UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
PROGRAMA INTEGRADO EM BIOTECNOLOGIA

MARCOS MARTINS ORNELAS JUNIOR

ESTUDO DA APLICAÇÃO DO SUBSTRATO X-GAL COMO SONDA PARA IDENTIFICAÇÃO DO *OPERON-LAC*

MOGI DAS CRUZES
2025

MARCOS MARTINS ORNELAS JUNIOR

ESTUDO DA APLICAÇÃO DO SUBSTRATO X-GAL COMO SONDA PARA IDENTIFICAÇÃO DO *OPERON-LAC*

Dissertação apresentada ao Programa Integrado em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes para obtenção do título de Mestre na Área de Biotecnologia, orientado pela Profª. Drª. Tatiane Faustino de Moraes e Coorientado pelo Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Júdice. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana, Animal e Ambiental – *One Health*

MOGI DAS CRUZES

2025

FINANCIAMENTO



Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Junior Ornelas, Marcos Martins
J95e Desenvolvimento de biossensor para detecção qualitativa da bactéria *escherichia coli* em urina / Marcos Martins Ornelas Júnior. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
Orientação: Profa. Dra. Tatiane Faustino de Moraes.
Coorientação: Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Júdice.

1. Infecções urinárias 2. Escherichia coli 3. Óperon Lac 4. Técnicas Biossensoriais I. Moraes, Tatiane Faustino de II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 660.6

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às nove horas e trinta minutos do dia trinta e um de janeiro de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada: "DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO QUALITATIVA DA BACTÉRIA ESCHERICHIA COLI EM URINA", para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Marcos Martins Ornelas**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Tatiane Faustino de Moraes, e Mauricio Ferreira Marcondes Machado, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Marcelo Ferreira Marcondes Machado, da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP. Sob a presidência da primeira, como orientadora da dissertação. A sessão pública da defesa da dissertação foi aberta pela senhora presidenta da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovado (aprovado(a) /reprovado(a)) por Unanimidade (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 31 de janeiro de 2025.

Comissão Examinadora	Julgamento
Prof. Dr. Marcelo Ferreira Marcondes Machado	Aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))
Prof. Dr. Mauricio Ferreira Marcondes Machado	Aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))
Profª Drª Tatiane Faustino de Moraes	Aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))

Tel.: (11) 4798-7000
0800 19 2001
www.umc.br

ADENDO

ADENDO À ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às nove horas e trinta minutos do dia trinta e um de janeiro de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da dissertação intitulada: "DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO QUALITATIVA DA BACTÉRIA ESCHERICHIA COLI EM URINA" pelo(a) candidato(a) **Marcos Martins Ornelas,** para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Em adendo, informo que o nome do aluno está incompleto, portanto, o nome completo é: **Marcos Martins Ornelas Junior.**

Também informo que a banca sugeriu alteração no título da dissertação, que foi acatada pelo(a) candidato(a). O título correto é: "ESTUDO DA APLICAÇÃO DO SUBSTRATO X-GAL COMO SONDA PARA IDENTIFICAÇÃO DO OPERON-LAC".

Mogi das Cruzes, 02 de junho de 2025.

Profª Drª Tatiane Faustino de Moraes
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pelo amor que me inspiraram a explorar e compreender o mundo por meio da ciência.

A minha parceira de vida, Vitória Alves de Araújo, seu apoio e incentivo foram fundamentais para a construção deste trabalho. Sua crença em meu potencial fez toda a diferença.

À minha orientadora, Tatiane Faustino de Moraes, e ao meu coorientador, Wagner Alves de Souza Júdice, pela confiança no potencial deste trabalho e parceria. A orientação de vocês foi valiosa.

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.711542/2022-00.

RESUMO

As Infecções do Trato Urinário (ITU) estão entre as principais razões para a busca de atendimento médico, se caracterizando como uma condição predominantemente feminina e afetando pelo menos 50% das mulheres adultas, sendo que dessas, um quarto sofre de Infecções do Trato Urinário recorrentes (ITUr). As bactérias gram-negativas e gram-positivas são apontadas como as principais causadoras das ITUs, com destaque para a *Escherichia coli* (*E. coli*) que representa cerca de 80% dos casos. Devido aos sintomas variados, o diagnóstico da doença pode ser desafiador e demandar tempo para análises laboratoriais. Neste trabalho, abordamos o desenvolvimento de um biossensor para a detecção qualitativa da bactéria *E. coli* em amostras de urina, além de avaliar a viabilidade econômica de sua comercialização, com o objetivo de auxiliar profissionais de saúde e pacientes no diagnóstico das ITUs. No que tange ao desenvolvimento do biossensor, investigamos a interação entre o X-Gal e o sistema regulador gênico do *operon lac* em diferentes temperaturas, visando avaliar a detecção da β-Galactosidase expressa pela bactéria *E. coli*. Foram realizados testes de detecção utilizando a sonda X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-d-galactopiranosídeo) em meios com tampão de força iônica constante e em amostras de urina. Os resultados indicaram detecções positivas, evidenciadas pela coloração azul do meio, permitindo a avaliação da estabilidade e sensibilidade do mecanismo de detecção. A avaliação de viabilidade econômica foi realizada através da construção do *Business Model Canvas (BMC)*, uma ferramenta de gerenciamento estratégico que permite esboçar modelos de negócios em uma única página. Observou-se que o biossensor é uma alternativa economicamente viável para o mercado de testes diagnósticos rápidos, podendo ser direcionado para o autoteste ("*Self-test*") ou para o ponto de atendimento médico. Os resultados obtidos nestes trabalhos contribuem para a exploração de possibilidades de desenvolvimento de sensores a partir da interação da enzima β-Galactosidase obtida da *E. coli*, com a sonda X-Gal.

Palavras-chave: infecção do trato urinário; biossensor; E*scherichia coli*; β-galactosidase; business model canvas.

ABSTRACT

Urinary Tract Infections (UTIs) are one of the leading causes of medical consultations, predominantly affecting women, with at least 50% of adult women experiencing this condition. Among these, approximately one-quarter suffer from recurrent Urinary Tract Infections (rUTIs). Both gram-negative and gram-positive bacteria are identified as the main causative agents of UTIs, with *Escherichia coli* (*E. coli*) being responsible for about 80% of the cases. Due to the variety of symptoms, diagnosing UTIs can be challenging and often requires time-consuming laboratory analyses. In this study, we address the development of a biosensor for the qualitative detection of *E. coli* in urine samples, as well as the economic feasibility of commercializing such a product, aiming to assist healthcare professionals and patients in diagnosing UTIs. Regarding the biosensor development, we investigated the interaction between X-Gal and the lac operon regulatory gene system at different temperatures to assess the detection of E. coli through the expression of β-Galactosidase. Detection tests were conducted using the X-Gal probe (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranoside) in media with a constant ionic strength buffer and in urine samples. The results indicated positive detections, evidenced by the blue coloration of the medium, allowing for the evaluation of the detection mechanism's stability and sensitivity. The economic feasibility analysis was performed using the Business Model Canvas (BMC), a strategic management tool that facilitates the visualization of business models on a single page. The results demonstrated that the biosensor represents an economically viable alternative for the rapid diagnostic testing market, with potential applications for self-tests as well as medical point-of-care testing. The findings of this study contribute to exploring new possibilities for the development of sensors based on the interaction of the β-Galactosidase enzyme derived from *E. coli* with the X-Gal probe.

Keywords: urinary tract infection; biosensor; *Escherichia coli*; β-galactosidase; business model canvas.

1. INTRODUÇÃO

O mercado global de testes de diagnóstico é extenso e abrange uma variedade de exames para diferentes doenças como câncer, doenças infecciosas, doenças genéticas, entre outras.[1] Estima-se que a utilização de testes para diagnóstico médico representou aproximadamente 44 bilhões de dólares em 2023, com expectativas de crescimento contínuo devido a demanda por resultados precisos e rápidos. De acordo com o relatório da Grand View Research, a taxa de crescimento anual deste mercado será ao redor de 6,1% até 2030.[1] Especificamente o mercado global de testes para detecção das ITUs, representou US$ 8,7 bilhões em 2022 e está projetado para atingir US$ 12,5 bilhões até 2031.[2,3]

1.1 Anatomia e fisiopatologia das ITUs

O sistema urinário é considerado um sistema oco composto por uretra, bexiga urinária, ureter e rim. Em termos de importância, os rins são os órgãos principais pois atuam como filtros naturais, limpando os detritos indesejáveis solúveis em água e reabsorvendo componentes como água, glicose e aminoácidos. Através do ureter, a urina é direcionada para a bexigada, que se caracteriza por ser uma estrutura muscular e flexível. O passo seguinte do fluxo de fluidos urinários é a excreção que ocorre pela uretra. O sistema urinário apresenta uma robusta defesa contra patógenos no ambiente em que está inserido. No entanto, durante a excreção do fluido, há uma janela de oportunidade para a invasão através da uretra, o que pode resultar na contaminação da bexiga e, em casos mais graves, afetar os rins.[4,5]

A Infecção do Trato Urinário (ITU) é uma condição comum, geralmente causada por bactérias, sendo a *Escherichia coli* (*E. coli*) responsável por até 80% dos casos.

A escassez de dados sobre a incidência das Infecções do Trato Urinário (ITUs) ao longo dos anos é uma preocupação reconhecida. No entanto, em virtude do impacto significativo dessa condição na saúde pública, o Institute of Health Metrics and Evaluation (IHME) realizou um estudo epidemiológico global sistemático denominado Global Burden of Disease (GBD). Este estudo empregou um modelo de meta-regressão bayesiana, o DisMod-MR, que quantifica a incidência, mortalidade, incapacidade e 87 fatores de risco associados a 369 doenças, considerando variáveis como sexo, idade, localização e ano, abrangendo 204 países e territórios entre 1990

e 2019. Os resultados revelaram um aumento substancial no número total de incidentes, na taxa de mortalidade e nos Anos de Vida Ajustados por Incapacidade (DALY) relacionados às ITUs, independentemente do gênero, localização geográfica ou faixa etária. Especificamente, o número total de casos de ITU cresceu 60,40%, passando de 252,25 milhões em 1990 para 404,61 milhões em 2019. Esse aumento é particularmente pronunciado em países em desenvolvimento, como a Índia, onde as taxas de incidência mais que dobraram no mesmo período, em grande parte devido à sobrecarga do sistema de saúde e às condições precárias de higiene.[6]

Fatores como idade avançada, gravidez e presença de anomalias anatômicas, má higienização das partes intimas e a falta de acesso a água potável contribuem para o aumento do risco de ITU. Devido a uretra feminina ser mais curta que a masculina e estar mais próxima do ânus, a disseminação da *E. coli* no sistema urinário feminino é facilitada aumentando a insciência de episódios de ITUs, no entanto fatores como flutuações hormonais também influência na infecção.[7]

As ITUs são classificadas em dois tipos dependendo do local anatômico no qual se desenvolve: ITU superior (pielonefrite) e ITU inferior (cistite). A ITU superior se caracteriza por se desenvolver nos rins ou ureter enquanto a ITU inferior se desenvolve na bexiga ou uretra. Outra condição comum da doença é a Infecção do Trato Urinário recorrente (ITUr), que é caracterizada pela ocorrência de duas manifestações comprovadas da doença no intervalo de 6 meses e acomete cerca de 50% das mulheres que já apresentaram ITU ao longo da vida. Os sintomas das ITUs incluem dor ao urinar, frequência urinária aumentada, urina turva e com odor forte. O tratamento geralmente envolve o uso de antibióticos como nitrofurantoína, trimetoprima/sulfametoxazol e fosfomicina e são selecionados com base no tipo de bactéria e na gravidade da infecção.[8]

A relação entre E. coli e ITU está bem estabelecida, presume-se que quando a bactéria do trato intestinal invade a região periuretral ocorre a migração para o trato urinário. O deslocamento é facilitado pela presença dos flagelos e pili que usam adenosinas para aderir a parede celular da bexiga. Embora seja um conceito amplamente adotado, uma melhor compreensão dessa interação bacteriana é crucial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes para ITU. [9]

O diagnóstico das ITUs envolve a consideração de diversos fatores, incluindo exames clínicos e o histórico médico do paciente. Como ilustrado na Figura 1, certos fatores de risco são reconhecidos como componentes essenciais que influenciam a escolha de tratamentos preventivos, visando reduzir a probabilidade de recorrência. É fundamental compreender profundamente os fatores de risco associados às ITUs recorrentes para otimizar a abordagem terapêutica.[10]

Figura 1. Fatores de risco das ITUs

S. No	Types	Risk factors													Reference
		Gender	Age	Diabetes	Menopause	Catheterization/Foreign Body	Frequent Sexual Intercourse	Use of Contraception	Family History	Anatomic Abnormalities	Antimicrobials/Antibiotic Use	Hormonal Changes	Transplantation	Pregnancy	
1	Cystitis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(Schmiemann et al., 2010; Yoon et al., 2013)
2	Pyelonephritis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(Scholes et al., 2005; Bethel, 2012)

Fonte: Swathi Sujith, Adline Princy Solomon, Bosco J, 2024.

Os métodos e práticas médicas para o manejo de doenças patológicas são determinados não apenas pelo tempo necessário para o diagnóstico, mas também pelo custo e pela precisão dos métodos utilizados. Pequenos atrasos no diagnóstico podem impactar significativamente a saúde e o bem-estar do paciente, tornando essencial a realização de avaliações rápidas e precisas.[11] Portanto, um teste ideal deve ser acessível, ágil e confiável, especialmente para o diagnóstico de indivíduos com alto risco. Contudo, o diagnóstico de infecções do trato urinário (ITUs) apresenta desafios, uma vez que os sinais e sintomas podem se sobrepor aos fatores de risco associados.[12]

A urinálise com fita reagente é um exame inicial para detectar a presença de esterase leucocitária (LE), nitrito e hemácias na urina, com base nos sintomas do paciente. A LE, elevada durante infecções do trato urinário (ITU), é detectada quando há de 5 a 15 leucócitos por campo de alta potência. O LE reage na fita, tornando-a azul.[12] A presença de nitrito indica a redução de nitratos por bactérias, sendo positivo com uma concentração de 0,1 g/ml. A hematúria também é sinalizada por uma mudança de cor

na tira, mas requer confirmação microscópica. O estudo de Mambatta et al. avaliou a sensibilidade do teste com o Multistix 10 SG, encontrando sensibilidades de 23,31% para nitrito, 48,5% para LE e 63,94% para hemácias. O estudo concluiu que, devido à baixa sensibilidade dos testes, uma urocultura é necessária para pacientes suspeitos de ITUs.[12] A interpretação dos resultados pode ser influenciada por várias condições, sendo difícil a obtenção de uma conclusão.

Métodos como Exames microscópicos, urocultura, estudo de imagem e métodos diagnósticos moleculares apresentam precisão acima de 80%, no entanto, apresentam também vulnerabilidades e demandam recursos laboratoriais e impactam no tempo de diagnóstico, conforme apresentado na figura 2.[10]

Figura 2. Métodos de detecção da ITU, prós e contras.

Sl.No.	Method Of Detection	Probable Biomarker	Demerits of the Detection Method	References
1	Dip stick analysis	Nitrate	False negative results due to • diluted sample • presence of *Streptococcus* spp.	(Chu and Lowder, 2018)
		Leukocyte esterase	False negative results due to • Contamination of Urine sample • Consumption of Antibiotics • technical error	(Wilson and Gaido, 2004; Mambatta et al., 2015)
		RBCs	false-positive result due to • hemoglobinuria, • myoglobinuria, • menstrual blood, • concentrated urine, • vigorous exercise • presence of oxidising agents like hypochlorite and povidone, • exposure to air • the pH of the urine is less than 5.1	(Bacârea et al., 2021)
2	Microscopic Examination	Bacteria	Outcome affected by • proper patient guidance, • appropriate urine collection and handling, • adequate microscopic equipment	(Wilson and Gaido, 2004)
3	Urine Culture	Bacteria	• Contamination of urine sample, • Handling of Sample	(Wilson and Gaido, 2004)
4	Imaging Techniques		Lack of high quality images due to • patient's characteristics, • morbid obesity, • the presence of gas in the intestine, • lesions, and abnormalities	(Bjerklund Johansen, 2004; Riccabona, 2016)
5	PCR	Bacteria	• Preparation of Primers • Expensive • Skilled Personnel required	Yang and Rothman, 2004)
6	MALDI -TOF	Bacteria	Poor species discrimination due to • inherent similarities between organisms • misidentification due to a small number of spectra in the database	(Rychert, 2019)

Fonte: Swathi Sujith, Adline Princy Solomon, Bosco J, 2024.

