



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus São José dos Campos

MICHELLE CARDOSO

**MICROESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA POR
TRANSFORMADA DE FOURIER: identificação e discriminação
de cepas clínicas de
Candida albicans e *Candida glabrata***



2010

MICHELLE CARDOSO

**MICROESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA POR TRANSFORMADA
DE FOURIER: identificação e discriminação de cepas clínicas de
Candida albicans e *Candida glabrata***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Patologia.

Orientador: Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2010

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2008

C179m Cardoso, Michelle.
Microespectroscopia FT-IR: identificação e discriminação de cepas clínicas de
Candida albicans e *Candida glabrata*./ Michelle Cardoso. __ São José dos
Campos : [s.n.], 2010
77f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia
de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2010.
Orientador: Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira

1. Microespectroscopia FT-IR . 2. Identificação . 3. *Candida albicans* . 4.
Candida glabrata. I. Oliveira, Luciane Dias de. II. Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

iD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio
convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 22 de junho de 2010.

Assinatura:

E-mail: mikafosjc@yahoo.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira (Orientador)
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Dra. Célia Regina Gonçalves e Silva
Universidade de Taubaté - UNITAU

Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

São José dos Campos, 14 de junho de 2010.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Máximo Tadeu Cardoso e
Nilcéia Ramos Cardoso, por me mostrar o caminho correto
e me ensinar o valor do amor e do caráter. Sem o apoio
e a confiança de vocês nada disso teria sido possível.*

*Mãe, tudo que alcancei até hoje foi porque não me deixaste desistir, me
ensinaste a ser forte e não me abater com as dificuldades, sempre me
mostraste em*

QUEM recorrer nesses momentos.

*Pai, sua mansidão me fizeste crescer, e seu apoio em todas as minhas
escolhas sem nunca questionar é que me permitiram ser o que sou hoje.
Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por tudo de bom que
ambos fizeram e ainda fazem por mim.*

À minha avó materna Maria Gonçalves, meu exemplo de fé, pelas orações diárias a Deus em favor à minha vida. Sua força de viver me ajuda a enfrentar os mais difíceis obstáculos.

À minha irmã Márcia Valéria, pelo cuidado, paciência e carinho. Por entender as minhas necessidades e as minhas escolhas.

Ao meu noivo Tiago Sousa, pela cumplicidade e apoio. Obrigada por entender as minhas ausências, pela paciência nos meus momentos de nervosismo, e principalmente por acreditar em mim sempre, suas palavras de incentivo todas as vezes que fraquejei foram imprescindíveis nessa minha caminhada. Sou feliz por tê-lo ao meu lado. Essa conquista é sua também.

*À Professora e Amiga Maria Nadir Gasparotto Mancini (in memoriam).
Pouco foi o tempo de convivência, mas o suficiente para aprender a ter
amor pelo ensino, a desejar
o conhecimento e a buscar a sabedoria. Não foi somente a saudade que
ficou, mas sim o carinho, o respeito e a admiração.
Sempre lembrarei de ti minha querida MESTRE, tu és parte essencial
dessa conquista, isso é o que importa!*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*A Deus, meu Pai celestial, que ouviu todas
as minhas orações e as respondeu
no momento certo.*

&

*A Jesus, meu único e eterno Salvador, que me estendeu as mãos
nos momentos de dificuldade,
nunca me deixando perder a fé.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. José Roberto Rodrigues.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito.

A Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, pela dedicação, pela amizade e pela paciência. Obrigada por confiar em mim e por sempre acreditar que eu era capaz. Sua garra e dedicação me servem de exemplo para continuar a lutar pelos meus ideais.

A Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha, pelo apoio na hora mais difícil e delicada, por ter me amparado no momento em que mais precisei. Suas palavras me trouxeram conforto, confiança e tranquilidade. Sempre me fez acreditar que tudo daria certo.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, por ter permitido que parte desse estudo fosse realizado no laboratório de Microbiologia e Imunologia desta unidade, e por ter autorizado o uso das cepas de leveduras. Agradeço também os conselhos na elaboração dessa dissertação.

A Profa. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante, pelo carinho. Nunca me esquecerei do seu abraço acolhedor no dia mais difícil dessa minha jornada.

Ao Prof. Adj. Luis Antonio Guimarães Cabral e Profa. Adja. Janete Dias Almeida pela oportunidade de frequentar a clínica de Propedêutica Estomatológica, pelos conhecimentos compartilhados e pelo incentivo a ingressar na pós-graduação. Aos amigos Dárcio, Victor, Mônica e Celina, pela convivência na Propedêutica Estomatológica.

A Prfa. Dra. Juliana Campos Junqueira, pelo convívio e disposição em ajudar em momentos de necessidade.

Às Professoras da Disciplina de Patologia, em especial Profa. Dra. e chefe do departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal Adriana Aigotti H. Brandão, pelo convívio, pelos conhecimentos compartilhados e pela amizade.

Aos Professores de todas as disciplinas de graduação e pós-graduação pelo meu crescimento profissional.

Às amigas Rosilene e Marta pelo auxílio no laboratório de microbiologia, pela paciência e disposição em me ajudar. Sem o auxílio de vocês esse trabalho não teria sido possível. E sem a amizade de vocês não teria sido tão fácil.

Aos meus amigos da pós-graduação Tábata, Lilibeth, Ana Paula, Adriana Delgado, Adriana Marchini, Dennia, Cristina Werkman, Carolina Foot, Jônatas, Ana Lourdes, Fernanda, Camila, Karina, Isabel, Fernando e tantos outros pelo convívio, cumplicidade e amizade. A presença de vocês tornou toda essa caminhada mais fácil e apreciável.

Aos meus amigos de graduação, Paula, Tatê, Gleyce, Cris, Carlito e Tamis. A distância e os caminhos opostos nunca foram capazes de nos distanciar. Sei que torceram por mim, e sou grata por isso.

A todos os colegas do laboratório de Microbiologia e Imunologia, pela amizade construída em tão pouco tempo, mas que tornaram meus dias agradáveis e proveitosos no laboratório.

Aos alunos da Univap Mayara, Jéssica, Mayra e Carol por terem me recebido tão bem no período que estive com vocês. Em especial a Ingrid e ao João que sempre se mostram dispostos a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Leandro Raniero por ter me auxiliado na parte experimental desse projeto,

sempre disposto nas horas em que precisei.

Ao Prof. Dr. Airton Abrahão Martin por ter permitido o uso do aparelho de microespectroscopia. Meu muito obrigada, sem essa oportunidade esse trabalho não teria sido possível.

Aos funcionários do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pela dedicação e atenção.

A todas bibliotecárias, representadas por Silvana Alvares.

A todos os funcionários da Faculdade.

A Capes pela concessão de bolsa.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que eu concluísse o mestrado. Sou extremamente grata, pois nos momentos mais difíceis não faltaram pessoas que me apoiassem e que acreditassem em mim. O meu muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ssp	= Espécies
TG	=Tubo germinativo
CA	= CHROMOagar
BA	= BiGGY (meio de cultura diferencial)
AID	= Albicans ID2 agar
C.	= <i>Candida</i>
FT-IR	= Infravermelho por transformada de Fourier
DNA	= Ácido desoxirribonucleíco
RNA	= Ácido ribonucleíco
cm ⁻¹	= Centímetro retrógrado
M.	= <i>Mycobacterium</i>
pH	= Potencial de hidrogênio iônico
°C	= Graus Celsius
µm	= Micrometro
µL	= Microlitro
mm	= Milímetro
PCR	= Reação em cadeia de polimerase
PHB	= Poly-β-hidroxibutírico
RAPD	= <i>Randomly amplified polymorphic DNA</i>
RFLP	= <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
PFGE	= <i>Pulsed Field gel eletrophoresis</i>
HIV	= <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
%	= Porcentagem
ATCC	= <i>American type culture collection</i>
CaF ₂	= Fluoreto de Cálcio
n	= Número

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Métodos convencionais para identificação de leveduras do gênero <i>Candida</i>	16
2.2 Métodos moleculares para identificação microbiológica.....	21
2.3 Espectroscopia no infravermelho.....	25
2.4 Espectroscopia FT-IR na microbiologia.....	28
3 PROPOSIÇÃO.....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 Origem das cepas.....	43
4.2 Preparação das amostras.....	44
4.3 Registro do espectro.....	47
4.4 Processamento dos dados e análise estatística.....	49
5 RESULTADOS.....	51
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO.....	68
8 REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO A.....	76
ABSTRACT.....	77

Cardoso M. Microespectroscopia FT-IR: identificação e discriminação de cepas clínicas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2010.

RESUMO

A técnica da espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FT-IR) vem sendo largamente empregada como uma abordagem rápida e simples para a identificação de microrganismos, incluindo a do gênero *Candida*. A proposta deste estudo foi avaliar o emprego da microespectroscopia FT-IR na identificação e discriminação de 5 cepas clínicas de *Candida albicans* e 3 de *Candida glabrata*, as quais foram identificadas previamente por meio de métodos convencionais, e mais duas cepas ATCC de cada espécie. As amostras foram analisadas em triplicata, a partir de culturas independentes, por meio de filmes finos obtidos da suspensão em solução salina estéril a 0,85% da biomassa da colônia que ficou incubada por 24 horas em placas com ágar Saboraud Dextrose. Dez espectros com 32 varreduras foram obtidos na forma de ponto em 10 regiões selecionadas aleatoriamente nas amostras. A média foi obtida dos dez espectros de cada amostra para a análise estatística multivariada, dada pela análise de *cluster*. Além disso os espectros foram transformados em primeira derivada e três janelas espectrais foram determinadas ($900-1250\text{ cm}^{-1}$, $1300-1600\text{ cm}^{-1}$, $2800-3000\text{ cm}^{-1}$). A representação dos resultados foi dada pela construção de um dendograma. Nesse, foi possível separar em dois grupos distintos as duas espécies de *Candida* estudadas. Dessa forma, pode-se concluir que a microespectroscopia FT-IR foi capaz de identificar e discriminar cepas clínicas de *Candida albicans* e de *Candida glabrata*, sendo um método promissor para identificação de leveduras.

Palavras-chave: Microespectroscopia FT-IR. Identificação. *Candida albicans*. *Candida glabrata*.

1 INTRODUÇÃO

Em análises de rotina, métodos de identificação de microrganismos são baseados na assimilação e reações de fermentação de carboidratos e morfologia. Entretanto, embora aplicados largamente, esses testes apresentam várias limitações, pois consomem tempo e para algumas espécies consideradas próximas, não são tão acuradas. Dessa forma, a combinação de vários métodos é necessária para alcançar a identificação correta entre as espécies (Barnett et al., 1990; Lacaz et al., 1998). Normalmente para a identificação de espécies de leveduras do gênero *Candida*, mais de cinco dias podem ser esperados entre o recebimento do material do paciente e a apresentação dos resultados de identificação para o clínico. Além disso, esses métodos não podem ser universalmente utilizados para a tipagem de cepas de *Candida* de mesma espécie. Todas essas limitações podem trazer prejuízos no diagnóstico clínico do paciente, e conseqüentemente a não instituição da terapêutica correta pode acarretar em um pobre prognóstico da doença, devido à seleção de microrganismos resistente ao medicamento (Araujo et al., 2005).

Essas limitações têm permitido avanços no desenvolvimento da biologia molecular como ferramenta em sistemas de identificação de espécies e subespécies. No entanto, trata-se de técnicas de custo elevado e que necessitam de pessoal especializado, tanto para execução dos procedimentos, quanto para a análise dos dados, que freqüentemente são complexos (Xu et al., 2002)

Uma diferente abordagem baseada em técnicas de espectroscopia ótica tem sido proposta para identificação de *Candida* ssp., sendo um método considerado de fácil execução, o qual não

necessita de reagentes ou corantes, é rápido e permite a obtenção de excelentes resultados empregando pequenas quantidades de biomassa da cultura do microrganismo (Sandt et al., 2000; Maquelin et al., 2003; Choo-Smith et al., 2003). É uma técnica baseada na absorção da radiação infravermelha pelas ligações moleculares de compostos presentes nas estruturas das células, como proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucléicos. Essa absorção é responsável por caracterizar a composição bioquímica de vários sistemas biológicos complexos como os microrganismos e fornece “*fingerprint*” altamente específico para cada espécie de microrganismo (Naumann, 2000).

Nesse contexto, torna-se interessante analisar a aplicação da microespectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FT-IR) na identificação e discriminação de cepas clínicas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, identificadas previamente por meio de técnicas convencionais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Métodos convencionais para identificação de leveduras do gênero *Candida*

Geralmente os sistemas rotineiros de identificação das leveduras são baseados nas características fenotípicas desses microrganismos. O perfil morfológico, enzimático, fisiológico e bioquímico dessas células compõe um conjunto de métodos, com os quais os laboratórios de pesquisa (Huppert et al., 1975; Al-Abeid et al., 2004) lançam mão para a rotina de identificação de isolados de espécies de *Candida* e a escolha de um deles é determinada pelo nível de identificação requerida, número total de amostras examinadas e recursos disponíveis no laboratório (Spolidorio et al., 2009). Entretanto, esses métodos convencionais apresentam limitações, uma vez que não são capazes de identificar claramente certas espécies, podendo muitas vezes ocorrer resultados falsos negativos e falsos positivos. Além disso, são técnicas trabalhosas já que, vários testes, um complementando o outro, devem ser realizados para identificação final das espécies (Heelan et al., 1996; Verweij et al., 1999; Yucesoy et al., 2001) e o período que se leva para conseguir realizar a identificação desde o recebimento do material do paciente e toda a análise da amostra gira em torno de aproximadamente 5 dias (Yucesoy et al., 2005). Outro fator limitante é o custo que envolve certos métodos, que embora possam ser mais rápidos acabam não sendo utilizados devido a não disposição dos mesmos em certos laboratórios. Essa questão é de alta relevância nos casos de identificação em grande escala (Fenn et al., 1999; Verweij et al., 1999).

O perfil morfológico é baseado nas características que as colônias tomam ao crescer em certos meios de cultura. O isolamento das cepas de *Candida* ssp. é feita a partir de meios de culturas chamados de seletivos, e o mais comumente usado é o ágar Sabouraud Dextrose suplementado com cloranfenicol. Nesse meio de cultura a maioria das espécies de *Candida* apresenta coloração branca ou branco-amarelada, forma convexa, aparência lisa e opaca, úmida e cremosa e com odor característico. No entanto, essa abordagem não é capaz de fornecer identificação entre as espécies, mas tem somente a função de permitir o crescimento seletivo das leveduras, já que não ocorre o crescimento de células bacterianas devido à complementação do meio com agentes antibacterianos (Spolidorio et al., 2009).

O crescimento das colônias em meio ágar ainda pode servir de técnica para a diferenciação entre algumas espécies de *Candida*. Isso é possível a partir dos meios chamados de diferenciais, ou seja, quando é adicionado no meio de cultura algum substrato cromogênico ou fluorogênico, os quais são hidrolisados por enzimas específicas das células que permite a identificação macroscópica de *Candida* ssp. baseado na coloração ou fluorescência das colônias. O perfil morfológico também é fundamentado na observação de estruturas microscópicas, como habilidade de algumas espécies em formar tubo germinativo (TG) e produzir clamidoconídio. Embora o teste do TG seja considerado rápido, apresenta suas limitações, pois pode permitir resultados falsos positivos e falsos negativos, assim como o teste da produção de clamidoconídio. Sendo assim, métodos adicionais, baseados em outros perfis como, por exemplo, o bioquímico, é utilizado (Barnett et al., 1990; Lacaz et al., 1998). Dessa forma, são abordados testes de assimilação e fermentação de carboidratos, apresentados geralmente na forma de kits (Louvois et al., 1979).

Em 1962, Mackenzie avaliou o teste de formação de TG na identificação de 163 isolados *C. albicans*. Além disso, avaliou os

fatores responsáveis por um provável resultado falso negativo para esse teste. Os resultados mostraram que houve formação dessa estrutura em 95% dos isolados e ainda, achados falsos negativos para TG podem ocorrer em condições inapropriadas, como uma inoculação com grande carga microbiana no meio usado para esse teste. Dessa forma, o autor concluiu que o teste de formação de TG embora permita o diagnóstico presuntivo de *C. albicans*, outros testes como, formação de clamidoconídio e assimilação e fermentação de carboidratos devem ser realizados quando houver identificação positiva e na diferenciação de outras *Candida* spp.

