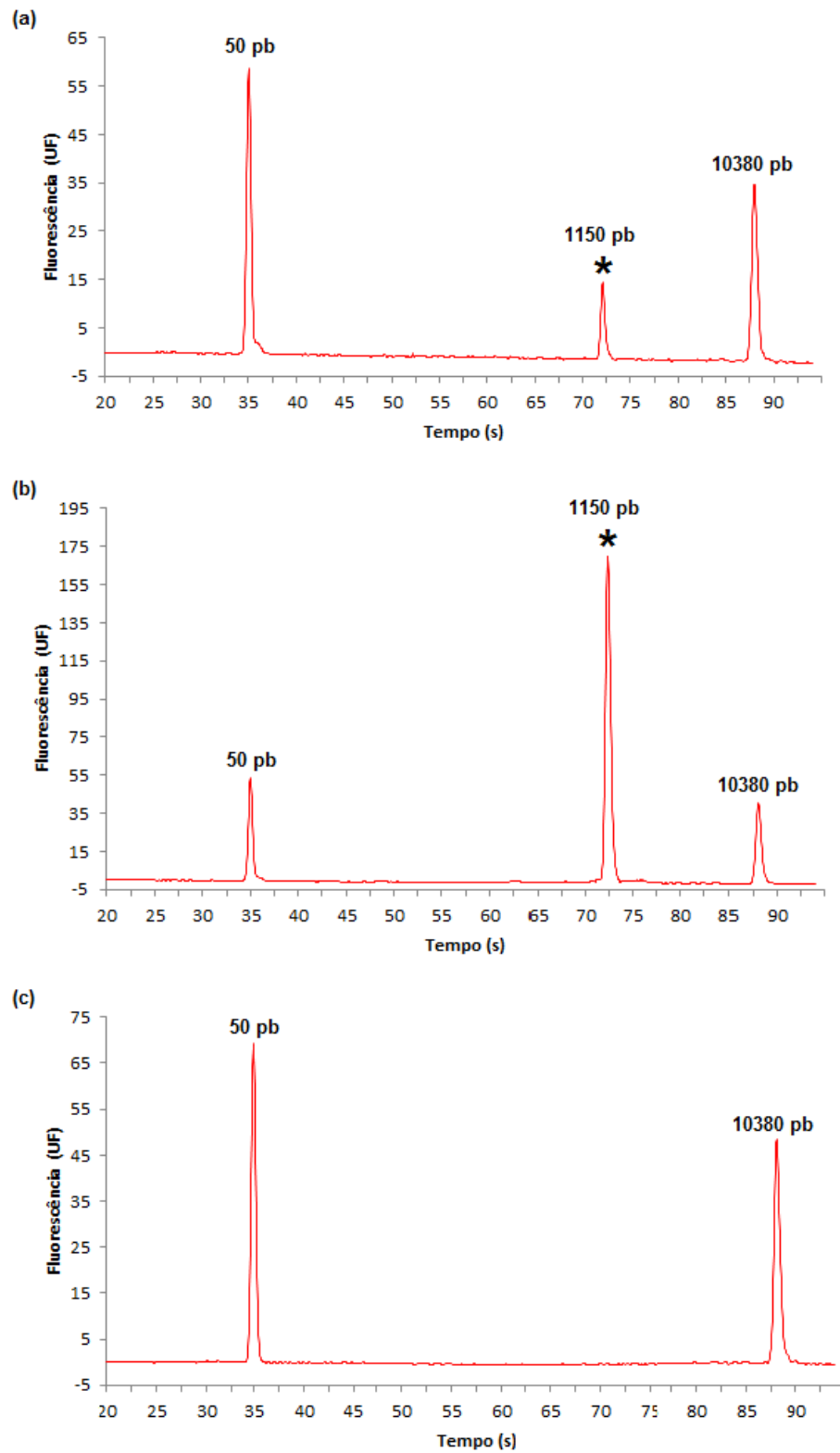


Figura 22 – (a) Eletroferograma mostrando a amplificação do fragmento de 1150 pb da bactéria *E. coli* em microchip de PT, (b) controle positivo em termociclador e (c) controle negativo em termociclador.

