



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

BRUNA CORINA SILVA DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS POR ESPECTROSCOPIA
VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-
IR)**

Recife

2022

BRUNA CORINA SILVA DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS POR ESPECTROSCOPIA
VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-
IR)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara.

Recife
2022

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Sandra Maria Neri Santiago, CRB-4 / 1267

L732c Lima, Bruna Corina Silva de.
Caracterização de micro-organismos por espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) / Bruna Corina Silva de Lima. – 2022.
97 f.: il., fig., tab.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. Recife, 2022.
Inclui referências e apêndice.

1. Engenharia biomédica. 2. Diagnóstico. 3. Análises clínicas. 4. Análise multivariada. I. Yara, Ricardo (Orientador). II. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.) BCTG/2023-125

BRUNA CORINA SILVA DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS POR ESPECTROSCOPIA
VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-
IR)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Engenharia Biomédica. Área de concentração: Bioengenharia.

Aprovada em: 28/06/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Yara (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Wellington Pinheiro dos Santos (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Carlos André dos Santos Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha mãe, meus familiares e meu namorado que me apoiaram incansavelmente durante minha jornada acadêmica.

Aos meus amigos, por todo suporte e incentivo para que eu concluísse o mestrado.

Ao meu orientador, por acreditar em mim e ter dado o seu melhor para que pudéssemos gerar bons resultados.

A banca, pela disponibilidade em avaliar e me auxiliar no aprimoramento do meu trabalho.

E, por fim, a Capes e ao Instituto Tecnológico das Cadeias Biossustentáveis (ITCbio) pelo financiamento e suporte à pesquisa.

RESUMO

Diversos micro-organismos são responsáveis por doenças infecciosas que acometem seres humanos ou outros animais, as quais podem ser graves e levar a óbitos. Sendo assim, a correta identificação destes patógenos é necessária para o diagnóstico adequado, bem como para definição do tratamento correto. Usualmente, os métodos tradicionais para identificação de micro-organismos envolvem testes fenotípicos, uma série de ensaios de bioquímicos ou sequenciamento genético, os quais são efetivos, porém demandam tempo e suprimentos. Nos esforços para desenvolver técnicas diagnósticas físico-químicas sensíveis, eficazes e com menores custos, a espectroscopia vibracional no infravermelho vem mostrando-se como ferramenta ideal para análises de células microbianas, pois é capaz de reconhecer padrões vibracionais específicos e fornecer informações moleculares sobre amostras biológicas. Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo promover a caracterização de micro-organismos utilizando espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) a partir da inativação térmica por calor seco a 105°C. Para tal, foi utilizado o micro-organismo padrão *Saccharomyces cerevisiae* extraído e cultivado a partir do fermento comercial *Fleischmann*®. As colônias cultivadas foram coletadas e transferidas para placas de Petri (60x15mm), tiveram sua biomassa aferida e direcionadas a uma estufa de secagem, onde permaneceram a 105°C por intervalos de tempo e, por fim, foram novamente pesadas. Seguente ao processo de secagem, foi realizada a análise da inativação a fim de averiguar se os micro-organismos foram devidamente inativados. As amostras secas foram trituradas e levadas para leitura em um espectrofotômetro Cary 630 Agilent FTIR com módulo ATR acoplado para obtenção do perfil espectral. Tal perfil foi comparado com o obtido a partir da inativação utilizando paraformaldeído 4% por meio de Análises de Componentes Principais (PCA), Análise Hierárquica de Cluster (HCA) e Freeviz. Deste modo, concluiu-se que os tratamentos de inativação e secagem aumentam a biossegurança do operador e melhoram a sensibilidade da análise por FTIR. A técnica também contribuiu para a distinção de diferentes métodos de processamento de amostras.

Palavras-chave: diagnóstico; análises clínicas; análise multivariada.

ABSTRACT

Several microorganisms are responsible for infectious diseases that affect humans or other animals, which can be serious and lead to death. Therefore, the correct identification of these pathogens is necessary for the proper diagnosis, as well as for the definition of the correct treatment. Usually, traditional methods for identifying microorganisms involve phenotypic tests, a series of biochemical assays or genetic sequencing, which are effective but demand time and supplies. In efforts to develop sensitive, effective and cost effective physicochemical diagnostic techniques, infrared vibrational spectroscopy has proved to be an ideal tool for microbial cell analysis, as it is capable of recognizing specific vibrational patterns and providing molecular information about biological samples. In this sense, the present work aims to promote the characterization of microorganisms using vibrational spectroscopy in infrared with Fourier transform (FT-IR) from thermal inactivation by dry heat at 105°C. For this, the standard microorganism *Saccharomyces cerevisiae* extracted and cultivated from the commercial yeast *Fleischmann*® was used. The cultivated colonies were collected and transferred to Petri dishes (60x15mm), had their biomass measured and sent to a drying oven, where they remained at 105°C for time intervals and, finally, were weighed again. Following the drying process, the inactivation analysis was carried out in order to verify if the microorganisms were properly inactivated. The dried samples were ground and taken for reading in a Cary 630 Agilent FTIR spectrophotometer with ATR module coupled to obtain the spectral profile. This profile was compared with that obtained from inactivation using 4% paraformaldehyde through Principal Component Analysis (PCA), Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Freeviz. Thus, it was concluded that the inactivation and drying treatments increase the operator's biosecurity and improve the sensitivity of the FTIR analysis. The technique also contributed to the distinction of different sample processing methods.

Keywords: diagnosis; clinical analysis; multivariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Espectro da radiação eletromagnética incluindo seu comprimento de onda e frequência.....	18
Figura 2 -	Regiões do espectro eletromagnético e as respectivas alterações ocorrentes na amostra. RMN corresponde a Ressonância Nuclear Magnética e RSE Ressonância de Spin Eletrônica.....	19
Figura 3 -	Modos vibracionais de estiramento e dobramento.....	21
Figura 4 -	Vibrações fundamentais de infravermelho do grupo CH ₂	22
Figura 5 -	Modelo do oscilador harmônico.	23
Figura 6 -	Número de onda de acordo com as ligações químicas mantidas entre os carbonos.....	25
Figura 7 -	Fluxograma geral dos experimentos A.....	36
Figura 8 -	Fluxograma geral dos experimentos B.....	37
Figura 9 -	Fluxograma geral do ensaio preliminar de biossegurança utilizando inativação térmica de bactérias e levedura por calor seco a 105°C.....	38
Figura 10 -	Micro-organismos utilizados no ensaio preliminar.....	38
Figura 11 -	Fluxograma das etapas de secagem do ensaio preliminar	39
Figura 12 -	Fluxograma geral do processo de secagem utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como micro-organismo padrão.....	41
Figura 13 -	Fluxograma das etapas de isolamento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir do fermento comercial Fleischmann ®.....	42
Figura 14 -	Etapas gerais do processo de secagem.	43
Figura 15 -	Fluxograma geral dos ensaios de secagem 1,2 e 3.....	44
Figura 16 -	Fluxograma geral do ensaio de secagem 4	45
Figura 17 -	Etapas da análise de inativação dos ensaios 1 e 2.....	46
Figura 18 -	Etapas da análise de inativação do ensaio 4	47
Figura 19 -	Parâmetros testados para melhor aquisição espectral	48
Figura 20 -	Espectrofotômetro Cary 360 Agilent	49
Figura 21 -	Protocolo do tratamento com PFA.	50
Figura 22 -	Protocolo do tratamento Padrão.	51
Figura 23 -	Crescimento observados nas espécies <i>Micrococcus luteus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	53
Figura 24 -	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em microscópio óptico com	