Helan et al. em 1996, avaliaram a identificação de *C. albicans* por meio do perfil enzimático dessas leveduras utilizando três métodos comerciais e compararam com os resultados obtidos pelo teste do TG. Nesse contexto, 113 isolados de leveduras foram incluídos na pesquisa, dos quais 55 foram identificados como *C. albicans* por meio da formação de TG e teste de fermentação e assimilação de carboidrato. Quando submetidos ao teste enzimático, foi alcançada uma completa correlação com os resultados encontrados para TG e o teste bioquímico. No entanto, com relação a outras espécies, houve dois casos de resultados falsos positivos para os testes enzimáticos. Os autores concluíram que a rapidez com que se detém a identificação, principalmente de *C. albicans*, por esses testes enzimáticos é uma vantagem para esse tipo de abordagem comparado com o teste de TG, no entanto, o seu valor de reprodutibilidade depende de uma série de fatores. Ainda, como forma de identificação definitiva das espécies, o emprego das análises bioquímicas é indispensável.

A identificação de *C. glabrata* por meio de métodos comerciais, os quais avaliaram o perfil bioquímico dessas células, foi realizada por Fenn et al. em 1999. Os autores constataram resultados falsos negativos para os quatro testes. Dessa forma, concluíram que nos casos de resultados falsos negativos, outras abordagens devem ser

realizadas com o objetivo de alcançar uma identificação final desses casos.

Foongladda et al. (2002) compararam a performance de um teste seletivo para *Candida* e os métodos convencionais de formação de clamidoconídio, formação de TG e fermentação de carboidratos na identificação de 420 isolados clínicos. De acordo com os resultados, dos 420 isolados, 283 (63,38%) eram *C. albicans*, dos quais 282 (99,64%) foram determinados pelo teste seletivo para *Candida*. Os outros 134 isolados puderam ser identificados ao nível de espécies por meio dos métodos convencionais, os quais foram identificados como: 59 *C. tropicalis*, 39 *Trichosporon* ssp., 19 *C. glabrata*, 11 *Cryptococcus neoformans*, quatro *C. krusei*, uma *C. guilliermondii*, três *C. stellatoidea* e uma *Rhodotorula*. Resultados falsos positivos para o teste de TG foram encontrados em quatro cepas de *C. tropicalis* e duas de *C. glabrata*. Vinte e cinco cepas de *C. albicans* (8,8%) foram negativas para tubo germinativo. Além disso, resultado falso negativo para o teste seletivo para *Candida* foi constatado para duas cepas de *C. tropicalis*, uma de *C. glabrata* e uma de *Trichosporon* ssp. Nesse contexto, os autores concluíram que o teste seletivo para *Candida* é um método alternativo para a fácil identificação de cepas de *C. albicans*, no entanto, para identificação de outras espécies de *Candida*, deve-se utilizar os métodos convencionais.

Yucesoy et al. (2005) avaliaram três meios diferenciais (CHROMagar *Candida* (CA), BiGGY agar (BA) e Albicans ID2 agar (AID)) na identificação de 215 isolados de leveduras, sendo 133 *C. albicans*, 23 *C. tropicalis*, 8 *C. krusei*, 23 *C. glabrata*, 4 *C. kefyr* e 1 *C. guilliermondii*. De acordo com os resultados, a sensibilidade e a especificidade dos testes diferenciais para *Candida* ssp. sob incubação de 24, 48 e 72 horas foram: *C. albicans* em CA (100%, 100% e 100%), BA (99.2%, 91% e 89.5%) e AID (97.7%, 99.2% e 100%); *C. tropicalis* em CA (95.7%, 100% e 100%), BA (17.4%, 87% e 91,3%); *C. krusei* em CA (100%, 100% e

100%), BA (0%, 100% e 100%); *C. glabrata* em CA (15%, 90% e 90%) e em BA essa espécie foi facilmente reconhecida, pois foi uma espécie que cresceu fracamente dando colônias pequenas de coloração marrom claro. Além disso, foram realizados testes de formação de TG seguidos de testes bioquímicos como forma de controle dos resultados da identificação obtidos pelos métodos diferenciais testados. Dessa maneira, os autores concluíram que o uso dos testes CA e AID são confiáveis na identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. albicans*. E, ainda, a baixa sensibilidade e especificidade do teste BA para a identificação de *Candida* ssp. comumente isoladas limita sua utilização clínica.

Em 2005, Araujo et al. também realizaram identificação de 53 isolados de leveduras de 120 amostras de urina de pacientes hospitalizados. Para tanto, esses autores utilizaram métodos convencionais como morfologia da colônia, prova do TG, produção de clamidoconídio e prova de assimilação de carboidratos. Sendo que, para os 53 isolados foram identificadas 34 cepas de *C. albicans*, 07 de *C. tropicalis*, 05 de *C. krusei*, 04 de *C. glabrata* e 03 de *C. parapsilosis*. O principal objetivo do estudo foi avaliar a utilização do meio de CHROMagar na identificação presuntiva de *Candida* ssp. Como resultado, os autores encontraram que dentre os 34 isolados de *C. albicans* que foram cultivados em CHROMagar *Candida*, 88,2% (n=30) mostraram características morfológicas e pigmentação das colônias compatíveis com essa espécie, enquanto quatro deles apresentaram-se indefinidos. As espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. parapsilosis* (n=3), *C. krusei* (n=5) e *C. glabrata* (n=4) mostraram 100% de concordância entre os dois métodos. Já *C. tropicalis* teve como resultado 71,4% (n=5). A conclusão desse trabalho foi que a utilização desse meio pode contribuir para uma identificação presuntiva de *Candida* ssp. mas não dispensa a complementação do teste com outros métodos convencionais.

Contudo, a identificação de leveduras do gênero *Candida*

pode ser realizada por diferentes métodos, sendo que em muitos casos um método é complementar ao outro, de modo que estudos devem ser ampliados nesta área a fim de obter métodos de identificação mais rápidos e precisos.

2.2 Técnicas de biologia molecular na microbiologia

Atualmente, no campo microbiológico tem se aumentado o emprego de técnicas de biologia molecular como ferramenta para o diagnóstico dos agentes etiológicos e estudo epidemiológico das principais doenças infecciosas, bem como na identificação e discriminação entre espécies com características fenotípicas semelhantes e até mesmo de difícil cultivo e isolamento. Essa abordagem vem sendo utilizada nos casos em que os métodos convencionais não são capazes de fornecer resultados adequados (Neppelenbroek et al., 2006).

Uma técnica largamente utilizada na identificação microbiana é a chamada reação em cadeia de polimerase (PCR). Esse método possibilita que a identificação seja alcançada mesmo nos casos em que a quantidade de microrganismo é pequena, seja pela dificuldade no cultivo e isolamento do mesmo, ou pela pouca disponibilidade de amostra. É baseada na amplificação de um fragmento do DNA, a partir de iniciadores chamados de *primers*, e pela ação da enzima DNA-polimerase. Após o DNA molde passar por um ciclo de processamento influenciado por diferentes temperaturas (desnaturação 94-96°C, ligação dos iniciadores 30-60°C, e finalmente a síntese de DNA por ação da DNA-polimerase 72°C) repetidas vezes (20 a 30) obtém-se como resultado o aumento exponencial no total de cópias de DNA sintetizado. Ainda baseado nessa metodologia, é possível realizar a amplificação do RNA a partir da sua conversão em DNA complementar pela enzima transcriptase

reversa. Sendo assim a técnica é denominada de (RT)-PCR (Tang et al., 1997).

O uso dessa abordagem na identificação microbiológica revela três importantes fatores que devem ser considerados: 1) seleção da região alvo específica do DNA/RNA para identificar o microrganismo, a partir de seqüências específicas oriundas de base de dados ou por clonagem e seqüenciamento de partes arbitrárias do genoma microbiano, conhecido como DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD); 2) extração do DNA/RNA total da amostra envolvida; 3) método para identificar a presença da região alvo do DNA/RNA da amostra, com auxílio de sondas com seqüências homólogas ao fragmento de DNA/RNA alvo do microrganismo em questão, as quais são marcadas tanto por isótopos radioativos quanto por uma substância quimioluminescente (Atkins, Clark, 2004).

Outras metodologias que possuem como princípio básico o método de PCR também têm sido empregadas no campo da microbiologia com o objetivo de melhorar a performance e sensibilidade dessa técnica na identificação e tipagem dos microrganismos. Dessa forma, podemos destacar o método PCR-*nested*, o qual fornece melhor especificidade dos resultados, pois são realizadas duas etapas de amplificação empregando diferentes *primers* em cada uma delas, sendo assim, devido ao procedimento repetitivo de amplificação, podem ocorrer contaminações da amostra fazendo disso uma desvantagem para essa abordagem. Ainda nesse contexto, é possível realizar a amplificação de vários alvos de DNA molde ao mesmo tempo, por meio da *multiplex* PCR, a qual emprega *primers* com temperaturas semelhantes de anelamento. Ainda a partir da técnica de *broad-range* PCR, a qual utiliza *primers* que reconhecem seqüências conservadas de material cromossômico microbiano, é possível realizar a identificação do microrganismo diretamente em tecidos humanos ou sangue. Isso pode ser aplicado principalmente nos casos em que se exigem procedimentos delicados de

cultura, ou até mesmo patógenos que não são capazes de serem cultivados (Tang et al., 1997; Nikari et al., 2002).

Segundo trabalho feito por Lehmann et al. (1997), RAPD análise permitiu e a identificação e a caracterização genotípica de diferentes espécies de *Candida* e conseqüentemente destacam que essa técnica também pode ser utilizada na tipagem de cepas. Em 2004, Resende et al., também utilizaram em seu estudo, a identificação genotípica em *Candida* ssp. por meio da análise RAPD e compararam com a identificação alcançada pelos métodos convencionais. Dessa forma, o estudo revelou que a técnica molecular exibiu resultados coerentes com os que foram obtidos pelos métodos convencionais.

Uma vez que as metodologias moleculares fazem uso do material genômico para identificar e caracterizar a célula microbiana, é possível alcançar resultados satisfatórios nos estudos de identificação de espécies de microrganismos considerados semelhantes fenotipicamente, e por esse motivo os métodos convencionais não são recomendados para este fim. Uma abordagem utilizada para esses estudos é a utilização de enzimas de restrição para a clivagem do DNA já amplificado pelo método de PCR, o que permite que fragmentos do DNA alvo, denominados de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (restriction fragment length polymorphism – RFLP) sejam obtidos em diferentes tamanhos, os quais podem ser separados quando submetidos à eletroforese de campo pulsátil (PFGE) e posteriormente marcados por uma sonda (Tang et al., 1997; Nikari et al., 2002).

Ahmad et al. (2004), a partir de métodos moleculares isolaram e identificaram cepas clínicas de *C. dubliniensis* em pacientes HIV negativo no Kuwait. Em 2005, Mirhendi et al. também aplicaram a técnica de PCR-RFLP na diferenciação entre as espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, e obtiveram resultados satisfatórios na identificação por este método.

As técnicas de biologia molecular também têm sido

empregadas no estudo epidemiológico das doenças infecciosas, pois diferentemente dos testes fenotípicos tais abordagens são capazes de realizar satisfatoriamente a tipagem das cepas. Em 2001, Vrioni & Matisiota-Bernard realizaram a tipagem molecular de 40 isolados de *Candida* ssp. de pacientes hospitalizados. Nesse estudo, a análise RAPD permitiu alcançar resultados satisfatórios na tipagem das cepas para cada paciente, demonstrando que a infecção por *C. albicans* foi de origem endógena, já a infecção por *C. tropicalis* foi tanto de origem endógena quanto exógena, e em relação à infecção por *C. parapsilosis* foi por contaminação exógena.

Chen et al. em 2004, investigaram o uso de quatro métodos da biologia molecular, baseados nas técnicas de PFGE em 53 isolados de *C. albicans* coletados de 18 hospitais em Taiwan. O estudo revelou que cada método tem seu poder discriminatório e são ferramentas úteis, a partir de diferentes mecanismos de tipagem, no estudo epidemiológico da infecção por *Candida*.

Um estudo realizado por Xavier et al. (2008), objetivou a tipagem molecular de 25 amostras clínicas de *Candida* ssp. isoladas de crianças com candidemia, internadas na unidade de terapia intensiva neonatal de um hospital universitário entre 1998-2006. Por meio da técnica de RAPD-PCR, 11 padrões genéticos puderam ser distintos, e apenas em dois casos foi observada relação epidemiológica.

Nesse contexto, a biologia molecular tem se mostrado como uma ferramenta promissora no campo microbiológico, quando aplicada em casos que a metodologia convencional de identificação, discriminação e caracterização microbiana apresentam resultados inapropriados. Embora seja possível adquirir resultados rápidos com as técnicas, estudos empregando as técnicas moleculares têm apontado desvantagens nessas abordagens. As principais são em relação ao custo dos materiais empregados como, por exemplo, dos *primers*, a complexidade na interpretação dos dados, bem como a complexidade

metodológica dos procedimentos e a necessidade de pessoas preparadas e experientes na manipulação e realização dos procedimentos.

Xu et al. (2002), compararam os resultados da identificação de *Candida* spp pela técnica de PCR com as obtidas pelo API 20 C, e observaram que a técnica molecular foi coerente com a do método convencional, mas salientou que todos os isolados de *C. albicans* devem ser analisados genotipicamente para identificação de *C. dubliniensis*. Ainda nesse estudo, os autores fizeram um levantamento sobre as vantagens e desvantagens da técnica de biologia molecular em comparação com o teste API. Dessa forma, foi destacado que esse último requer um tempo de 72 h para fornecer os resultados da identificação, diferentemente do que é exigido pelo método molecular, que é de aproximadamente 20 h. No entanto, o custo e a complexidade do método molecular diminuem sua aplicabilidade nos laboratórios de rotina diagnóstica.

Diante dessas desvantagens, técnicas rápidas, sem custos elevados, que proporcionem resultados reprodutíveis e de baixa complexidade dos procedimentos laboratoriais devem ser estudadas, a fim de melhorar e facilitar o diagnóstico dos agentes etiológicos das principais doenças infecciosas.

2.3 Espectroscopia no infravermelho

O processo de interação entre a radiação eletromagnética e a matéria é analisado pela espectroscopia, e o registro dessa interação é dado pelo espectro. Essa análise tem como um dos principais objetivos obter informações relevantes sobre a estrutura atômica e/ou molecular da matéria. De um modo geral, a incidência da radiação sobre alguma molécula pode gerar uma transição entre os estados energéticos da

mesma, de acordo com o valor de energia da radiação eletromagnética incidente sobre essa molécula. As transições entre os estados ocorrem diferenciadamente, os quais podem ser divididos em: transições eletrônicas, vibracionais e/ou rotacionais. Para análise de cada um desses tipos de transições é utilizada uma técnica específica como se segue: Espectroscopia de Absorção Eletrônica, Espectroscopia Raman, Espectroscopia no Infravermelho, dentre outras (Oliveira, 2001).

As moléculas, sendo elas diatômicas ou poliatômicas, apresentam modos vibracionais envolvendo as ligações químicas, esses modos vibracionais podem se dar por meio do aumento da distância entre átomos e/ou através da deformação dos ângulos formados pelos átomos. Dessa forma, a radiação eletromagnética ao interagir com essas ligações, pode ser absorvida e conseqüentemente esses movimentos vibracionais serem interpretados por meio da espectroscopia no infravermelho. Para tanto, a interpretação desses movimentos vibracionais só é possível quando ocorre variação no momento dipolo elétrico das ligações entre os átomos presentes na molécula estudada. Resumindo, as bandas espectrais de absorção no infravermelho são a interpretação dos movimentos vibracionais das ligações presentes nas moléculas e a sua interação com a luz infravermelha (Luz et al., 2003; Stuart, 2004).