1.2 *Escherichia coli*

A E. *coli* é uma bactéria gram-negativa encontrada no trato gastrointestinal de humanos saudáveis.[13] Embora muitas cepas sejam inofensivas, algumas podem

causar doenças graves como meningite neonatal, gastroenterite, infecções do trato urinário, síndrome hemolítico-urêmica, peritonite, pneumonia, mastite e septicemia.[14]

A *E. coli* desempenha um papel significativo tanto na pesquisa científica quanto na saúde pública. Como organismo modelo, a *E. coli* tem sido utilizada em diferentes estudos, a exemplo disso pode-se citar estudos para utilização de cepas de *E. coli* Nissle 1917 geneticamente tratadas para administração de modalidades terapêuticas em locais de doenças. Estes avanços científicos são possíveis devido a versatilidade genética e facilidade de manipulação da *E. coli* e contribuem para compreensão da biologia molecular, proporcionando alternativas para o tratamento de doenças infecciosas e distúrbios metabólitos.8 No entanto, seu potencial patogênico a torna uma preocupação em saúde pública, especialmente em áreas com práticas inadequadas de saneamento e higiene.[15]

A *E. coli* é comumente encontrada em humano adultos saudáveis, especificamente no intestino grosso onde existe como um constituinte normal da microbiota, exercendo função importante na prevenção da colonização de espécies bacterianas prejudiciais.[16]

Embora a maioria das cepas de *E. coli* sejam inofensivas e desempenhem diversas funções importantes como auxiliar na digestão dos alimentos, no processamento de resíduos fisiológicos e na produção de vitamina K, existem cepas patogênicas como o clone ST1319 que expressam características de virulência e podem causar uma ampla variedade de doenças, especialmente ITUs. Essas doenças incluem infecções diarreicas, infecções do trato urinário, bacteremia e sepse. [11,12] Estas cepas patogênicas de *E. coli* como aquelas que causam infecções do trato urinário, doenças gastrointestinais e outras infecções extraintestinais, destacam a dupla natureza dessa bactéria. Em regiões com baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), a contaminação por *E. coli* está frequentemente associada à infraestrutura inadequada de saneamento, levando a infecções recorrentes e surtos.[17,18]

Além disso, o uso irregular de antibióticos e a plasticidade genética da *E. coli* contribui para o surgimento da resistência microbiana. Conforme descrito por Safitri et al. (2024), a resistência bacteriana é impulsionada por diversos mecanismos e fatores como a inativação enzimática, uma vez que a *E. coli* produz enzimas β-lactamases

que desativam antibióticos, particurlamente β-lactamas e o aumento da atividade das bombas de efluxo permitindo que a bactéria expulse antibióticos, consequentemente, reduzindo suas concentrações intracelulares.[14] Por tanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) enfatiza que a resistência da *E. coli* a antibióticos representa um desafio significativo para o tratamento de ITUs e destaca a necessidade de monitoramento rigoroso e a adoção de medidas preventivas.[19,20,21,22]

1.3 β-Galactosidase

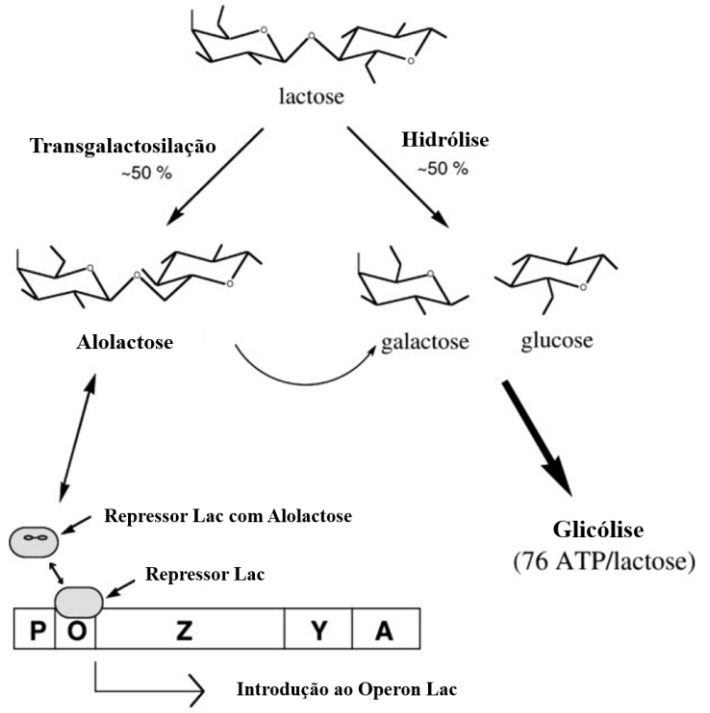
A β-Galactosidase é uma enzima crucial presente em várias espécies de fungos e bactérias, incluindo *E. coli*. Em bactérias, sua principal função é a hidrólise da lactose em glicose e galactose. Estruturalmente, essa enzima é composta por quatro subunidades, cada uma com um sítio ativo responsável pela clivagem do substrato. Na *E. coli*, a expressão da β-Galactosidase é controlada pelo operon lacZ, que regula os genes envolvidos no metabolismo da lactose. Quando a lactose está presente, a enzima é produzida para realizar sua clivagem. A interação entre a β-Galactosidase e o operon lacZ tem sido amplamente estudada em pesquisas moleculares.[23,24]

A estrutura da β-Galactosidase é complexa e apresenta um formato composto de quatro subunidades idênticas. Cada uma de suas unidades apresentam dobras específicas que propicia uma conformação tridimensional essencial para atividade enzimática. O sítio ativo da enzima, onde ocorre a ligação do substrato e a catálise tem sua especificidade determinada pelo arranjo de resíduos de seus aminoácidos, permitindo que a molécula interaja precisamente com seu substrato. Quando a enzima se liga a lactose há uma mudança conformacional na molécula, otimizando o alinhamento de resíduos críticos dentro do sítio ativo. Esse alinhamento é fundamental para estabilizar o estado de transição do substrato, reduzindo a energia de ativação necessária para reação. Neste processo, os resíduos de aminoácidos são essenciais, especialmente os resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico que são frequentemente encontrados no sítio ativo e desempenham um papel significativo na transferência de prótons, como doadores e aceptores de prótons, facilitando a clivagem e a subsequente formação de novas ligações.[25]

A β-Galactosidase apresenta atividade enzimática conforme esquema apresentado na figura 3, onde inicialmente a enzima pode hidrolisar o dissacarídeo

lactose formando glicose e galactose, no entanto, a enzima também pode catalisar a transgalactosilação da lactose para alolactose e clivá-la gerando seus monossacarídeos. A alolactose se liga ao repressor lacZ e gera um sistema de regulador de β-Galactosidase na célula.

Figura 3. Representação esquemática da atividade enzimática da β-Galactosidase na célula de *E. coli*.

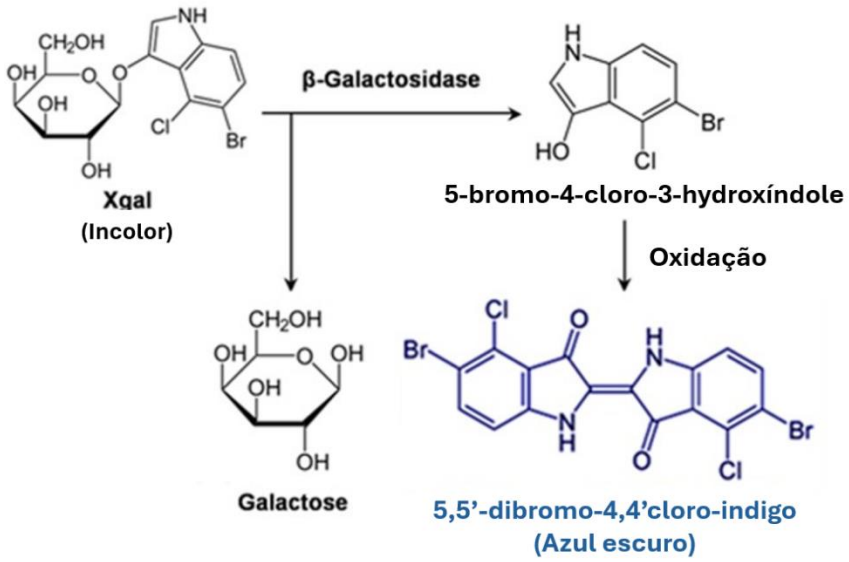


Legenda: Esquema geral da atividade enzimática da β-Galactosidase no qual a enzima pode clivar a lactose para gerar glicose e galactose, mas também pode transgalactosilar o substrato para formar alolactose e pode hidrolisar a alolactose

Fonte: Adaptada de Juers DH et al; 2012.

Além da importância em processos metabólicos, a β-Galactosidase também é utilizada como marcador em técnicas de biologia molecular. Um exemplo do seu uso como marcador é o teste de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil-β- d -galactopiranosídeo), uma sonda cromogênica que é hidrolisada pela enzima resultando na formação do produto 5-bromo-4-cloro-3-hidroxíndole que dimeriza e oxida espontaneamente dando origem a coloração azulada no meio, conforme apresentado na figura 4.

Figura 4. Reação de dimerização do X-Gal.



Fonte: Adaptado de Cai X, Li, Krumholz A, Guo Z et al.

Em seu trabalho, Trimborn et al (2022), utiliza a interação entre X-Gal e β-Galactosidase para em fase sólida para avaliar a atividade da enzima e medir a força da interação proteína-proteína em células de levedura usando uma configuração experimental simples e de baixo custo.[26] A β-Galactosidase também pode ser utilizada como biomarcador em várias aplicações, tais como ensaios imunoenzimáticos (ELISAs), estudos de expressão gênica, classificação de tuberculose e hibridização in situ. Conforme sugerido por Li L et al (2021), anormalidades da β-Galactosidase estão ligadas a diversas doenças, como deposição de gangliosídeos, câncer de ovário primário e senescência celular, por isso a detecção eficiente da enzima é fundamental para diagnósticos assertivos.[27]

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a detecção da enzima β-Galactosidase através da reação com X-Gal em meio celular.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de reação: Ajustar parâmetros como concentração de enzima, pH, temperatura e tempo de reação, visando maximizar a sensibilidade e especificidade da metodologia.
- Avaliar a influência de inibidores na reação: Investigar os efeitos de potenciais inibidores presentes em amostras de urina, sobre a atividade da enzima β-Galactosidase e desenvolver estratégias para mitigar seu impacto.
- Refinar a metodologia de quantificação celular: Aperfeiçoar os métodos de quantificação celular e correlacionar os resultados com a contagens de células.

3. ESCOPO

O escopo do trabalho é constituído por dois artigos de pesquisa complementares realizados em conjunto, com o objetivo de abordar o desenvolvimento e a viabilidade econômica de um biossensor para detecção de *E. coli* na urina.

O primeiro artigo trata da avaliação da viabilidade comercial com base nas investigações reportada no segundo artigo, no qual buscou entender a aplicação do mecanismo de reação entre a β-Galactosidase e o X-Gal na detecção da *E. coli*. Esta avaliação utiliza a metodologia *Lean Business Model Canvas* para analisar a viabilidade técnica de implementação no mercado de produtos médicos, segmentos de clientes, propostas de valor e fluxos de receita. Os resultados deste estudo foram publicados na Revista Científica UMC, detalhando o cenário do mercado de testes de detecção de doenças e insights estratégicos necessários para transicionar o biossensor do desenvolvimento para a comercialização.

O segundo artigo apresenta os resultados da experimentação em laboratório, abordando desafios e obtendo aprendizados fundamentais sobre o funcionamento do mecanismo de reação β-Galactosidase e X-Gal para detecção da *E. coli*. Os resultados, desafios e os principais aprendizados deste estudo estão sendo compilados para publicação na Revista de Ciências Médicas e Biológicas, com o objetivo de contribuir com conhecimentos no desenvolvimento de biossensores para diagnóstico de infecções do trato urinário.

Ambos os trabalhos estão interligados, visando preencher a lacuna entre o desenvolvimento de biossensores e a viabilidade comercial.

4. CAPÍTULOS

4.1 ARTIGO: APLICAÇÃO DA METODOLOGIA *LEAN BUSINESS MODEL CANVAS* NO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR EM CELULOSE PARA DETECÇÃO QUALITATIVA DA INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO (ITU)

Nome(s) completo(s) do(s) autor(es): Marcos Martins Ornelas Junior; Tatiane Faustino de Moraes; Wagner Alves de Souza Júdice; Daniela Leite Jabes.

Artigo publicado no periódico: Revista Científica UMC, v. 8 n. 3 (Dez 2023) - Especial I Summit UMC

RESUMO EXPANDIDO ESTRUTURADO

APLICAÇÃO DA METODOLOGIA *LEAN BUSINESS MODEL CANVAS* NO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR EM CELULOSE PARA DETECÇÃO QUALITATIVA DA INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO (ITU)

Application of the lean business model canvas methodology in the development of a cellulose biosensor for qualitative detection of Urinary Tract Infection (UTI)

Aplicación de la metodología lean business model canvas en el desarrollo de un biosensor de celulosa para la detección cualitativa de Infección del Tracto Urinario (ITU)

Marcos Martins Ornelas Junior[1]*, Deorlan dos Santos Barbosa[1], Daniela Leite Jabes[1], Wagner Alves de Souza Júdice[1], Tatiane Faustino de Moraes[1] .

INTRODUÇÃO

O Brasil conta com mais de 12,7 mil *startups* espalhadas por todo o país, segundo a Associação Brasileira de *Startups*, sendo que "*startup*" é definida como modelos de negócios nativos do mercado digital e que ainda não contam com uma validação. Nos tempos modernos, a criação e consolidação de um negócio está cada vez mais ágil e necessita de ferramentas que possam nortear as decisões da organização[1].

Osterwalder [2] buscando desenhar um método representativo de criação de um modelo de negócio, propôs o *Business Model Canvas*, uma ferramenta visual que permite gerar reflexões e discussões rápidas ainda no início de um negócio. Nesse sentido, sua aplicação é fundamental para *startups*, já

[1] Universidade de Mogi das Cruzes (UMC). 0009-0008-9128-629X; ;0000-0002-1608-9105; 0000-0001-7297-0784; 0009-0009-85872791.Mogi das Cruzes. *E-mail: marcos.ornelasjr@outlook.com

SUBMETIDO EM: 11/2023 | ACEITO EM: 11/2023 | PUBLICADO EM: 12/2023

que permite uma validação prévia da ideia a fim de considerar o problema a ser resolvido, os recursos necessários e o mercado no qual o produto será inserido.

As Infecções do Trato Urinário (ITUs) são uma das doenças bacteriológicas mais comuns do ciclo de vida humano, atingindo milhões de pessoas anualmente em todo o mundo e representam um impacto econômico significativo, gastos diretamente com assistência à saúde. As ITUs podem atingir tanto mulheres quanto homens, porém 50% das mulheres adultas terão mais de um episódio da doença durante a vida e cerca de 1/4 das mulheres com cistite aguda apresentam infecções urinárias recorrentes, caracterizando-se como uma doença tradicionalmente feminina [3].

O diagnóstico da ITU é difícil de ser realizado por necessitar de análises clínicas com elevado tempo de execução, sendo que o tratamento sem os devidos resultados das análises pode levar a superdiagnosticação ou subdiagnosticação da doença[4]. Há um grande e contínuo Estudo de Prevalência Global de Infecções em Urologia (estudo GPIU) que avaliou entre 2003 e 2010, 19.765 pacientes, dos quais 9,4% foram diagnosticadas como UTIs associadas aos cuidados de saúde (HAUTI), sendo 70,4% pacientes do sexo feminino. O grupo tinha idade média de 59 anos e 3/4 das ITUs foram diagnosticadas pelo método tradicional de urocultura [5].

Atualmente, existem alguns recursos para detecção da ITU e a contagem de glóbulos brancos pode ser indicativo da presença da doença. Assim, contagens acima de 10 glóbulos brancos por microlitro na urina sugerem ITU. Já o teste em fitas esterase leucocitária detecta a acidez (pH) da urina por medida pela tira reagente e tem especificidade de cerca de 98% e sensibilidade de até 96%. Outro teste que pode ser aplicado para a detecção das ITUs, o teste de nitrito, tem a premissa de detecção de membros da família *Enterobacteriaceae*, comumente associada a essa patologia e apresenta como desvantagem a possibilidade de resultado falso negativo com menores números de bactérias (<10.000 UFC/mL) e microrganismos não produtores de nitrito[6].