	aumento de 40X.....	56
Figura 25 -	Ensaio 1 de secagem de <i>S. cerevisiae</i> utilizando diferentes quantidades de massa.....	56
Figura 26 -	Ensaio 2 de secagem da levedura <i>S. cerevisiae</i> em 990 minutos utilizando diferentes quantidades de biomassa.....	57
Figura 27 -	Ensaio 3 de secagem da levedura <i>S. cerevisiae</i> em 3230 minutos utilizando diferentes quantidades de biomassa.....	58
Figura 28 -	Ensaio 4: Teor de umidade das amostras do ensaio de estabilidade do perfil espectral por FT-IR.....	59
Figura 29 -	Espectros de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sob diferentes métodos de leitura. A figura D apresenta menos ruído e bandas mais definidas e representa o método D.....	61
Figura 30 -	Espectro da levedura <i>S. cerevisiae</i> submetida ao tratamento padrão .	65
Figura 31 -	Espectro da levedura <i>S. cerevisiae</i> submetida ao tratamento com PFA	65
Figura 32 -	Espectro da levedura <i>S. cerevisiae</i> submetida ao tratamento de secagem.....	66
Figura 33 -	Gráfico referente a máximos evidenciados a partir do processo de secagem.....	67
Figura 34 -	Gráfico das médias referentes dos dois tratamentos (secagem e PFA) x padrão.	68
Figura 35 -	Desvio padrão em relação a cada tratamento	68
Figura 36 -	Variância em relação a cada tratamento.....	68
Figura 37 -	Gráfico gerado a partir do teste-F.	69
Figura 38 -	Teste-T em relação as médias da secagem e PFA.	70
Figura 39 -	Relação entre as variâncias de cada tratamento.	70
Figura 40 -	Espectros FT-IR para cada tratamento evidenciando as regiões anômalas subtraídas nas etapas de pré-processamento.....	72
Figura 41 -	Desenvolvimento de critérios para processamentos de dados de FTIR. A) Dados de FTIR após pré-processamento. B) Regiões excluídas a partir da avaliação de valores do desvio-padrão.....	73
Figura 42 -	<i>Scatter plot</i> gerado a partir dos escores PC1 (0,851) e PC2 (0,061). A) <i>Scatter plot</i> evidenciando a distribuição dos pontos amostrais e a formação dos grupos entre os mesmos tipos de tratamento. B) <i>Scatter</i>	

	plot evidenciando a distribuição dos pontos amostrais com legenda para cada ponto amostral.....	75
Figura 43 -	Quadro referente aos valores dos escores gerados pela PCA antes e após a retirada das regiões anômalas.	76
Figura 44 -	Dendograma gerado pela HCA. C1: cluster 1 referente aos PFA, C2: cluster 2 referente ao padrão, C3: cluster 3 referente a secagem.	79
Figura 45 -	Gráfico gerado a partir do algoritmo Freeviz; os eixos dos componentes principais foram dispostos ortogonalmente e as dimensões dos eixos foram proporcionais a contribuição de cada componente PC1 (0,851); PC2 (0,061); PC3 (0,057) e; PC4 (0,014)	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Intervalos de secagem para os ensaios 1, 2, 3 e 4.	44
Tabela 2 –	Tabela referente ao teor de umidade médio perdido ao longo do processo de secagem e ao desvio padrão de cada experimento. s = desvio padrão.....	58
Tabela 3 –	Número de onda associado aos grupos funcionais obtidos a partir do FT-IR.....	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1	ESPECTROSCOPIA	16
3.1.1	Espectroscopia molecular	19
3.2	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	25
3.2.1	Espectroscopia infravermelho em análises microbiológicas.....	28
3.2.2	Biossegurança da análise espectroscópica de micro-organismos	29
3.3	ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA), ANÁLISE HIERÁRQUICA DE CLUSTER (HCA) E FREEVIZ.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	ENSAIO PRELIMINAR DE BIOSSEGURANÇA	37
4.1.1	Inativação das amostras microbiológicas por secagem de patógenos	38
4.1.2	ANÁLISE DA INATIVAÇÃO	40
4.2	DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE INATIVAÇÃO COM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	40
4.2.1	Isolamento do micro-organismo padrão <i>Saccharomyces cerevisiae</i>....	41
4.2.2	Ensaio de secagem	42
4.2.3	Análise da inativação	45
4.3	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO	47
4.3.1	Desenvolvimento de protocolos para análise espectral	47
4.3.2	Análises espectroscópicas de amostras inativadas por secagem	48
4.4	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS UTILIZANDO PARAFORMALDEÍDO A 4% (PFA).....	49
4.5	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS UTILIZANDO AMOSTRA FRESCA (PADRÃO).....	50
4.6	ANÁLISES COMPUTACIONAIS.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	ENSAIO PRELIMINARES	52

5.1.1	Inativação por secagem	52
5.2	ENSAIO DE SECAGEM E INATIVAÇÃO COM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	55
5.2.1	Ensaio de secagem	56
5.3	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO	60
5.3.1	Otimização e determinação da técnica.....	60
5.3.2	Aquisição dos espectros FTIR com diferentes tratamentos de inativação	62
5.4	ANÁLISES COMPUTACIONAIS.....	67
6	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87
	APÊNDICE A – APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO NA DETERMINAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FILMES DE <i>ANTHURIUM AFFINE</i>.....	93

1 INTRODUÇÃO

A espectroscopia vibracional no infravermelho tem sido amplamente empregada na análise de amostras biológicas, pois fornece informações químicas sobre inúmeros compostos, revelando a estrutura, composição do material analisado e permitindo a determinação desde moléculas mais simples até sistemas complexos como células e tecidos. Neste sentido, a técnica também se destaca como uma alternativa na identificação e caracterização de patógenos microbianos (FORATO et al., 2010; ERUKHIMOYITCH et al., 2005).

Fungos e bactérias são micro-organismos frequentemente responsáveis por doenças infecciosas que acometem seres humanos e outros animais, estas podem ser graves e levar o indivíduo a óbito. A correta identificação do patógeno associado a uma determinada infecção se faz necessária para a construção de um diagnóstico válido e realização do tratamento adequado, especialmente no contexto da utilização de antimicrobianos. Por conta disso, existem métodos tradicionais adotados na identificação destes agentes, os quais podem envolver uma série de testes fenotípicos, ensaios bioquímicos, sequenciamento genético ou técnicas como a espectrometria de massas (MS) associada à ionização por dessorção a laser assistida por matriz – tempo-de-voo (MALDI-TOF) (ALMASOUD et al., 2021; ERUKHIMOYITCH et al., 2005; YANG et al., 2014; CARBONELLE et al., 2011).