A radiação infravermelha estende-se da região da luz visível até sobreposições das microondas, e, portanto, trata-se de valores convenientes de 10.000 cm^{-1} a 10 cm^{-1} em unidades de número de ondas (Naumann, 2000).

A técnica da espectroscopia de absorção no infravermelho é baseada na coleta dos dados a partir da variação na freqüência da luz infravermelha monocromática. Contudo, há maior gasto de tempo para a obtenção dos dados, pois as medições são realizadas a partir de uma freqüência após a outra, bem como, um alto custo na construção do monocromador utilizado nesse método. Como forma de aprimorar essa técnica, a espectroscopia no infravermelho por

transformada de Fourier (FT-IR) tem sido utilizada. Nesse contexto, a radiação eletromagnética no infravermelho em todos os comprimentos de onda encontrados nessa faixa é guiada através de um interferômetro do tipo Michelson. Os dados são coletados na forma de interferogramas, e o espectro infravermelho é obtido a partir da transformada de Fourier desse interferograma. Com isso, a espectroscopia FT-IR tem aumentado drasticamente a qualidade dos dados coletados, pela melhoria dos espectros obtidos, e pela diminuição do tempo de obtenção desses dados (Schmitt; Flemming, 1998; Luz et al., 2003; Hins, 2007; Giarola, 2007).

O espectro infravermelho é a diferença de intensidade da radiação infravermelha registrada antes e depois da passagem através da amostra, ou seja, o quanto de radiação eletromagnética foi absorvido, gerando assim o grau de absorbância (Beekes et al., 2007). Sendo que, a partir de frequências características, intensidades e larguras de bandas no espectro infravermelho, esse método analítico é capaz de identificar grupos funcionais, caracterizar a conformação estrutural molecular e fornecer informações sobre os constituintes (proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, polissacarídeos e etc) do material analisado (Naumann 2000; Beekes et al., 2007). Dessa forma, essa técnica tem sido largamente utilizada na indústria e na pesquisa científica, envolvendo uma ampla faixa de estudos biológicos, no que se refere a investigações clínicas de tecidos de colo de útero, pulmonar, mamário, gastrintestinal, linfócitos, linfomas não Hodgkin, células tumorais, próstata, cólon, fibroblastos, DNA, drogas anticâncer, detecção de células cancerígenas, mensuração de glicose, tecido ósseo e identificação de espécies e cepas de microrganismos (Movasaghi et al., 2008).

2.4 Espectroscopia FT-IR na microbiologia

A aplicação da espectroscopia FT-IR na microbiologia foi relatada pela primeira vez há mais de 60 anos, mas foi entre as décadas de 80 e 90 que essa nova técnica tornou-se uma ferramenta emergente no campo das análises microbiológicas (Naumann, 2000; Sandt et al., 2006).

De acordo com alguns autores, é um método que pode ser completamente automatizado (Sandt et al., 2006), sendo considerado simples, uma vez que não se faz necessário o emprego de reagentes, nem a adição de corantes ou rótulos para a mensuração espectral (Maquelin et al., 2003; Choo-Smith et al., 2003). Além disso, as análises espectrais são realizadas sem que ocorra modificação na amostra, permitindo que a integridade dos espectros e a química dos microrganismos e tecidos não sejam comprometidas (Schmitt; Flemming, 1998; Beeks et al., 2007).

Em microbiologia, o espectro infravermelho é representado por uma sobreposição de todos os modos vibracionais ativos de várias moléculas presentes na amostra microbiana (Beekes et al., 2007). Essa sobreposição decorre de vibrações moleculares das substâncias poliméricas extracelular, da parede celular, da membrana e do citoplasma das células. Apesar da disponibilidade de várias técnicas de aprimoramento de resolução, ainda não é possível separar completamente um espectro do outro. No entanto, a região entre 4000 e 500 cm^{-1} , conhecida como região espectral infravermelho médio, detém bandas características e adequadas para a caracterização dos microrganismos, pois o espectro FT-IR das células intactas reflete grupos funcionais específicos ou ligações de componentes bioquímicos como proteínas, carboidratos, fosfolípidios e ácidos nucleicos, o que pode gerar um espectro com alto conteúdo de informação (Naumann, 2000; Branam;

Wells, 2007). Entretanto, muitos grupos estruturais e funcionais dos diferentes microrganismos são idênticos e geram espectros muito parecidos. Porém, a quantidade e a distribuição desses diferentes grupos funcionais variam entre as cepas microbianas, dessa forma, as bandas dos espectros dos microrganismos podem ser correlacionadas com estruturas definidas (Schmitt; Flemming, 1998). Portanto, os autores definem que o espectro de um dado microrganismo é considerado um tipo de “*fingerprint*” do mesmo (Helm et al., 1991; Ngo-Thi et al., 2003; Rebuffo-Scheer et al., 2007).

O espectro das amostras microbianas, além de fornecer um número de bandas de absorção que descreve a composição molecular dessas células, também é considerado sensível a mudanças estruturais, variações de interações intra e inter molecular, constituição de membrana, interação lipídio–proteína e estado conformacional das diferentes estruturas secundárias das proteínas. O estado físico da amostra, bem como o estado de hidratação ou agregação, interação com íons e assim por diante, tem uma forte influência nos resultados. Sendo assim, uma rigorosa padronização da amostra no que diz respeito às condições de cultura, em particular, o meio de cultura, temperatura de incubação, tempo de cultura da amostra e o processo de aquisição dos dados devem ser obrigatoriamente realizados (Naumann 2000; Maquelin et al., 2003).

A partir do conhecimento de que essa técnica é altamente sensível, e a frequência da luz do espectro resultante fornece informações bioquímicas em relação à composição e estrutura molecular das células. Muitas pesquisas recentemente têm sido propostas no campo da microbiologia. O principal propósito dessas pesquisas é a discriminação, a identificação e a classificação de células microbianas intactas (Mariey et al., 2001; Branam; Wells, 2007).

Nieto et al, em 2004, empregaram a espectroscopia FT-IR para diferenciar cepas da família *Enterobacteriaceae* e os gêneros

Staphylococcus, *Proteus* e *Pseudomonas*. Esses autores definiram janelas espectrais para diferenciar as populações. Logo, para o estudo comparativo foram selecionadas as seguintes regiões espectrais: janela espectral de lipídios (2986 – 2841 cm^{-1}), de carboidratos (1290 – 1180 cm^{-1}) e a denominada de “verdadeiro *fingerprint*” (944 – 805 cm^{-1}). A escolha da primeira janela espectral reflete a distinta composição lipídica das paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas empregadas nesse estudo, enquanto que, na segunda janela, as diferenças se associam com a composição de carboidratos (por exemplo, o polissacarídeo extracelular). Finalmente, a terceira janela reflete características não definidas, associadas, por exemplo, a estruturas quaternárias das proteínas e outras macromoléculas, mas específicas para cada uma das cepas. A partir dos resultados da análise dos grupos descritos em forma de dendograma, os autores encontraram que as cepas estudadas formaram dois grandes grupos, o das bactérias Gram-positivas e o das Gram-negativas, respectivamente, que se uniram a níveis elevados de heterogeneidade. E observaram quatro subgrupos maiores que se associaram com os gêneros estudados. Dessa forma, os autores concluíram que a espectroscopia FT-IR pôde, portanto, classificar os microrganismos em diferentes níveis taxonômicos sem a necessidade de uma seleção prévia por outros critérios. A disponibilidade dos resultados é mais rápida do que com as técnicas moleculares mais modernas, a preparação da amostra é simples e requer uma pequena quantidade de biomassa para as medições. Além disso, esse trabalho demonstrou que as técnicas vibracionais não requerem processamentos especiais das células.

Em 1995, Naumanm et al. realizaram um estudo sobre a espectroscopia como uma poderosa ferramenta analítica na caracterização não invasiva de células microbianas intactas. Nesse trabalho, foram incluídas cepas da família *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Pseudomonas*. Com relação aos dados no

dendograma, dois grupos principais foram separados de acordo com a positividade para a coloração de Gram. Além disso, esses autores identificaram bandas de absorção características no espectro dos microrganismos analisados e constataram janelas de absorções específicas para proteínas celulares ($1500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$), para fosfatos, oligossacarídeos e polissacarídeos da parede celular ($1300 - 800 \text{ cm}^{-1}$).

A fim de classificar as bactérias de acordo com o gênero por meio da espectroscopia FT-IR, Helm et al. (1991) analisaram os 39 espectros de espécies selecionadas do gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Clostridium*. Como resultado, todos *Staphylococcus* analisados foram incluídos em um grupo de mesmo gênero, o qual foi subdividido em 2 subgrupos contendo cepas de espécies coagulase positivas e espécies coagulase negativas. Com relação ao gênero *Streptococcus*, todas as espécies foram agrupadas em um único *cluster*, no entanto, a respeito da afiliação taxonômica para cocos e para bastonetes, respectivamente, os gêneros *Streptococcus* e *Clostridium* não puderam ser completamente separados dentro de dois gêneros distintos. Para os autores, isso pode ter acontecido devido ao fato de que o regime de classificação discutido nesse estudo foi baseado somente nas similaridades espectrais e, portanto, são influenciadas pela janela espectral selecionada. Ainda nesse estudo, os autores analisaram 15 cepas do gênero *Legionella* e obtiveram como resultado a separação em dois *clusters*, ou seja, microrganismos produtores de ácido graxo poly- β -hydroxibutírico e os microrganismos não produtores. Além disso, 139 diferentes espectros de cepas clínicas dos gêneros: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Legionella*, e da família *Enterobacteriaceae* foram investigados de acordo com a positividade para coloração de Gram. Pelo método estatístico de Ward's houve a separação de dois grupos maiores, que exclusivamente continham as cepas Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente.

O aumento da prevalência das doenças infecciosas tem

sido um dos problemas enfrentados pela saúde pública, principalmente em ambiente hospitalar. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 29 das 96 principais causas de morbidade e mortalidade entre humanos estão relacionadas às doenças infecciosas causadas por diversos agentes microbianos. (Uma explicação para esse aumento tem sido dirigido ao fato da não instituição de antibióticos específicos aos microrganismos em questão. Por outro lado, um tratamento empírico por meio de antibióticos de alto espectro é freqüentemente iniciado, enquanto se aguarda a identificação do patógeno. Outras conseqüências da escolha empírica do agente antimicrobiano são os possíveis efeitos colaterais resultantes e a seleção de microrganismos resistentes (Doern et al., 1994). Como forma de contornar essa questão, a rápida identificação possivelmente é um fator importante na decisão terapêutica (Maquelin et al., 2003).

Recentemente, uma técnica paralela à espectroscopia FT-IR tem sido empregada com o propósito de acelerar a diferenciação e identificação dos microrganismos envolvidos nas doenças infecciosas, bem como, analisar a suscetibilidade antibiótica desses patógenos. Nesse método um microscópio de luz está acoplado ao espectrômetro FT-IR, sendo que a técnica é baseada na investigação de microcolônias puras ou mistas, as quais geralmente ainda não são visíveis a olho nu (Naumann, 2000), o que reflete um menor tempo na obtenção de culturas dos microrganismos para a análise de identificação e diferenciação microbiológica (Choo-Smith et al., 2001).

Sandt et al. (2006), em um estudo realizado com 160 cepas de 15 espécies e 9 gêneros de bactérias de isolados clínicos, consideradas clinicamente patógenos relevantes, registraram o espectro das microcolônias bacterianas depois de 6-7 horas e 10 horas de cultura e estabeleceram uma base de dados. Nesse trabalho, os autores, usando a microespectroscopia FT-IR e alguns métodos estatísticos, conseguiram identificar e separar em *clusters* os microrganismos de espécies e

gêneros diferentes.

Em 2007, Rebuffo-Scheer et al. realizaram um estudo objetivando a rápida diferenciação de 10 espécies, por meio da microespectroscopia, entre as 28 cepas do gênero *Mycobacterium* não-tuberculose. Nesse estudo, as microcolônias analisadas alcançaram um diâmetro de aproximadamente 80 a 140 μm , e 435 espectros foram então registrados. Após os dados serem submetidos à análise hierárquica de *cluster*, o dendograma mostrou claramente distintos *clusters* formados por diferentes espécies com a exceção de apenas uma cepa. Além disso, a microscopia FT-IR permitiu também a clara distinção entre micobactérias relacionadas com infecções em seres humanos, como *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. phlei* e *M. chelonae*.

Maquelin et al. (2003), em um estudo clínico prospectivo feito para identificar patógenos causadores de infecções na corrente sanguínea de pacientes hospitalizados, analisaram 138 amostras de sangue, das quais 131 apresentaram contaminação por bactérias. Essas amostras, devidamente preparadas, resultaram em microcolônias cultivadas por um período de 6 a 8 horas. Logo, 121 amostras foram submetidas à análise espectral para a identificação das cepas, o que resultou em 98,3% de acertos na identificação (119 das 121). Dessa forma, esses autores concluíram que a microespectroscopia fornece uma nova resposta para a necessidade de uma rápida identificação microbiana.

Ngo Thi et al., em 2003, estudaram o emprego da microespectroscopia FT-IR como uma nova ferramenta na caracterização dos microrganismos. Para tanto, esses autores utilizaram cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, cultivadas por um período de 6 ou 10 horas dependendo da cepa. De acordo com esse estudo, três janelas espectrais foram selecionadas (3000-2800 cm^{-1} , 1500-1400 cm^{-1} e 1200-900 cm^{-1}), das quais foi possível encontrar três *clusters* separando o espectro de microrganismos Gram-positivos, Gram-

negativos e leveduras, respectivamente. Além disso, todas as quatro diferentes cepas de *S. aureus* puderam ser separadas dentro de *subclusters*. Ainda, o principal objetivo desse estudo, foi investigar os efeitos do antibiótico oxacilina β -lactâmico no espectro FT-IR de cepas de *S. aureus* suscetíveis e cepas de *S. aureus* resistentes a esse agente antimicrobiano. De acordo com os resultados obtidos, foi concluído que a microespectroscopia FT-IR é uma ferramenta capaz de diferenciar entre células sensíveis e células resistentes ao antibiótico, além de identificar a banda (1085 e 1060 cm^{-1}) que pode ser tomada como marcador para monitorar o efeito do antibiótico β -lactâmico sobre *S. aureus*.

Sabe-se que os microrganismos não vivem isolados na natureza, mas coexistem em complexas comunidades multicelulares, por exemplo, colônias, corpos frutíferos, ou biofilme. Sob essas condições, as células devem adaptar-se a condições de limitação de suprimentos nutricionais, mudanças de temperaturas, pH, umidade, etc. Consequentemente, esses fatores podem modificar sua aparência fenotípica e tornar-se diferenciadas dentro de variantes de células especializadas. Com relação a essa variabilidade, alguns estudos, empregando a microespectroscopia FT-IR, têm sido realizados a fim de investigar a homogeneidade e heterogeneidade espacial do crescimento microbiano nas colônias. Ngo Thi; Naumann em 2007 desenvolveram uma técnica para avaliar a heterogeneidade do crescimento celular em macrocolônias microbianas por meio da microespectroscopia FT-IR. Para isto, foram obtidas macrocolônias de três cepas de gêneros diferentes (*Legionella bozemanii*, *Bacillus megaterium* e *Candida albicans*), as quais foram congeladas a -70°C e, em seguida, crioseccionadas em finas fatias de aproximadamente $20\ \mu\text{m}$. Por meio do microscópio acoplado no espectroscópio FT-IR, as amostras foram visualizadas e a partir de uma metodologia elaborada pelos autores as áreas pré-selecionadas das amostras foram analisadas. Três condições diferentes para cada gênero foram avaliadas, respectivamente. Para *Legionella bozemanii*, foi avaliada

a heterogeneidade espacial da produção de ácido Poly- β -hidroxibutírico (PHB), uma molécula encontrada em uma ampla variedade de microrganismos, a qual serve de reserva de energia e fonte de carbono para a sobrevivência das bactérias sob condições desfavoráveis nutricionais. Como resultado, os autores encontraram que a produção de PHB foi observada principalmente dos espectros obtidos das áreas afastadas do meio de cultura, conseqüentemente espectros obtidos das áreas próximas a superfície do meio de cultura foram essencialmente livre de PHB. Essas informações foram alcançadas pela presença ou ausência de picos espectrais da banda em 1738 cm^{-1} , considerada um indicador diagnóstico de PHB. Com relação as macrocolônias de *Bacillus megaterium*, foi avaliada a heterogeneidade espacial da produção de compostos capsulares, exopolissacarídeos, glicoproteínas, ou glicolípidos. A capacidade em produzir esse componente é dada pelo tipo de meio a ser cultivados *Bacillus* ssp, ou seja, meios ricos em açúcar e pobres em nitrogênio, potássio ou fosfatos. De acordo com os resultados, as células das regiões superficiais, afastadas do meio de cultura, continham mais polipeptídeo capsular e polissacarídeo capsular do que as células das regiões próximas à superfície do ágar. Dessa forma, os autores concluíram que a microespectroscopia FT-IR foi capaz de registrar as mudanças espectrais pelas variações de composição dentro das colônias relatadas, no entanto, essas mudanças são extremamente complexas, o que não dispensa o emprego de outras técnicas para se obter dados complementares. Além disso, o estudo revelou que ocorre heterogeneidade espacial na composição das células em crescimento nas colônias mesmo sob condições laboratoriais.