Com o valor da concentração de DNA para cada fragmento obtido ao final da PCR, calculou-se o número de cópias de DNA obtidas ao final da reação. Sabendo-se o número de cópias iniciais de DNA (calculado a partir da massa de DNA inserida na mistura reacional da PCR e da massa molar do DNA de cada bactéria) foi possível calcular a eficiência da PCR através da seguinte fórmula:

$$C_T = C_0 (1 + e)^{C_t} \quad (\text{CHEN } et \text{ al.}, 2007)$$

onde, C_T é o número de cópias ao final da PCR, C_0 é o número de cópias iniciais, e é a eficiência da PCR e C_t é o número de ciclos de aquecimento da PCR. A Tabela 3 mostra os números de cópias iniciais e final e a eficiência da PCR no microchip para ambas as bactérias.

Tabela 3 – Número de cópias iniciais e após a PCR para os fragmentos de DNA amplificados a partir das bactérias *A. brasilense* e *E. coli* e eficiência da PCR em microchip de PT.

Bactéria	Nº de cópias inicial de DNA	Nº de cópias de DNA ao final da PCR	Eficiência da PCR (%)
<i>A. brasilense</i> AbV5	1,60x10 ⁶	2,89x10 ⁹	28,39
<i>E. coli</i> BL21	1,26x10 ⁶	1,80x10 ⁹	27,41

Uma eficiência da PCR de aproximadamente 28% foi encontrada para ambos os fragmentos de DNA amplificados em microchip para um programa de 30 ciclos de aquecimento. Os valores de eficiência da PCR encontrados nos microchips de PT representam ~77% da eficiência da PCR realizada convencionalmente em tubo (37%) para o fragmento de 1500 pb da bactéria *A. brasilense* e ~83% da eficiência da PCR realizada em tubo (~33%) para o fragmento de 1150 pb da bactéria *E. coli*.

Em relação ao tempo da PCR em microchip, a amplificação do fragmento de 1500 pb da bactéria *A. brasilense* representou uma redução de 30% no tempo em relação ao método convencional realizado em termociclador de bancada, enquanto que para o fragmento de 1150 pb da *E. coli* a economia de tempo foi de 25% em relação ao método convencional. O tempo de extensão utilizado nestas reações de amplificação foi significativamente longo (ver Metodologia) devido ao comprimento do *amplicon* e a limitação da velocidade de síntese da *Taq polimerase* convencional utilizada neste trabalho. O tempo de extensão pode ser potencialmente reduzido em

trabalhos futuros se for utilizada uma enzima com uma alta velocidade de síntese. Entretanto, o sucesso do uso do dispositivo de PT para PCR com longos tempos de duração sugere uma boa estabilidade/tolerância do dispositivo para ciclos de aquecimento com radiação IV.

A amplificação destes dois fragmentos de DNA (1150 e 1500 pb) em microchips de PT demonstram a potencialidade que a técnica tem para o desenvolvimento de metodologias tanto para detecção de bactérias de importância clínica (*E. coli*) quanto para detecção de bactérias ambientais (*A. brasilense*).

6. CONCLUSÃO

As diversas vantagens da microfluídica, como tempo reduzido das análises, utilização de pequenos volumes de reagentes e amostra, e possibilidade de executar as análises em locais remotos são fatores que justificam a crescente busca por sistemas microfluídicos nos últimos anos. Neste sentido, a fabricação de microchips de PT demonstrou ser uma excelente alternativa para aplicações em preparo de amostra para análises genéticas em microescala a partir de células bacterianas, pois se trata de um processo simples e de baixo custo.

A extração dinâmica de DNA em fase sólida em microchip de PT mostrou ser um método rápido (~20 minutos) e eficiente (mais de 75% de recuperação) para a purificação de DNA de bactérias. As eficiências de extração de DNA de bactérias em microchip foram superiores as encontradas no método de extração convencional. As partículas de sílica magnética utilizadas na dSPE possuem grande afinidade a ácidos nucleicos e, o fato de serem manipuladas por um campo magnético, aumentam suas interações com a amostra e facilitam a dessorção do DNA na etapa de eluição. Esses fatores justificam a alta eficiência de extração obtidas neste trabalho.

As frações coletadas na extração de DNA se mostraram altamente concentradas, pois foram recuperados nas três primeiras frações após agitação das partículas magnéticas cerca de 40% de todo o DNA contido nas amostras das bactérias *Azospirillum brasilense* AbV5 e *Escherichia coli* BL21. O DNA extraído em microchip de PT demonstrou ser um DNA com pureza adequada podendo ser amplificado em uma etapa subsequente através da reação da PCR.