No entanto, estes métodos demandam suprimentos, tempo, podem apresentar altos custos e às vezes não são acessíveis. No intuito de desenvolver métodos instrumentais mais simples e eficientes para a identificação de micro-organismos, técnicas físico-químicas têm sido estudadas. Assim sendo, a espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) tem sido uma alternativa promissora por demandar menos tempo, custos e fornecer dados robustos para cada espécie microbiana analisada (ALMASOUD et al.; CARBONELLE et al., 2011; AHMED, AMIAMA; SEALY, 2009).

Os primeiros registros da abordagem por FT-IR na identificação de micro-organismos datam a partir da década de 1950 (RANDALL et al., 1951), porém somente anos depois através dos trabalhos de Naumman et al. (1991) a técnica foi reintroduzida e considerada válida também por outros pesquisadores. O surgimento dos interferômetros infravermelhos, inclusão da transformada de Fourier, acesso a computadores eficientes e a análises multivariadas foi essencial para o

impulsionamento do método, pois anteriormente os espectrofotômetros dispersivos utilizados apresentavam baixa performance (WENNING; SCHERER, 2013; MARIEY et al., 2001).

A espectroscopia na região do infravermelho depende da transição de estado de energia vibracional das moléculas, deste modo, através da técnica FT-IR a amostra é irradiada por um feixe infravermelho a partir do qual os fótons transferem energia para as moléculas e como consequência, há uma elevação no nível de excitação molecular acarretando na vibração das ligações moleculares. A absorção do infravermelho observada em números de onda é determinada pelas propriedades vibracionais do grupo funcional específico da molécula, por conta disso, cada material estudado terá um perfil espectral característico, assim é possível determinar agrupamentos químicos e identificar bactérias, fungos ou vírus (CHEN et al., 2015; NAUMANN et al., 1991).

Ainda que seja comum a aplicação da espectroscopia no infravermelho na identificação e caracterização de micro-organismos, são escassos trabalhos que levem em consideração a biossegurança durante a manipulação dos agentes infecciosos encaminhados ao aparelho FT-IR. Durante o processo de leitura das amostras, o material microbiano é depositado diretamente na superfície do cristal do aparelho, a qual posteriormente é higienizada com álcool 70% de acordo com as recomendações do fabricante. No entanto, existem micro-organismos resistentes a este tipo de intervenção que podem permanecer no equipamento ocasionando contaminações cruzadas ou gerando dados espectrais imprecisos (BERNARDI; COSTA, 2017).

Os estudos que levam em consideração a inativação dos micro-organismos, utilizam álcool 70% ou então paraformaldeído a 4% como alternativa para reduzir os riscos durante a manipulação. No entanto, o emprego destes métodos pode ser ineficaz ou até mesmo prejudicar a obtenção de dados espectrais satisfatórios.

Neste sentido, pesquisas voltadas ao desenvolvimento de metodologias seguras para identificação de micro-organismos através de espectroscopias vibracional no infravermelho são necessárias para avanços nesta área.

2 OBJETIVOS

A seguir apresentam-se os objetivos gerais e específicos que nortearam este trabalho.

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver técnicas para a inativação e caracterização de amostras de micro-organismos utilizando espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FT- IR).

2.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver técnicas de inativação de micro-organismos por calor seco para análises por FT-IR
- b) Comparar protocolos de inativação e suas implicações na obtenção de dados espectrais de micro-organismos.
- c) Analisar e aprimorar perfis espectrais de micro-organismos após retirada de água pela inativação térmica.
- d) Comparar pré-tratamentos descritos na literatura e o de secagem utilizando análise multivariada e espectroscopia vibracional no infravermelho.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Esta seção trata-se dos aspectos gerais, específicos e fundamentos teóricos do método espectroscópico empregado no presente trabalho. Para tal, discorre-se sobre a espectroscopia e seu conceito geral e sua ramificação correspondente à faixa da radiação eletromagnética no infravermelho. Por fim, a fundamentação teórica também traz os procedimentos de análise multivariada utilizados para o processamento dos dados espectroscópicos gerados.

3.1 Espectroscopia

A origem da espectroscopia se deu a partir dos experimentos realizados inicialmente por Isaac Newton em 1666, quando este demonstrou que a luz branca, ao passar por um prisma, se decompõe em diferentes cores formando um espectro arco-íris. No século XIX, William Hyde Wollaston observou que passando a luz por uma fenda e depois por um prisma, surgiam linhas escuras no espectro, as quais ele interpretou como o limite das cores. As linhas correspondiam aos limites das fendas espectrográficas, as escuras relacionadas à absorção e as resplandecentes com a emissão de luz. Experimentos como estes embasaram o interesse e desenvolvimento da espectroscopia como ciência (ORÉFICE, 2012).

A designação da espectroscopia, em seu modo abrangente e complexo, inclui geração e registro de sinais gráficos a partir de perturbações provocadas na matéria estudada por um feixe incidente. No entanto, tradicionalmente, esta é retratada como um termo geral para a ciência que explora a interação entre a matéria e a radiação eletromagnética, tendo como um dos principais objetivos a determinação da energia de átomos e moléculas (ORÉFICE, 2012; SALA, 2011).

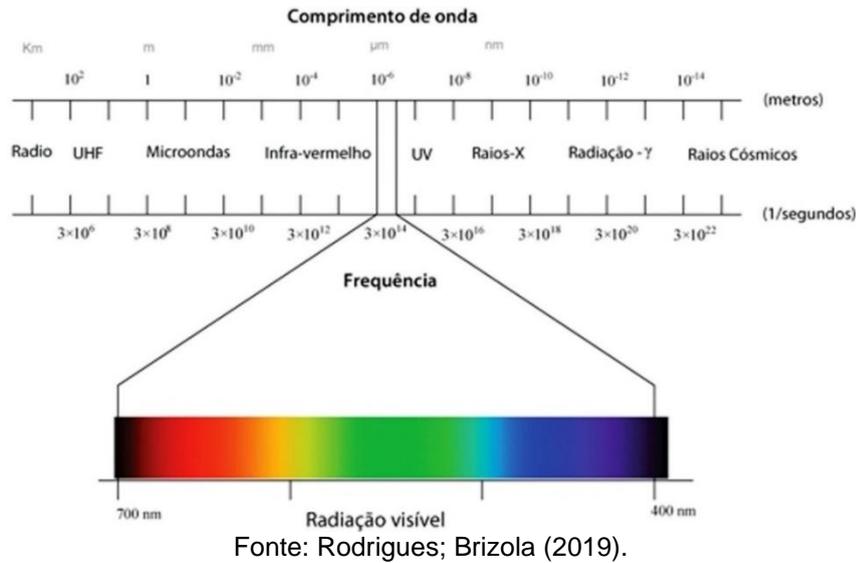
A radiação eletromagnética é uma forma de energia transmitida através do espaço em alta velocidade, composta por dois vetores básicos, um vetor campo elétrico e outro vetor campo magnético, mutualmente ortogonais que se propagam em direções específicas. Além disso, também apresenta dualidade onda-partícula, o que conseqüentemente, acarreta comportamentos ondulatórios e corpusculares distintos (CANEVAROLO, 2017).