A espectroscopia FT-IR também tem sido empregada em leveduras, principalmente do gênero *Candida*. Alguns trabalhos têm sido realizados no que diz respeito à capacidade de identificação, discriminação, classificação e caracterização desses microrganismos ao nível de gênero e espécies. Além disso, estudos têm sido dirigidos para

avaliação epidemiológica devido à capacidade dessa técnica em distinguir cepas de mesmas espécies.

Sandt et al., em 2003, realizaram um estudo com nove pacientes hospitalizados, dos quais 79 isolados de *C. albicans* foram obtidos para análise epidemiológica por meio da espectroscopia FT-IR. Nesse estudo, os autores utilizaram meios convencionais para a identificação *C. albicans*. No entanto, para avaliar se houve ou não caso de infecção cruzada entre esses pacientes, foi empregado o estudo por meio da espectroscopia. Nesse contexto, foi possível diferenciar nove distintos grupos, um por paciente, sendo que somente um espectro obtido foi misclassificado, ou seja, não foi incluído ao seu respectivo grupo. Além disso, essa técnica foi comparada com os resultados alcançados pela técnica de RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*). De acordo com os autores, essas técnicas têm suas vantagens particulares, pois o método RAPD é menos prejudicado pelas variações das condições de cultura, que são as principais limitações das técnicas fenotípicas. Entretanto, a multiplicidade de passos no protocolo dessa forma de estudo dificulta a reprodutibilidade e a rapidez do mesmo. Já o protocolo da espectroscopia FTIR é simples e envolve menos passos e, ainda, caso haja dúvidas, as amostras podem ser rapidamente re-analisadas sem qualquer custo adicional, uma vez que, uma das vantagens é a capacidade de se realizar o estudo da amostra sem que ocorra qualquer modificação na mesma pela passagem da radiação. Portanto, a partir desse estudo, os autores concluíram que tanto a espectroscopia FT-IR quanto a RAPD foram capazes de mostrar que não houve infecção cruzada entre esses pacientes. Os mesmos também concluíram que a espectroscopia FT-IR é um método de obtenção de dados rápido, de baixo custo, reprodutível e aplicável a qualquer microrganismo passível de ser cultivado e, portanto, pode ser estendido à *Candida* não *albicans*, com quase nenhuma modificação do protocolo.

Em 2007, Essendoubi et al. também empregaram

espectroscopia na investigação epidemiológica e tipagem de 29 isolados de *C. glabrata* de 4 pacientes hospitalizados no mesmo período e 2 em outro período, os quais foram tidos como referência. O principal propósito do estudo foi avaliar a contaminação cruzada nesses pacientes. Esses autores também analisaram isolados de um mesmo indivíduo, no entanto, em regiões anatômicas diferentes, com o objetivo de identificar as janelas espectrais que melhor discriminassem as cepas de acordo com cada paciente. Dessa forma, três regiões espectrais foram determinadas, as quais permitiram que os resultados demonstrassem a distinção de 6 *clusters*, correspondendo, respectivamente, aos quatro pacientes hospitalizados na mesma época e dois aos pacientes tidos como referência. Tal avaliação mostrou que não houve contaminação cruzada entre eles. Sendo assim, os autores concluíram que a espectroscopia FT-IR pode potencialmente servir como uma ferramenta de investigação epidemiológica, usada para identificar e controlar fontes de infecção pela determinação das origens da infecção, as rotas de aquisição, transmissão de cepas e sua persistência.

Para avaliar a capacidade de diferenciação entre espécies de *Candida* usando espectroscopia, Sockalingum et al. (2002) estudaram a abordagem dessa técnica sobre cepas-padrão de cinco espécies diferentes (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*) pertencentes a esse gênero, e 20 isolados de *C. albicans* em pacientes HIV positivos. De acordo com os resultados, a análise espectral foi capaz de definir cinco grupos independentes, sem que houvesse qualquer desencontro nos grupos espectrais.

Ainda com relação ao emprego da espectroscopia infravermelha no estudo de *Candida* ssp. com relevância clínica, Essendoubi et al. (2005) avaliaram essa técnica na rápida identificação de diferentes espécies de microrganismo em vários estágios de crescimento das células. Para tanto, 56 cepas clínicas de diferentes espécies (10 de *C. albicans*, 10 de *C. glabrata*, 10 de *C. krusei*, 9 de *C. kefyr*, 10 de *C.*

parapsilosis e 7 de *C. tropicalis*) foram analisadas em culturas de 24 horas por meio da espectroscopia e também em culturas de 10 e 18 horas (dependendo da espécie) por meio da microespectroscopia. Para a realização da análise hierárquica de *cluster*, as janelas espectrais que melhor discriminavam uma espécie da outra foram selecionadas. Na avaliação das culturas puras das cepas obtidas em 24 horas, seis grupos correspondendo a cada espécie estudada puderam ser estabelecidos. Entretanto, três cepas de *C. krusei*, duas cepas de *C. glabrata*, uma cepa de *C. parapsilosis* e duas cepas de *C. kefyr* foram desclassificadas em relação aos seus respectivos grupos. Nesse contexto, os autores elegeram outras janelas espectrais para que alcançassem um aumento na taxa de classificação, com isso, ocorreram 100% de identificação exata para o estudo de cepas de *Candida* ssp. Com relação à análise microespectroscópica das colônias medindo aproximadamente 50 a 250 µm obtidas em 10 e 18 horas, também foi possível separar seis grupos de acordo com as espécies, e essa discriminação alcançou 100% de exatidão. Dessa forma, os autores concluíram que as duas metodologias abordadas são capazes de identificar diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida*, sendo que, a microespectroscopia é uma técnica viável na identificação rápida de colônias pequenas, revelando sua capacidade em gerar dados ainda que com pouca biomassa disponível. No entanto, esses autores salientaram que os resultados alcançados com a microespectroscopia se devam a severa padronização da metodologia na obtenção das culturas e dos dados.

Nesse mesmo contexto, Toubas et al., em 2007, também avaliaram o emprego da técnica de espectroscopia e microespectroscopia FT-IR na discriminação de três espécies: *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* sob condições de cultura de 24 horas, 10 e 18 horas (dependendo da espécie). Além disso, esses autores ainda analisaram a capacidade dessa metodologia na tipagem das cepas de *Candida* ssp, como forma de avaliação epidemiológica em pacientes hospitalizados. De

acordo com os resultados alcançados, tanto para metodologia abordada para cultura de 24 horas, quanto para cultura de 10 e 18 horas, foi possível discriminar três grupos, os quais foram associados com as respectivas espécies. Para o estudo epidemiológico foram obtidos 17 isolados clínicos de *C. albicans* em diferentes sítios anatômicos de cinco pacientes, nove de *C. glabrata* em diferentes sítios anatômicos de três pacientes e 14 de *C. parapsilosis* em diferentes sítios anatômicos de quatro pacientes. Além de duas cepas de *C. albicans* tomada como referência. Os resultados mostraram que a técnica permitiu que uma boa tipagem das cepas fosse alcançada, uma vez que, todos os isolados analisados foram incluídos no *cluster* dos respectivos pacientes. Dessa forma, concluíram que não houve infecção cruzada entre os pacientes.

A avaliação dessa nova abordagem na identificação de espécies estreitamente relacionadas como ocorre entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* foi realizada por Tintelnot et al. (2000). Esses autores avaliaram marcadores fenotípicos para a seleção e identificação dessas duas espécies de *Candida*. Dentre esses marcadores, foi incluída a espectroscopia FT-IR, que, de acordo com os resultados, foi capaz de separar as duas espécies em *clusters* individuais. Dessa forma, os autores concluíram que as informações contidas no espectro FT-IR são suficientes para alcançar a diferenciação fenotípica entre essas duas espécies estreitamente relacionadas.

A espectroscopia FT-IR também tem se mostrado sensível às mudanças metabólicas e fenotípicas das leveduras do gênero *Candida*. Nesse contexto, Adt et al. (2006) estudaram a espectroscopia FT-IR como uma potencial ferramenta para análise das modificações estruturais entre *C. albicans* na forma de blastosporo e na forma de hifas, e ainda, avaliaram o potencial do FT-IR na tipagem rápida de *C. albicans* utilizando a forma hifal. Sendo assim, os espectros foram obtidos de culturas puras dessa espécie de *Candida* apresentando as duas formas fenotípicas. Esses autores elegeram três regiões espectrais para analisar as

modificações estruturais como se segue: 950-1185 cm^{-1} , 1480-1720 cm^{-1} e 2840-3000 cm^{-1} , correspondendo, respectivamente, absorções de polissacarídeos, proteínas e lipídios. De acordo com os resultados obtidos, quando comparado com blastoporo, para a hifa houve um aumento (45%) do conteúdo protéico e uma diminuição de polissacarídeos (20%) e ácidos graxos (10%). Além disso, cada região espectral selecionada foi analisada detalhadamente, com isso puderam caracterizar as mudanças moleculares e estruturais do conteúdo discriminado por essas janelas espectrais tanto para a forma hifal quanto para forma de blastoporo. Com relação à identificação rápida entre essas duas apresentações fenotípicas da *C. albicans*, uma análise hierárquica de *cluster* foi realizada, e conforme os resultados espectrais, foi possível separá-las em dois grupos, respectivamente. Esse fato mostrou que a técnica FT-IR também foi eficiente na discriminação e identificação de *C. albicans* na forma hifal. Com isso, os autores concluíram que a identificação por espectroscopia FT-IR pode ser implementada em dois estágios, uma para rápida identificação de 7 horas usando hifas, seguido por um teste de confirmação com blastoporo em 24 horas.

A fim de explorar o potencial da microespectroscopia FT-IR no estudo de microcolônias intactas e individuais, e ainda, especificar regiões dentro das mesmas, Orsini et al. (2000) estudaram o espectro de *C. albicans*. Assim, as análises espectrais foram obtidas depois de 12 horas de crescimento das colônias, as quais tinham entre 100 e 300 μm de diâmetro. Três regiões da colônia foram avaliadas: o centro, região intermediária e periferia e, de acordo com os espectros obtidos, observou-se importantes diferenças entre as três regiões da colônia, principalmente em relação à forma espectral da banda entre 1200 e 900 cm^{-1} e na intensidade relativa das mesmas, bem como entre as bandas de absorção de proteínas (amido I 1655 cm^{-1} e amido II 1547 cm^{-1}). Os autores acreditam que a possível origem dessa heterogeneidade dentro das colônias seja atribuída a diferenças metabólicas e idade das células em

diferentes regiões. Portanto, foi também verificado por meio da FT-IR o crescimento das microcolônias de *C. albicans* sob diferentes concentrações de dextrose, dessa forma, foi observada a ocorrência de diferenças espectrais entre as colônias. Além disso, foi também verificada a diferença metabólica entre as células em diferentes partes da colônia, dessa forma, foi demonstrado que houve diferenças em relação à ingestão desse açúcar entre as células da periferia e da região central das colônias. Sendo assim, os autores concluíram que a heterogeneidade encontrada dentro de microcolônias individuais pode ser relacionada com as diferentes concentrações de ingestão de açúcar entre as células da periferia e do centro da colônia.

Assim, a microespectroscopia FT-IR é uma nova e rápida ferramenta no estudo das alterações metabólicas das células, principalmente na função de ingestão de glicose, ou seja, uma técnica altamente sensível a qualquer mudança no estado celular, seja ao nível de parede, como ao nível de processos fisiológicos que ocorram dentro do citoplasma das células, sendo interessante ampliar os estudos utilizando microespectroscopia FT-IR na identificação de microrganismos, a fim de otimizar os procedimentos laboratoriais e agilizar os processos de identificação microbiana por métodos mais rápidos e menos dispendiosos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a microespectroscopia infravermelha por transformada de Fourier na identificação e discriminação entre cepas clínicas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, identificadas inicialmente pelos métodos convencionais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem das cepas

Oito cepas clínicas e duas cepas-padrão do gênero *Candida* foram obtidas da coleção de cultura do laboratório de microbiologia e imunologia (LMI) do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” Campus de São José dos Campos, sob autorização (Anexo A). No quadro 1 estão indicadas as cepas de *Candida* empregadas nesse estudo.

Quadro 1 – Cepas do gênero *Candida* empregadas no estudo

Espécie	Fonte	Nº da cepa
<i>Candida albicans</i>	ATCC	18804
<i>Candida albicans</i>	LMI-fosjc	03
<i>Candida albicans</i>	LMI-fosjc	22
<i>Candida albicans</i>	LMI-fosjc	28
<i>Candida albicans</i>	LMI-fosjc	29
<i>Candida albicans</i>	LMI-fosjc	43
<i>Candida glabrata</i>	ATCC	90030
<i>Candida glabrata</i>	LMI-fosjc	57
<i>Candida glabrata</i>	LMI-fosjc	67
<i>Candida glabrata</i>	LMI-fosjc	107

ATCC: *American Type Culture Collection*, LMI-fosjc: cepas pertencentes à coleção de cultura do laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

As cepas estavam armazenadas em geladeira a 4°C em ágar inclinados com Sabourad Dextrose (Difco, Detroit, Michigan, EUA). Um dia antes da análise espectral, as cepas de *Candida* foram semeadas por esgotamento em placas em meio ágar Sabourad dextrose, incubadas à 37°C por 24 horas e examinadas para verificar se não houve contaminação.

4.2 Preparação das amostras

Por meio de duas alçadas (alça de platina com fio de 5 mm de espessura) uma pequena quantidade de biomassa foi cuidadosamente removida das colônias na superfície do meio ágar, suspensas em 120 µL de solução de NaCl estéril a 0,85% (Cloreto de sódio, Cromoline Química, Diadema, São Paulo, Brasil) contidas em tubos de ensaio e homogeneizadas em agitador de tubos (PHOENIX) por 30 segundos. Alíquotas de 5 µL da suspensão foram transferidas para lentes de CaF₂ (medindo aproximadamente 1 centímetro de diâmetro e 0,5 de espessura) e submetidas à secagem em estufa a 50°C por 1 hora. Obtidos os filmes finos, adequados para as medidas em microespectroscopia FT-IR, as janelas de CaF₂ eram depositas em um suporte, conforme ilustrado na figura 01, para posterior assentamento no aparelho de microespectroscopia FT-IR (Figura 02). Antes do procedimento, as lentes de CaF₂ eram lavadas com água e detergente, em seguida desinfetadas com álcool 70% e secas com papel absorvente.