O microchip de PT demonstrou ser capaz de amplificar longos segmentos de DNA com aquecimento mediado por radiação IV, com volume reduzido (2 μ L), economia de tempo (25% a 30% menos tempo em relação ao método convencional) e uma eficiência de reação que corresponde a cerca de 75% do método convencional a partir de DNA de bactérias.

As etapas realizadas até o presente momento (extração e amplificação de DNA) em microchip de PT mostraram pela primeira vez o sucesso do uso destes dispositivos para análises de DNA de bactérias. Os resultados demonstram o grande

potencial dos microchips de PT em direção à obtenção de um dispositivo descartável de PT totalmente integrado para detecção e identificação de bactérias.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A continuação do trabalho visa melhorar a qualidade dos resultados já obtidos e concluir as etapas que ainda faltam para a obtenção de um dispositivo de PT totalmente integrado para detecção e identificação de bactérias através da identificação de genes específicos.

Para tanto, as próximas etapas envolvem:

- Redução do tempo da PCR de longos segmentos de DNA no microchip de PT utilizando uma enzima com maior velocidade de extensão, como por exemplo, a SpeedSTAR™ DNA polimerase que é uma enzima capaz de realizar a extensão da fita de DNA a uma velocidade de 10 segundos/Kb, em contrapartida a *Taq* DNA polimerase que possui uma velocidade de extensão da fita de DNA de 60 segundo/Kb;
- Realização da separação/identificação de DNA em dispositivo microfluídico de PT com detecção de Fluorescência Induzida a laser;
- Integração das etapas de extração, amplificação por IV-PCR e separação de DNA de modo a obter um dispositivo microfluídico totalmente integrado para detecção de genes de bactérias, com capacidade de “*sample-in-answer-out*”;
- Desenvolvimento de metodologias para detecção de bactérias resistentes a antibióticos em microchip de PT totalmente integrado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agilent DNA 7500 and DNA 12000 kit quick start guide. Publication number: G2938-90025. **Agilent technologies**, 2006.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Brasília: **ANVISA**, 2013.

ARRIEL, N. H. C.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; CAPELOTO, A.; DI MAURO, S. M. Z.; DI MAURO, A. O. Análise comparativa de quatro protocolos de extração de DNA genômico, em gergelim. **Revista brasileira oleaginosas e fibrosas**, v. 6, n. 2, p. 525-535, 2002.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521-577, 2004.

BELAAOUAJ, A.; LAPOUMEROULIE, C.; CANIÇA, M. M.; VEDEL, G.; NÉVOT, P.; KRISHNAMOORTHY, R.; PAUL, G. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). **FEMS Microbiology Letters**, v. 120, p. 75-80, 1994.

BIENVENUE, J. M.; DUNCALF, N.; MARCHIARULLO, D.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. Microchip-based cell lysis and DNA extraction from sperm cells for application to forensic analysis. **J. Forensic Sci.**, v. 51, n. 2, p. 266-273, 2006.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-van DILLEN, P. M. E.; NOORDAA, J. van der. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, p. 45-47, 1989.

BREADMORE, M. C.; WOLFE, K. A.; ARCIBAL, I. G.; LEUNG, W. K.; DICKSON, D.; GIORDANO, B. C.; POWER, M. E.; FERRANCE, J. P.; FELDMAN, S. H.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P. Microchip-based purification of DNA from biological samples. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1880-1886, 2003.

BROCKE, A.; NICHOLSON, G.; BAYER, E. Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 22, n. 7, p. 1251-1266, 2001.

BUTLER, J. M. **Forensic DNA typing: biology and technology behind STR markers**. 2 ed. San Diego: Academic Presss, 2001, 311p.

CADY, N. C.; STELICK, S.; BATT, C. A. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 1, p. 59-66, 2003.

CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. *Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. **Asociación Argentina de Microbiología**, 2008, 268 p.

CHEN, L.; WEST, J.; AUROUX, P.-A.; MANZ, A.; DAY, P. J. R. Ultrasensitive PCR and real-time detection from human genomic samples using a bidirectional flow microreactor. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 23, p. 9185-9190, 2007.