A natureza ondulatória da radiação eletromagnética manifesta-se, durante sua propagação em uma área de um ponto a outro, por meio de fenômenos físicos de interferência, dispersão, polarização e coerência da radiação. Neste sentido, pode ser descrita como uma onda de propriedades específicas, como comprimento de onda, frequência, velocidade e amplitude. No entanto, diferentemente de ondas sonoras, por exemplo, a radiação eletromagnética se propaga facilmente pelo vácuo e em maior velocidade (SKOOG et al., 2006).

Em contraste, a interação com a matéria ocasiona o comportamento corpuscular, o qual geralmente pode ser demonstrado pelo efeito Compton e efeito fotoelétrico. No efeito Compton, há transferência de energia do fóton incidente para elétrons livres do material, acarretando no espalhamento de um fóton com energia inferior ao incidente. Já o efeito fotoelétrico é caracterizado pela ejeção de elétrons energizados, quando a radiação incide na matéria. Os tipos de interação mais relevantes para espectroscopia envolvem transições entre diferentes níveis energéticos das espécies químicas, dependendo fortemente da energia da radiação empregada e o modo de detecção (YOSHIMURA, 2009).

O espectro eletromagnético cobre amplas faixas de energias, isto é evidenciado em diferentes frequências e comprimentos de onda. As divisões principais do espectro eletromagnético estão ilustradas na *Figura 1*. A parte visível, ou seja, aquela que pode ser enxergada pelo olho humano, compõe uma faixa diminuta em relação ao espectro total. As faixas caracterizadas por frequências mais altas e, conseqüentemente, menores comprimentos de onda carregam mais energia. Um fóton de raio X ($\nu = 3 \times 10^{18}$ Hz, $\lambda = 10^{-10}$ m), por exemplo, é 10.000 vezes mais energético que um fóton emitido por uma lâmpada comum ($\nu = 3 \times 10^{14}$ Hz, $\lambda = 10^{-6}$ m) (SKOOG et al., 2006).

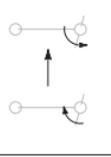
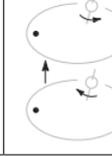
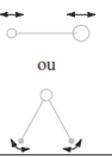
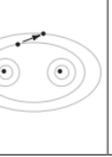
Figura 1 - Espectro da radiação eletromagnética incluindo seu comprimento de onda e frequência.



Múltiplas regiões do espectro eletromagnético podem ser empregadas em análises espectroscópicas, porém, uma vez que as faixas representam energias distintas com comprimentos de onda específicos, cada uma possui seus respectivos métodos de medidas. Neste sentido, existem diferentes equipamentos e técnicas de espectroscopia capazes de gerar dados espectroscópicos. Associadamente, a resposta da matéria ao interagir com a radiação eletromagnética também varia de acordo com as características da radiação incidente (CANEVAROLO, 2004; SKOOG et al., 2006).

As regiões do espectro eletromagnético, empregadas em análises espectroscópicas, e transições atômicas e moleculares provenientes da interação com o analito estão representadas na Figura 2. A relação entre a radiação incidente e amostra pode resultar em diferentes comportamentos, a ressonância nuclear magnética (RNM) e a ressonância de spin eletrônica (RSE) causam leves modificações como, por exemplo, alterações de spin, já no UV/visível as alterações ocorrem na distribuição eletrônica e, mais drasticamente, no caso dos raios γ ocorrem mudanças drásticas na configuração nuclear (SKOOG et al., 2006).

Figura 2 - Regiões do espectro eletromagnético e as respectivas alterações ocorrentes na amostra. RMN corresponde a Ressonância Nuclear Magnética e RSE Ressonância de Spin Eletrônica.

Tipo de alteração quântica:	Alteração de <i>spin</i>		Alteração da orientação	Alteração da configuração	Alteração da distribuição eletrônica		Alteração da configuração nuclear
							
	10^{-2}	1	100	10^4	10^6	Número de onda, cm^{-1} 10^8	
	10 m	100 cm	1 cm	100 μm	1.000 nm	10 nm	Comprimento de onda 100 pm
	3×10^6	3×10^8	3×10^{10}	3×10^{12}	3×10^{14}	3×10^{16}	Frequência, Hz 3×10^{18}
	10^{-3}	10^{-1}	10	10^3	10^5	10^7	Energia, J mol^{-1} 10^9
Tipo de espectroscopia:	RMN	RSE	Microonda	Infravermelho	Visível e ultravioleta	Raios X	Raios γ

Fonte: Skoog (2006).

Na região do infravermelho (IR), observa-se a ocorrência de alterações física na configuração da molécula, caracterizadas por modos vibracionais distintos. Neste sentido, a espectroscopia infravermelha, tradicionalmente, pertence aos campos de estudos da Espectroscopia Vibracional.

3.1.1 Espectroscopia molecular

Os espectros moleculares fundamentam-se nos fenômenos de absorção, emissão, ou o espalhamento de um fóton quando a energia de uma molécula varia. Neste caso, a energia da molécula pode se alterar por meio de transições eletrônicas e, especialmente, pelas mudanças de estados de rotação e de vibração. Os espectros moleculares propiciam informações sobre maior número de propriedades, e sua análise permite a determinação de valores para forças, os comprimentos e ângulos das ligações (ATKINS; de PAULA, 2008).

Os espectros obtidos por absorção podem ser monitorados através da variação de frequência. Quando uma amostra é irradiada, ocorre a absorção e a emissão da energia, a diferença entre esses dois processos é medida por um detector e expressa em frequência. A espectroscopia de absorção é largamente aplicada a estudos de transições eletrônicas, rotações e vibrações moleculares. No entanto, as transições de rotação e vibração podem se induzidas por absorção ou emissão direta da radiação na região do infravermelho ou por meio

da Espectroscopia Raman, neste observam-se as frequências da radiação espalhada (ATKINS; de PAULA, 2008).

A intensidade das linhas espectrais é expressa pela transmitância, T , esta é a razão entre a intensidade transmitida, I , e a intensidade incidente, I_0 , ambas em mesma frequência, desta forma, $T = I / I_0$. Experimentalmente a intensidade transmitida varia com a espessura da amostra e com a molaridade $[J]$ do analito, de acordo com a lei de Lambert-Beer.