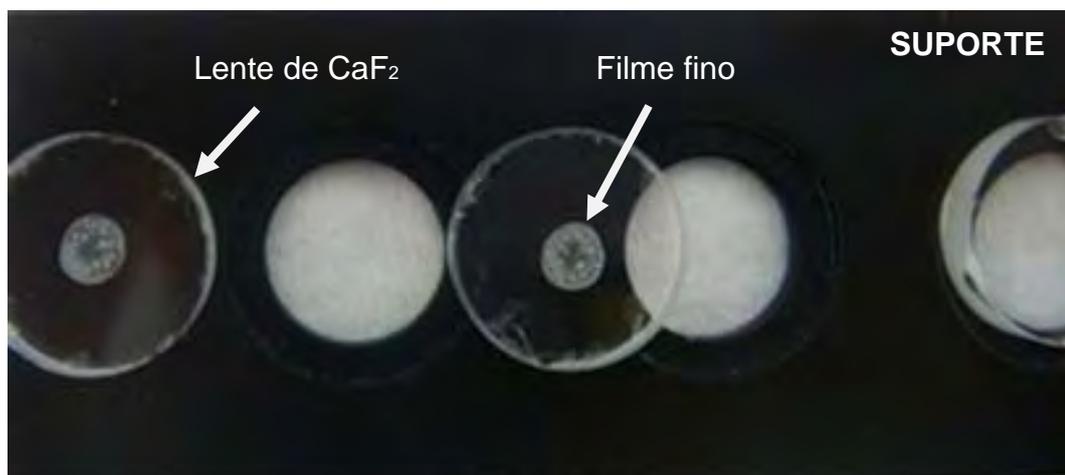


Figura A



Figura B

Figura 01 – (A) Filmes finos e transparentes nas lentes de CaF₂, (B) Lentes de CaF₂ depositadas em suporte.

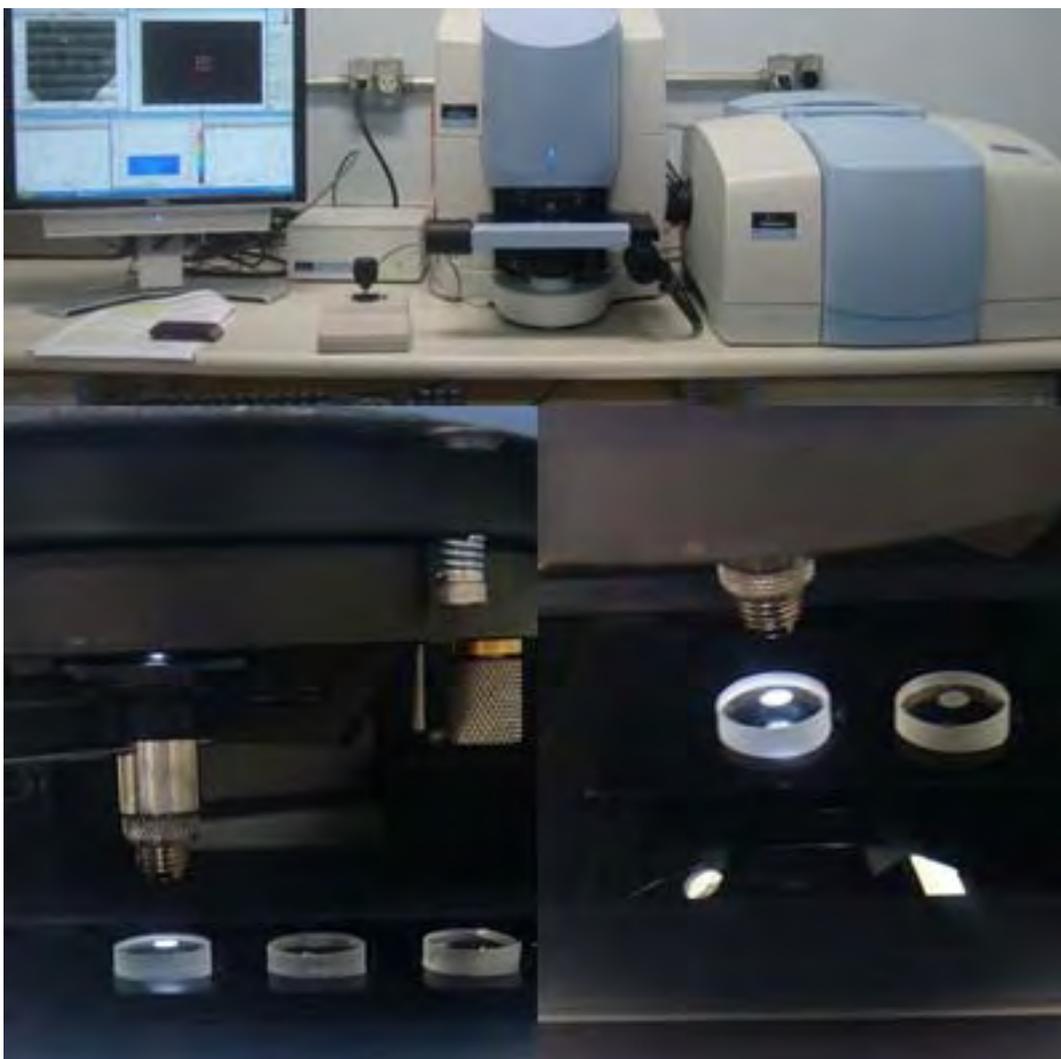


Figura 02 – Equipamento de microespectroscopia FT-IR e suporte com as lentes de CaF_2 depositadas no equipamento para leitura espectral das amostras de *Candida* em suspensão na forma de filme fino e transparente, adequado para as medidas.

4.3 Registro do espectro

A análise por microespectroscopia FT-IR das amostras foi realizada no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB) do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

A cada leitura de uma amostra, uma imagem (2000 μm x 2000 μm) do filme fino foi obtida por meio de um microscópio acoplado no espectrofotômetro. Os espectros das amostras das leveduras, na forma de filmes finos obtidos da suspensão de NaCl a 0,85 %, foram registrados em modo de ponto por transmissão/absorção no comprimento de onda de 900-4000 cm^{-1} utilizando o espectrômetro Spectrum Spotlight 400 FT-IR da PerkinElmer (Reino Unido). Por meio da imagem do filme fino, dez pontos foram selecionados aleatoriamente nas amostras, como ilustrado na figura 03.

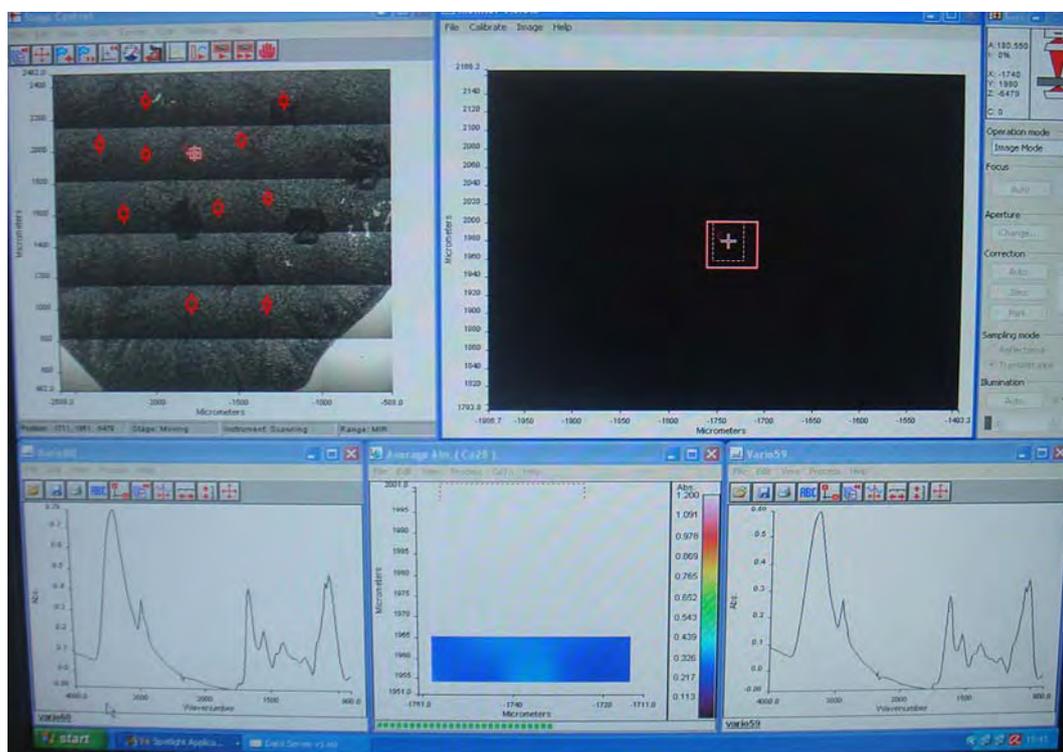


Figura 03 – Ilustração dos dez pontos selecionados aleatoriamente na imagem do filme fino obtido por meio do microscópio acoplado no espectrômetro (canto superior esquerdo).

Na resolução de 4 cm^{-1} , 32 varreduras foram realizadas para cada ponto e obtida a média. Os espectros foram considerados reprodutíveis, quando os picos espectrais não ultrapassavam o valor de 0.1 em unidades de absorbância. Um *background* utilizando uma janela

sem o filme fino foi realizado a cada troca de amostra. A fim de determinar a reprodutibilidade dos nossos resultados, todas as cepas foram analisadas em triplicata a partir de culturas independentes de cada cepa do microrganismo estudado, como ilustrado na figura 04.

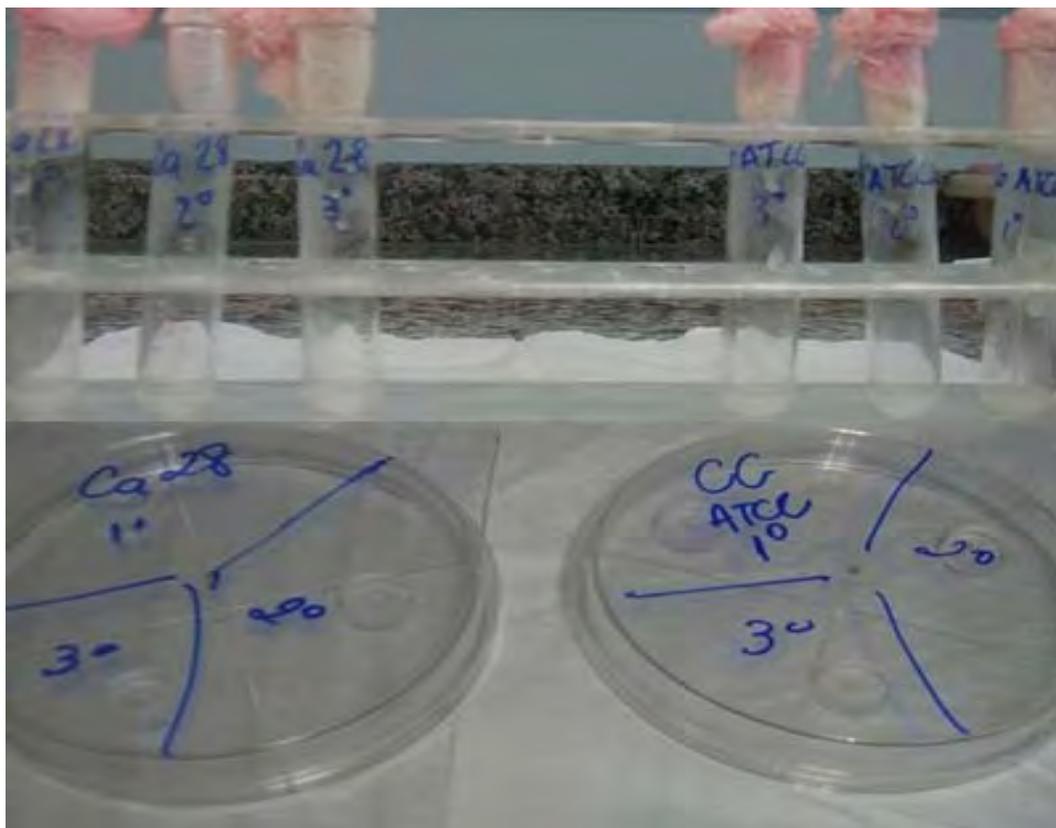


Figura 04 – Suspensão das cepas de *Candida* (*C. albicans* 28 e *C. glabrata* ATCC 90003) em triplicata e lentes de CaF₂ com alíquotas de 5 µl dessa suspensão.

4.4 Processamento dos dados e análise estatística

Para o modo de ponto, dez espectros foram obtidos de cada amostra, os quais foram inspecionados visualmente com o objetivo de identificar picos espectrais que pudessem estar discordantes entre as triplicatas, em relação à forma e intensidade, comparados aos outros.

Após essa inspeção, a média dos dez espectros foi realizada utilizando o programa estatístico OPUS (versão 4.2, Bruker).

As médias espectrais, no intervalo de 900-4000 cm^{-1} , foram submetidas ao cálculo da primeira derivada com 9 pontos de suavização e normalização vetorial, com o objetivo de amplificar o número de características discriminantes presentes no espectro e minimizar a heterogeneidade espectral devido às diferenças de espessura da amostra. Os dados também foram submetidos ao teste de correlação de coeficiente de Pearson. Três intervalos espectrais (2800-3000 cm^{-1} , 1300-1500 cm^{-1} , 900-1250 cm^{-1}) capazes de fornecer uma ótima discriminação entre as espécies e cepas, foram selecionados de acordo com dados da literatura, os quais serviram de entrada para análise hierárquica de *cluster*.

5. RESULTADOS

Para esse estudo um total de 290 espectros em modo de ponto foi obtido de cepas clínicas e cepas-padrão oriundas da coleção de cultura do laboratório de microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. Micrografias do filme fino, ilustradas na figura 05, permitiram avaliar a homogeneidade do mesmo e facilitaram a seleção dos dez pontos em cada amostra para a análise espectral.

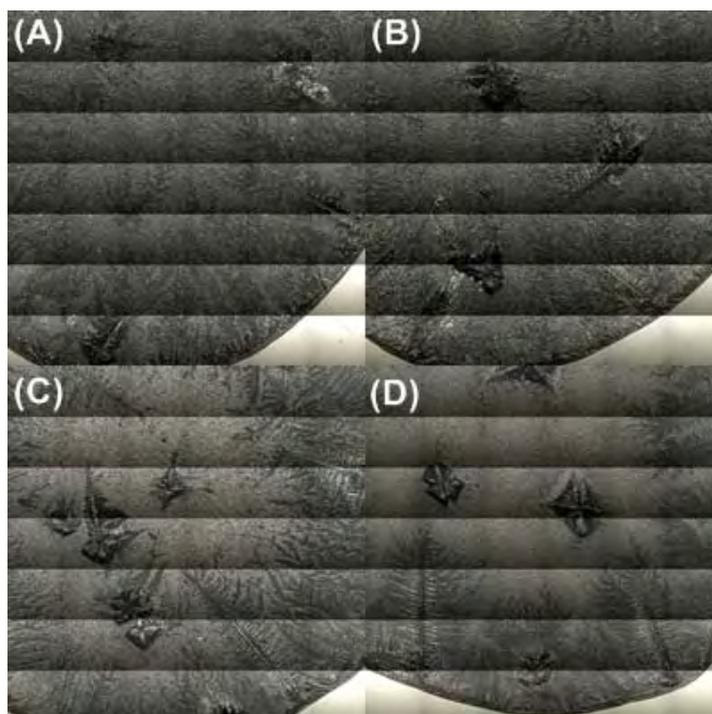


Figura 05 – Micrografia de 4 filmes finos das cepas *C. albicans* 28 (A), *C. albicans* 43 (B), *C. glabrata* 67 (C) e *C. glabrata* ATCC (D)

Para cada amostra em triplicata (n=29) foi obtida a média dos dez espectros, totalizando 29 médias espectrais, as quais foram submetidas à normalização vetorial e correção de linha de base. Dessa

forma, na figura 06 pode-se observar a ilustração representativa dos 29 espectros sobrepostos, situados no intervalo de 900-4000 cm^{-1} , correspondentes as médias. Destacado em cinza os picos correspondentes a três janelas espectrais que representam vibrações das ligações moleculares de lipídeos (2800-3000 cm^{-1}), proteínas (1300-1500 cm^{-1}) e polissacarídeos (900-1250 cm^{-1}).