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é classificada como uma Enterobacteriaceae, Gram-Negativa amplamente estudada. A *E. Coli* regula a expressão de β-Galactosidase de acordo com a concentração de lactose disponível no meio, quando necessário expressa a enzima β-Galactosidase para a clivagens da lactose, porém a enzima também é amplamente conhecida pela habilidade de degradar o X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo), um composto incolor que quando clivado pela enzima tem como produto da reação o 5-bromo-4-cloro-3-indoxil que em contato com ar é oxidado, formando o 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo com coloração azulada[6].

Considerando a relevância e incidência da ITUs, propõe-se com o presente trabalho somar uma alternativa para detecção da *E. Coli* através de um teste rápido e seletivo no mercado e, assim, viabilizar a solução através da aplicação do Lean Business Model Canva.

OBJETIVO

Aplicar a ferramenta *Lean Canvas* para modelagem de negócio direcionado a detecção da *Escherichia coli* na urina.

MATERIAL E MÉTODOS

A partir da aplicação da ferramenta de modelagem de negócios *Lean Canvas* será desenvolvido um painel que permitirá a reflexão e o desenvolvimento de uma solução inovadora para a detecção da bactéria *E. coli* em amostras de urina.

A elaboração do *Canvas*, ou quadro de modelo de negócio, é uma ferramenta concebida por Osterwalder [2] para facilitar o desenvolvimento de um modelo de negócio de maneira coletiva que consiste num quadro seccionado em nove partes, e cada uma delas diz respeito a um componente essencial da estrutura do modelo de negócio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho realizado por Barquet[7] propõe um *framework* para apoiar a adoção de sistemas produto-serviço, também conhecido pela sigla PSS (*Product–Service Systems*), empregando o conceito de modelo de negócio. A ferramenta conceitual de modelos de negócios *Canvas* foi utilizada para analisar empresas em termos de requisitos PSS, e definir ações para sua implementação.

O objetivo é preenchê-lo, por meio de anotações breves em *post-its*, de forma que todos os participantes contribuam com ideias para a definição desses componentes. Os *post-its* são um elemento importante nesse tipo de atividade, pois permitem o reposicionamento das ideias conforme surjam novas contribuições e esclarecimentos. O modelo visa garantir a sustentabilidade financeira e operacional dessas redes. O modelo do *Canvas* foi utilizado para analisar e mapear as partes interessadas, e para identificar as oportunidades disponíveis e os riscos envolvidos, a fim de propor um modelo de negócio inovador.

Nesse cenário, a aplicação da metodologia *Lean Canvas* possibilitou, em um primeiro momento, a reflexão sobre o tipo de negócio que estava sendo planejado e quais seriam as ações necessárias para iniciá-lo, considerando cada campo do *Canvas* (Problema, Solução, Métricas Chaves, Proposta Única de Valor, Vantagem Injusta, Canais, Segmentos de Clientes, Estrutura de Custos e Fontes de Renda) detalhados a seguir.

Problema: todos os anos milhões de pessoas apresentam diferentes sintomas causados pelas ITUs, uma doença que pode se apresentar de diversas formas dependendo de fatores como: a situação clínica do paciente, tipo de bactéria causadora da infecção e recorrência da doença. Por apresentar diversos sintomas, é necessário a confirmação do diagnóstico via exames laboratoriais, porém o tratamento é iniciado previamente com antibióticos que, caso não seja confirmada a suspeita, podem levar ao aumento da resistência bacteriana.

Solução: desenvolver um teste para detecção da *E. Coli* (principal causadora das UTIs) que seja rápido, preciso, amigável ao paciente e sem a necessidade de prescrição médica.

Métricas Chaves: os principais parâmetros de desempenho do produto no mercado contam com a comprovação da efetividade do produto na detecção da bactéria antes do lançamento e aceitabilidade dos consumidores após o lançamento.

Proposta Única de Valor: o dispositivo se destaca dos demais no mercado pelo custo *versus* especificidade na detecção das ITUs.

Vantagem Injusta: o dispositivo conta com tecnologia bioquímica com precisão elevada para detecção da *E. Coli* e apresenta baixo custo.

Canais: os canais de vendas vislumbrados para o produto é o farmacêutico e e-commerce via site do fabricante.

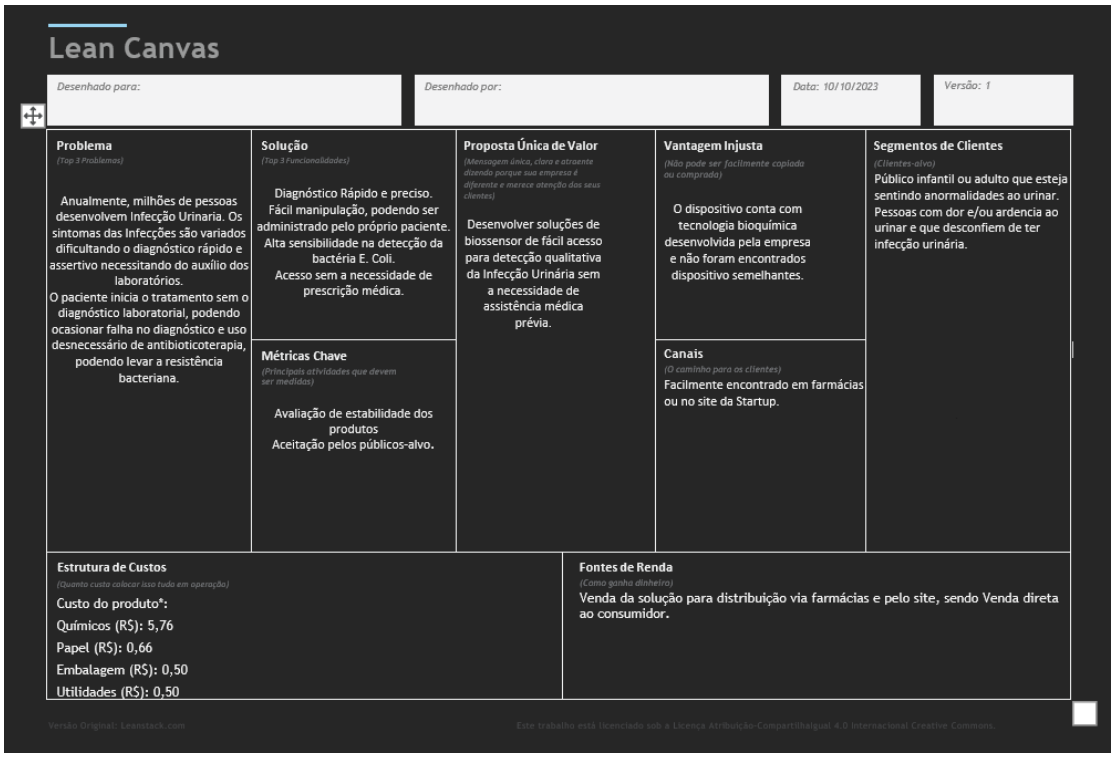
Seguimentos de Clientes: o produto será direcionado para crianças, adultos e idosos que apresentam incômodos ao urinar.

Fontes de Renda: as fontes de renda pretendidas com o produto são através da venda direta via e-commerce ou venda indireta via farmacêuticas.

Estrutura de custos: em um primeiro momento, a estrutura de custo está diretamente associada com o desenvolvimento do *MVP (Minimum Viable Product*), sendo estimado cerca de R$ 70.000,00 para pesquisa e análises laboratoriais e R$ 30.000,00 considerando 1 ano de trabalho com a necessidade de alocação de novas pessoas no projeto.

Dessa forma, os primeiros *insights* foram transferidos para a primeira versão do *Lean Canvas,* apresentado na figura 1.

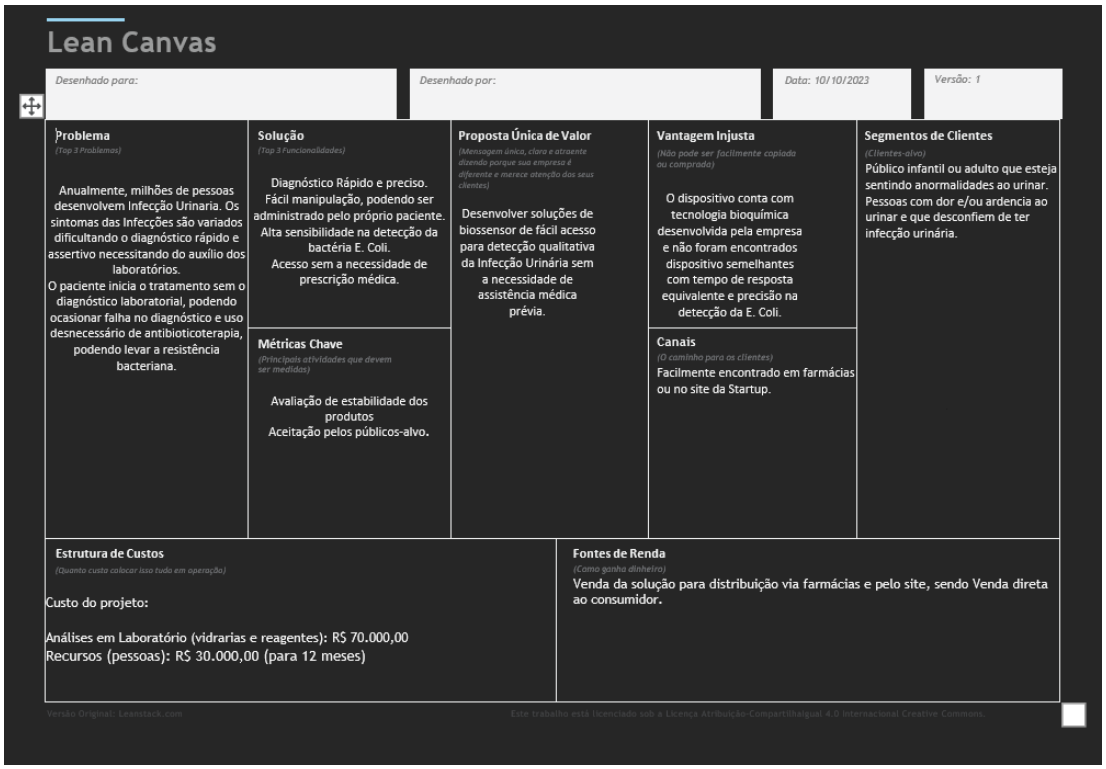
Figura 1. Primeira versão do *Lean Canvas*.



Fonte: Os autores.

Em um segundo momento, após a apresentação da versão inicial para um grupo de autores na área do empreendedorismo que fizeram o papel de mentores, houve a possibilidade de coletar *feedbacks* importantes para o desenvolvimento do trabalho. A partir desse primeiro contato com os mentores, colocou-se em *check* o *design* do produto, a aceitabilidade do cliente, a aplicação inicialmente planejada e a alocação de recursos necessários para o primeiro *MVP (Minimum Viable Product*). Portanto, foi necessário ajustar alguns pontos como os custos envolvidos no desenho do MVP, as vantagens do produto e o mercado onde estávamos prestes a ingressar. Dessa forma, a apresentação resultou no amadurecimento da ideia e nos ajustes do nosso modelo *Canva* apresentado na figura 2.

Figura 2. *Lean Canvas* ajustado após feedbacks obtidos na mentoria.



Fonte: Os autores

Após a elaboração da versão final do *Canvas*, foi possível obter maiores esclarecimentos acerca das possibilidades e rotas que poderíamos seguir com o projeto e a futura apresentação do *pitch* ajustando principalmente as perspectivas frente a concorrência e os custos esperados para o *MVP*, já considerando um produto com *design* ajustado para o mercado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe uma demanda crescente por produtos com diagnóstico clínico assertivo e de baixo custo, considerando a biotecnologia como base para o desenvolvimento destas soluções. Porém, para o ganho de relevância no mercado, as soluções devem estar alinhadas com os recursos e metodologias administrativas adequadas para entender e atacar o real problema do consumidor. Dessa forma, a metodologia *Lean Canvas* teve papel fundamental no desenvolvimento do projeto de modelo de negócio e, assim, foi possível estruturar uma visão estratégica da solução com foco na satisfação do cliente e no melhor posicionamento do produto no mercado.

REFERÊNCIAS

1. SANTANA, W. Brasil tem 12,7 mil startups; entenda quando empresas perdem esse status. Disponível em: <https://www.infomoney.com.br/negocios/brasil-tem-127-mil-startups-entenda-quando-empresas-perdem-esse-status/>. Acesso em: 6 nov. 2023.
2. OSTERWALDER, A. Business Model Generation - inovação em modelos de negócios: um manual para visionários, inovadores e revolucionários. Rio de Janeiro: Alta Books, 2011.
3. Sabih A, Leslie SW. Complicated Urinary Tract Infections. [Updated 2023 Jan 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436013/>
4. Yang X, Chen H, Zheng Y, Qu S, Wang H and Yi F (2022) Disease burden and long-term trends of urinary tract infections: A worldwide report. Front. Public Health 10:888205. doi: 10.3389/fpubh.2022.888205.
5. Santos, Maria José Amador, Porcy, Claude, Menezes, Rubens Alex de Oliveira. Etiologia e perfil de resistência bacteriana em uroculturas de pacientes atendidos em um hospital público de Macapá-Amapá, Brasil. Um estudo transversal. Laboratório de Microbiologia da Faculdade Estácio de Macapá (AP). Brasil, 2019.
6. BARQUET, A. P. B. et al. Employing the business model concept to support the adoption of product service systems (PSS). Industrial Marketing Management, Elsevier Inc., v. 42, n. 5, p. 693–704, 2013. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0019850113000710>. Acesso em: 02 nov. 2023.
7. Najar MS, Saldanha CL, Banday KA. Approach to urinary tract infections. Indian J Nephrol. 2009 Oct;19(4):129-39. doi: 10.4103/0971-4065.59333. PMID: 20535247; PMCID: PMC2875701.
8. Business Models. In Cloud Computing and Social Networking (ICCCSN), International Conference p. 26-27, abr 2012 Bandung, West Java. Disponível em: < http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=6215726> Acesso em: 02 nov. 2023.
9. Implen GmbH. OD600 DiluPhotometer: Cell Density, Bacterial Growth, Yeast Growth. Disponível em: <https://www.implen.de/od600diluphotometer/od600/#:~:text=Expected%20OD%20600%20is%20determined,coli>.
10. https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2010.00022/full

4.2 ARTIGO: DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO QUALITATIVA DA *BACTÉRIA ESCHERICHIA COLI* EM URINA

Nome(s) completo(s) do(s) autor(es): Marcos Martins Ornelas Junior; Wagner Alves de Souza Júdice; Tatiane Faustino de Moraes.

Artigo para submissão no periódico: Revista de Ciências Médicas e Biológicas

RESUMO

As Infecções do Trato Urinário (ITU) são uma das principais causas de consultas médicas, afetando predominantemente as mulheres, onde cerca de metade sofre desse problema e um quarto delas com infecções recorrentes (ITUr). A etiologia dessas infecções pode ser atribuída a uma variedade de bactérias, sendo a *Escherichia coli* responsável por aproximadamente 80% dos casos de ITU.

O diagnóstico das ITUs pode ser realizado por diferentes métodos, incluindo contagem de leucócitos na urina, teste de nitrito e cultura de urina. Neste estudo, investigou-se a eficácia de uma nova abordagem colorimétrica para detectar a presença de *Escherichia coli* (*E. coli*) na urina, utilizando a enzima β-galactosidase e o X-Gal como sonda. Os resultados indicaram que houve síntese da enzima pela *E. coli* e a avaliação foi realizada através da detecção visual de coloração azulada após 20 minutos de teste, foi utilizado meio composto por tampão de força iônica constante e os resultados contaram com confirmação por espectrofotometria. A atividade ótima da enzima se deu em pH 6,5, com estabilidade similar em urina e tampão a 25ºC. Amostras estudadas em urina foram submetidas a reação com X-Gal por 20 minutos a 25ºC e apresentaram resultados de absorbância 32,7% menores em comparação com as amostras estudadas em tampão. Observou-se que a 60ºC houve instabilidades na atividade enzimática, especialmente em amostras com urina. Avaliações com células não lisadas mostraram detecção eficaz após 48 horas de reação, demonstrando a necessidade de explorar alternativas para uma lise química mais rápida das células. Foram realizados testes exploratórios em meios compostos por celulose fluff e polímero superabsorvente (poliacrilato de sódio), a fim de simular a composição de fraldas e absorventes, obteve-se resultados positivos de detecção

apresentando coloração azulada no meio. Os resultados apontam ajustes importantes de metodologia para o aprofundamento do desenvolvimento de um sensor funcional.