A Espectroscopia na região do Infravermelho e Raman fornecem padrões vibracionais distintos e fontes de informações sobre as moléculas. A depender da molécula, mesmas ou diferentes transições vibracionais podem ser exploradas e as técnicas promovem informações complementares. Em Raman, as transições vibracionais são induzidas pela dispersão inelástica da luz monocromática ao longo da molécula. Já para a espectroscopia por absorção na região do Infravermelho, a vibração normal que apresentar uma variação no momento dipolar, será ativa no infravermelho e uma banda será observada no espectro IR. (CANEVAROLO, 2004; SIEBERT; HILDEBRANDT, 2008).

Compostos que tenham ligação covalente, independente de serem orgânicos ou inorgânicos, absorvem diferentes frequências de radiação eletromagnética na região do Infravermelho do espectro eletromagnético. A região do Infravermelho está associada a transições de energia vibracional e também, possui frequência inversamente proporcional ao comprimento de onda e diretamente proporcional a energia. No entanto, comumente a radiação na região do infravermelho é determinada em termos da unidade de número de onda, a qual é também diretamente proporcional à energia (PAVIA et al., 2010).

Uma molécula, ao absorver radiação na região do infravermelho, sofre mudanças no seu estado energético, atingindo assim, um estado mais elevado de energia. Nesta faixa da radiação, as alterações de energia correspondem a ordens de 8 a 40 kJ/mol. As modificações observadas englobam frequências vibracionais de estiramento e dobramento das ligações. Inicialmente, a energia incidente é absorvida e acarreta no aumento da amplitude dos movimentos vibracionais das ligações nas moléculas (PAVIA et al., 2010; ATKINS; de PAULA, 2010)

No entanto, apenas moléculas capazes de sofrer alterações no momento dipolo conseguem absorver energia no infravermelho. Para ocorrer absorção da

energia, é necessário que a ligação apresente momento dipolar seja capaz de variar com a mesma frequência da radiação incidente. Deste modo, o dipolo elétrico oscilante acopla-se ao campo eletromagnético da radiação, a qual varia de forma senoidal e incorpora-se a molécula (CANEVAROLO, 2004).

A radiação infravermelha absorvida pela molécula é convertida em energia molecular vibracional, estas vibrações moleculares podem ocorrer em dois modos clássicos, de estiramento ou dobramento (Figura 3). As vibrações de estiramento são movimentos rítmicos de aumento e encurtamento ao longo do eixo de ligação entre os átomos, acarretando na variação da distância interatômica. Já as vibrações de encurtamento consistem em mudanças no ângulo entre ligações com um átomo em comum ou o movimento de um único grupo de átomos, sem que ocorra movimento nos outros grupos (SILVERSTEIN et al., 2005).

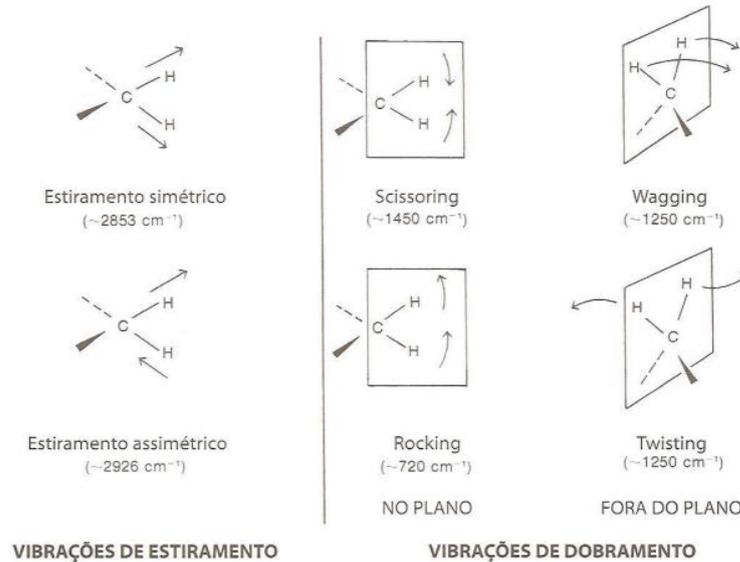
Figura 3 - Modos vibracionais de estiramento e dobramento.



Fonte: Silvestein et al. (2005).

Outros tipos complexos de estiramento e dobramento também podem ser ativos, as vibrações de dobramento ainda podem ser designadas por *scissoring*, *wagging*, *rocking* e *twisting* (Figura 4). Em moléculas constituídas por grupos de três ou mais átomos, onde pelo menos dois destes são idênticos, há estiramentos simétricos e assimétricos. Assim, estas vibrações citadas são conhecidas como vibrações fundamentais e originam-se da excitação de um estado fundamental para um estado excitado (PAVIA et al., 2010).

Figura 4 - Vibrações fundamentais de infravermelho do grupo CH₂.

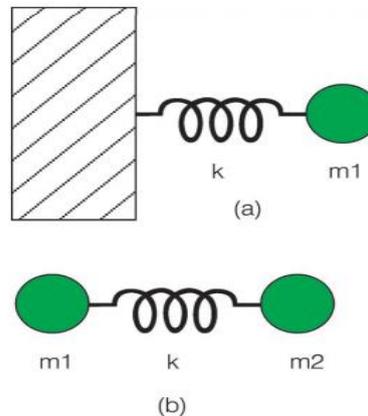


Fonte: Silvestein et al. (2009).

Dentro desta perspectiva é possível explorar o modo como a força de ligação e as massas dos átomos ligados afetam as frequências de vibração. Uma molécula diatômica pode ser considerada como duas massas vibratórias conectadas por uma mola. A distância entre a ligação muda continuamente e pode ser definida como distância de equilíbrio, quando a mola é esticada ou comprimida além da distância, a energia potencial do sistema aumenta. Similar a um oscilador harmônico, quando uma ligação vibra, a energia de vibração é contínua e periodicamente muda de energia cinética para energia potencial (SIEBERT; HILDEBRANDT, 2008).

Portanto, para compreender os fenômenos relacionados as vibrações ocorrentes nas ligações químicas, sejam estas relacionadas a variações nas distâncias de equilíbrio ou modificações angulares, o modelo do oscilador harmônico pode ser utilizado. Este é composto basicamente por uma partícula de massa m e uma parede de massa superior a massa da partícula, ambos conectados por uma mola (Figura 5) (WILSON et al., 1955).

Figura 5 - Modelo do oscilador harmônico.



Fonte: Oliveira (2001).

A vibração corresponde a um movimento periódico da partícula em relação ao eixo da mola, contribuindo para sua distensão e, conseqüentemente modificando a distância entre a partícula e a parede. No entanto, devido a diferença entre a massa da parede e da partícula apenas a partícula movimenta-se. Se uma variação na distância Δx entre a partícula e a parede for aplicável, a partícula irá se distanciar da parede, mas será trazida de volta uma vez que está ligada à parede pela mola. Portanto, nesta situação a mola atua como força restaurada da posição inicial (CLARO, 2018; SIEBERT; HILDEBRANDT, 2008).

