

SEM HV: 30.0 kV	WD: 4.03 mm		VEGA3 TESCAN
SEM MAG: 26.7 kx	Det: TE Dark	2 µm	
View field: 10.4 µm	Date(m/d/y): 01/24/09	Embrapa Agroindústria Tropical	

COMUNICADO  
TÉCNICO

277

Fortaleza, CE  
Março, 2022



# Metodologia de Microscopia Eletrônica de Transmissão para Avaliação da Ação Antibacteriana de Substâncias Extraídas de Plantas

Maria Jaiana Gomes Ferreira  
Flayanna Gouveia Braga Dias  
Celli Rodrigues Muniz  
Larissa Moraes Ribeiro da Silva  
Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

# Metodologia de Microscopia Eletrônica de Transmissão para Avaliação da Ação Antibacteriana de Substâncias Extraídas de Plantas<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Maria Jaiana Gomes Ferreira, Tecnóloga de Alimentos, doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos, Fortaleza, CE; Flayanna Gouveia Braga Dias, Engenheira de Alimentos, mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos, Fortaleza, CE; Celli Rodrigues Muniz, Bióloga, doutora em Biotecnologia, analista A, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Larissa Moraes Ribeiro da Silva, Engenheira de Alimentos, doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos, Fortaleza, CE; Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, Bióloga, doutora em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos, Fortaleza, CE

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) com etiologia bacteriana são prevalentes em todo o mundo, permanecendo como preocupante causa de incapacitações, óbitos e perdas socioeconômicas, sendo potencializadas por contaminações durante o processamento ou pela manipulação inadequada dos alimentos de origem animal ou vegetal. De acordo com dados divulgados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, entre os anos de 2007 a 2017, no Brasil, foram notificados 11.527 surtos de doenças veiculadas por alimentos, estando *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis* associados a muitos dos casos em que a etiologia da doença é identificada (Brasil, 2018).

A emergência de cepas resistentes a antibióticos torna o cenário mais difícil

e desafiador. A Organização Mundial da Saúde considera que o nível de resistência a antibióticos atingiu uma ameaça séria à saúde em todo o mundo (WHO, 2014), problema que traz à tona a importância do desenvolvimento ou da prospecção de novas drogas ou substâncias que ajudem no combate a microrganismos patogênicos.

Substâncias extraídas de plantas com potenciais bioatividades têm se apresentado como alternativa relevante para potencializar ou prover ações antibacterianas, alterando morfológicamente ou não as células bacterianas expostas a sua ação, as quais podem ser incorporadas em fármacos ou alimentos (Negi et al., 2012). Essas substâncias bioativas ou fitoquímicos incluem taninos, alcaloides, carboidratos e glicosídeos, terpenoides,

esteróis, flavonoides e cumarinas (Yadav; Agarwala, 2011), que podem estar associadas a efeito antimicrobiano efetivo devido à possibilidade de sinergismo entre distintas moléculas. Devido ao aumento da demanda por alimentos com menor adição de substâncias sintéticas, substâncias naturais isoladas de plantas têm sido consideradas fontes promissoras de conservantes para alimentos (Mostafa et al., 2018).

Muitos trabalhos na área de microbiologia utilizam a microscopia eletrônica para a análise morfológica de bactérias, incluindo estudos que visam à determinação do mecanismo da ação bactericida ou bacteriostática de substâncias extraídas de plantas. Friedman (2015) relata que mecanismos de ruptura de paredes celulares e membranas plasmáticas estão entre os mais convencionais associados à ação de extratos ou compostos vegetais, sendo, portanto, visíveis em microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Bactérias com danos a serem visualizados por MET podem ser processadas convencionalmente, com fixação em tetróxido de ósmio, desidratação em soluções de etanol, infiltração em resina e ultramicrotomia para obtenção dos espécimes fatiados e aptos a serem depositados sobre as grades (Li et al., 2016); porém, essa técnica é demorada e onerosa. O Contraste Negativo, por outro lado, envolve menos etapas e permite a

visualização das bactérias com bastante definição em um tempo laboral menor.