CHEN, Y.; PÉPIN, A. Nanofabrication: conventional and nonconventional methods. **Electrophoresis**, v. 22, n. 2, p. 187-207, 2001.

CHEN, Z.; MAUK, M. G.; WANG, J.; ABRAMS, W. R.; CORSTJENS, P. L. A. M.; NIEBDALA, R. S.; MALAMUD, D.; BAU, H. H. A microfluidic system for saliva-based detection of infectious diseases. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 1098, p. 429-436, 2007.

CHRISTEL, L. A.; PETERSEN, K.; McMILLAN, W.; NORTHRUP, M. A. Rapid, automated nucleic acid probe assays using silicon microstructures for nucleic acid concentration. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 121, n. 1, p. 22-27, 1999.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; FERREIRA, M. C.; GRANGE, L.; CAMPO, R. J.; MOSTASSO, F. L.; ANDRADE, D. S.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizobio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 833-840, 2003.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement (M100-S17). **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Wayne, PA. 2007.

COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; CARRILHO, E.; JESUS, D. P.; SILVA, J. A. F.; SILVA, H. D. T.; DO LAGO, C. L. Microsistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1986-2000, 2007.

CORRÊA, E. M.; POSSIK, P. A. **A análise de DNA por eletroforese**, 2004. Disponível em: <<http://www.ciencianews.com.br/siteDNA/testesgeneticos.pdf>>. Acesso em: 16/01/2013.

CORREA, O. S.; ROMERO, A. M.; SORIA, M. A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G.

Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. **Asociación Argentina de Microbiología**, p.87-95, 2008.

DA SILVA, E. R.; SEGATO, T. P.; COLTRO, W. K. T.; LIMA, R. S.; CARRILHO, E.; MAZO, L. H. Determination of glyphosate and AMPA on polyester-toner electrophoresis microchip with contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 34, n. 14, p. 2107-2111, 2013.

DE SOUZA, F. R.; ALVES, G. L.; COLTRO, W. K. T. Capillary-Driven toner-based microfluidic devices for clinical diagnostics with colorimetric detection. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 21, p. 9002-9007, 2012.

DUARTE, G. R. M. **Análises Genéticas em Sistemas Microfabricados**. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

DUARTE, G. R. M.; PRICE, C. W.; AUGUSTINE, B. H.; CARRILHO, E.; LANDERS, J. P. Dynamic solid phase DNA extraction and PCR amplification in Polyester-Toner based microchip. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 13, p. 5182-5189, 2011.

EASLEY, C. J.; KARLINSEY, J. M.; BIENVENUE, J. M.; LEGENDRE, L. A.; ROPER, M. G.; FELDMAN, S. H.; HUGHES, M. A.; HEWLETT, E. L.; MERKEL, T. J.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 51, p. 19272-19277, 2006.

FIORINI, G. S.; CHIU, D.T. Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. **BioTechniques**, v. 38, n. 3, p. 429-446, 2005.

GAWRON, A. J.; MARTIN, R. S.; LUNTE, S. M. Fabrication and evaluation of a carbon-based dual-electrode detector for poly(dimethylsiloxane) electrophoresis chips. **Electrophoresis**, v. 22, n. 2, p. 242-248, 2001.

GABRIEL, E. F. M.; JUNIOR, G. F. D.; GARCIA, P. T.; DE JESUS, D. P.; COLTRO, W. K. T. Polyester-toner electrophoresis microchips with improved analytical performance and extended lifetime. **Electrophoresis**, v. 33, n. 17, p. 2660-2667, 2012.

GERVASIO, A. P. G.; LAVORANTE, A. F.; MORAES, M. C. B.; GINÉ, M. F.; MIRANDA, C. E. S.; CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 65-74, 2003.

GIORDANO, B. C.; FERRANCE, J. P.; SWEDBERG, S.; HÜHMER, A.; LANDERS, J. P. Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds. **Analytical Biochemistry**, v. 291, n. 1, p. 124-132, 2001.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, 2010.

HORNER-DEVINE, M. C.; CARNEY, K. M.; BOHANNAN, B. J. M. An ecological perspective on bacterial biodiversity. **Proceedings of the Royal Society B.**, v. 271, n. 1535, p. 113-122, 2004.

HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. *Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. **Asociación Argentina de Microbiología**, p.17-35, 2008.