Dois leis da física estão associadas a estes movimentos, a primeira corresponde a Segunda Lei de Newton, a qual postula que força é igual ao produto da massa pela aceleração e, a Lei de Hooke, onde a força de restauração, igual ao produto do deslocamento sofrido pela partícula vezes uma constante, chamada de constante de força (intrínseca a cada mola). Juntando as duas equações, obtêm-se a equação abaixo, correspondente ao movimento da mola. O sinal negativo presente no primeiro membro indica que a força de restauração da mola é oposta a força de deslocamento sofrido pela partícula (SALA, 2011; CLARO, 2018; SIEBERT; HILDEBRANDT, 2008).

$$F = - k\Delta x = ma \quad (1)$$

Uma vez que o movimento ocorre de forma periódica, a distância Δx pode ser associada a uma função periódica do tipo seno ou cosseno. Obtendo-se assim, a seguinte equação

$$\Delta x = x_0 \cos(2\pi vt + \varphi) \quad (2)$$

Onde x_0 é a posição inicial da partícula e a função cosseno indica a periodicidade do movimento, bem como o termo 2π ; v é a frequência do movimento, t é a dependência temporal do mesmo e ϕ uma constante qualquer. Substituindo a equação (2) na expressão da equação (1) e, considerando que a aceleração corresponde a derivada segunda de Δx em relação ao tempo, como resultado há a seguinte expressão:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (3)$$

Logo, esta expressão (4) fornece frequência de oscilação v da partícula de massa m , ligada a uma parede de massa infinita por uma mola de constante k . Analisando diretamente o sistema composto por duas partículas de massa mola m_1 e m_2 , interligadas por uma mola de constante k , observa-se que as duas partículas irão sofrer deslocamentos, chamados de Δx_1 e Δx_2 . As leis de movimento neste caso, serão:

$$\begin{aligned} m_1 a_1 - k(\Delta x_2 - \Delta x_1) &= 0 \\ m_2 a_2 - k(\Delta x_2 - \Delta x_1) &= 0 \end{aligned} \quad (4)$$

Considerando as equações em (4) similares a descrita em (2), ao substituir em (3) e resolver o sistema, obtêm-se a frequência para duas partículas a partir da expressão abaixo:

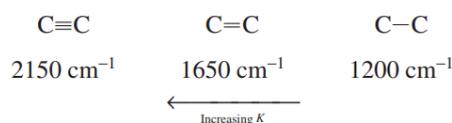
$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (5)$$

onde μ refere-se à massa reduzida da molécula

$$\mu = \frac{m_1 + m_2}{m_1 m_2} \quad (6)$$

Logo, uma molécula diatômica apresenta um modo vibracional definido em função das massas dos dois átomos e também da constante k . Além disso, em ligações triplas são três vezes as ligações simples, enquanto as constantes de força para ligações duplas são o dobro das simples. Nota-se que as ligações mais fortes têm uma força maior constante K e vibram em frequências mais altas que ligações mais fracas. As ligações entre átomos de mais densos vibram em frequências mais baixas do que as ligações entre átomos mais leves (BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009). Em geral, ligações triplas são mais fortes que ligações duplas ou simples e têm frequências de vibração mais altas com números de onda superiores (Figura 6).

Figura 6 - Número de onda de acordo com as ligações químicas mantidas entre os carbonos.



Fonte: Silvestein (2005).

3.2 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

A espectroscopia vibracional no infravermelho explora a interação entre a radiação eletromagnética na região do infravermelho (IR) e a matéria, esta faixa apresenta valores de comprimento de onda maiores que a luz visível e menores que micro-ondas. A energia de transição proveniente desta interação, varia de acordo com a região do espectro eletromagnético. No entanto, somente entre os comprimentos de onda de 2,5 μm até 25 μm observa-se uma região associada ao infravermelho vibracional. No que se refere a faixa do infravermelho, a transição de energia corresponde a mudanças no modo vibracional de uma molécula (CANEVAROLO, 2017; ATKINS, 2008).

As moléculas apresentam vibrações fundamentais, as quais são padrões contínuos de vibração e fazem parte de sua natureza química. Ao absorver radiação na faixa do infravermelho, as moléculas são excitadas e induzidas a um estado de maior energia. Neste processo, as frequências de absorção são equivalentes as frequências vibracionais fundamentais e a energia absorvida promove o aumento da amplitude dos movimentos vibracionais. No entanto, apenas frequência específicas podem ser absorvidas e, existem regras de seleção para ocorrência da absorção no infravermelho, logo, nem todas as moléculas absorvem a energia proveniente do IR. (PAVIA et al., 2014).

Para que uma molécula seja considerada ativa no IR e absorva esta energia, é necessário a existência de ligações com um momento dipolo que mude em função do tempo. Portanto, para a transferência de energia, o dipolo elétrico oscilante é fundamental e deve ser capaz de mudar na mesma frequência da radiação introduzida para que assim, o dipolo oscilante possa acoplar ao campo eletromagnético da radiação incidente. Uma vez que cada ligação química apresenta seu padrão vibracional, moléculas distintas não apresentarão mesmo

comportamento de absorção no IR. Neste sentido, o perfil espectral obtido funciona como impressões digitais, fornecendo informações sobre a natureza química e estrutura do material analisado (SILVERSTEIN, WEBSTER; KIEMLE, 2005; PAVIA et al., 2014).

Os grupos funcionais identificados a partir dos máximos em um perfil espectral podem ser associadas a determinados níveis de energia, frequência ou número de onda. Exemplificando, moléculas que apresentam numerosas ligações O-H, apresentarão máximos em um espectro IR próximos do número de onda em 4000 cm^{-1} ou moléculas que apresentam ligações C=C vão apresentar máximos entre 1800 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} . A análise de um espectro IR pode considerar diversos parâmetros, ao abordar a posição dos picos pode-se descrever aspectos como energia, frequência, número de onda ou comprimento de onda, essas informações serão observadas nos pontos associados ao eixo X. Ao considerar a intensidade dos picos, é possível realizar inferências quanto ao grau de absorção e transmissão da energia, informação expressa pelo eixo Y. Ademais, é possível descrever um espectro a partir do formato dos picos, designando-os como largos, estreitos ou agudos (PAVIA et al., 2014; SALA, 2011; SILVERSTEIN, WEBSTER; KIEMLE, 2005).

O instrumento que viabiliza a obtenção de um espectro IR é o espectrômetro de infravermelho ou espectrofotômetro. O aparelho mais comum e moderno utilizado na rotina de análises é o espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, o qual é capaz de fornecer espectros IR em segundos. Neste processo, é gerado um sinal complexo chamado de interferograma, cujo processamento é realizado por um computador e apresenta frequências resultantes da radiação que foi transmitida. Por conta disso, atribui-se uma operação matemática a fim de separar essas frequências e torná-las passíveis de análises, a transformada de Fourier (CANEVAROLO, 2017; SILVERSTEIN; BASSLER, 1963).