O presente trabalho tem como objetivo estabelecer uma metodologia baseada em Contraste Negativo para visualizar culturas puras de bactérias ou bactérias submetidas previamente a substâncias extraídas de plantas com potencial antimicrobiano, ajudando a elucidar seu mecanismo de ação.

## Contraste Negativo para visualização de bactérias

Dentro da Microscopia Eletrônica de Transmissão, o contraste negativo apresenta-se como um método simples e rápido destinado ao estudo da morfologia, do tamanho e da microcaracterização de espécimens particulados, tais como vírus, organelas celulares, bactérias, estruturas menores componentes de fungos, algas, plantas, etc. (Muniz et al., 2019). Bactérias contrastadas negativamente apresentam uma ótima preservação do seu estado original, visto que suas macromoléculas fixam-se com perfeição, ficando ainda protegidas contra os efeitos danosos ocasionados pelo feixe de elétrons do microscópio eletrônico. Para tanto, o microrganismo é imerso na solução de um contrastante metálico, ácido fosfotúngstico, por exemplo, e, após a secagem, os átomos de metal eletrodensos envelopam a

superfície da amostra, causando uma diferença de contraste entre o seu interior e sua superfície, visivelmente mais eletrodensa, que é revelada em grandeza de detalhes.

Alterações na morfologia de suas membranas ou paredes são perfeitamente visualizados por essa técnica que pode, portanto, ser incluída em avaliações de bioatividade de substâncias em mecanismos de ações bacteriostáticas ou bactericidas.

A superfície bacteriana é dotada de uma parede celular bem definida e constitui um limite entre o ambiente externo e a célula, apresentando diversas funções, incluindo a determinação da forma celular, o envolvimento em processos de crescimento e divisão, a contribuição na resistência à pressão de turgidez e à seleção de moléculas que entram ou saem da célula, o reconhecimento de sinalizações moleculares e a interação celular. Alterações nessas superfícies podem indicar estresses químicos, bioquímicos ou físicos, e, quando severas, mudanças em sua morfologia e estrutura podem ser detectadas e visualizadas em microscopia eletrônica (Dufrêne, 2004).

Culturas bacterianas submetidas ao ensaio de determinação de Concentração Inibitória Mínima e de Concentração Bactericida Mínima frente à substância ou extrato vegetal testado, em placas de microdiluição (Górniak et al., 2019), são passíveis de serem submetidos à presente metodologia.

## Metodologia

As cepas das bactérias de interesse oriundas de culturas puras cultivadas no meio Ágar Trypticase de Soja – TSA (Difco, Sparks, USA) foram incubadas a 35 °C/24 horas em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*). Após esse período, uma colônia isolada foi transferida para 5 mL do caldo Trypticase de Soja – TSB (Difco, Sparks, USA), em seguida incubada a 35 °C/24 horas em BOD para se obter uma concentração final de  $10^8$  UFC/mL. A partir dessa concentração, diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) foram preparadas em água peptonada a fim de se obter uma suspensão bacteriana de  $10^5$  UFC/mL, para ser testada isoladamente ou na presença da Concentração Bactericida Mínima determinada previamente para os extratos de plantas, e então submetida aos ensaios de microscopia.

Volumes iguais do fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4) e da suspensão bacteriana de  $10^5$  UFC/mL, com e sem os extratos de plantas, foram colocados em eppendorfs de 2 mL, mantendo-se a mistura a 4 °C por toda a noite até o dia seguinte (Bozzola; Russell, 1999). Foram realizadas quatro lavagens nas amostras, em que a primeira foi feita com o fixador e as outras três lavagens com tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2. Entre cada lavagem, as amostras foram centrifugadas a

12.000 g/10 min/10 °C e o sobrenadante removido. O “pellet” obtido foi ressuspendido na lavagem seguinte. Essas lavagens permitem que outras sujidades menores não interfiram no campo de visão, restringindo as observações às bactérias isoladas. Uma gota do “pellet” obtido na lavagem final foi depositada sobre a grade própria para MET, retirando-se o excesso com papel de filtro após três minutos. Em seguida, uma gota do contrastante, ácido fosfotúngstico, foi adicionada; após três minutos, o excesso foi removido. As grades prontas foram encaminhadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão e visualizadas sob velocidade de aceleração de elétrons de 30 Kv em aumentos acima de 5000x, para que detalhes da morfologia ficassem visíveis.