Palavras-chave: Infecção do Trato Urinário, *Escherichia coli*, β-Galactosidase.

ABSTRACT

Urinary Tract Infections (UTIs) are one of the leading causes of medical consultations, predominantly affecting women, with approximately half suffering from this issue and one-quarter experiencing recurrent infections (rUTIs). The etiology of these infections can be attributed to a variety of bacteria, with Escherichia coli accounting for about 80% of UTI cases. UTI diagnosis can be performed using different methods, including leukocyte count in urine, nitrite testing, and urine culture. In this study, we investigated the effectiveness of a new colorimetric approach to detect the presence of *Escherichia coli* (*E. coli*) in urine, utilizing the enzyme β-galactosidase and X-Gal as a probe. The results indicated that the enzyme was synthesized by *E. coli*, and the assessment was conducted through the visual detection of a bluish coloration after 20 minutes of testing, using a medium composed of a constant ionic strength buffer, with results confirmed by spectrophotometry. The optimal enzyme activity occurred at a pH of 6.5, with similar stability in urine and buffer at 25ºC. Urine samples reacted with X-Gal for 20 minutes at 25ºC showed absorbance results that were 32.7% lower compared to samples studied in buffer. It was noted that at 60ºC, there were instabilities in enzymatic activity, especially in urine samples. Assessments with non-lysed cells showed effective detection after 48 hours of reaction, demonstrating the need to explore alternatives for a faster chemical lysis of the cells. Exploratory tests were conducted using media composed of fluff cellulose and superabsorbent polymer (sodium polyacrylate) to simulate the composition of diapers and sanitary pads, yielding positive detection results with a bluish coloration in the medium. The results indicate important methodological adjustments for the further development of a functional sensor.

Keywords: Urinary Tract Infection, *Escherichia coli*, β-Galactosidase.

1. INTRODUÇÃO

As Infecções do Trato Urinário (ITUs) são a segunda doença infecciosa mais comum em todo mundo, afetando mais de 150 milhões de pessoas anualmente, por isso têm se tornado uma preocupação crescente na saúde pública, especialmente devido à alta prevalência entre as mulheres. Estudos indicam que pelo menos 60% das mulheres irão apresentar ITU ao menos uma vez na vida e entre 30 e 40% apresentarão Infecção do Trato Urinário recorrente (ITUr).[1] No entanto, apenas 1 em cada 10 homens terá ITU. As mulheres são particularmente suscetíveis a esta infecção devido a fatores anatômicos, aumentando a incidência com a idade especialmente em mulheres com mais de 65 anos.[2]

A bactéria gram-negativa *Escherichia coli (E. coli)* é reconhecida como o principal agente etiológico das ITUs, responsável por mais de 80% dos casos de infecções. É importante ressaltar a complexidade das manifestações clínicas das ITUs, que incluem sintomas como disúria e febre, além disso, a *E. coli* uropatogênica tem a capacidade de colonizar reservatórios fora da bexiga. Essa habilidade de persistir em tecidos epiteliais da bexiga, formando reservatórios intracelulares quiescentes, contribui para a recorrência das infecções, complicando ainda mais o manejo clínico das ITUs.[3]

Estudos mais recente reforçam a relevância do diagnóstico precoce e preciso das ITUs, abordando as limitações dos métodos convencionais de detecção de *E. coli* e de tratamentos para a doença. A pesquisa realizada por Alghoraibi (2023), com 250 pacientes com um único episódio de ITU e 227 pacientes com episódios recorrentes, ressaltou que 55% dos pacientes com ITUr monitorados foram tratados com antibióticos profiláticos, indicando maior recorrência em terapias empíricas. A pesquisa enfatiza a importância de monitorar as características de resistência dos patógenos associados às ITUs e a falta de uso de tratamentos alternativos para doença, uma vez que a resistência microbiana pode tornar essas infecções ainda mais desafiadoras no futuro.[4]

Os estudos evidenciam a complexidade e a gravidade das ITUs causadas por *E. coli*, principalmente em locais carentes de acesso a saúde, além de destacar a necessidade urgente de inovação nas estratégias de diagnóstico e tratamento para melhorar os resultados clínicos e reduzir a carga sobre os sistemas de saúde.

Entretanto, o mercado global de testes de ITU foi avaliado em aproximadamente US$ 8,7 bilhões em 2022 e está projetado para atingir US$ 12,49 bilhões até 2031, refletindo uma taxa de crescimento anual composta de 4,1% durante o período [5]. Este mercado abrange diversas metodologias de teste incluindo kits de testes laboratoriais e testes no local de atendimento, ambos essenciais para o diagnóstico e prescrição de tratamentos para ITUs. Existem fatores que colaboram para o crescimento do mercado de testes para esta doença, entre eles avanços em tecnologias de diagnóstico, particularmente métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR), que melhoraram a precisão e a velocidade dos diagnósticos. Além disso, inovações como "*Self-Tests*" de infecção do trato urinário destacam a mudança da indústria em direção a soluções de testes rápidos e precisos.[5,6]

Atualmente, existem alguns recursos para detecção da ITU que se enquadram na categoria de "*Self-Tests*". O teste com fitas pode indicar qualitativamente a presença de leucócitos, sangue, nitratos e proteínas na urina. No entanto, o teste de nitrito tem como premissa a detecção de *Enterobacteriaceae*, porém apresenta como desvantagem a possibilidade de resultados falso negativos dependendo do número de bactérias e microrganismos não produtores de nitrito.[7]

Considerando a relevância e incidência da ITU e o mercado em crescimento, propomos neste trabalho um mecanismo reacional alternativo para detecção da *Escherichia coli* na urina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultura celular de *Escherichia coli*, lise mecânica e obtenção da β-Galactosidase

A metodologia adotada para a obtenção da enzima β-Galactosidase, a partir de uma cultura de célula de *Escherichia coli* BL21 é amplamente empregada em pesquisas de biologia molecular devido ao seu rápido crescimento e alta densidade celular.[8] As metodologias foram baseadas nos protocolos empregados no Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB) da Universidade de Mogi das Cruzes.

A partir de uma cepa estoque de *E. coli*, as células foram diluídas em meio Luria Bertani (LB) da Sigma-Aldrich composto por 5g/L de NaCl, 10g/L de triptofano

hidrolisado e 5g/L de extrato de levedura. As amostras foram incubadas sob agitação contínua (140rpm) por 12 horas a 37ºC.

Após o crescimento, as células de *E. coli* foram sedimentadas por centrifugação a 13000 rpm por 20 minutos e 4ºC. Após separação por sedimentação, as células foram coletadas e ressuspensas em tampão TRIS-HCl 50 mM e 20% (v/v) de glicerol. O pH da ressuspensão foi ajustado para 7,4 com HCl, considerando que *E. coli* é uma bactéria neutrófila com bom crescimento em pH neutro. As suspensões celulares foram armazenadas a -80ºC para uso posterior.

A quantificação do número de células de *E. coli* foi avaliada por densidade óptica a 600nm (DO600) utilizando um espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop® (One/OneC) com quatro leituras independentes e utilizando cubeta com caminho óptico de 10mm. A concentração de células foi estimada a partir da relação entre a densidade ótica e o número de células no qual DO600 de 1,0 é igual a $8x10^{8}$ células por mL.[9,10] O valor de concentração celular obtido foi utilizado para determinar a concentração inicial das culturas bacterianas para procedimentos subsequentes

Em seguida, 15mL da suspensão celular foram submetidos à lise mecânica por sonicação (Sonics VCX 750 Vibra Cell) em ciclos de 10 segundos por 15 minutos. O homogenato celular foi centrifugado a 5000rpm por 16 minutos em temperatura ambiente (25ºC). A suspensão enzimática foi dividida em alíquotas de 1,7mL e novamente foi centrifugado por 5min a 13000rpm em temperatura ambiente para separação dos sedimentos restantes na mistura. A suspensão enzimática foi armazenada a -80ºC para análises subsequentes.

2.2 Ensaio de sensibilidade de detecção da β-Galactosidase em suspensão enzimática

A suspensão enzimática obtida conforme descrito na seção 2.1 foi utilizado para validar a atividade da enzima β-Galactosidase. As análises foram realizadas utilizando a sonda cromogênica X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo) como substrato.

2.2.1 Determinação do volume mínimo de X-Gal necessário para indicação de atividade enzimática

Foram preparados dez frascos, cada um contendo 100µL da suspensão enzimática. Em seguida, adicionou-se a cada frasco uma alíquota de X-Gal 0,4 g/mL nas seguintes proporções: 0,5%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3,5%; 4%; 4,5%; 10%; 15% e 20%. A amostra controle foi preparada com 100µL de suspensão enzimática e sem adição de X-Gal. Em seguida, foram homogeneizadas por agitação a 800rpm e 40ºC por 30 minutos em agitador térmico (Thermo Shaker 6c cts-6c). Após o período de incubação, as amostras foram submetidas a uma avaliação visual para a detecção de alterações na coloração do meio ou a formação de precipitado azulado. Ao fim da avaliação, foi adicionado 100µL de dimetilformamida (DMF) à mistura, seguido de homogeneização cuidadosa.

Após 40 minutos de reação, as amostras foram diluídas 20 vezes em água devido à dificuldade em obter resultados com menor variação causada pela turbidez do meio, em seguida, a absorbância foi mensurada utilizando um espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop® (One/One C) a 650 nm, comprimento de onda previamente empregado na literatura para a detecção do composto 5-bromo-4-cloro-3-hidroxíndole que é o produto da reação entre X-Gal e a de β-Galactosidase.[11] Para essa análise, foram utilizados 5µL de cada amostra testada.

2.2.2 Determinação do Volume mínimo detectável de suspensão enzimática.

Para determinar o volume mínimo de suspensão enzimática necessário para a detecção de β-Galactosidase, foram realizados ensaios com diferentes alíquotas da suspensão (12,5%; 25%; 50% e 100%). Os tubos foram completados com tampão TRIS-HCl (87,5%; 75% e 50%, respectivamente), o volume final se manteve igual a 100µL. Adicionou-se 0,5µL de X-Gal (0,923 mol/L) a cada frasco. A amostra controle foi preparada apenas com suspensão enzimática, sem adição de X-Gal. Após 40 minutos, as amostras foram diluídas 21 vezes em DMF e homogeneizadas para dissolver o precipitado. Em seguida, foram novamente diluídas 20 vezes, desta vez em água e avaliadas no espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop® (One/One C) a 650nm. Para essa análise, foram utilizados 5µL de cada amostra testada.

2.2.3 Monitoramento da atividade enzimática ao longo de 80 minutos

Prepararam-se dois frascos com 250µL de uma solução constituída por 15% de suspensão enzimática e 85% de tampão TRIS-HCl 50mM. Em um dos frascos,

adicionou-se 0,5µL de X-Gal 0,923 mol/L, enquanto o outro frasco foi utilizado como controle, sem adição de X-Gal. A atividade enzimática foi monitorada durante 80 minutos, com coletas de 10µL, a cada 5 minutos, para leitura em um espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop® (One/OneC), utilizando um comprimento de onda de 650nm.

O mesmo procedimento foi replicado substituindo o tampão por urina com pH ajustado para 6,5.

2.3 Determinação do perfil de pH da β-Galactosidase

Para a análise da estabilidade da atividade enzimática foram preparadas algumas soluções tampões de força iônica constante com diferentes valores de pH. Cada solução foi composta por acetato de sódio (25mM), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico (MES) (25mM), glicina (25mM) e TRIS-HCl (75mM). O pH dos tampões foram ajustados para valores entre 3,5 e 9,5, variando em incrementos de 0,5 unidades de pH.

Para cada valor de pH, foram preparadas soluções compostas por 15% de sobrenadante enzimático, 85% de tampão de força iônica constante ajustado para os pHs específicos e 0,5µL de solução de X-Gal (0,923 mol/L). O controle foi preparado com apenas sobrenadante enzimático e tampão, sem a adição de X-Gal.

Após 30 minutos de reação, foram coletados 5µL de cada amostra e a absorbância foi mensurada utilizando um espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop® (One/OneC) a um comprimento de onda de 650nm.

2.4 Avaliação da estabilidade térmica da suspensão enzimática

A estabilidade térmica da β-Galactosidase foi avaliada em três condições de temperatura: 25ºC (simulando a temperatura ambiente), 45ºC e 60ºC.

Para a temperatura de 25ºC, 1mL de sobrenadante enzimático produzido conforme reportado na seção 2.1, foi adicionado a um tubo Falcon contendo 1mL de tampão de força iônica constante com composição descrita na seção 2.3 e pH 6,5. Ao longo de todo o processo, o tubo foi mantido em um béquer com água para garantir o equilíbrio térmico a 25ºC. A cada 1 hora, foram coletados 400µL da solução e

adicionados 2µL de X-Gal 0,923 mol/L. A mistura foi mantida em agitação constantemente a 800rpm em um Thermo shaker (modelo 6c cts-6c) e amostras de 10µL foram coletadas ao longo de 5 horas. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop® (One/OneC) a 650nm.

Para as avaliações a 45ºC e 60ºC, misturou-se 1mL de sobrenadante enzimático com 1mL de tampão universal (pH 6,5) em tubo Falcon. O tubo foi aquecido no Thermo shaker (modelo 6c cts-6c) até atingir a temperatura desejada e mantido sob agitação constante a 800rpm. A cada 5 minutos, foram coletados 250µL da solução as quais foram armazenadas em gelo para estabilização, em seguida adicionou-se 1,25µL de X-Gal 0,923 mol/L. As amostras foram mantidas em agitação após adição do X-Gal. Na sequência, após a adição do X-Gal, alíquotas de 10µL das amostras foram coletadas a cada 60 minutos e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop® (One/OneC) a 650nm. O monitoramento da reação foi realizado por um período total de 6 horas para cada temperatura.

2.5 Avaliação da estabilidade da suspensão enzimática em urina

O projeto foi submetido ao comitê de ética sob o CAAE 77582024.8.0000.5497, e obteve aprovação no parecer nº 6.731.44 para utilização de amostras de urina humana no estudo.

Os colaboradores do estudo foram instruídos a coletar as amostras de urina utilizando tubos cônicos estéreis de 50mL e adotando boas práticas de higiene afim de evitar contaminações durante o processo. Após a coleta, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a 2ºC no laboratório do CIIB para garantir a integridade.

Para a avaliação de estabilidade da suspensão enzimática, as amostras de urina coletada pelos colaboradores foram ajustadas para o pH 6,5 com NaOH (5 mol/L). Em seguida, foram preparadas soluções contendo 15% de sobrenadante enzimático, 85% de urina e 0,5µL de solução de X-Gal 0,923 mol/L.

A reação foi monitorada por 80 minutos, sendo que a cada 10 minutos, foram coletados 5µL da solução e a absorbância foi mensurada utilizando um

espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop® (One/OneC) a um comprimento de onda de 650nm.

2.6 Avaliação colorimétrica com células de *E. coli* em solução lisante

A partir de uma cepa estoque de *E. coli*, células foram diluídas em 700mL de meio Luria Bertani (LB) e incubadas sob agitação contínua (140rpm) por 18 horas a 37ºC. Após cultivo, as células de *E. coli* foram decantadas por centrifugação a 13000 rpm por 20 minutos e 4ºC. As células sedimentadas foram ressuspensas em tampão TRIS-HCl 50mM e 20% (v/v) de glicerol, o pH foi ajustado para 7,4. A mensuração da absorbância foi realizada através da leitura de 1mL da diluição celular em espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop® (One/OneC) a um comprimento de onda de 600nm e o número de célula foi determinado através da relação DO600 descrita na seção 2.1.

Uma alíquota da suspensão celular foi diluída em TRIS-HCl 50mM (pH 7,4) para alcançar volumes finais contendo 10^9 células por microlitro. Em seguida, alíquotas com 350; 300; 250; 200 e 150µL foram transferidas para tubos cônicos contendo, respectivamente, 300; 350; 400; 450; 500µL de solução lisante composto por TRIS HCl 50mM pH 8, NaCl 25mM, EDTA 2mM e Triton 0,1% (v/v), e por fim foi adicionado 10% (v/v) de Lisozima (0,7 mol/L) totalizando um volume de 715µL em cada tubo. Nas amostras controle, foram utilizadas alíquotas de suspensão enzimática de 350, 300, 250, 200 e 150µL. Em cada recipiente, adicionou-se TRIS-HCl 50mM pH 7 até completar um volume final de 715µL.