HÜHMER, A.; LANDERS, J. P. Noncontact infrared-mediated thermocycling for effective polymerase chain reaction amplification of DNA in nanoliter volumes. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 21, p. 5507-5512, 2000.

IORDANOV, V. P.; BASTEMEIJER, J.; BOSSCHE, A.; SARRO, P. M.; MALATEK, M.; YOUNG, I. T.; VAN DEDEM, G. W. K.; VELLEKOOP, M. J. PCR array on chip - thermal characterization. **Proceedings of IEEE**, v. 2, p. 1045-1048, 2003.

JUNIOR, M. J. P.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**, v. 1, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 7, p. 39-43, 1989.

LAGALLY, E. T.; MATHIES, R. A. Integrated genetic analysis microsystems, **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 37, n. 23, p. R245-R261, 2004.

LAGO, C. L.; SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; SILVA, J. A. F. A dry process for production of microfluidic devices based on the lamination of laser-printed polyester films. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 15, p. 3853-3858, 2003.

LEHNINGER, L. **Lehninger Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman & Co, 4.ed, 2004, 1100p.

LI, S. F. Y.; KRICKA, L. J. Clinical analysis by microchip capillary electrophoresis. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 37-45, 2006.

LIU, A-L.; HE, F-Y.; HU, Y-L.; XIA, X-H. Plastified poly(ethylene terephthalate) (PET)-toner microfluidic chip by direct-printing integrated with electrochemical detection for pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1303-1308, 2006.

LOUNSBURY, J. A.; LANDERS, J. P. Ultrafast amplification of DNA on plastic microdevices for forensic short tandem repeat analysis. **J. Forensic Sci.**, v. 58, n. 4, p. 866-874, 2013.

MADIGAN, M. T.; Martinko, J. M.; Parcker, J. **Brock Biology of Microorganisms**. Tenth Edition. Prentice Hall INC, 2000.

MANICA, D. P.; EWING, A. G. Prototyping disposable electrophoresis microchips with electrochemical detection using rapid marker masking and laminar flow etching. **Electrophoresis**, v. 23, n. 21, p. 3735-3743, 2002.

MARTEL, A.; DEVRIESE, L. A.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. Presence of macrolide resistance genes in streptococci isolated from pigs and pork carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 27-32, 2003.

Metodos y Diagnosticos del Laboratorio Clinico. **Editora Médica Panamericana**, 8 Ed., 1983.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 263-273, 1986.

NETO, J. R.; JÚNIOR, V. A. M.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris*. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

NOGUEIRA, C. A. M.; MOMESSO, C. A. S.; MACHADO, R. L. D.; ALMEIDA, M. T. G.; ROSSIT, A. R. B. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 6, n. 2, p. 35-38, 2004.

NORTON, D. M. Polymerase Chain Reaction-Based Methods for Detection of *Listeria monocytogenes*: Toward Real-Time Screening for Food and Environmental Samples. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, p. 505-515, 2002.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004.

ODA, R.; STRAUSBAUCH, M.; BORSON, N.; HÜHMER, A.; JURRENS, S.; CRAIGHEAD, J.; WETTSTEIN, P.; ECKLOFF, B.; KLINE, B.; LANDERS, J. P. Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4361-4368, 1998.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 26, p. 1591-1601, 1994.

OLIVEIRA, K. A.; OLIVEIRA, C. R.; SILVEIRA, L. A.; COLTRO, W. K. T. Laser-printing of toner-based 96-microzone plates for immunoassays. **Analyst**, v. 138, n. 4, p. 1114-1121, 2013.

PAMME, N. Continuous flow separations in microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 12, p. 1644-1659, 2007.

PANARO, N. J.; YUEN, P. K.; SAKAZUME, T.; FORTINA, P.; KRICKA, L. J.; WILDING, P. Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 1851-1853, 2000.

PATERSON, A. H.; BRUBAKER, C. L.; WENDEL, J. F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium spp.*) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. **Plant molecular biology reporter**, v. 11, n. 2, p. 122-127, 1993.

PENOT, I.; BERGES, N.; GUIGUENE, C.; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays L.*) in France using biochemical tests and plasmid profiles. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 798-803, 1992.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**, Rio de Janeiro: Interciência, 2002.