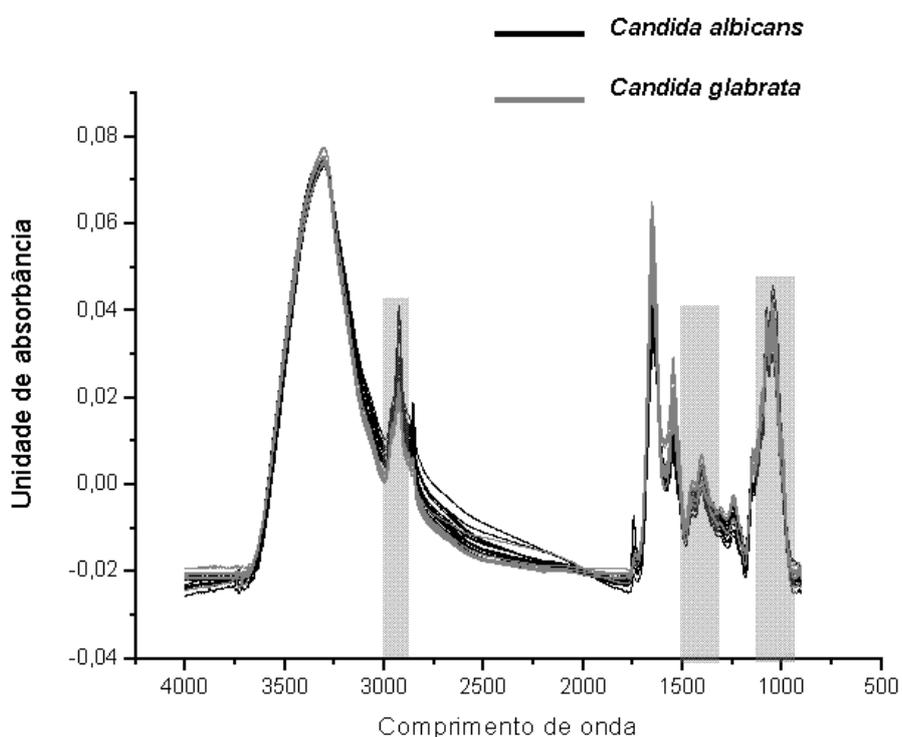


Figura 06 – Espectros FT-IR (em modo de ponto) sobrepostos das 29 médias obtidas dos dez espectros de cada amostra (n=29). No intervalo espectral de 900-4000 cm^{-1} . Destacado em cinza os picos correspondentes a três janelas espectrais que representam vibrações das ligações moleculares de lipídeos (2800-3000 cm^{-1}), proteínas (1300-1500 cm^{-1}) e polissacarídeos (900-1250 cm^{-1}).

A figura 07 ilustra espectros FT-IR (em modo de ponto) representativos das triplicatas das cepas *C. albicans* 22 e *C. glabrata* 107. Os espectros representados foram submetidos à correção de linha de base e normalização vetorial.

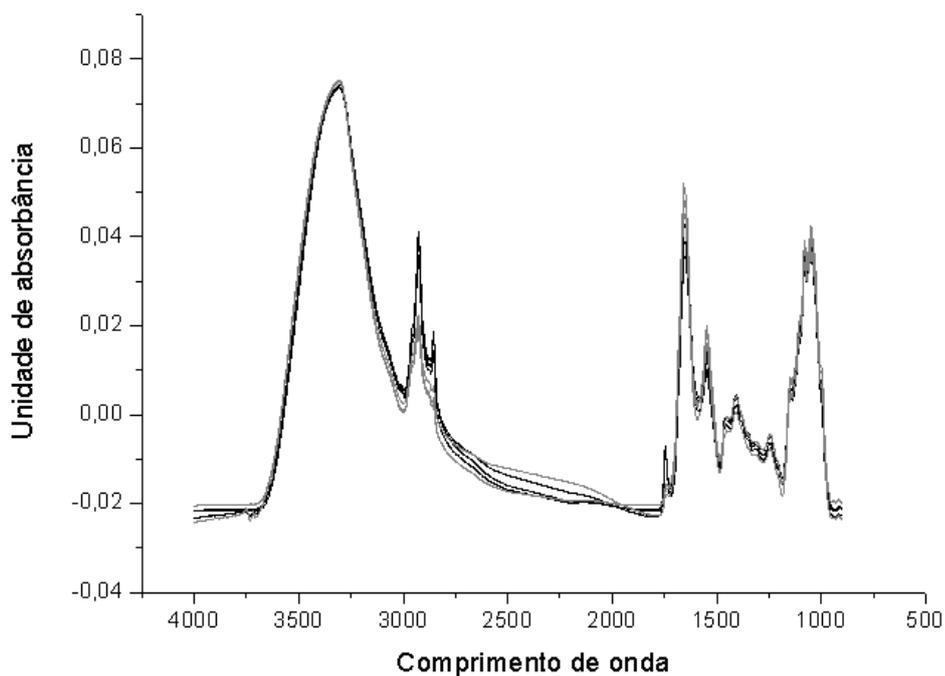


Figura 07 – Médias espectrais FT-IR sobrepostas, das cepas *C. albicans* 22 e *C. glabrata* 107 em triplicata submetidas a correção de linha de base e normalização vetorial.

As três regiões espectrais selecionadas para esse estudo, que ilustram os picos espectrais correspondentes as ligações moleculares de polissacarídeos ($900-1250\text{ cm}^{-1}$), proteínas ($1300-1600\text{ cm}^{-1}$) e lipídeos ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$), foram destacadas na figura 08, 09 e 10. Ainda, os quadros 2, 3 e 4 resumem os tipos de ligações encontradas nesses intervalos, dos principais constituintes bioquímicos das células microbianas.

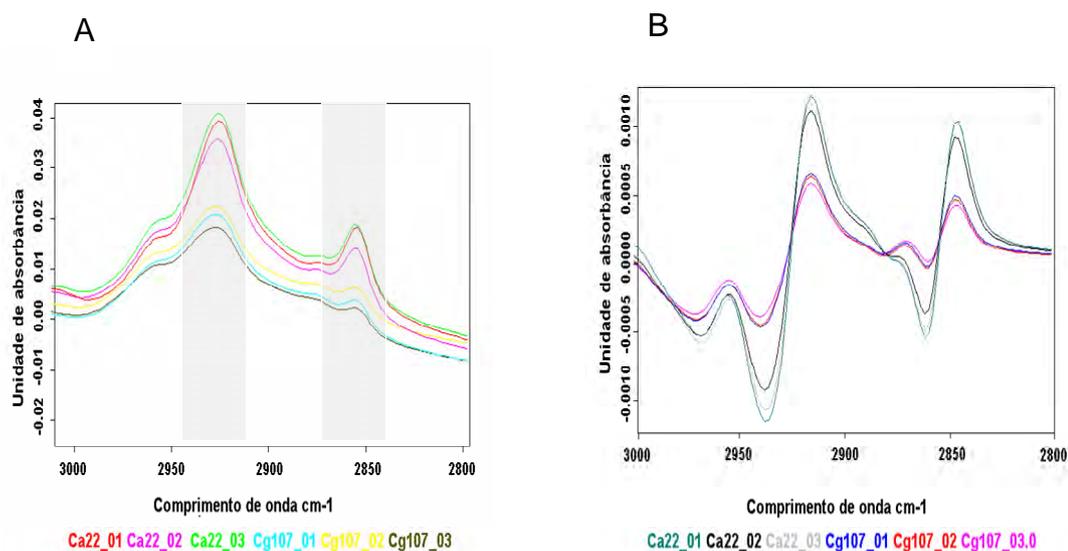


Figura 08 – (A) Espectros sem derivada (B) Espectros em primeira derivada. Espectros representando os picos das médias espectrais FT-IR das cepas *C. albicans* 22 (Ca 22) e *C. glabrata* 107 (Cg 107) em triplicata. Cada média espectral correspondente a cepa analisada foi destacada por uma cor. Janela espectral de 2800-3000 cm^{-1} (intervalo espectral que representa ligações moleculares de lípidios). É possível observar pelas áreas destacadas em cinza as diferenças de intensidade das bandas espectrais.

Quadro 2 – Tipos de ligações moleculares dos principais constituintes bioquímicos das células microbianas representados pelos picos espectrais encontrados no intervalo espectral de 2800-3000 cm^{-1} .

Ligações Moleculares	Constituintes bioquímicos
Vibrações de estiramento de ligações C-H de grupos funcionais $-\text{CH}_3$ e $>\text{CH}_2$	Lípídeos e algumas vibrações de cadeias laterais de aminoácidos

Fonte: Adaptado de Nauman et al 2000

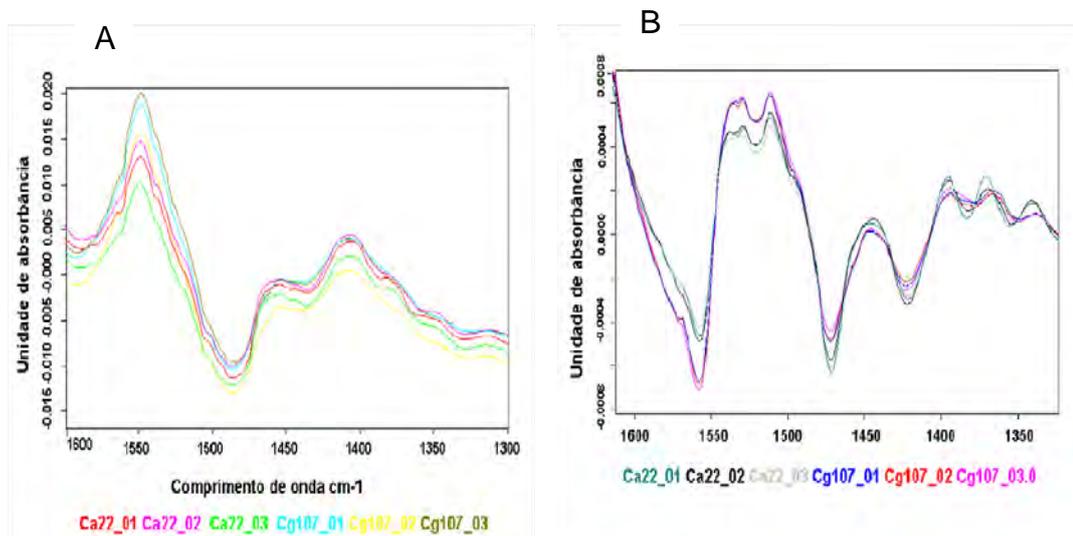


Figura 09 – (A) Espectros sem derivada (B) Espectros em primeira derivada. Espectros representando os picos das médias espectrais FT-IR das cepas *C. albicans* 22 (Ca 22) e *C. glabrata* 107 (Cg 107) em triplicata. Cada média correspondente a cepa analisada foi destacada por uma cor. Janela espectral de 1300-1600 cm^{-1} (intervalo espectral que representa ligações moleculares de proteínas).

Quadro 3 -Tipos de ligações moleculares dos principais constituintes bioquímicos das células microbianas representados pelos picos espectrais encontrados no intervalo espectral de 1300-1600 cm^{-1} .

Ligações Moleculares	Constituintes bioquímicos
Deformação de $>\text{CH}_2$ e $>\text{CH}_3$, vibrações de estiramento de $-\text{COO}^-$	Lípídeos, proteínas e fracas bandas determinadas por vibrações de cadeias laterais de aminoácidos

Fonte: Adaptado de Nauman et al 2000

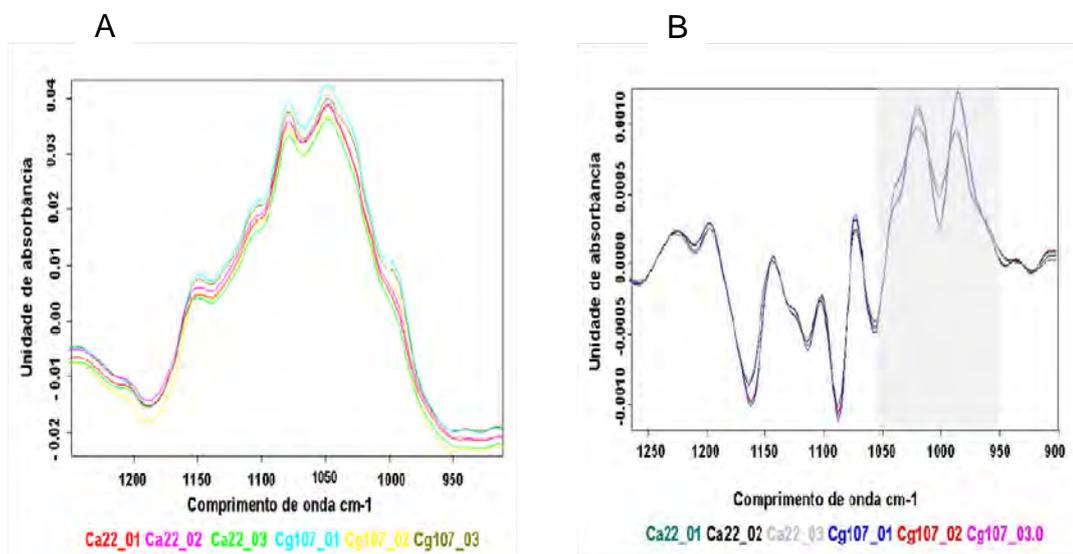


Figura 10 – (A) Espectros sem derivada (B) Espectros em primeira derivada. Médias espectrais FT-IR das cepas *C. albicans* 22 (Ca 22) e *C. glabrata* 107 (Cg 107) em triplicata. Cada média espectral correspondente a cepa analisada foi destacada por uma cor. Janela espectral de 900-1250 cm^{-1} (intervalo espectral que representa ligações moleculares de polissacarídeos).

Quadro 4 - Tipos de ligações moleculares dos principais constituintes bioquímicos das células microbianos representados pelos picos espectrais encontrados no intervalo espectral de 900-1250 cm^{-1} .

Ligações Moleculares	Constituintes bioquímicos
Vibrações de estiramento de grupos PO_2^- e vibrações de estiramento de C-O-C e C-O-P	Ácidos nucleicos e oligo e polissacarídeos

Fonte: Adaptado de Nauman et al 2000

Com o objetivo de amplificar as características sutis discriminantes de cada espectro, as médias de todas as amostras foram submetidas à primeira derivada. Como representação, a figura 11 ilustra seis médias espectrais, três da cepa *C. albicans* 22 e três da *C. glabrata*

107, respectivamente.

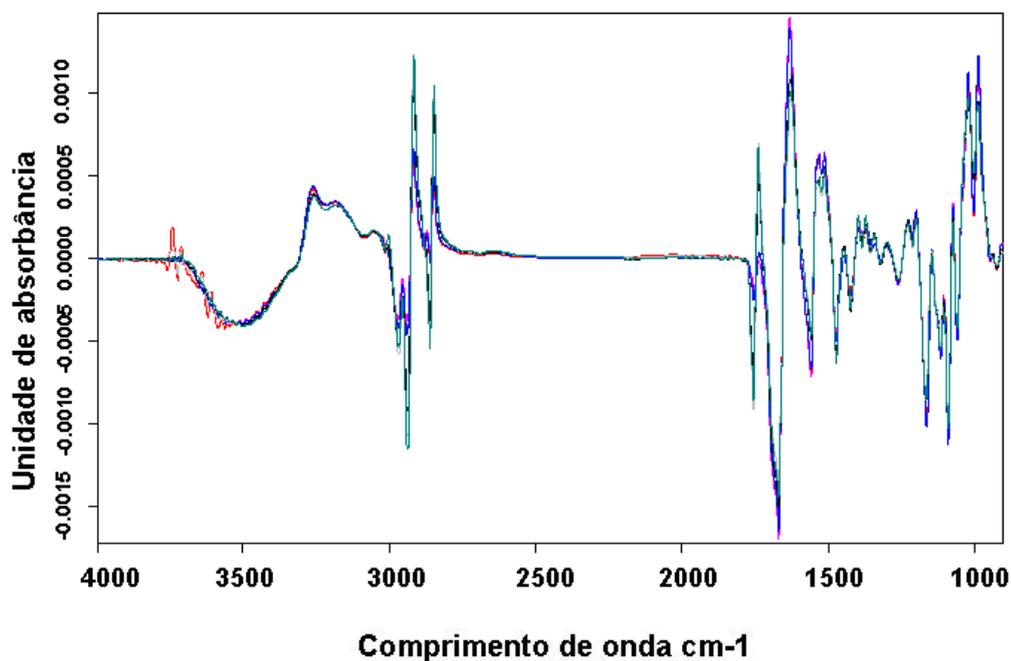


Figura 11 – Médias espectrais sobrepostas em primeira derivada de amostras em triplicata das cepas *Candida albicans* 22 e *Candida glabrata* 107. Intervalo de 900-4000 cm^{-1} .