Os recipientes foram mantidos sob agitação constante (800rpm e temperatura ambiente 25ºC) por 1 hora e, após centrifugação a 13000rpm por 5min, foi adicionado 1,5µL de X-Gal 0,923 mol/L.

As misturas foram monitoradas até o aparecimento de sinais de coloração azulada no meio.

2.7 Detecção colorimétrica de *E. coli* em suporte de papel absorvente

Cinco fitas de papel absorvente foram cortadas nos dimensionais de 5mm x 75mm e 14,5mm x 75mm. Os dimensionais foram baseados na literatura[18]. Cerca de 50mm da parte superior das fitas foram impermeabilizadas com parafina proveniente

do derretimento a 65ºC de vela comercial. Logo abaixo, foram adicionados 20µL de tampão lisante (composição descrita na seção 2.6) e 2,5µL de X-Gal 0,923 mol/L. Na ponta inferior da fita de papel, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, foram adicionados 20µL de dextrose (D-glucose) 1mol/L a fim de criar uma zona de atração para a bactéria *E. coli*, conforme indicado na literatura[18].

As fitas de papel foram secas ao ar por uma hora e, em seguida, imersas em um béquer contendo 10mL de TRIS-HCl 50mM (pH 7) e 1mL de solução de celular de *E. coli* 10^6 células/mL. O sistema foi observado até que qualquer coloração azulada fosse visível nas fitas.

2.8 Detecção colorimétrica de células de E. coli em meio composto por celulose Fluff e Polímero Superabsorvente

Em dois béqueres foram pesados 1g da mistura de celulose Fluff e Polímero Superabsorvente obtida de fraldas descartáveis comerciais. O material foi distribuído de forma a cobrir toda a superfície inferior interna dos béqueres.

Em seguida, adicionaram-se 3mL de tampão em cada recipiente. No primeiro béquer (amostra), foi acrescentado o tampão lisante, conforme a composição descrita na seção 2.6, juntamente com 1mL da solução de células a uma concentração de 10^6 células/mL. No segundo béquer (controle), utilizou-se tampão composto por TRIS-HCl 50mM (pH 7) e NaCl 50mM, seguido da adição de 1mL de alíquota de células mecanicamente lisadas por sonicação por 2 minutos. Em ambos os béqueres, foram adicionados 50µL de X-Gal 0,923 mol/L.

O sistema foi observado até que qualquer coloração azulada nos recipientes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cultura celular de *Escherichia coli* e quantificação celular

O crescimento bacteriano em suspensão provoca um aumento na turbidez do meio, tornando um excelente indicador da presença de microrganismos em soluções aquosas. Um dos métodos mais comuns para medir a turbidez é a quantificação da absorbância no meio líquido. Esse procedimento consiste na passagem de luz através de uma cubeta contendo a amostra, e na medição da luz que é absorvida pela solução. Entende-se que quanto maior a concentração de células, maior a turbidez do meio e,

consequentemente, maior será a absorbância medida. No entanto, a geometria celular e a presença de interferentes podem resultar em desvios no resultado de absorbância. Na tabela 1 são descritos os resultados das absorbâncias e os valores das concentrações das células de *E. coli* calculados através da relação entre a densidade óptica e a concentração celular exposta na seção 2.1. A análise do número de células em quatro amostras da cepa de *E. coli* evidenciou uma média de $1{,}96x10^{9} \pm 2{,}08x10^{7}$ células/mL.

Tabela 1. Mensuração da concentração de células no cultivo de *E. coli.*

Leitura	**1**	**2**	**3**	**4**
Absorbância (A)	2,44	2,41	2,47	2,45
Células. mL^{-1}	$1{,}95x10^{9}$	$1{,}93x10^{9}$	$1{,}98x10^{9}$	$1{,}96x10^{9}$

Fonte: Autores.

Os resultados obtidos através da avaliação da absorbância das amostras de células cultivas, evidenciam uma correlação entre a absorbância e a concentração celular. Observa-se que, à medida que a turbidez do meio aumenta, o sinal de absorbância também se intensifica, indicando uma maior concentração de células presentes no meio.

Entretanto, a mensuração da concentração pode sofrer variações de acordo com as características das células cultivadas. O estudo desenvolvido por Fukuda (2023) investigou a relação entre o número de conjuntos completos de cromossomos em uma célula (ploidia) e o tamanho da célula, onde determinou que a ploidia interfere diretamente no diâmetro da célula e, consequentemente, nos resultados da densidade ótica obtida por espectrofotômetro.[23] No entanto, Mira et al (2022) pontua em seu trabalho que embora a densidade óptica (DO) sozinha seja uma métrica pouco confiável quando utilizado para valores de DOs próximos a 0,1 pode ser proporcionalmente precisa para determinação da concentração celular. Ainda em seu trabalho, Mira et al realizou a avaliação da relação entre DO600 e o número de células de *E. coli* K12 DH5α encontrando valores de $4{,}36 \times 10^{8}$ células/mL para uma DO600 igual a 0,348, ou seja, cada DO600 igual a 1,0 seria equivalente a $1{,}25 \times 10^{9}$ células de *E. coli* K12 DH5α por mL, representando um resultado 56,2% maior que o adotado neste trabalho (8×10^{8}). Entre tanto, o trabalho também indica que a relação entre OD

e título celular, não é fixa e varia com base na configuração do espectrofotômetro, comprimento do caminho de luz, tamanho da célula e densidade da cultura.[11]

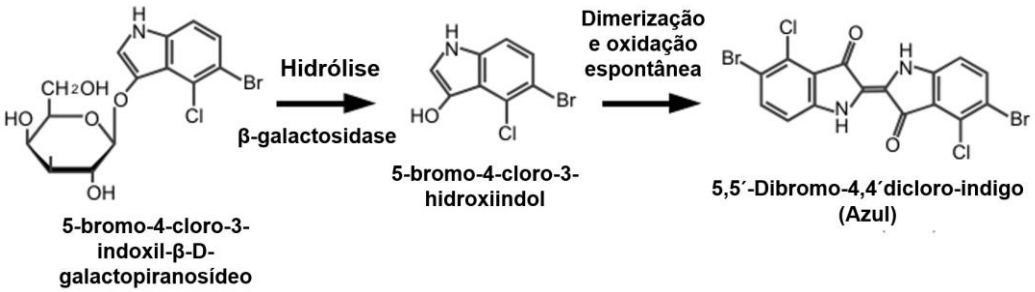
Por tanto, deve-se considerar possíveis desvios nos valores de concentração de células no meio, que podem impactar nas avaliações subsequentes.

3.2 Ensaio de sensibilidade de detecção da β-Galactosidase em sobrenadante enzimático

A literatura indica que, em um meio com baixos níveis de lactose, a síntese de β-Galactosidase é limitada, uma vez que a presença do dissacarídeo ativa o operon lac no circuito regulador genético. Entretanto, independente da presença da lactose, mutações nos genes regulatórios do operon lac, como gene LacI (que codifica o repressor LacI) ou mutações na região operadora, podem impedir que o repressor se ligue ao operador propiciando a contínua formação dos genes expressos pelo operon lac, entre eles a β-Galactosidase[11,12,13]. Tal mecanismo pode justificar a presença de coloração azulada nas amostras, indicando a presença da enzima no meio.

A enzima β-Galactosidase hidrolisa a sonda cromogênica X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo) formando galactose e 5-bromo-4-cloro-3-indoxil que é oxidado e convertido no corante azul 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, conforme representado na figura 1. Essa reação é sensível e pode ser quantificada usando métodos espectrofotométricos, embora a natureza insolúvel do produto limite as medições de absorbância direta, sendo necessário métodos de diluição[35].

Figura 1. Reação entre a enzima β-Galactosidase e a sonda X- gal.



Fonte: Fujita, A. e Misumi, Y., 2017 (adaptada).

Após a adição de diferentes alíquotas do X-Gal na suspensão enzimática, foi possível observar a presença de coloração azulada intensa nos primeiros 20 minutos

de incubação. As amostras foram submetidas a avaliação em espectrofotômetro após 40 minutos de reação e os resultados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Valores de absorbância das soluções de suspensão enzimática com diferentes alíquotas de X-Gal**.**

Amostra	Controle	1	2	3	4	5
Volume X-Gal [µL]	0	2	4	10	15	20
Absorbância (A)	0,08	5,40	5,76	7,13	6,73	3,89

Fonte: Autores.

A amostra 3, que recebeu 10µL de X-Gal, registrou absorbância mais alta comparada as demais, com 7,13. Contudo, as amostras 4 e 5, que receberam volumes superiores (15 e 20µL, respectivamente), apresentaram um menor valor de absorbância, com valores de 6,73 e 3,89. O controle (água), não mostrou alterações de coloração na análise visual, porém quando foi submetido a leitura da absorbância, foi identificado um valor de 0,08 o qual foi descontado dos valores de absorbância das amostras. A partir destes resultados, entende-se que há um incremento nos valores da absorbância de acordo com o aumento do volume de X-Gal, no entanto, observou-se a possibilidade de redução dos volumes de sonda uma vez que as amostras apresentaram coloração azulada.

Com o objetivo de determinar o menor volume possível de X-Gal para a detecção de β-Galactosidase em suspensão enzimática, novas análises foram realizadas e os valores da absorbância foram mensurados.

Observou-se que, embora visualmente a amostra 2 se destaque com coloração mais intensa nos primeiros 20 minutos de reação, os resultados não se refletem em valores de absorbância. Conforme observado na tabela 3, a amostra 2 apresentou 3,20 de absorbância após 40 minutos de reação enquanto as amostras 3, 4 e 5 apresentaram 4,80; 4,80 e 5,20 respectivamente, indicando menor concentração do composto 5,5’Dibromo-4,4’-dicloro-indigo na amostra 2. A diferença visual pode ser justificada pela influência dos resíduos celulares provenientes da lise mecânica.

Tabela 3. Valores de absorbância das soluções de suspensão enzimática com diferentes alíquotas de X-Gal.

Amostra	Controle	1	2	3	4	5
Volume X-Gal (µL)	0	0,5	1,5	2,5	3,5	4,5
Absorbância (A)	0	2,40	3,70	4,50	4,80	5,20

Fonte: Autores.

A determinação do constante de Michaelis (Km) da reação entre X-Gal e β-Galactosidase foi realizada por meio da análise cinética, utilizando o modelo de Michaelis-Menten. Os resultados obtidos indicam que o Km observado está em torno de 1µM, o que sugere que a afinidade da enzima pelo substrato é relativamente alta. No entanto, é importante destacar que, apesar de estarmos operando em concentrações de substrato abaixo do Km, a reação apresenta uma taxa de hidrólise considerada lenta. Essa observação pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo a possibilidade de limitações intrínsecas na atividade catalítica da beta-galactosidase ou a presença de inibidores, que podem afetar a eficiência da conversão de X-Gal em produto.[34]

Ainda considerando os resultados apresentados na tabela 3, observou-se que o menor volume possível de X-Gal em suspensão enzimática necessário para a detecção de β-Galactosidase foi de 0,5 µL, considerando que a amostras 1 apresentou coloração azulada visível.

Uma vez determinado o volume mínimo de X-Gal, foram iniciadas análises para determinação do volume mínimo de suspensão enzimática necessário para a detecção de β-Galactosidase. Novas soluções com diferentes volumes da suspensão enzimática foram preparadas, e adicionou-se 0,5µL de X-Gal. Foi realizado a leitura da absorbância e os valores foram determinados e os resultados estão apresentados na tabela 4.

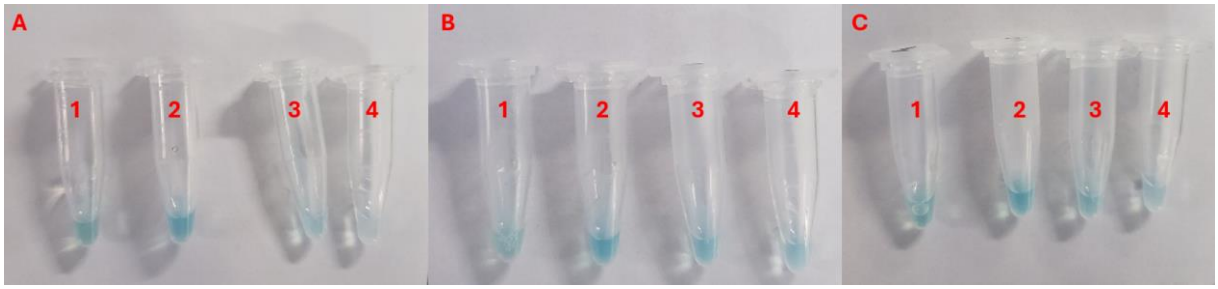
Tabela 4. Valores de absorbância das soluções de diferentes alíquotas de suspensão enzimática com volume fixo de X-Gal.

Amostra	Controle	1	2	3	4
Volume de suspensão Enzimática [µL]	0	100	50	25	12,5
Absorbância (A)	0	11,5	5,6	2,8	0,8

Fonte: Autores.

A amostra 1 recebeu 100 µL da suspensão enzimática, o maior volume, e, como resultado, apresentou o maior valor de absorbância (11,5), enquanto a amostra 4 recebeu o menor volume de suspensão enzimática e, consequentemente, apresentou o menor valor de absorbância (0,8). Por tanto, houve diminuição do sinal de absorbância de acordo com a redução do volume da suspensão enzimática. A figura 2 ilustra a evolução das reações ao longo do tempo, evidenciando um incremento na intensidade da coloração azul nas amostras analisadas. Notavelmente, a amostra 2, contendo 50 µL de suspensão enzimática, destaca-se ao apresentar coloração visível já nos primeiros 20 minutos de reação.

Figura 2. Atividade da β-Galactosidase ao longo do tempo.



A- Amostras após 20 minutos de reação; **B-** Amostras após 30minutos de reação; **C-** Amostras após 40 minutos de reação.

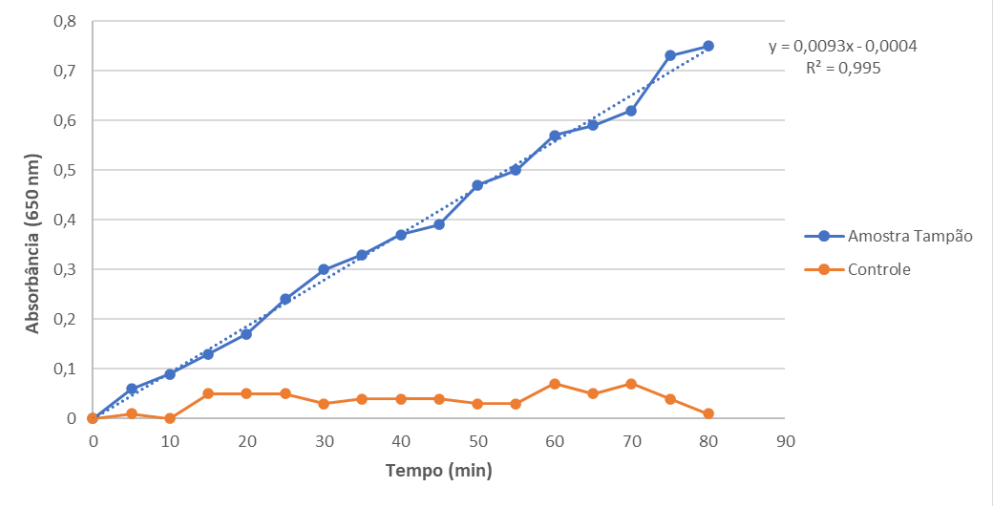
Fonte: Autores.

Ainda considerando os resultados apresentados na tabela 4, observou-se que o volume mínimo de suspensão enzimática necessário para a detecção de β-Galactosidase com uma alíquota de 0,5µL de X-Gal, foi de 50µL considerando os resultados de absorbância e da avaliação visual qualitativa apresentada na figura 2.

3.2.1 Monitoramento da atividade enzimática em função do tempo

A atividade enzimática é influenciada diretamente pela ação do tempo reacional. Quanto mais tempo a enzima estiver em contato com o substrato, mais produtos serão produzidos. Por tanto, foi realizado o monitoramento da atividade enzimática ao longo de 80 minutos de reação. Os resultados apresentados na figura 3 evidenciam o crescimento linear nos valores de absorbância, demonstrando que há clivagem da sonda X-Gal e geração do produto azulado 5-bromo-4-cloro-3-indoxil. Já os valores de absorbância para a solução controle, sem a presença do X-Gal, apresentou valores praticamente estáveis de absorbância.