PORTUGAL, J. R.; ARF, O.; LONGUI, W. V.; GITTI, D. C.; BARBIERI, M. K. F.; GONZAGA, A. R.; TEIXEIRA, D. S. Inoculação com *Azospirillum brasilense* via foliar associada à doses de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. **XXIX Congresso nacional de milho e sorgo**. Águas de Lindóia, 2012.

PRICE, C. W.; LESLIE, D. C.; LANDERS, J. P. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 17, p. 2484-2494, 2009.

RAMOS, C. G. S. Estudo dos padrões de resistência aos β -Lactâmicos e inibidores de β -lactamases em estirpes de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas em animais. Relatório de Estágio, Centro de Bacteriologia, **Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge**, 2002.

REMUALDO, V.; FILHO, A. M. Biologia molecular aplicada ao diagnóstico de doenças infecciosas. **Prática Hospitalar**, n. 53, p. 33-35, 2007.

ROPER, M. G.; EASLEY, C. J.; LEGENDRE, L. A.; HUMPHREY, J. A. C.; LANDERS, J. P. Infrared temperature control system for a completely noncontact polymerase chain reaction in microfluidic chips. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 1294-1300, 2007.

ROSA, D. D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. **Summa Phytopathologica**. v. 34, n. 3, p. 259-261, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY, USA. 1989.

SÁENZ Y. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* no patógenas de alimentos y de la microflora intestinal de humanos y animales. **Tese (Doutorado)**. Universidade de La Rioja, 2004.

SCHROEDER, C. M.; WHITE, D. G.; MENG, J. Retail meat and poultry as reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. **Food Microbiology**. v. 21, p. 249-255, 2004.

SRINIVASAN, V.; PAMULA, V. K.; FAIR, R. B. An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids. **Lab on a Chip**, v. 4, n. 4, p. 310-315, 2004.

TIAN, H.; HUHMER, A. F.; LANDERS, J. P. Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. **Analytical Biochemistry**, v. 283, n. 2, p. 175-191, 2000.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1016-1024, 1979.

TODAR K. Pathogenic *E. coli*. Bacterial Diseases of Humans. **Todar's Online Textbook of Bacteriology**, 2002. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>>. Acesso em: 13/09/2013.

TOMA, C.; ESPINOSA, E. M. Distribution of Putative Adhesins in Different Seropathotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 4937-4946, 2004.

TUMBARELLO, M.; SALI, M. Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli*: Risk Factors for Inadequate Initial Antimicrobial Therapy. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 52, n. 9, p. 3244-3252, 2008.

VIERSTRAETE, A. Principles of PCR. **Multimedia Educational Resource for Learning and Online Teaching**, 1999. Disponível em: <<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>. Acesso em: 15/01/2013.

WANG, J.; PUMERA, M.; CHATRATHI, M. P.; ESCARPA, A.; KONRAD, R.; GRIEBEL, A.; DORNER, W.; LOWE, H. Towards disposable lab-on-a-chip: poly(methylmethacrylate) microchip electrophoresis device with electrochemical detection. **Electrophoresis**, v. 23, n. 4, p. 596-601, 2002.

WEN, J.; LEGENDRE, L. A.; BIENVENUE, J. M.; LANDERS, J. P. Purification of nucleic acids in microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 17, p. 6472-6479, 2008.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368-373, 2006.

WILDING, P.; SHOFFNER, M. A.; KRICKA, L. J. PCR in a silicon microstructure. **Clinical Chemistry**, v. 40, p. 1815-1818, 1994.

WINTZINGERODE, F. V.; GOBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 213-229, 1997.

WOLFE, K. A.; BREADMORE, M. C.; FERRANCE, J. P.; POWER, M. E.; CONROY, J. F.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P. Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids. **Electrophoresis**, v. 23, n. 5, p. 727-733, 2002.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451-1470, 2005.

XIA, Y.; EMBLEY, T. M.; O'DONNELL, A. G. Phylogenetic analysis of *Azospirillum* by direct sequencing of PCR amplified 16S rDNA. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 197-201, 1994.

YEO, L. Y.; CHANG, H-C.; CHAN, P. P. Y.; FRIEND, J. R. Microfluidic devices for bioapplications. **Small**, v. 7, n. 1, p. 12-48, 2011.

ZHANG, X.; HASWELL, S. J. Materials matter in microfluidic devices. **MRS Bulletin**, v. 31, n. 2, p. 95-99, 2006.

