Caracterização de fungos isolados no monitoramento ambiental do Centro de Radiofarmácia.

Laura Cavalcante Cidrão e Margareth Mie Nakamura Matsuda
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

O controle de contaminação microbiana em áreas de produção de radiofármacos é crucial devido à meia-vida física curta deste tipo de medicamento. Pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF), RDC 658/2022 e IN 128/2022 da ANVISA, o monitoramento ambiental de viáveis e não viáveis de áreas classificadas é obrigatório [1,2]. Propõe-se o uso de *fingerprinting* de proteínas celulares inteiras com SDS-PAGE para identificar e classificar fungos e leveduras provenientes do monitoramento ambiental [3].

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é avaliar a técnica de *fingerprinting* de proteínas celulares inteiras utilizando SDS-PAGE para identificar e classificar microrganismos contaminantes em ambientes classificados da produção de radiofármacos. O estudo visa avaliar a técnica como uma alternativa econômica para a identificação de fungos filamentosos e criar uma biblioteca de perfis proteicos, comparando com os fornecidos por empresas especializadas.

Três técnicas para extração de proteínas de filamentosos fungos foram avaliadas, e para cada técnica (Figuras 1, 2 e 3), foram realizadas cinco replicatas. Foi usado o fungo *Aspergillus brasiliensis* (NCPF 2275; Biomérieux) como referência. O microrganismo foi cultivado–em placas de Petri de 90 mm com Ágar Sabouraud dextrose 4% a 22,5 ± 2,5 °C por 4 dias ao abrigo da luz. Os extratos proteicos foram congelados a -20 °C até o uso. Os extratos foram analisados, por método de Bradford [4]. A proporção (Mp/Mm) entre a massa total de proteínas extraídas (Mp) e a massa inicial do micélio (Mm) foi calculada e a comparação entre as técnicas foi realizada aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunnett para comparações múltiplas (software GraphPad Prism 5.0).

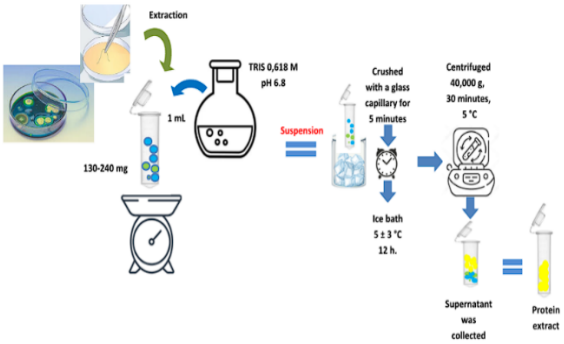

Figura 1. Esquema da extração proteica com Tris 0,618M

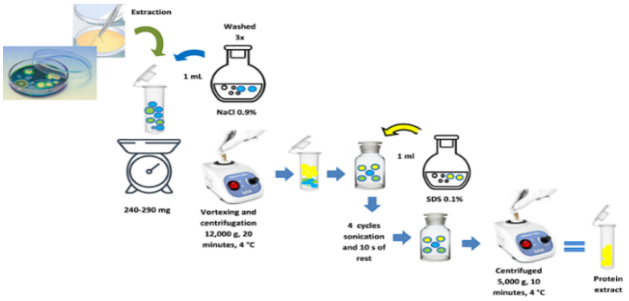

Figura 2. Esquema da extração proteica com SDS 0,1%.

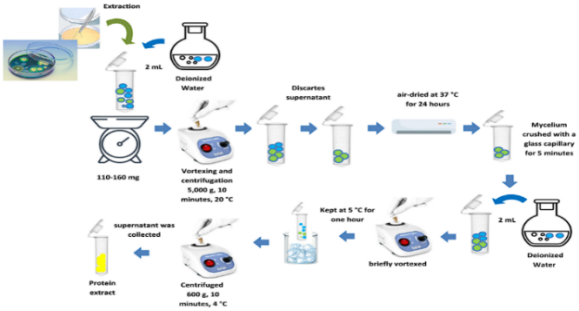

Figura 3. Esquema para extração proteica com água purificada.

A técnica de extração de proteínas usando solução tampão de TRIS 0,618 M (pH 6,8) revelou-se a mais eficaz, com um rendimento médio de 1,2 µg de proteína por 1 mg de micélio (CV de 14,3%). O TRIS tem maior eficiência na manutenção do pH estável, preservando a integridade das proteínas. Em contraste, a extração com SDS 0,1% e sonicação resultou em rendimento médio de 0,30 µg de proteína, e a extração com água com rendimento máximo de 0,35 µg. A menor eficiência das técnicas com SDS e água pode ser atribuída à fragmentação inadequada do micélio e diferenças morfológicas entre os fungos. Futuras investigações irão comparar a eficácia de uma técnica uniforme em diversas espécies de fungos. A Figura 4representa a relação (Mp/Mm) para astécnicas empregadas, sendo M1-TRIS 0,618 M; M2.SDS 0,1%; M3 H 2 O purificada.

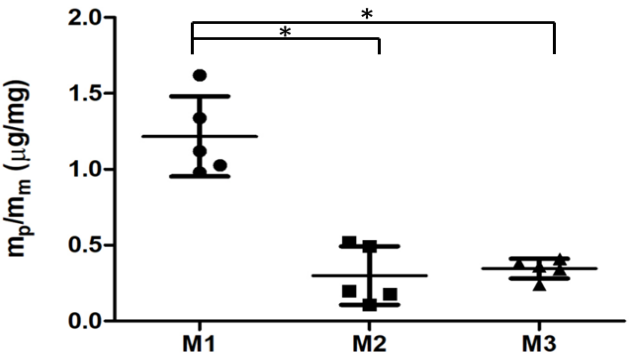

Figura 4. Relação Mp/Mm para as extrações proteicas M1, M2 e M3.

A técnica de extração de proteínas com TRIS 0,618 M pH 6,8 mostrou-se a mais eficiente para o *Aspergillus brasiliensis*. Estudos futuros devem explorar a complexidade dos perfis eletroforéticos obtidos e investigar a variação entre diferentes espécies de fungos filamentosos.

CONCLUSÃO

As técnicas avaliadas foram facilidade de execução após fazendo algumas adaptações às condições de laboratório e disponibilidade de reagentes e equipamentos. A extração de proteínas com TRIS 0,618 pH 6,8 de *Aspergillus brasiliensis*, modelo de fungo filamentoso, foi o mais técnica apropriada.

[1] ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada n° 658. Disponível em: https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-658-de-30-de-marco-de-2022-389846242, 2024.

[2] ANVISA, IN 128, de 30/03/2022. Disponível em: https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-pres/inss-n-128-de-28-de-marco-de-2022-389275446, 2024.

[3] BRADFORD, M.M. (1976), “Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding”, Analytical Biochemistry, vol. 72, n. 1-2, pp. 248-254.

Programa PIBIC-PROBIC/CNPq - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica CNEN