A espectroscopia na região do infravermelho tem sido amplamente utilizada como método confiável na análise de compostos e matrizes complexas, permitindo que substâncias orgânicas possam ser identificadas através de seus modos vibracionais (SILVERSTEIN; BASSLER, 1962). Para tal, é necessário construir ajustes que otimizem a aquisição dos espectros e sejam capazes de fornecer dados satisfatórios. Espectros em boa qualidade permitem a identificação correta das bandas, para tal, indispensavelmente devem apresentar o menor ruído possível

(BENETTI et al., 2010). Há dois parâmetros básicos de aquisição do equipamento espectrofotômetro relacionados com a qualidade de sinal abordados nesta dissertação, o número de varreduras e a resolução. Na literatura, assim como propostado por Benetti et al. (2010), citam-se os mesmos padrões explorados nesta dissertação e a velocidade do espelho móvel como parâmetro ajustável, mas este último não exigiu modificações.

O número de varreduras indica quantas vezes será realizada a aquisição do espectro background e o da amostra, em seguida o sistema calcula a média a fim de construir o espectro final. No espectrofotômetro é possível efetuar várias varreduras e acumular interferogramas correspondentes, este processo é conhecido como co-adição. A co-adição traz como vantagem o aumento da relação sinal/ruído, produzindo um espectro final com menos ruídos. A resolução corresponde a capacidade do equipamento distinguir o perfil espectral de duas bandas próximas e identificá-las como picos independentes, também representa o número de pontos de aquisição em um espectro durante a varredura do mesmo. Comumente, recomenda-se valores menores de resolução a fim de identificar melhor a posição dos picos e aumentar a relação sinal/ruído. No entanto, a escolha da resolução depende da amostra e do tipo de informação desejada do espectro (CANEVAROLO JR, 2004).

Na literatura observa-se que os parâmetros de análise variam de acordo com o material estudado e o espectrofotômetro utilizado. Santos et al. (2012) comparou métodos estatísticos e não-estatísticos utilizando espectros infravermelhos de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis* com objetivo de testar o potencial destes na discriminação de micro-organismos. O filme bacteriano produzido por Santos et al. (2012), foi direcionado ao espectrofotômetro Spectrum Spotlight 400 FT-IR da Perkin Elmer, onde foi analisado com resolução de 4 cm^{-1} em modo de transmissão com 32 varreduras. Já Sakane, Matsuura; Simioni (2019) investigaram a composição química de chás verdes provenientes de agricultura convencional e agricultura orgânica, observando as diferentes concentrações químicas de cada amostra utilizando espectroscopia no infravermelho. O espectrofotômetro foi o Spectrum Spotlight 400 FT-IR da Perkin Elmer, mesmo modelo utilizado por Santos et al. (2012). No entanto, apenas 12 varreduras foram utilizadas, resolução de 4 cm^{-1} e o material analisado não esteve em sob forma de filme. Autores como Rodriguez et al. (2018) e Puzey et al. (2008) modificaram tanto a varredura como a resolução, a qual foi igual a 2 cm^{-1} .

3.2.1 Espectroscopia infravermelho em análises microbiológicas

A utilização de FTIR para a identificação de micro-organismos tem sido estudada desde 1950, no entanto, a introdução da técnica como um método válido para análises microbiológicas só ocorreu anos depois. Em 1991, Naumman e colaboradores publicaram o primeiro trabalho que impulsionou diversos estudos posteriores sobre FTIR na discriminação, identificação e caracterização de micro-organismos. A partir desses estudos, revela-se o potencial da técnica, pois foi demonstrado que o sinal infravermelho dos micro-organismos é altamente específico e gera impressões digitais padrões capazes de investigar a identidade específica destes. Além disso, a simplicidade e versatilidade das análises FTIR foram propostas como meio eficaz e rápido para diferenciar, classificar e identificar em larga escala até em nível de subespécie (MARIEY et al., 2005; NAUMMAN et al., 1991; YANG et al., 2020).

A técnica FTIR permite o estabelecimento de impressões digitais da estrutura da célula intacta do micro-organismo. Estes padrões obtidos correspondem a características vibracionais de todos os constituintes químicos da célula, ou seja, das proteínas, DNA e RNA, membranas e outros componentes da parede celular. Observa-se a aplicação também para estudos de processos que ocorrem na célula microbiana, como por exemplo, a análise das modificações estruturais decorrentes do processo de morfogênese da espécie *Candida albicans* (ADT et al., 2006).

A compreensão correta dos espectros IR das células microbianas requer uma percepção geral de sua composição e estruturas químicas presentes, as quais podem variar entre as espécies. No caso das bactérias, observam-se estruturas citoplasmáticas não compartimentalizadas e mais simples do que em leveduras e fungos. No entanto, externamente as bactérias possuem estruturas moleculares complexas. Estas incluem membrana externa, parede celular, cápsulas e, às vezes, camadas específicas. Uma das principais estruturas que permite a diferenciação entre bactérias a partir de espectros IR é o envelope celular, formado pela membrana e parede celular, os quais podem ser enquadrar as bactérias em Gram-Positivas e Gram-negativas (NAUMMAN; DIETER, 2006).

Para leveduras os lipídios e polissacarídeos componentes da membrana têm um impacto significativo na sistemática e filogenia destas, mas compostos de reserva como o glicogênio também podem ser indicadores, uma vez que sua

concentração é dependente do estado fisiológico da célula. As paredes celulares dos fungos são compostas por complexos polissacarídeos e glicoproteínas, onde a composição qualitativa destes é de valor taxonômico e a composição quantitativa varia com as condições de cultivo (NAUMMAN; DIETER, 2006).

Portanto, bandas de absorção no Infravermelho podem ser atribuídas a grupo funcionais componentes da estrutura química do micro-organismos. O uso de técnicas espectroscópicas vibracionais requer padronização de procedimentos para culturas e amostragem, bem como controle de parâmetros de aquisição espectral. Por outro lado, a análise espectral não necessita da determinação de todas as frequências, intensidades e larguras de banda atribuindo-as a compostos moleculares específicos. Métodos quimiométricos e técnicas estatísticas multivariadas podem ser empregadas para a compreensão total dos espectros, uma vez que são capazes de reconhecer padrões (MAQUELIN et al., 2002).

Existem diferentes análises multivariadas aplicáveis a identificação de micro-organismos, estas referem-se a métodos estatísticos que possibilitam o estudo simultâneo de múltiplas variáveis de um determinado objeto sob investigação. Uma vez que o número de variáveis nestes estudos é elevado, a representação gráfica do conjunto de dados viabiliza a melhor obtenção de resultados. Os algoritmos para análise multivariada são responsáveis por elaborar projeções que representem o máximo das informações contidas em um conjunto de dados analíticos. Neste contexto, entre as abordagens multivariadas empregadas no estudo de micro-organismos, a análise dos componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de cluster (HCA) têm se mostrado frequentes em diversos estudos (MAQUELIN et al., 2002).