9. ANEXO

9.1. *Preparo dos meios de cultura*

- Meio DYGS (NETO *et al.*, 1986)

Glicose	2,0 g.L ⁻¹
Ácido málico	2,0 g.L ⁻¹
Peptona bacteriológica	1,5 g.L ⁻¹
Extrato de levedura	2,0 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,5 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g.L ⁻¹
Ácido glutâmico	1,5 g.L ⁻¹
Ágar (somente meio sólido)	15,0 g.L ⁻¹
Ajustar pH para 6,8	
Completar com água ultrapura	

- Meio LB (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Triptona	10,0 g.L ⁻¹
Extrato de levedura	5,0 g.L ⁻¹
NaCl	5,0 g.L ⁻¹
Ágar (somente meio sólido)	15,0 g.L ⁻¹
Ajustar pH para 7,5	
Completar com água ultrapura	

9.2. *Preparo das soluções*

- Tampão Tris-EDTA (TE) 10X pH 8,0

Tris base	12,0 g.L ⁻¹
EDTA	3,4 g.L ⁻¹
Ajustar pH para 8,0	
Completar com água ultrapura	

- Hidrocloroeto de Guanidina 8M pH 7,6
 Hidrocloroeto de Guanidina 764,0 g.L⁻¹
 Ajustar pH para 7,6
 Completar com água ultrapura

9.3. Classificação dos antibióticos quanto aos halos de inibição

Tabela 4 – Classificação dos antibióticos utilizados no antibiograma quanto aos seus respectivos valores de halos de inibição.

Antibiótico	Halos de inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Ácido Nalidíxico (30 µg)	≤13	14-18	≥19
Amoxicilina (10 µg)	≤13	14-16	≥17
Amoxicilina + Ácido Clavulânico (20/10 µg)	≤13	14-17	≥18
Ampicilina + Sulbactam (10/10 µg)	≤11	12-14	≥15
Aztreonam (30 µg)	≤15	16-21	≥22
Ceftazidima (30 µg)	≤14	15-17	≥18

Fonte: CLSI (2007)

9.4. Protocolo de separação de DNA em Bioanalyzer

- Preparo da mistura gel-corante (Agilent, 2006):
 - a) Deixar o corante concentrado e a matriz de gel de DNA atingir temperatura ambiente por 30 minutos;
 - b) Agitar em vórtex e adicionar 25 µL do corante concentrado ao frasco da matriz de gel de DNA;
 - c) Agitar em vórtex e transferir a solução para o frasco com filtro;
 - d) Centrifugar a 1500 g ± 20% por 10 minutos. Proteger a solução da luz e estocar a 4 °C.
- Preenchimento do chip com a mistura gel-corante (Agilent, 2006):
 - a) Deixar a mistura gel-corante atingir temperatura ambiente por 30 minutos antes de usar;
 - b) Colocar um novo chip de DNA no suporte contendo a seringa;

- c) Pipetar 9 μL da mistura gel-corante para o poço marcado com **G**;
 - d) Certificar que o êmbolo da seringa está posicionado na marca de 1 mL e, em seguida, fechar o suporte com o chip já posicionado;
 - e) Pressionar o êmbolo até que este pare devido à trava do suporte;
 - f) Esperar por exatamente 30 segundos e liberar a trava do êmbolo;
 - g) Esperar por 5 segundos. Vagarosamente volte o êmbolo para a posição de 1 mL;
 - h) Abrir o suporte e pipetar 9 μL da mistura gel-corante para os dois poços marcados com G.
-
- Preenchimento do chip com os marcadores (Agilent, 2006):
 - a) Pipetar 5 μL do marcador para todos os 12 poços de amostra e para o poço do *ladder*. Não deixar nenhum poço vazio.

 - Preenchimento do chip com o *Ladder* e com as amostras (Agilent, 2006):
 - a) Pipetar 1 μL do ladder DNA para o poço referente ao ladder;
 - b) Pipetar 1 μL da amostra para cada um dos poços que serão utilizados, para os poços que não serão utilizados pipetar 1 μL de água deionizada;
 - c) Colocar o chip horizontalmente no *vórtex* específico que acompanha o equipamento e agitar por 1 minuto a uma velocidade de 2400 rpm;
 - d) Posicionar o microchip no Bioanalyzer 2100 e iniciar a separação.