Com base nas diferenças de absorção, observadas nos espectros contidos nos intervalos espectrais selecionados, os mesmos serviram de entrada para a análise hierárquica de *cluster*. As distâncias interespectrais situadas nos três intervalos selecionados nesse estudo foram calculadas pelo teste de correlação de coeficiente de Pearson e analisada por meio do algoritmo de Ward's. O resultado dessa análise foi descrito em forma de dendograma, representado pela figura 12. Este dendograma, compreendendo 27 médias espectrais, exibiu dois principais *clusters* separando claramente o grupo de seis cepas de *C. albicans* e quatro de *C. glabrata*.

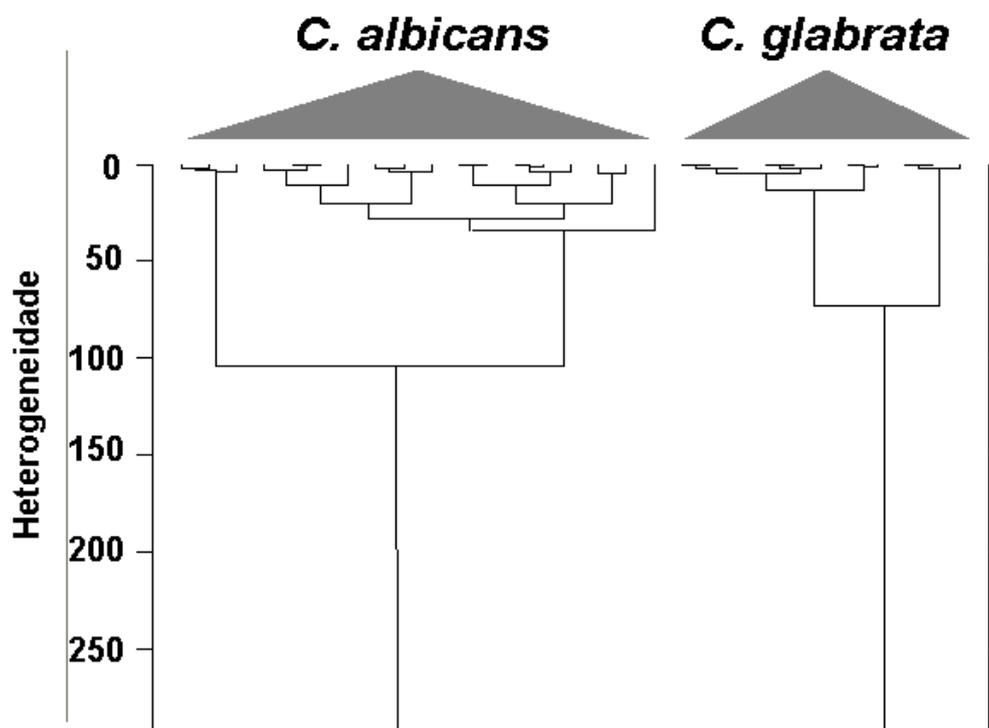


Figura 12 – Dendrograma: resultado da análise de cluster. Exibindo dois grupos distintos para *C. albicans* e *C. glabrata*.

A figura 13 ilustra o mesmo dendrograma. No entanto, são destacados subgrupos, contendo as cepas de mesma espécie em triplicata, dentro dos dois principais grupos maiores. Com exceção de uma amostra de *C. albicans* 29 e *C. albicans* ATCC, as quais se agruparam isoladamente dentro do grupo principal para *C. albicans*.

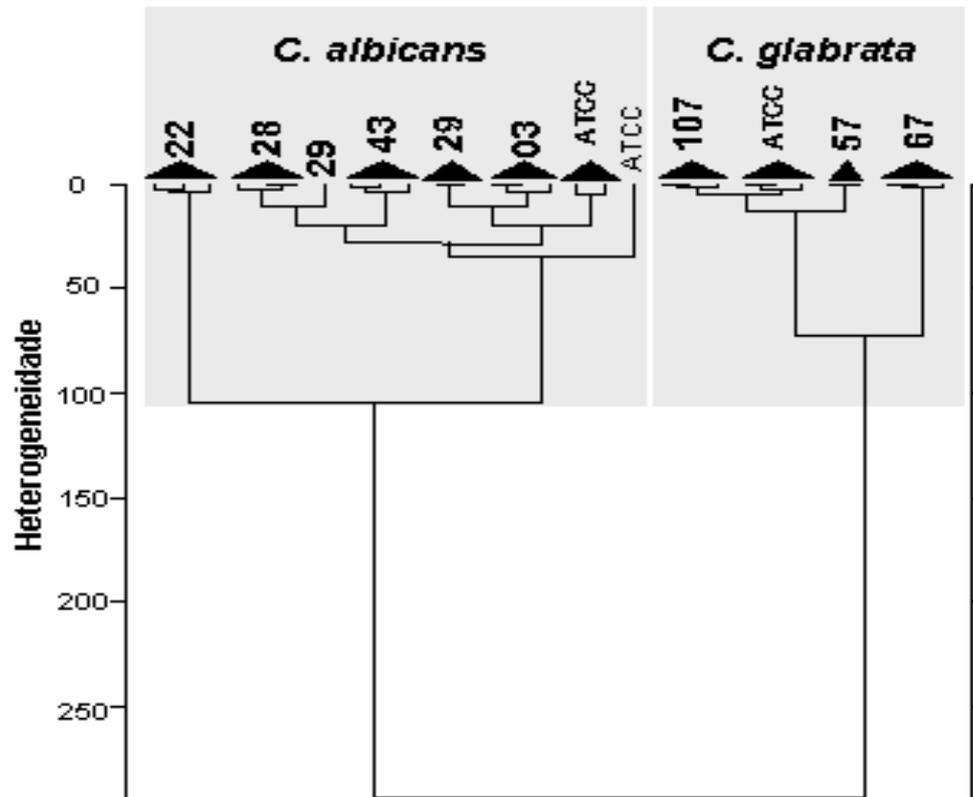


Figura 13 –Dendograma: resultado da análise de *cluster*. Destacando os subgrupos formados pelas cepas de mesma espécie em triplicata, com exceção de uma cepa de *C. albicans* 29 e uma cepa de *C. albicans* ATCC.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos 30 anos, aplicações da espectroscopia FT-IR no campo biomédico, particularmente na identificação de microrganismos, têm aumentado o interesse dos pesquisadores. Essa abordagem mostra um alto potencial não somente na identificação ao nível de gênero e espécies, mas também na discriminação entre cepas de mesma espécie. Além disso, esse método tem demonstrado rapidez, simplicidade, não é destrutivo, não necessita de reagentes e requer amostras com pequena quantidade de biomassa.

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar o emprego da microespectroscopia FT-IR na identificação e discriminação de 5 cepas clínicas de *C. albicans* e 2 cepas clínicas de *C. glabrata*, a partir da suspensão desses microrganismos em solução fisiológica, na forma de filmes finos, adequados para a leitura espectral FT-IR no modo de transmissão/absorção.

Primeiramente, um protocolo padronizado para as condições de cultura, preparação da amostra, e parâmetros na aquisição dos espectros (número de varreduras e resolução espectral) foram seguidos com base no trabalho de Fontoura et al (2010). De acordo com estudos, parâmetros de cultivo dos microrganismos (tempo de cultura, composição do meio e pH, temperatura, conteúdo de água, etc) fortemente influenciam o espectro FT-IR e, por esta razão, devem ser estreitamente padronizados (Wenning et al., 2002; Sandt et al., 2003; Toubas et al., 2007). Com base no exposto, uma das triplicatas da cepa de *C. glabrata* 57 foi excluída do atual estudo, devido a não realização do *background* na janela de CaF₂ livre de amostra, antes da leitura espectral da mesma. Esse procedimento é realizado a fim de impedir que outros

fenômenos ocorram com a radiação infravermelha, como reflexão e espalhamento pelo meio onde a amostra está sendo analisada e/ou pelas condições do ambiente (vapor de água e níveis de CO₂) e, conseqüentemente, interfira na qualidade e reprodutividade dos espectros das amostras (Leal, 2009). Ainda com relação aos procedimentos de padronização, a qualidade dos filmes como homogeneidade e espessura foi um fator chave para a reprodutibilidade dos espectros, as quais foram avaliadas (inspeção visual) por meio das micrografias realizadas de cada amostra antes da leitura espectral, e a fixação do valor de no máximo 0.1 unidades de absorbância. Esse valor foi tomado como base, pois foi um valor que permitiu uma boa definição visual dos picos espectrais.

O espectro FT-IR é resultado da sobreposição dos modos vibracionais das moléculas, dados pela absorção da radiação infravermelha (Beekes et al., 2007). Essas moléculas compõem grupos funcionais das proteínas, lipídeos e carboidratos das várias estruturas celulares dos microrganismos. A qualidade e a quantidade desses componentes podem variar entre as espécies e é com base nisso que a espectroscopia FT-IR é usada na identificação dos mesmos, pois essas diferenças no conteúdo estrutural servem como um tipo de “*fingerprint*” das bactérias e das leveduras. Dessa forma, é por meio do intervalo espectral de 900-4000 cm⁻¹ que as vibrações moleculares desses constituintes são detectadas (Helm et al., 1991; Ngo-Thi et al., 2003; Rebuffo-Scheer et al., 2007). No entanto, por toda essa janela espectral é possível alcançar muitas informações sobre os microrganismos que nem sempre são capazes de diferenciá-los um dos outros.

Para tanto, a partir da comparação entre os espectros tratados em primeira derivada, consegue-se observar variações importantes em determinados intervalos espectrais, responsáveis por permitir uma melhor discriminação entre as espécies. Com isso, neste estudo, foram selecionadas três janelas espectrais discriminantes que refletiram os modos vibracionais das moléculas dos principais

componentes estruturais dos microrganismos, sendo elas: 900-1250 (polissacarídeo), 1300-1600 (proteínas) e 2800-3000 (lipídeos). O uso desses intervalos como entrada para a análise de *cluster*, bem como o emprego de análise estatística multivariada, permitiu a representação dos resultados em um dendograma, o qual demonstrou a separação de dois grupos principais englobando cada espécie de *Candida* estudada (*C. albicans* e *C. glabrata*). Embora alguns estudos relacionados ao uso da espectroscopia FT-IR na identificação e discriminação entre espécies de *Candida* revelem que apenas a região de absorção de polissacarídeos (900-1200 cm^{-1}) seja um bom marcador, já que ela revela uma ótima reprodutibilidade e variabilidade entre espécies de *Candida* (Naumann et al., 1995, Toubas et al., 2007), no presente estudo, foi demonstrado que a combinação dos três intervalos espectrais permitiu uma melhor discriminação entre as duas espécies estudadas.

Nesse contexto, a microespectroscopia FT-IR mostrou ser uma técnica capaz de identificar e discriminar espécies de *Candida*. Os resultados da atual pesquisa concordaram com outros estudos, que também demonstraram sucesso na identificação e discriminação entre *Candida* ssp. por meio da microespectroscopia FT-IR (Timmins et al., 1998; Tintelnot et al., 2000; Sockalingum et al., 2002; Wenning et al., 2002; Essendoubi et al., 2005; Toubas et al., 2007), sendo a microespectroscopia FT-IR um importante método de identificação de cepas clínicas de leveduras do gênero *Candida*.

No presente estudo, também pode-se observar a capacidade desse método de alcançar a discriminação entre as cepas da mesma espécie de *Candida*, a partir do correto agrupamento das triplicatas em um mesmo *subcluster*, por meio do uso dos intervalos espectrais selecionados. Com exceção de uma amostra de *C. albicans* 29 e *C. albicans* ATCC. Isso pode ter ocorrido, pois as principais características discriminantes para a diferenciação entre cepas de mesma espécie podem estar refletidas em outros intervalos espectrais. Dessa

forma, é necessário ampliar os estudos dos espectros de cada cepa objetivando a seleção de janelas espectrais capazes de fornecer esse tipo de discriminação.

Com relação à capacidade desse método em realizar a tipagem das cepas, muitas pesquisas têm sido realizadas em estudo epidemiológico de doenças infecciosas, o que trouxe um ótimo avanço nesse campo, já que os métodos convencionais não têm essa capacidade (Sandt et al., 2003; Essendoubi et al., 2007; Toubas et al., 2007). Nesse contexto, Toubas et al 2007 avaliaram a técnica de microespectroscopia FT-IR na tipagem de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Para tanto, as cepas foram isoladas de diferentes sítios anatômicos de pacientes sob cuidados em um mesmo ambiente hospitalar, e previamente identificadas quanto à espécie. Como referência, uma ou duas cepas-padrão de cada espécie foram utilizadas no estudo. Após a leitura espectral de cada amostra, os autores analisaram visualmente os espectros para definir o intervalo que melhor fizesse a discriminação entre as cepas. E posteriormente utilizaram esse intervalo ($900-1200\text{ cm}^{-1}$) como entrada para análise de *cluster*. A partir dos resultados obtidos, um dendograma foi criado para cada espécie estudada. Nesse dendograma as cepas isoladas de vários sítios anatômicos foram agrupadas em um mesmo *cluster* para cada paciente, e as cepas-padrão em outro *cluster* isolado. Dessa forma, esse estudo demonstrou que a técnica é uma ferramenta útil na micologia médica tanto para a discriminação das espécies quanto na tipagem das cepas. Portanto, pode contribuir para acelerar a implementação de medidas de controle no ambiente clínico, particularmente em situações epidêmicas.

Os microrganismos são encontrados em comunidades multicelulares complexas, por exemplo, colônias, corpos frutíferos e biofilmes. Nesse ambiente ecológico, as células microbianas precisam se adaptar a várias condições, como limitado suprimento de nutrientes, mudanças de temperatura, pH, umidade e etc., e conseqüentemente deve

modificar sua aparência fenotípica e diferenciar-se numa variante celular especializada. A microespectroscopia FT-IR pode ser utilizada para investigar essas mudanças. Ngo Thi, Naumann (2007) aplicaram a microespectroscopia FT-IR na investigação do crescimento heterogêneo das colônias microbianas. Eles avaliaram as mudanças na composição bioquímica das células em diferentes regiões da colônia, a partir de cortes por criosecção da colônia estudada. Nesse contexto, esses autores destacaram que a microespectroscopia FT-IR pode ser uma ferramenta útil para a investigação da heterogeneidade espacial do crescimento das células em macrocolônias microbianas e, ainda, pode ser adaptada para análise de comunidades multicelulares mais complexas, por exemplo, biofilmes ou crescimento de colônias em condições naturais. Dessa forma, a microespectroscopia FT-IR pode ter inúmeras aplicações na identificação microbiana, podendo ser utilizada em diferentes áreas de estudo.