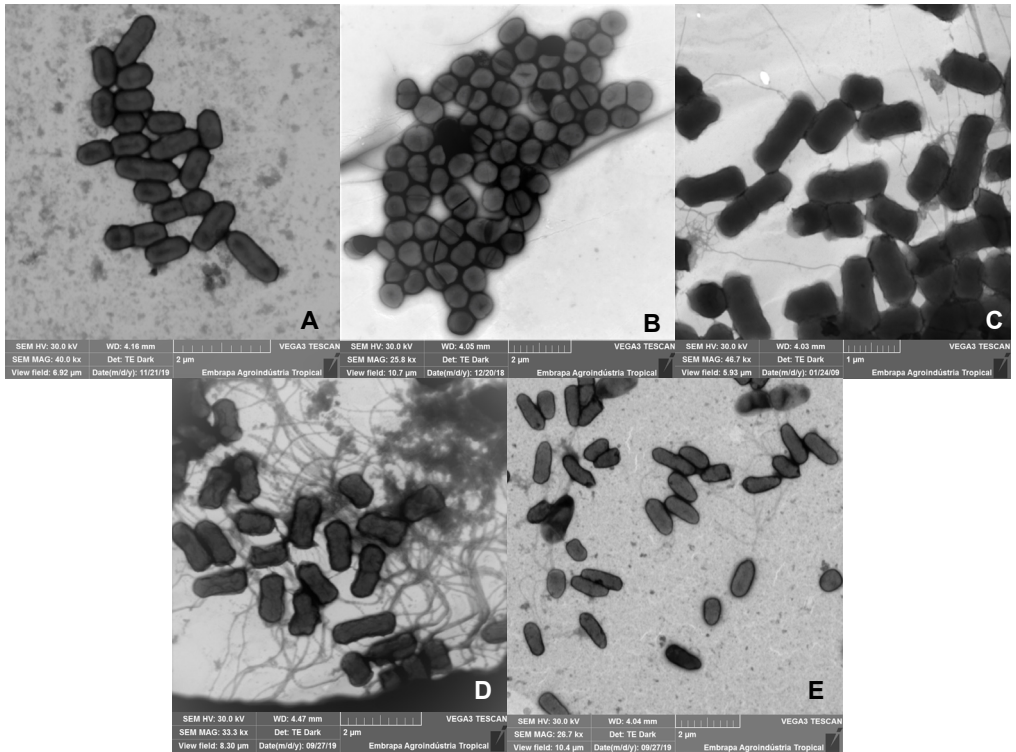
## Imagens de bactérias visualizadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão

Exemplos de imagens obtidas com a técnica descrita estão apresentadas na Figura 1, as quais foram obtidas utilizando-se o modo “campo claro”. As imagens correspondem à amostra de bactérias oriundas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA) da Universidade Federal do Ceará (UFC)

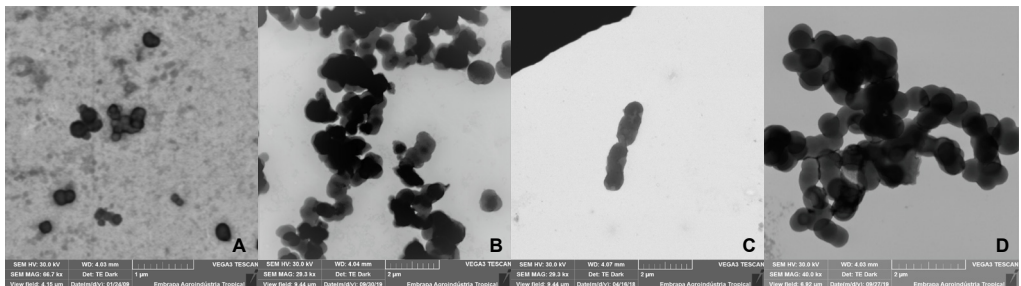
sem nenhum tratamento. Observa-se que a forma das bactérias se apresenta íntegra, com paredes regulares, sendo possível visualizar a presença de certos anexos, tais como fímbrias e flagelos.