Figura 3. Monitoramento da atividade enzimática em função do tempo em meio tampão.



Fonte: Autores.

A curva da amostra possibilita o cálculo da taxa de reação a partir dos dados de absorbância e tempo da reação, conforme descrito na equação 1. A taxa de reação obtida foi de 0,9375x10^{-2} unidades de absorbância por minuto.

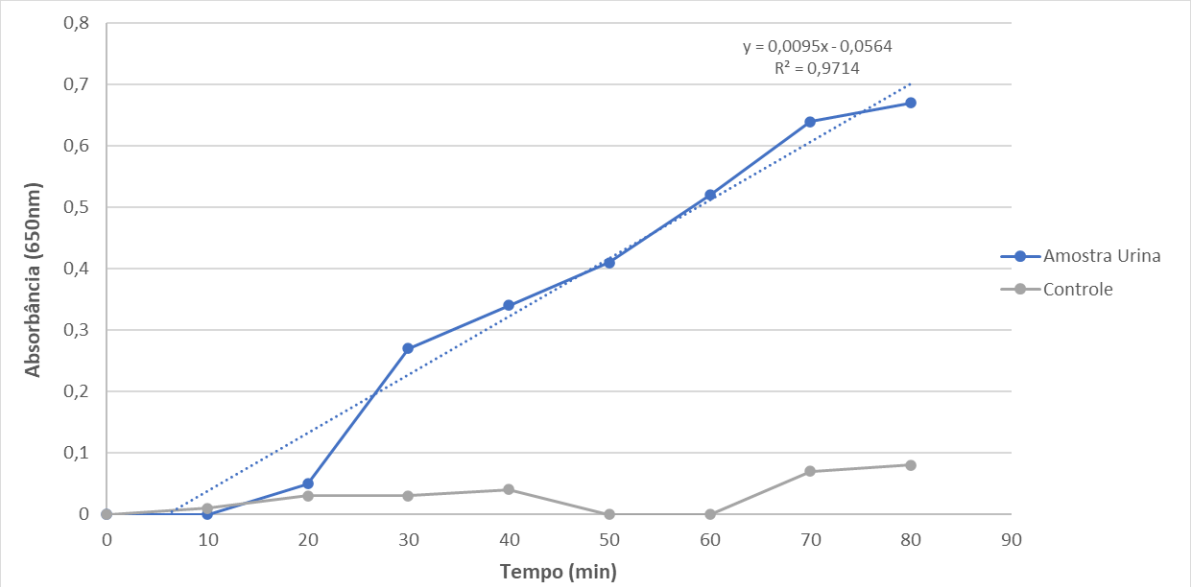
$$Taxa\ de\ Reação = \frac{\Delta Absorbância}{\Delta tempo} = \frac{A2-A1}{t2-t1} \qquad \text{Eq. 1}$$

Onde a ΔAbsorbância é a variação de absorbância monitorada e Δtempo é a variação de tempo correspondente.

O processo de monitoramento da reação foi repetido em urina onde foi possível observar a diferença na velocidade de reação através da aplicação da equação 1. De

acordo com os dados expostos na figura 4, a taxa de reação encontrada para urina foi de 1,037 x10^{-2} unidades de absorbância por minuto, cerca de 10,6% maior que os dados encontrados em tampão. Tais resultados indicam maior velocidade da enzima em meio urina, uma vez que foram alcançados maiores patamares de absorbância com menor tempo de reação. No entanto, ao desconsiderar os primeiros 20 minutos de reação, durante os quais se observa um salto significativo na atividade enzimática em meio urina (figura 4), a taxa de reação se estabiliza em aproximadamente 0,800 × 10^{-2} unidades de absorbância por minuto. Em contraste, em meio tampão, a taxa de reação não apresenta variações significativas, mantendo-se em 0,967 × 10^{-2} unidades de absorbância por minuto. Nestas condições, a enzima demonstrou uma velocidade aproximadamente de 21% superior em meio tampão em comparação com meio urina.

Figura 4. Monitoramento da atividade enzimática em função do tempo em meio tampão.



Fonte: Autores.

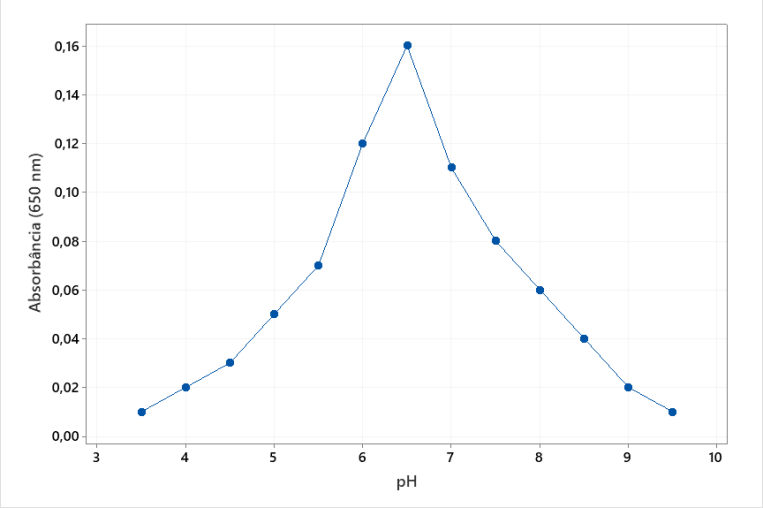
O meio no qual a enzima está influencia seu comportamento, segundo Braham (et al. 2021), enzimas trabalhadas em meios com alta concentração iônica podem se favorecer aumentando a eficiência da atividade enzimática pois tem a função de estabilização da enzima e podem fornecer cofatores essenciais para reação.[35] Por exemplo, ânions de alta densidade de carga, como o fosfato, podem aumentar a estabilidade aumentando a energia livre de Gibbs necessária para a hidratação durante o desdobramento.[40] Por outro lado, a urina pode ter diversas composições

dependendo do período de coleta, alimentação e saúde do indivíduo, por tanto a atividade enzimática pode apresentar variações dependendo da origem da urina analisada e, consequentemente, favorecer ou prejudicar a ação enzimática.

3.3 Determinação do perfil de pH da β-Galactosidade.

Cada enzima tem uma faixa ideal de pH. Mudar o pH para um valor fora dessa faixa faz com que a atividade enzimática diminua. Além disso, valores extremos de pH podem causar a desnaturação das enzimas.[41] Desta forma, foi feito uma análise da estabilidade da suspensão enzimática de β-Galactosidade em tampão de força iônica constante em uma faixa de pH de 3,5 a 9,5. Foram realizadas leituras da absorbância e os resultados são apresentados na figura 5.

Figura 5. Comportamento da enzima em diferentes condições de pH.



Fonte: Autores

A análise da figura 5 revela que, nos pH 3,5 e 9,5, os valores de absorbância são os mais baixos, indicando pouca ou nenhuma atividade enzimática. Por outro lado, em pH 6,5, observou-se o valor máximo de absorbância (0,16), sugerindo que este é o pH ideal para a atividade da β-Galactosidase.

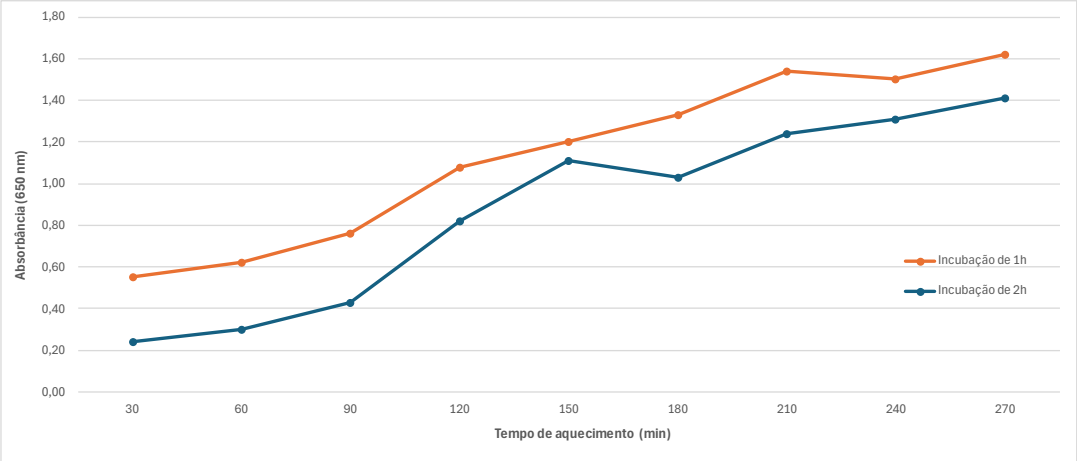
Além disso, a absorbância, que reflete a atividade enzimática, mostrou que em pH 6, a enzima atingiu 75% de sua atividade máxima, enquanto em pH 7, atingiu 68,7% e em pH 6,5 atingiu 100% de sua capacidade. Esses resultados corroboram a literatura, que aponta uma preferência da β-Galactosidase de *E. coli* por pH neutro, com pico de atividade entre os pHs 6 e 7, dependendo da origem da proteína[12].

3.3.1 Avaliação da estabilidade térmica da β-Galactosidase

A temperatura influência o desempenho das enzimas, inicialmente aumentando a atividade enzimática à medida que a temperatura sobe, devido à conformação favorável do sítio ativo e ao aumento da energia cinética das moléculas. Isso continua até alcançar uma temperatura ótima, onde a atividade é máxima e há estabilidade de atividade. No entanto, temperaturas excessivamente altas levam à desnaturação da enzima, resultando na perda da conformação tridimensional e na diminuição da atividade, pois o sítio ativo não consegue mais interagir adequadamente com o substrato.[42]

Amostras de soluções de suspensões enzimáticos com X-Gal foram incubadas inicialmente a 25ºC e apresentaram atividade enzimática nas 5 horas de avaliação, conforme resultados apresentados na figura 6. Pode-se observar sinais crescentes e expressivos de absorbância ao longo do tempo. Observa-se também que as amostras incubadas por 1 hora e 2 horas exibem comportamentos que, à primeira vista, parecem divergentes e, portanto, requerem uma confirmação estatística para validação. Para estas as amostras incubadas por 1 e 2 horas, aplicou-se o teste t, para confirmar a diferença entre os dois grupos de amostras. Os dados apresentaram distribuição normal (Kolmogorov-smirnov > 0,150), e variâncias homogêneas (Levene = 0,783). Segundo o teste t, os dados não apresentam diferença estatisticamente significativa (p =0,224).

Figura 6. Avaliação da absorbância ao longo do tempo em meio tampão e a 25ºC simulando temperatura ambiente (TA).



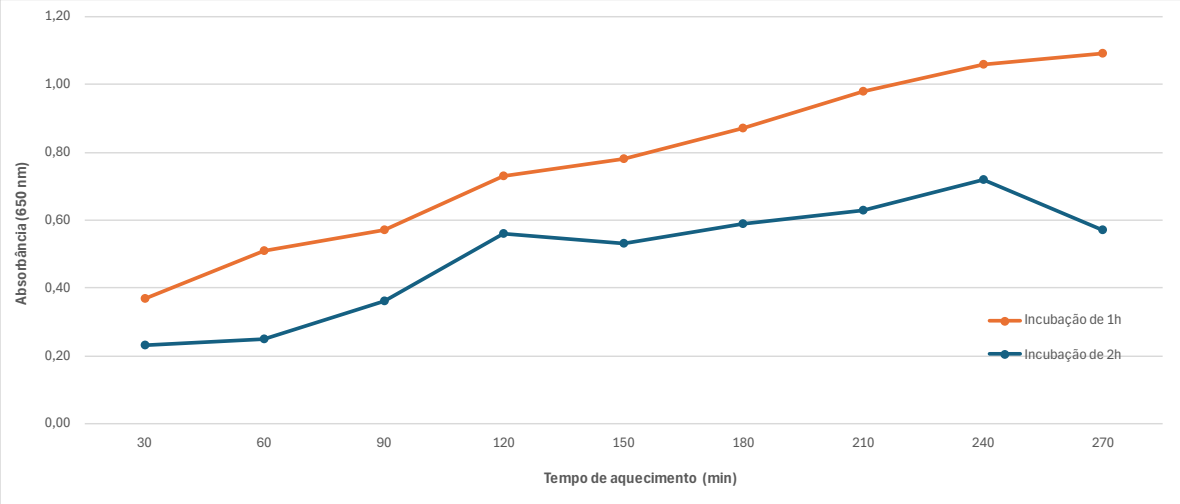
Fonte: Autores.

Embora não haja diferença estatística significativa entre os dados, quando se aplicou a equação 1 para avaliação das taxas de reação dos dois grupos de amostras, observou-se uma ligeira diferença nos resultados. A incubação por 1 hora apresenta taxa de reação de $4{,}458 \times 10^{-3}$ unidades de absorbância por minuto, enquanto a incubação por 2 horas apresentou uma taxa de $4{,}875 \times 10^{-3}$ unidades de absorbância por minuto. Assim, ainda que a taxa de reação tenha apresentado divergência, com base na análise estatística, não existe diferença significativa entre as amostras.

O comportamento da reação à temperatura ambiente também foi monitorado em urina. É importante enfatizar que a urina é uma mistura complexa que apresenta diversas moléculas em sua composição a depender de fatores como alimentação e comportamentos dos indivíduos, tornando imprevisível o comportamento da suspensão enzimática após em diferentes condições de exposição a este meio.

As amostras contendo suspensão enzimática e urina apresentaram aumento expressivo de absorbância ao longo do tempo quando submetidas a análises a 25ºC, conforme apresentado na figura 7.

Figura 7. Avaliação da absorbância ao longo do tempo em urina e 25ºC.



Fonte: Autores.

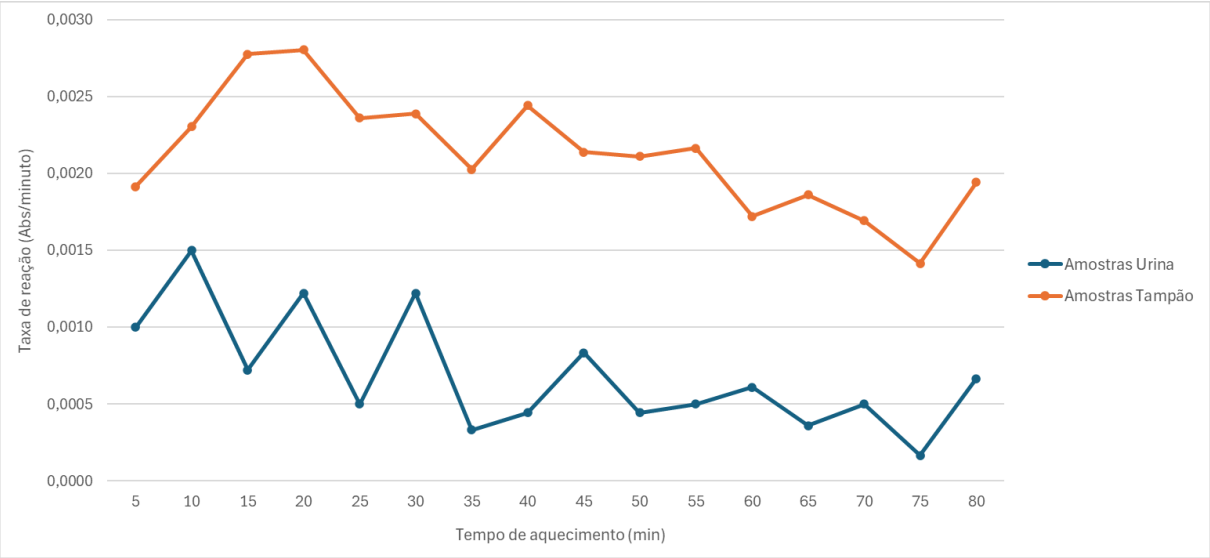
O comportamento da atividade enzimática após incubação sugere divergências entre os dois grupos de amostra, sendo que a incubação por 1h apresenta maiores níveis de absorbância quando comparado a incubação por 2h. Com base nas observações aplicou-se o teste t afim de confirmar a diferença entre os dois grupos

de amostras. Os dados apresentaram distribuição normal (Kolmogorov-smirnov > 0,05), e variâncias homogêneas (Levene = 0,925). Segundo o teste t, os dados apresentam diferença estatisticamente significativa (p = 0,039), ou seja, o tempo pode afetar a eficiência da enzima em urina.