Uma grande vantagem da espectroscopia FT-IR é a rapidez na identificação do microrganismo, pois, após obtenção da colônia (neste estudo foi padronizado o crescimento de 24 h, entretanto, pode-se utilizar tempos menores como de 6 a 12 h), o tempo necessário desde a obtenção das amostras em filme fino até o registro dos espectros, é de no máximo 2 h. Pela técnica de *imprint* esse intervalo pode diminuir para 30 minutos (Essendoubi et al., 2005). O custo também é bem baixo (exceto pelo equipamento), não sendo necessária a utilização de nenhum reagente ou corante. Estas são vantagens em comparação com outros métodos de identificação de leveduras (convencional, bioquímico e molecular). Com relação aos métodos convencionais, que utilizam o perfil morfológico das cepas e de estruturas microscópicas, bem como, o perfil metabólico na identificação das espécies de *Candida*, são procedimentos que exigem tempo para alcançar resultados reprodutíveis. Desde a chegada do material coletado do paciente até a identificação final do microrganismo pode transcorrer cinco dias (Yucesoy et al., 2005). A

obtenção das colônias puras, com biomassa suficiente para a identificação dos microrganismos, pode demorar de 24 a 72 h dependendo do microrganismo analisado, sendo que após o isolamento da colônia microbiana, as análises de identificação são realizadas. A técnica para avaliar a produção do tubo germinativo pela *Candida* geralmente é simples e rápida, devendo-se esperar cerca de 2 a 3 h para que as amostras estejam prontas para a análise. No entanto, pode apresentar resultados falso-positivos e falso-negativos, devendo ser complementado por outros métodos de identificação. Foongladda et al (2002) realizaram o teste de produção de tubo germinativo em 420 isolados clínicos, e demonstraram resultados falso-positivos e falso-negativos para essa técnica. A formação de clamidoconídeo é um método que exige 72 h para obtenção dos resultados, porém em casos de espécies próximas como *C. albicans* e *C. dubliniensis*, ambas são positivas para esse teste, sendo assim, a necessidade de outros meios de identificação é verdadeira (Ahmad et al., 2004; Mirhendi et al., 2005). Assim, além do método de identificação convencional de leveduras ser bastante trabalhoso e dispendioso, nem sempre é possível a identificação precisa da cepa, como por exemplo *C. albicans* e *C. dubliniensis*, sendo necessária a complementação por outras técnicas (bioquímicas e moleculares).

Com relação aos testes bioquímicos (assimilação e fermentação de carboidratos), geralmente são empregados *kits* (API) que permitem a identificação dos microrganismos. Essa técnica é largamente utilizada como procedimento de identificação microbiana pelos laboratórios de pesquisas, pois fornece resultados reprodutíveis para várias espécies de *Candida*, no entanto, o tempo necessário para que o teste forneça os resultados é de aproximadamente 72 h (Xu et al., 2002) e estes *kits* apresentam custo elevado para utilização na rotina de identificação microbiana.

Atualmente os métodos moleculares têm sido

empregados como ferramenta de identificação de microrganismos de difícil cultivo e isolamento, bem como, na tipagem das cepas, a qual é uma avaliação de grande importância nos estudos de transmissibilidade de microrganismos, rotas de infecção e análises epidemiológicas. Xu et al. (2002) empregaram ferramentas da biologia molecular na identificação microbiana, e fizeram um levantamento sobre a aplicabilidade desse método na rotina de diagnóstico laboratorial. Foi destacado que é um método mais rápido que as técnicas convencionais, porém de alta complexidade, alto custo e requer o emprego de equipamentos complexos. Em 2000, Tintelnot et al. demonstraram que a microespectroscopia FT-IR foi tão confiável como a genotipagem em discriminar espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* obtidas de enxágües bucais de pacientes HIV - positivos. Um estudo realizado por Sandt et al em 2003 revelou resultados semelhantes na tipagem de isolados de *C. albicans* de pacientes em cuidados intensivos, por meio da espectroscopia FT-IR e da biologia molecular por análise do RAPD. No entanto, os autores destacaram que ambas as técnicas possuem vantagens. Dessa forma, a multiplicidade dos passos no protocolo da análise de RAPD e a dificuldade na interpretação dos dados fazem dela uma ferramenta complexa. Essendoubi et al. (2005) identificaram, por microespectroscopia FT-IR, 6 espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. Krusei* e *C. kefyr*) de uma coleção de 57 cepas clínicas de *Candida* de pacientes hospitalizados. Os autores concluíram que a microespectroscopia FT-IR é um importante método, pois, em comparação às técnicas convencionais e moleculares é mais barato, mais rápido e possui grande potencial de identificação e discriminação de microrganismos.

Contudo, os resultados da presente pesquisa demonstraram que a identificação e a discriminação entre as espécies de *C. albicans* e *C. glabrata* por meio da microespectroscopia FT-IR foi possível. A técnica não necessita de maiores preparos das amostras,

como o emprego de reagentes e corantes, é simples, rápida e alcança resultados reprodutíveis com pequenas quantidades de biomassa. Estas características são bastante importantes na identificação de cepas clínicas, pois devido ao contínuo aumento de candidose humana e a grande diversidade de leveduras do gênero *Candida*, é fundamental a identificação da cepa o mais rápido possível. A identificação precoce permite o correto diagnóstico e tratamento com terapia antifúngica adequada ao paciente, reduzindo morbidade e mortalidade relacionada a estas infecções (Essendoubi et al., 2005). Desta forma, a microespectroscopia FT-IR deve ser melhor estudada e aplicada, pois, de acordo com a literatura e com os resultados obtidos neste estudo, este método de identificação microbiana é bastante promissor.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, pode-se concluir que a microespectroscopia infravermelha por transformada de Fourier:

- a) foi capaz de identificar e discriminar cepas clínicas de *C. albicans* e *C. glabrata*, bem como, de realizar a tipagem entre cepas de *Candida* de mesma espécie;
- b) forneceu resultados reprodutíveis utilizando pouca biomassa da cultura do microrganismo;
- c) é um método confiável, rápido, de fácil execução e de baixo custo para identificação de leveduras do gênero *Candida*, sendo uma ferramenta promissora na microbiologia.

8 REFERÊNCIAS*

Adt I, Toubas D, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum D. FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. Arch Microbiol. 2006 Feb;185:277-285.

Ahmad S, Khan Z, Mokaddas E, Khan Z. Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Kuwait. J Med Microbiol. 2004; 53:633-637.

Al-Abeid HM, Abu-Elteen KH, Elkarmi AZ, Hamad MA. Isolation and characterization of *Candida* spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants and antifungal sensitivity. Jpn J Infec Dis. 2004;57:279-284.

Araujo CR, Miranda KC, Passos XS, Hasimoto LK, Lemos JA, Khrais CHA, et al. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMOagarTM *Candida*. Rev Patol Trop. 2005 jan-abr;34(1):37-42.

Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. J. Appl. Genet. 2004;45(1):3-15.

Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: Characteristics and identification. New York: Cambridge; 1990. p.25-35.

Beekes M, Lasch P, Naumann D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. Veterin Microbiol. 2007;123:305-319.

*Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Branan N, Wells TA. Microorganism characterization using ATR-FTIR on an ultrathin polystyrene layer. *Vibrac Spectrosc.* 2007;44:192-196.

Chen K, Lo H, Lin Y, Li S. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *J Med Microbiol.* 2005;54:249-258.

Choo-Smith LP, Maquelin K, van Vreeswijk T, Bruining HA, Puppels GJ, Ngo Thi NA, et al. Investigation microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. *Appl Environm Microbiol.* 2003 Apr;67(4):1461-1469.

Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1757-1762.

Essendoubi M, Toubas D, Bouzaggou M, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD. Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. *Bioch et Bioph Acta.* 2005 May;1724:239-247.

Essendoubi M, Toubas D, Lepouse C, Leon A, Bougeade F, Pinon JM, et al. Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy. *J. Microbiol Methods.* 2007 Oct;71:325-331.

Fenn JP, Billetdeaux E, Segal H, Skodack-Jones L, Padilla PE, Bale M, et al. Comparison of four methodologies for rapid and cost-effective identification of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 1999 Oct;37(10):3387-3389.

Fontoura I. Microespectroscopia FT-IR na identificação rápida de bactérias em cultura pura e mista [dissertação]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba (SP): UNIVAP; 2010.

Foongladda S, Haouharn P, Sakulmaiwatana P, Chairprasert A. Comparative evaluation of Candi *Select* test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isolates. *Mycoses.* 2002;45:75-78.

Giarola VM. Ressonância de plásmons de superfície aplicada ao desenvolvimento de sistemas arborecentes hemocompatíveis [dissertação]. Itajubá. Universidade Federal de Itajubá (MG); 2007.

Heelan JS, Siliezar D, Coon K. Comparison of rapid testing methods for enzyme production with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1996 Nov;34(11):2847-2849.

Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. J. Gener Microbiol. 1991;137:69-79.

Hins RTP. Aspectos e impactos ambientais associados ao processo de injeção da Blenda PPO/PSAI através do inventário do ciclo de vida [dissertação]. Joinville: Universidade do Estado de Santa Catarina (SC) – UDESC; 2007

Huppert M, Harper G, Sun SH, Delanerolle V. Rapid methods for identification of yeasts. J Clin Microbiol. 1975 Jul;2(1):21-34.

Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia para identificação Fungos Actinomicetos Algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier; 1998. p.86-89.

Leal K. Energia e o espectro eletromagnético [internet]. Material didático. 2009 [citado em 01 de abril de 2010]. Disponível em: http://www.uff.br/fisicoquimica/docentes/katialeal/didatico/Capitulo_2.pdf .

Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using Random Amplified Polymorphic DNA. J Clin Microbiol. 1992 Dec;30(12):3249-3254.

Louvois J, Mulhall A, Hurley R. Biochemical identification of clinically important yeasts. J Clin Pathol. 1979;32:715-718.

Luz ER, Silva MIP, Sotto CAT. Predição de propriedades de gasolinas usando espectroscopia FTIR e regressão por mínimos quadrados parciais [dissertação]. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (RJ) – PUC;2003.

Mackenzie DWR. Serum tube identification of *Candida albicans*. J Clin Path. 1962;15:563-565.

Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, van den Braak N, Endtz HPh, Naumann, et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. J. Microbiol Methods. 2002;51:255-271.

Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, van Vreeswijk T, Stammler M, et al. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. J. Clin Microbiol. 2003 Jan;41(1);324-329.

Mariey L, Signolle JP, Amiel C, Travert J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. Vibrat Spectroc. 2001;26:151-159.

Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Maeda N, Ohshima T, Yamaguchi H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. Jpn J Infect Dis. 2005;58:235-237.

Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. Appl Spectros Rev. 2008;43:134-179.

Naumann D, Keller S, Helm D, Schultz C, Schrader B. FT-IR spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells. J. Molec Struct. 1995;347:399-406

Naumann D. Infrared spectroscopy in microbiology. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. R.A. Meyers (Ed.). 2000;102-131.

Neppelenbroek KH, Campanha NH, Spolidorio LC, Seó RS, Pavarina AC. Molecular fingerprinting methods for de discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. Oral Dis. 2006;12:242-253.

Ngo Thi NA, Kirschner C, Naumann D. FT-IR microspectrometry: A new tool for characterizing micro-organisms. Spie Digital Library [internet]. 2003 Jul [citado 4 de abril de 2010];3918(36).Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1117/12.384961>

Ngo Thi NA, Kirchner C, Naumann D. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. J Mol Struct. 2003 Dec;661-662:371-380.

Ngo Thi NA, Naumann D. Investigation the heterogeneity of cell growth in microbial colonies by FTIR microspectroscopy. Anal Bioanal Chemi. 2007; 387:1769-1777.

Nieto LI, Donolo AS, Bava AJ, Yantorno OM. Empleo de espectroscopia infrarroja-trasformada de Fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica. Act Bioquim Clin Latinoameric. 2004;38(3):289-295.

Oliveira LFC. Espectroscopia molecular. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola [internet]. 2001 Mai [citado em 23 de março de 2010];4:24-30. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/04/espect.pdf> .

Orsini F, Ami D, Villa AM, Sala G, Bellotti MG, Doglia SM. FT-IR microspectroscopy for microbiological studies. J. Microbiol. Methods. 2000 April;42:17-27.

Rebuffo-Scheer CA, Kirschner C, Staemmler M, Naumann D. Rapid species and strain differentiation of non-tuberculous mycobacteria by Fourier-transform infrared microspectroscopy. J. Microbiol Methods. 2007;68:282-290.

Resende JCP, Franco GR, Rosa CA, Hahn RC, Hamdan JS. Phenotypic and genotypic identification of *Candida* ssp. isolated from hospitalized patients. Rev Iberoam Micol. 2004;21:24-28.

Sandt C, Sockalingum GD, Aubert D, Lapan H, Lepouse C, Jaussaud M, et al. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar;41(3):954-959.

Sandt C, Madoulet C, Kohler A, Allouch P, de Champs C, Manfait M, et al. FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens. *J. Appl Microbiol.* 2006;101:785-797.

Schmitt J, Flemming HC. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *Internat Biodeter Biodegrad.* 1998;41:1-11.

Sockalingum GD, Sandt C, Toubas D, Gomez J, Pina P, Beguinot I, et al. FTIR characterization of *Candida* species and pathogenic *C. albicans* isolates from HIV+ patients. *Vibrat Spectr.* 2002;28:137-146.

Spolidorio DMP, Boriollo MFG, Estrela C, Spolidorio LC. Diferentes métodos fenotípicos para isolamento e identificação de espécies de *Candida*. *Robrac.* 2009;18(45):18-26.

Tang Y, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem.* 1997;43(11):2021-2038.

Timmins EM, Howel SA, Alsberg BK, Noble WC, Goodacre R. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol.* 1998 Feb;36(2):367-374.

Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann, Staemmler M, Franz T, et al. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J. Clin Microbiol.* 2000 Apr;38(4):1599-1608.

Toubas D, Essendoubi M, Adt I, Pinon JM, Manfait M, Sockalingum GD. FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*. *Anal Bioanal Chem.* 2007 Dec;387:1729-1737.

Verweij PE, Breuker IM, Rijs AJMM, Meis JFGM. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J Clin Pathol*. 1999;52:271-273.

Vrioni G, Matsiota-Bernard P. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. *J Infect*. 2001;42:50-56.

Wenning M, Seiler H, Scherer S. Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Oct;68(10):4717-4721.

Xavier PCN, Chang MR, Nunes MO, Palhares DB, Silva RA, Bonfim FG et al. Candidemia neonatal, em hospital público do Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Set-Out;41(5):459-463.

Xu J, Millar BC, Moore JE, McClurg R, Walker MJ, Evans J et al. Comparison of API20C with molecular identification of *Candida* ssp isolated from bloodstream infection. *J Clin Pathol*. 2002;55:774-777.

Yucesoy M, Esen N, Yulug N. Use of chromogenic tube and methyl blue sabouraud agar for the identification of *Candida albicans* strains. *J Med Sci*. 2001 Aug;47:161-167.

Yucesoy M, Oztek AO, Marol S. Comparison of three differential media for the presumptive identification of yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2005 Mar;11(3):232-247.

ANEXO A – Carta de autorização**CARTA DE AUTORIZAÇÃO**

Autorizo a aluna de mestrado do programa de Pós graduação em Biopatologia Bucal desta instituição, **MICHELLE CARDOSO**, a fazer uso das cepas de microrganismos da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" Campus de São José dos Campos em seu projeto de pesquisa intitulado "Microespectroscopia FT-IR: identificação e discriminação de cepas clínicas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*".

São José dos Campos, 10 de novembro de 2009



Prof Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge
(Responsável pela Disciplina de Microbiologia e Imunologia)

Cardoso M. *FT-IR microspectroscopy: identification na discrimination of clinical strains of Candida albicans and Candida glabrata [dissertation].* São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University, 2010.

ABSTRACT

The technique of infrared spectroscopy Fourier transform (FT-IR) has been widely used as a new approach for rapid identification and simple micro-organisms, including the genus Candida. The purpose of this study was to evaluate the use of FT-IR microspectroscopy for the identification and discrimination of 5 clinical strains of Candida albicans and Candida glabrata 3, which were previously identified by conventional methods, and two-standard strains of each species. The samples were analyzed in triplicate from independent cultures by means of thin films obtained from a suspension in sterile saline and 0.85% of the biomass of the colony that was incubated for 24 hours in Sabouraud dextrose agar plates. Ten spectra with 32 scans were obtained in 10 randomly selected regions in the samples. The average of ten spectra was obtained from each sample for the multivariate analysis, given by cluster analysis. In addition, three windows were determined spectral (900-1250 cm⁻¹, 1300-1600 cm⁻¹, 2800-3000 cm⁻¹) and the spectra were transformed into first derivative. The representation of the results was given by the construction of a dendrogram. In this, we separated into two groups of two Candida species studied. Thus, one can conclude that the FT-IR microspectroscopy was able to identify and distinguish clinical isolates of Candida albicans and Candida glabrata is an important method for identification of yeasts.

Keywords: Microspectroscopy FT-IR. Identification. Candida albicans. Candida glabrata. Microorganism.