Culturas bacterianas submetidas ao ensaio de determinação de Concentração Bactericida Mínima com extratos vegetais variados também foram observadas e são mostradas na Figura 2. Observa-se que as bactérias apresentam formas diferentes das originais, quando não tratadas. Acessórios como fímbrias e flagelos foram perdidos, enfatizando que a morfologia bacteriana é bastante alterada durante esses ensaios. Perda de rigidez da célula e tamanhos alterados também são observações registradas.

A presente metodologia é eficaz e precisa para a observação de detalhes de células bacterianas puras submetidas ou não a tratamentos de determinação de ações bactericidas ou bacteriostáticas de extratos vegetais. Quando submetidas a esses tratamentos, as alterações na morfologia são visivelmente salientes, podendo ser descritas e determinadas para diferentes extratos vegetais sob variadas concentrações.



**Figura 1.** Imagens de bactérias puras sem tratamento, obtidas por contraste negativo e visualizadas sob detector STEM em campo claro. (A) *Listeria monocytogenes*; (B) *Staphylococcus aureus*; (C) *Salmonella enteritidis*; (D) *Escherichia coli*; (E) *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figura 2.** Imagens de bactérias submetidas ao ensaio de determinação de Concentração Inibitória Mínima com extratos vegetais variados, obtidas por contraste negativo e visualizadas sob detector STEM em campo claro. (A) *Listeria monocytogenes*; (B) *Staphylococcus aureus*; (C) *Salmonella enteritidis*; (D) *Escherichia coli*.



## Referências

- BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**: principles and techniques for biologists. Learning: Jones & Bartlett, 1999. 670 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**, 2018. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>.
- DUFRENE, Y. F. Using nanotechniques to explore microbial surfaces. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 451-460, 2004.
- FRIEDMAN, M. Antibiotic-Resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 3805-3822, 2015.
- GÓRNIK, I.; BARTOSZEWSKI, R.; KRÓLICZEWSKI, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. **Phytochemical Review**, v. 18, p. 241-272, 2019. <<https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>>.
- LI, J.; AHN, J.; LIU, D.; CHEN, S.; YE, X.; DING, T. Evaluation of Ultrasound-Induced Damage to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by Flow Cytometry and Transmission Electron Microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 1828-1837, 2016. <<https://doi.org/10.1128/AEM.03080-15>>.
- MOSTAFA, A. A.; AL-ASKAR, A. A.; ALMAARY, K. S.; DAWOUD, T. M.; SHOLKAMY, E. N.; BAKRI, M. M. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 2, fev. p. 361-366, 2018.
- MUNIZ, C. R.; AZEREDO, H. M. C. de; ROSA, M. de F. **Preparo de amostras para observação de nanoestruturas em microscópio eletrônico de varredura acoplado a detector STEM**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2019. 6 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 248). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1109231/1/COT19002.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2021.
- NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 1, maio, p. 7-17, 2012.
- WHO. World Health Organization. **Antimicrobial resistance**: Global report on surveillance, 2014. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf)>.
- YADAV, R. N.; AGARWALA, M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. **Journal of Phytology**, v. 3, p. 12, 2011.

Exemplares desta edição  
podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici  
60511-110, Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109 / 3391-7195  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**1ª edição**  
(2022): on-line



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente

*Antônio Genésio Vasconcelos Neto*

Secretária-executiva

*Celli Rodrigues Muniz*

Secretária-administrativa

*Eveline de Castro Menezes*

Membros

*Afrânio Arley Teles Montenegro, Ana Cristina*

*Portugal Pinto de Carvalho, Christiana de*

*Fátima Bruce da Silva, Francisco Nelsieudes*

*Sombra Oliveira, José Roberto Vieira Júnior,*

*Laura Maria Bruno, Roselayne Ferro Furtado,*

*Sandra Maria Morais Rodrigues*

Revisão de texto

*José Cesamildo Cruz Magalhães*

Normalização bibliográfica

*Rita de Cassia Costa Cid*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica

*José Cesamildo Cruz Magalhães*

Imagem da capa

*Celli Rodrigues Muniz*