O monitoramento do comportamento da enzima apresentou diferenças importantes quando comparados tampões de força iônica constante e urina. Ao aplicar a equação de taxa de reação (Eq. 1) aos resultados gerados na primeira hora de incubação, observa-se que a enzima tem desempenho igual a 4,458 $x10^{-3}$ unidades de absorbância por minuto em tampão de força iônica constante, no entanto na urina, a taxa de reação cai pelo menos 32,7% passando para 3,000$x10^{-3}$. No livro “Preanalytical Treatment of Urine” (Tratamento Pré-analítico da Urina), Mattenheimer et al. (1992) descreve a urina como um ambiente “hostil às enzimas”, que pode levar a alterações estruturais nas proteínas enzimáticas, afetando sua atividade catalítica principalmente pela composição variável do fluído.[39]

A atividade enzimática pode ser inibida por temperaturas elevadas, que levam à desnaturação da proteína. Dado o objetivo do estudo, mapear o comportamento da enzima em diferentes temperaturas é essencial para compreender as limitações dos mecanismos de reação. Para a avaliação a 45ºC, a suspensão enzimática foi mantida sob aquecimento por 80 minutos, sem a presença da sonda X-Gal. Alíquotas foram coletadas a cada 5 minutos de aquecimento, armazenadas sob refrigeração e, em seguida, X-Gal foi adicionado. Posteriormente, as análises de absorbância foram realizadas ao longo de um período de 240 minutos de ração. Para simplificar a análise dos dados, os valores da taxa de reação são apresentados na figura 8 e discutidos posteriormente.

Figura 8. Performance enzimática em meio tampão e urina após aquecimento a 45ºC.



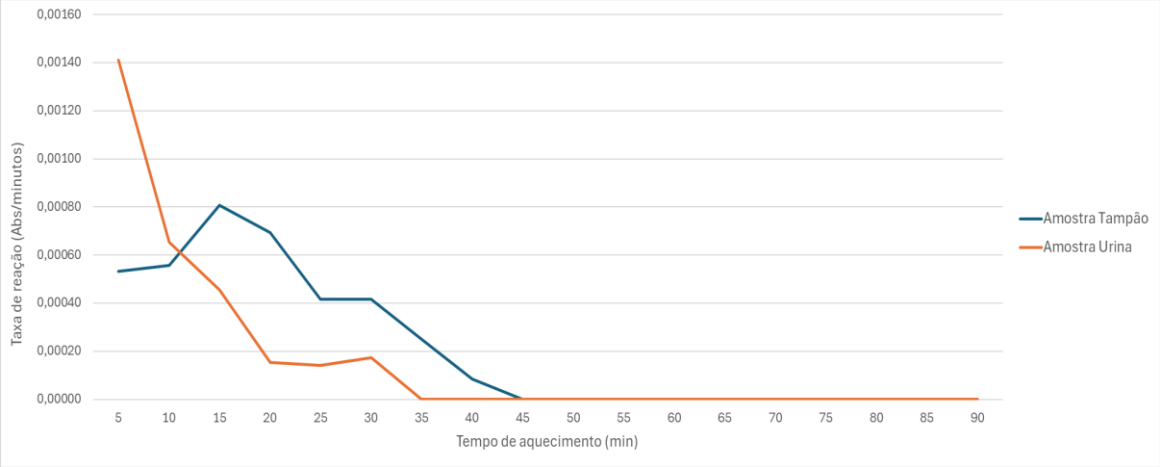
Fonte: Autores.

Os dados indicam que o aquecimento reduz a taxa de reação em ambos os meios, tampão e urina, no entanto, a redução é mais intensa quando a enzima está exposta em urina. Comparado a temperatura similar a ambiente (25ºC), no qual os dados são apresentados nesta mesma seção (3.3.1), observa-se que em urina há uma queda de pelo menos 79,6% após 60 minutos de incubação sob aquecimento, enquanto em tampão a queda é de 61,8%. Estudos recentes sobre a atividade enzimática em diferentes meios confirmam que a composição do meio pode influenciar significativamente a eficiência das enzimas, por exemplo, o estudo produzido por Pongkwan et al. (2018), indicou que a presença de inibidores endógenos na urina, como ureia e creatinina, pode interferir na atividade enzimática, resultando em menores níveis de clivagem de substratos comparado a condições ideais de tampão[20]. Além disso, o aquecimento pode induzir a liberação de substâncias que competem com os substratos enzimáticos, fator que pode explicar a diferença observada na atividade enzimática nos dois meios.[43]

As avaliações realizadas a 60ºC apresentaram queda brusca da taxa de reação, indicando uma possível condição de desnaturação da proteína nos primeiros 35 minutos de reação na presença de urina, conforme exposto no figura 9. Já na presença de tampão, observa-se que a queda de atividade é mais lenta resultando

em declínio total nos primeiros 45 minutos de reação, indicando melhor manutenção da performance da enzima nesta temperatura quando comparado com meio com urina.

Figura 9. Atividade enzimática em meio tampão e urina após aquecimento a 60ºC.



Fonte: Autores.

Em suma, os resultados sugerem que a β-Galactosidade apresentou temperatura melhor desempenho em temperatura ambiente (25ºC), tanto em tampão quando em urina. Os dados apresentados na figura 9 indicam que acima de 60ºC, a enzima é desnaturada. Também se observa que em temperaturas mais altas a proteína podem ser mais estáveis em urina quando comparada ao tampão. Esse comportamento pode ser reflexo da presença de cofatores ou outras substâncias iônicas na urina que podem estabilizar a enzima. No editorial de Marchetti (2023) destaca que os cofatores podem exercer uma influência significativa, regulando a estabilidade e a plasticidade das estruturas terciárias e/ou quaternárias das proteínas. Além disso, esses cofatores são fundamentais para garantir o correto processo de dobramento e a estabilidade intracelular da proteína-alvo.[44]

3.4 Avaliação colorimétrica com células integras de *E. coli* em solução lisante

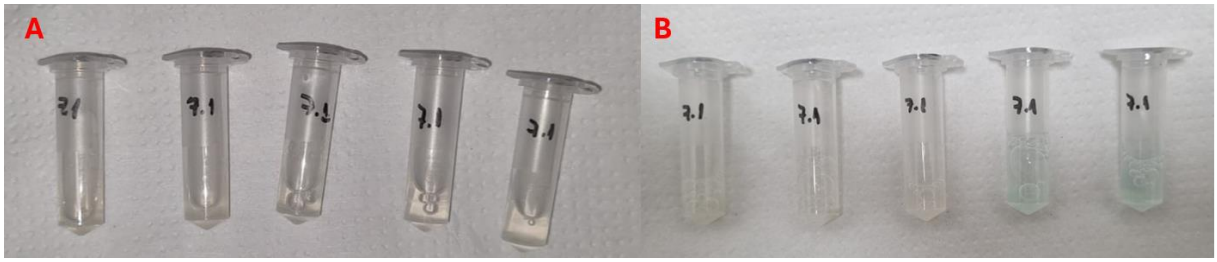
A β-Galactosidase pode ser extraída das células de *E. coli* por diversas metodologias, sendo a lise celular uma das mais comuns. Esse processo de ruptura da membrana plasmática resulta na liberação do conteúdo intracelular. Neste trabalho, a eficácia da lise foi avaliada por meio de uma metodologia colorimétrica utilizando X-Gal, monitorando a atividade da enzima β-Galactosidase. A eficácia de uma solução

lisante à base de detergentes foi investigada em células bacterianas integras, observando-se a liberação enzimática. Nos primeiros 30 minutos de incubação, não se observou alteração significativa na coloração do meio, sugerindo que a lise celular não ocorreu de maneira eficiente nos controles positivos que continham solução celular, conforme ilustrado na figura 10. Após dois dias de reação, os controles positivos 4 e 5, que continham 450 e 500 µL de solução lisante e 200 e 150 µL de solução celular respectivamente, apresentaram uma leve coloração azulada, indicando que ocorreu lise celular e liberação da enzima no meio.

Os controles negativos, que continham suspensão enzimática, apresentaram uma leve coloração azulada nas primeiras 12 horas.

Embora a lise tenha ocorrido, os resultados indicam que a eficiência do processo não foi ideal. Isso sugere a necessidade de explorar novos métodos de lise química, sendo o B-PER uma alternativa viável, uma vez que já foi utilizado com sucesso em sensores como o Dip-test desenvolvido por Gunda et al. (2017) e no biossensor proposto por Manzanas et al. (2020)[18,19].

Figura 10. Avaliação temporal de lise química de *E. coli* para detecção de B-galactosidase.



A- Controle positivo após 12 horas de reação; **B-** Controle positivo após 48 horas de reação.

Fonte: Autores.

3.5 Avaliação colorimétrica de detecção de *E. coli* utilizando fitas de papel

Os experimentos mostraram que a velocidade de absorção de líquidos e a difusão dos químicos foram influenciadas pelas dimensões das fitas de papel. As fitas com dimensões menores (5mm x 75mm) apresentaram dificuldades na difusão dos químicos, resultando em uma distribuição não uniforme e mistura entre os reagentes na formação das zonas de atração. Em contraste, as fitas com dimensões maiores

(14,5mm x 75mm) indicando uma melhor espalhabilidade dos químicos permitindo uma formação mais nítida das fronteiras.

Após 30 minutos, 60 minutos e até mesmo após 24 horas de imersão das fitas em solução contendo 10^6 células/mL de *E. coli* não foi observado coloração azulada. Ajustes na metodologia foram realizadas, o tampão lisante foi adicionado diretamente no béquer, e apenas X-Gal e dextrose foram aplicados nas fitas. No entanto, mesmo com essas modificações, não foi observada coloração visível nos tempos mencionados, conforme ilustrado na figura 11.

Figura 11. Fitas absorventes após 24 horas de imersão em solução de *E. coli*.



Fonte: Autores.

Possivelmente a secagem das fitas pode ter impactado negativamente a eficácia dos reagentes, resultando em uma performance comprometida, também pode-se considerar a degradação dos químicos utilizados na composição das fitas, uma vez que a estabilidade desses compostos é crucial para o funcionamento adequado do teste. Além disso, é importante considerar a eficiência da lise proposta conforme discutido na seção 3,4, caso o método de lise utilizado não seja suficientemente eficaz para romper as células de *E. coli* e expor a β-Galactosidase ao meio, isso poderia explicar a falta de resultados visíveis.

3.10 Análise da eficácia de diferentes tampões e métodos de lise em amostras de celulose fluff com polímero superabsorvente

As amostras foram monitoradas visualmente durante um período inicial de 60 minutos, não sendo observadas quaisquer mudanças de coloração no meio. Após um intervalo de 48 horas, uma nova avaliação foi conduzida. Conforme ilustrado na figura 12, foi possível constatar coloração azulada na amostra controle, que continha suspensão enzimática. Este resultado indica uma atividade enzimática significativa, evidenciada pela reação com o substrato X-Gal.

Figura 12. Comparação de sinal colorimétrico em amostras com células lisadas mecanicamente e células integras após incubação com X-Gal.



E- Amostras com solução celular; **F-** Amostra com suspensão enzimática.

Fonte: Autores.

A amostra tratada com o tampão lisante específico e contendo a solução celular com concentração de 10^9 células/mL também apresentou coloração azulada após o mesmo período de incubação. No entanto, a intensidade dessa coloração foi visivelmente menor em comparação com a amostra controle, o que pode sugerir uma menor eficiência na lise celular ou na atividade enzimática, possivelmente devido à composição do tampão lisante utilizado, conforme discutido nas Seções 3 e 4. As avaliações realizadas com celulose fluff e superabsorvente, que refletem a composição das fraldas, mostraram perspectivas interessantes para o biossensor, uma vez que não houve inativação da enzima no meio e foi observado um sinal azulado após 48 horas de reação. Esse resultado sugere que a enzima manteve sua atividade e a detecção é possível mesmo após um período prolongado. Contudo, é

importante ressaltar que o sinal mais intenso foi observado na amostra lisada mecanicamente, indicando que a eficácia da lise pode influenciar significativamente o desempenho do biossensor. A diferença no sinal entre as amostras sugere que o método de lise aplicado pode não ser ideal para todas as situações. Portanto, como discutido nas Seções 3,4; é necessário investigar alternativas de lise que não apenas sejam viáveis, mas também proporcionem tempos de reação mais curtos e maior eficiência. Tais alternativas devem ser avaliadas quanto à sua capacidade de liberar as enzimas de forma eficiente, sem comprometer a estabilidade dos compostos utilizados no biossensor. A implementação de métodos de lise mais rápidos e eficazes é crucial para otimizar o biossensor e garantir sua aplicabilidade em condições práticas.

4. CONCLUSÃO

A condução dessas análises iniciais proporcionou informações importantes para o desenvolvimento e aprimoramento da metodologia de detecção da enzima β-Galactosidase em células de *Escherichia coli*. Ao estabelecer as condições ideais de contorno, foi possível observar de forma clara a expressão da enzima, evidenciada pela coloração azulada nas amostras, indicando sua presença e atividade. A quantificação das células no meio, juntamente com a determinação dos limites de detecção, ressaltou a eficácia da solução lisante na ruptura celular e a manutenção da atividade da sonda X-Gal.

A análise do comportamento da β-Galactosidase em diferentes valores de pH revelou nuances importantes, destacando a sensibilidade da enzima a variações nesse parâmetro e seu impacto significativo no tempo de reação. Além disso, as avaliações de estabilidade em temperatura ambiente e elevada proporcionaram aprendizados adicionais sobre as condições ótimas de conservação e desempenho da enzima, especialmente em amostras clínicas como a urina.

Entretanto, a possível presença de inibidores na urina representa um desafio adicional a ser superado na aplicação prática da metodologia em amostras reais, exigindo estratégias específicas para mitigar seu efeito na reação enzimática. Esses resultados não apenas validam a viabilidade da metodologia proposta, mas também oferecem uma base sólida para seu aprimoramento futuro, incluindo a otimização das

condições de reação e a avaliação de sua aplicabilidade em contextos clínicos reais e em outros contextos envolvendo a bactéria *E. coli*.

Em suma, estes resultados representam um passo significativo em direção a ferramenta eficaz para a detecção precisa da β-Galactosidase, com potencial impacto nas áreas de diagnóstico clínico e pesquisa biológica.

5. REFERENCIAS

1. Bavanandan S, Keita N. Urinary Tract Infection Prevention and Treatment. Semin Nephrol. 2023 Sep;43(5):151468. doi: 10.1016/j.semnephrol.2023.151468. Epub 2024 Feb 24. PMID: 38403525.

2. Huang L, Huang C, Yan Y, Sun L, Li H. Urinary Tract Infection Etiological Profiles and Antibiotic Resistance Patterns Varied Among Different Age Categories: A Retrospective Study From a Tertiary General Hospital During a 12-Year Period. Frontiers in Microbiology. 2022 Jan 27;12.

3. Zhou Y, Zhou Z, Zheng L, Gong Z, Li Y, Jin Y, Huang Y, Chi M. Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli*: Mechanisms of Infection and Treatment Options. Int J Mol Sci. 2023 Jun 23;24(13):10537. doi: 10.3390/ijms241310537. PMID: 37445714; PMCID: PMC10341809.

4. Alghoraibi H, Asidan A, Aljawaied R, Almukhayzim R, Alsaydan A, Alamer E, Baharoon W, Masuadi E, Al Shukairi A, Layqah L, Baharoon S. Recurrent Urinary Tract Infection in Adult Patients, Risk Factors, and Efficacy of Low Dose Prophylactic Antibiotics Therapy. J Epidemiol Glob Health. 2023 Jun;13(2):200-211. doi: 10.1007/s44197-023-00105-4. Epub 2023 Jun 5. PMID: 37273158; PMCID: PMC10271986.

5. Global Urinary Tract Infection Testing Market Size, Share, Growth Analysis, By Infection Type, By Test Type, By End-user, By Test Kit - Industry Forecast 2024-2031 [Internet]. Giiresearch.com. 2024 [cited 2024 Nov 23]. Available from: https://www.giiresearch.com/report/sky1448334-global-urinary-tract-infection-testing-market-size.html

6. Urinary Tract Infection Testing Market Size: Report, 2023-2028 [Internet]. Knowledge Sourcing Intelligence LLP. 2023 [cited 2024 Nov 23]. Available from: https://www.knowledge-sourcing.com/report/urinary-tract-infection-testing-market

7. Medina M, Castillo-Pino E. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. Ther Adv Urol. 2019;11. doi:10.1177/1756287219832172.

8. Heyde SAH, Nørholm MHH. Tailoring the evolution of BL21(DE3) uncovers a key role for RNA stability in gene expression toxicity. Communications Biology

[Internet]. 2021 Aug 12;4(1):1–9. Available from: https://www.nature.com/articles/s42003-021-02493-4

9. Fraticelli Guzmán NS, Badawy MW, Stockslager MA, Farrell ML, van Zyl C, Stewart S, Hu DL, Forest CR. Quantitative assessment of automated purification and concentration of E. coli bacteria. SLAS Technol. 2023 Aug;28(4):251-257. doi: 10.1016/j.slast.2023.02.004. Epub 2023 Feb 18. PMID: 36804174.

10. Agilent Genomics : Tools - Bio Calculators [Internet]. www.agilent.com. Available from: https://www.agilent.com/store/biocalculators/calcODBacterial.jsp

11. Haase S, McCarthy CB, Ferrelli ML, Pidre ML, Sciocco-Cap A, Romanowski V. Development of a recombination system for the generation of occlusion positive genetically modified *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. Viruses. 2015 Mar 31;7(4):1599-1612. doi: 10.3390/v7041599. PMID: 25835531; PMCID: PMC4411667.

12. Pinto C, Melo-Miranda R, Gordo I, Sousa A. The Selective Advantage of the lac Operon for *Escherichia coli* Is Conditional on Diet and Microbiota Composition. Front Microbiol. 2021;12:709259. doi: 10.3389/fmicb.2021.709259.

13. Mira P, Yeh P, Hall BG (2022) Estimating microbial population data from optical density. PLoS ONE 17(10): e0276040. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276040

14. Godoy AS. Estudos estruturais e funcionais das enzimas beta-galactosidases de bactérias. Instituto de Física de São Carlos – USP, 2016.

15. Tomizawa M, Tsumaki K, Sone M. Characterization of the activity of β-Galactosidase from *Escherichia coli* and Drosophila melanogaster in fixed and non-fixed Drosophila tissues. Biochim Open. 2016 Jun 22;3:1-7. doi: 10.1016/j.biopen.2016.06.001. PMID: 29450125; PMCID: PMC5801911.

16. Sarigul, N., Korkmaz, F. & Kurultak, İ. A New Artificial Urine Protocol to Better Imitate Human Urine. Sci Rep 9, 20159 (2019). https://doi.org/10.1038/s41598-019-56693-4

17. Fernandes S, Geueke B, Delgado O, Coleman J, Hatti-Kaul R. Beta-galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. Appl Microbiol Biotechnol. 2002 Mar;58(3):313-21. doi: 10.1007/s00253-001-0905-4. Epub 2002 Jan 12. PMID: 11935182.

18. Flores SS, Clop PD, Barra JL, Argaraña CE, Perillo MA, Nolan V, et al. His-tag β-Galactosidase supramolecular performance. Biophysical Chemistry. 2022 Feb;281:106739.

19. Ferrão, A.R.; Pestana, P.; Borges, L.; Palmeira-de-Oliveira, R.; Palmeira-de-Oliveira, A.; Martinez-de-Oliveira, J. Quantification of Ions in Human Urine—A Review for Clinical Laboratories. Biomedicines 2024, 12, 1848. https://doi.org/10.3390/biomedicines12081848

20. Pongkwan Sitasuwan, Melendez C, Marinova M, Spruill M, L Andrew Lee. Comparison of Purified β-glucuronidases in Patient Urine Samples Indicates a Lack of Correlation Between Enzyme Activity and Drugs of Abuse Metabolite Hydrolysis Efficiencies Leading to Potential False Negatives. Journal of Analytical Toxicology [Internet]. 2018 Dec 5 [cited 2024 Aug 1];43(3):221–7. Disponível em: https://academic.oup.com/jat/article/43/3/221/5230983

21. Gunda NSK, Dasgupta S, Mitra SK. DipTest: A litmus test for *E. coli* detection in water. Mishra YK, editor. PLOS ONE. 2017 Sep 6;12(9):e0183234.

22. Manzanas C, Morrison E, Kim YS, Alipanah M, Adedokun G, Jin S, et al. Molecular testing devices for on-site detection of *E. coli* in water samples. Scientific Reports [Internet]. 2023 Mar 14;13(1):4245. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-023-31208-4

23. Fukuda N. Apparent diameter and cell density of yeast strains with different ploidy. Scientific Reports [Internet]. 2023 Jan 27;13(1):1513. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-023-28800-z

24. Yang X, Chen H, Zheng Y, Qu S, Wang H, Yi F. Disease burden and long-term trends of urinary tract infections: A worldwide report. Front Public Health. 2022;10:888205. doi: 10.3389/fpubh.2022.888205.

25. Sun JC, Joffe HV. Urinary Tract Infections: The Most Common Inpatient Problems in Internal Medicine, W.B. Saunders, 2007. Pages 278-292, ISBN 9781416032038.

26. Santos MJ, Porcy C, Menezes RAO. Etiology and bacterial resistance profile in urine cultures of patients attended at a public hospital in Macapá-Amapá, Brazil. A cross-sectional study. Laboratório de Microbiologia da Faculdade Estácio de Macapá (AP). Brazil, 2019.

27. National Center for Biotechnology Information (US). Chapter 2, Genetics of Human Aging. In: Handbook of the Biology of Aging [Internet]. Fourth edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2021 [cited 2024 Feb 12]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK582525/>.

28. Najar MS, Saldanha CL, Banday KA. Approach to urinary tract infections. Indian J Nephrol. 2009 Oct;19(4):129-39. doi: 10.4103/0971-4065.59333. PMID: 20535247; PMCID: PMC2875701.

29. Tuttle AR, Trahan ND, Son MS. Growth and Maintenance of *Escherichia coli Laboratory* Strains. Curr Protoc. 2021;1(1):e20. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cpz1.20>.

30. Sola CM, Oliveira PA, Feistel JC, Rezende SM, Cíntia. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. Centro Científico Conhecer. Enciclopédia Biosfera. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/riserver/api/core/bitstreams/891c468e-0fe1-4c71-8dbd-72db96d0dec9/content>.

31. Ferdous S, Dopp JL, Reuel NF. Optimization of *E. Coli* Tip-Sonication for High-Yield Cell-Free Extract using Finite Element Modeling. AIChE J. 2021;67(10):e17389. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/aic.17389>.

32. Bono MJ, Leslie SW, Reygaert WC. Urinary Tract Infection. [Updated on November 28, 2022]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470195/>.

33. Rojek MJ, Walt DR (2014) Observing Single Enzyme Molecules Interconvert between Activity States upon Heating. PLoS ONE 9(1): e86224. doi:10.1371/journal.pone.0086224

34. Zhou J, Argikar UA, Miners JO. Enzyme Kinetics of Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferases (UGTs). Methods in molecular biology. 2021 Jan 1;301–38.

35. Sabrina, Ait, Braham., El-Hocine, Siar., Sara, Arana-Peña., Diego, Carballares., Roberto, Morellon-Sterling., Hossein, Bavandi., Hossein, Bavandi., Diandra, de, Andrades., Diandra, de, Andrades., Jakub, F., Kornecki., Roberto, Fernandez-Lafuente. Effect of Concentrated Salts Solutions on the Stability of Immobilized Enzymes: Influence of Inactivation Conditions and Immobilization Protocol. Molecules, (2021).;26(4):968-. doi: 10.3390/MOLECULES26040968

36. Haase S, McCarthy CB, Ferrelli ML, Pidre ML, Sciocco-Cap A, Romanowski V. Development of a recombination system for the generation of occlusion positive genetically modified *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. Viruses. 2015 Mar 31;7(4):1599-1612. doi: 10.3390/v7041599. PMID: 25835531; PMCID: PMC4411667.

37. Blanco A, Blanco G. Chapter 8 - Enzymes [Internet]. Blanco A, Blanco G, editors. ScienceDirect. Academic Press; 2017. p. 153–75. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128035504000082?via%3Dihub

38. Trimborn L, Hoecker U, Ponnu J. A Simple Quantitative Assay for Measuring β-Galactosidase Activity Using X-Gal in Yeast-Based Interaction Analyses. Current Protocols. 2022 May;2(5).

39. Mattenheimer, H., Maruhn, D. (1992). Preanalytical Treatment of Urine. In: Jung, K., Mattenheimer, H., Burchardt, U. (eds) Urinary Enzymes. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-84313-6_6

40. Bye JW, Falconer RJ. Thermal stability of lysozyme as a function of ion concentration: A reappraisal of the relationship between the Hofmeister series and protein stability. Protein Science. 2013 Sep 20;22(11):1563–70.

41. Zaretckii M, Buslaev P, Kozlovskii I, Morozov A, Popov P. Approaching Optimal pH Enzyme Prediction with Large Language Models. ACS Synthetic Biology. 2024 Aug 28;13(9):3013–21.

42. Tang J, Riley WJ. A chemical kinetics theory for interpreting the non-monotonic temperature dependence of enzymatic reactions. Biogeosciences. 2024 Mar 4;21(5):1061–70.

43. Riccio G, Baroni S, Urbani A, Greco V. Mapping of Urinary Volatile Organic Compounds by a Rapid Analytical Method Using Gas Chromatography Coupled to Ion Mobility Spectrometry (GC–IMS). Metabolites. 2022 Nov 5;12(11):1072–2.

44. Marchetti M, Puglisi R, Cellini B, Dindo M, Marchesani F. Editorial: The role of cofactors in protein stability and homeostasis: Focus on human metabolism. Frontiers in Molecular Biosciences. 2023 Jan 25;10.

REFERÊNCIAS

1. GRAND VIEW RESEARCH. Point of Care (POC) Diagnostics Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Glucose Monitoring, Cardiometabolic Monitoring), By End Use (Hospitals, Homecare), By Region, And Segment Forecasts, 2022 – 2030 [citado em 2024 Nov 14]. Disponível em: https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/point-of-care-poc-diagnostics-industry.

2. GLOBAL INFORMATION. Urinary Tract Infection Testing Market Size, Share, Growth Analysis, By Infection Type, By Test Type, By End-user, By Test Kit - Industry Forecast 2024-2031 [Internet]. 2024 [citado em 2024 Nov 23]. Disponível em: https://www.giiresearch.com/report/sky1448334-global-urinary-tract-infection-testing-market-size.html.

3. PECK J, SHEPHERD JP. Recurrent Urinary Tract Infections. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. 2021 Sep;48(3):501–13.

4. SHAH C, BARAL R, BARTAULA B, SHRESTHA LB. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. BMC Microbiology [Internet]. 2019 Sep 2;19(1):204. Disponível em: https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1587-3.

5. LAXMINARAYAN R, DUSE A, WATTAL C, ZAIDI AKM, WERTHEIM HFL, SUMPRADIT N, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. Lancet Infect Dis. 2013;13(12):1057-1098. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309913703189?via%3Dihub. doi: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

6. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. 2014. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748.

7. NARAYAN KG, SINHA DK, SINGH DK. Escherichia coli. 2023 Jan 1;275-81.

8. BRAZ VS, MELCHIOR K, MOREIRA CG. Escherichia coli as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2020 Dez 21;10:548492.

9. REFERENCE MODULE IN FOOD SCIENCE. Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd ed. Academic Press: Escherichia coli Enterotoxigenic E. coli (ETEC). Elsevier eBooks, p. 728–734, 1 jan. 2014.

10. KIM B, KIM JH, LEE Y. Virulence Factors Associated With Escherichia coli Bacteremia and Urinary Tract Infection. Annals of Laboratory Medicine [Internet]. 2022 Mar 1 [citado em 2024 Mar 15];42(2):203-12. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34635614/.

11. DEVI M. Pathology, Ecology and Infection of E. coli. Research and Reviews Journal of Medical and Health Sciences. 2016;5(3):1-7.

12. CHO S et al. Prevalence and characterization of Escherichia coli isolated from the Upper Oconee Watershed in Northeast Georgia. Plos One. 2018 Maio 8 [citado em 2024 Maio 13];13(5):e0197005.

13. TIRUSEW S, DESTAW D, ABAS M. Global prevalence and risk factors of multidrug resistance Escherichia coli in human and animal samples (2015-2023): A systematic review and meta-analysis. Research Square (Research Square) [Internet]. 2024 Nov 5 [citado em 2024 Dec 21]; Disponível em: https://www.researchsquare.com/article/rs-5287484/v1.

14. SAFITRI Y, GULTOM WR, TOBING DA, DICKY N. Potensi Escherichia Coli Sebagai Resistansi Antibiotik. Algoritma [Internet]. 2024 Jun 21 [citado em 2024 Dec 21];2(5):08-20. Disponível em: https://journal.arimsi.or.id/index.php/Algoritma/article/view/109.

15. SUN JC, JOFFE HV. The Most Common Inpatient Problems in Internal Medicine: Ward Survival. Amsterdam: Sanders; 2007. Capítulo 14 - Urinary Tract Infection; p. 278-292.

16. LI L et al. Design strategies and biological applications of β-Galactosidase fluorescent sensor in ovarian cancer research and beyond. RSC advances. 2024 Jan 1;14(5):3010-3023.

17. KALATHINATHAN P, SAIN A, KRISHNAKANTH P et al. A Review on the Various Sources of β-Galactosidase and Its Lactose Hydrolysis Property. 2023 Mar 2;80(4):122.

18. DAMIN BIS, KOVALSKI FC, FISCHER J, PICCIN JS, DETTMER A. Challenges and perspectives of the β-Galactosidase enzyme. Applied microbiology and biotechnology [Internet]. 2021 Jul 1 [citado em 2021 Jun 1];105(13):5281-98. Disponível em: https://eds.p.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=6&sid=a3c444cf-73f8-48a4-838b-281b9798877d%40redis.

19. LI L, JIA F, LI Y, PENG Y. Design strategies and biological applications of β-Galactosidase fluorescent sensor in ovarian cancer research and beyond. RSC advances. 2024 Jan 1;14(5):3010–23.

20. SCHWAB S, JOBIN K, KURTS C. Urinary tract infection: recent insight into the evolutionary arms race between uropathogenic Escherichia coli and our immune system. Nephrology Dialysis Transplantation. 2017 Mar 15;32(12):1977-83.

21. FLORES-MIRELES AL, WALKER JN, CAPARON M, HULTGREN SJ. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015 [citado em Ano Mês Dia];13(5):269-284. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4457377/pdf/nihms691311.pdf. doi: https://doi.org/10.1038/nrmicro3432.

22. BETA-GALACTOSIDASE: Structure, Function, and Applications in Lactose Metabolism [Internet]. BiologyInsights. 2024. Disponível em: https://biologyinsights.com/beta-galactosidase-structure-function-and-applications-in-lactose-metabolism/.

23. MATTHEWS BW. The structure of E. coli β-galactosidase. Comptes Rendus Biologies. 2005 Jun;328(6):549-56.

24. SWATHI S, ADLINE PS, BOSCO J. Comprehensive insights into UTIs: from pathophysiology to precision diagnosis and management. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology [Internet]. 2024 Sep 24;14:1402941. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11458535/.

25. VASUDEVAN S, SRINIVASAN P, RAYAPPAN JBB, SOLOMON AP. A photoluminescence biosensor for the detection of N-acyl homoserine lactone using cysteamine functionalized ZnO nanoparticles for the early diagnosis of urinary tract infections. J. Mater. Chem. B. 2020;8:4228-4236. Disponível em: https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/tb/c9tb02243k. doi: 10.1039/C9TB02243K.

26. HICKLING DR, SUN T-T, WU XR. Anatomy and physiology of the urinary tract: relation to host defense and microbial infection. Microbiol. Spectr. 2015 Aug;3(4):10.1128. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26350322/. doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0016-2012.

27. ARINZON Z, PEISAKH A, SHUVAL I, SHABAT S, BERNER YN. Detection of urinary tract infection (UTI) in long-term care setting: Is the multireagent strip an adequate diagnostic tool? Arch. Gerontol. Geriat. 2009 Mar-Apr;48(2):227-31. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18314207/. doi: 10.1016/j.archger.2008.01.012.

28. MAMBATTA A, JAYARAJAN J, RASHME V, HARINI S, MENON S, KUPPUSAMY J. Reliability of dipstick assay in predicting urinary tract infection. J. Family Med. Prim. Care. 2015 Apr-Jun;4(2):265-8. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25949979/. doi: 10.4103/2249-4863.154672.

29. CHU CM, LOWDER JL. Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups. Am. J. Obstet. Gynecol. 2018 Jul;219(1):40-51. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29305250/. doi: 10.1016/j.ajog.2017.12.231.