3.2.2 Biossegurança da análise espectroscópica de micro-organismos

A manipulação de micro-organismos patógenos requer cuidados e atenção relacionados as boas práticas de laboratório a fim de garantir a segurança dos colaboradores responsáveis pelo manuseio do material, atenuar riscos quanto a exposição a agentes biológicos potencialmente prejudiciais e evitar contaminações. Nesse sentido, a Biossegurança é o conjunto de condutas aplicadas a prevenção, redução ou eliminação completa dos riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino ou desenvolvimento tecnológico. Os riscos no ambiente

laboratorial podem ser classificados em cinco tipos distintos, risco I (físicos), risco II (químicos), risco III (biológicos), risco IV (ergonômicos) e Risco V (acidentes) (PENNA et al., 2020).

Em relação aos acidentes individuais e coletivos, considera-se em especial os riscos químicos, físicos e biológicos. Os riscos biológicos também possuem diferentes classes de acordo com patogenicidade, virulência, modos de transmissão, disponibilidade de medidas profiláticas eficazes, de tratamento eficaz e endemicidade. Sendo assim, as normas de contenção baseadas nos princípios de biossegurança são determinadas de acordo com agente biológico que está sendo manipulado (RICHMOND; MCKINNEY, 2009). Agentes biológicos não patogênicos, com baixo risco individual e coletivo pertencem a classe de Risco 1. Os agentes capazes de causar infecções leves ou moderadas aos seres humanos e outros animais, porém com disseminação e propagação externa baixa, com medidas terapêuticas e profiláticas eficientes pertencem a classe de risco 2.

Todos os micro-organismos utilizados nos ensaios preliminares descritos nesta dissertação estão inclusos na classe de risco 2, portanto, a adoção de boas práticas inclui também o uso de barreiras físicas primárias como, por exemplo, cabine de segurança biológica e equipamentos de proteção individual. Além das medidas de contenção usuais, destacam-se os cuidados relacionados a contaminação de superfícies de trabalho e equipamentos, pois a manipulação inadequada dos patógenos pode gerar contaminações cruzadas. Neste caso, uma vez que o espectrofotômetro infravermelho realiza a leitura da amostra a partir da inserção direta do material no cristal contendo o detector, também é possível ocorrer contaminações durante a obtenção dos dados microbiológicos (PENNA et al., 2020).

Para construir o perfil espectral de uma substância, por exemplo, é necessário depositar a amostra no anteparo detector e realizar a leitura, ao final do processo a região é higienizada com álcool 70% e novas análises podem ser realizadas. Tais etapas também são empregadas para ensaios com micro-organismos, todavia, há espécies resistentes a desinfecção com álcool 70%. Segundo Bernardi (2017), a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* apresenta resistência à desinfecção por álcool 70%, devido a sua espessa parede celular constituída de peptidoglicano. Cepas padrão de *Klebsiella pneumoniae* demonstram sensibilidade a inativação por álcool 70%, porém em estudos conduzidos por Guo (2015), amostras clínicas evidenciaram que apenas 52% das bactérias são inativadas. Evidencia-se assim que

a atividade desinfetante pode variar de acordo com a cepa, devido a mecanismos de resistência desenvolvidos ao longo do tempo.

A espectroscopia vibracional no IR como técnica diagnóstica de micro-organismos patógenos requer medidas de redução dos riscos de infecção, uma vez que depende do manejo de agentes biológicos da classe de risco 2 e do contato direto entre a amostra com o aparelho. De acordo com Oliveira et al. (2016), a desinfecção incompleta ou realizada de maneira errada pode acarretar no aumento de micro-organismos resistentes. Observa-se na literatura métodos complementares aplicados na redução do risco de contaminação em análises espectroscópicas, estes são empregados no preparo dos agentes microbiológicos a serem analisados. No estudo conduzido por Ayu et al. (2018), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* foram inativados em álcool 70% a fim de proteger o operador do espectrofotômetro do risco de infecção. Costa et al. (2016) utilizou como substância de inativação uma solução de paraformaldeído 4%, no qual os isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* permaneceram em repouso por três horas a temperatura ambiente permitindo que a substância realize a inativação.

A inativação de micro-organismos patógenos por calor seco também pode ser utilizada como forma de minimizar os riscos de infecção ao manipular amostras microbiológicas, nesta dissertação 105°C por 55 minutos foi eficaz para quatro espécies diferentes. Osman, Garnotel e Drancourt (2017) estudaram a tolerância térmica de diferentes isolados clínicos de *Mycobacterium canettii* e uma cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* em temperaturas variadas, após 75 minutos de exposição a 25°C, 35°C e 45°C apenas um dos isolados de *M. canettii* apresentou redução significativa no número de colônias. No entanto, ao comparar a tolerância térmica com *M. tuberculosis*, as cepas clínicas de *M. canetti* apresentaram redução significativa no número de colônias. Portanto, observa-se que a tolerância térmica pode variar entre as cepas e, constatou-se que a temperatura máxima tolerada foi de 55°C em um intervalo de 90 minutos.

Em termos da análise IR, a inativação por calor seco além de eliminar as células viáveis potencialmente contaminantes, reduz o teor hídrico do material a ser analisado. A água presente em uma amostra apresenta forte absorção e pode encobrir a absorção de outros grupos funcionais e assim limitar informações

químicas. Por conta disso, a secagem pode ser utilizada com a finalidade de retirar a água presente no material e construção de um filme seguro a ser levado ao espectrofotômetro. Para garantir a segurança durante a operação do espectrofotômetro IR, podem ser utilizados micro-organismos padrões como, por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura é largamente utilizada na indústria e é um dos eucariotos mais estudados, pois apresenta contribuição na produção de fármacos, produtos fermentados, bebidas alcoólicas e enzimas de interesse industrial. Sua ampla utilização na indústria e na pesquisa se dá tanto por não apresentar riscos de infecção ao ser humano ou outros animais, quanto pelo volume de informações conhecidas acerca de seu metabolismo (DE ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015; BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009).

3.3 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA), ANÁLISE HIERÁRQUICA DE CLUSTER (HCA) E FREEVIZ

A análise de componentes principais (PCA) é uma técnica estatística de análise multivariada capaz de transformar linearmente um conjunto inicial de variáveis correlacionadas entre si em um novo conjunto menor de variáveis não correlacionadas, contendo a maior parte da informação do conjunto inicial. Esta é a técnica mais conhecida e associada ao redimensionamento de dados, reduzindo dados volumosos sem que ocorra perda de informações. Por meio da PCA, o conjunto de dados reduzidos a um conjunto de variáveis de mesma dimensão são designados componentes principais. Em geral, mais de um componente são obtidos e cada um corresponde a combinação linear de todas as variáveis originais, estes são independentes entre si e visam reter o máximo de informação referente a variação total acumulada nos dados (HONGYU, SANDANIELO; DE OLIVERIA JUNIOR, 2016).

A PCA redistribui a variação observada dos eixos originais em novos eixos ortogonais não correlacionados, gerando assim os componentes principais e possibilitando a construção de agrupamentos para dados relacionados. Como consequência, a técnica fornece um gráfico que representam as amostras em um sistema cartesiano, no qual cada eixo é referente a um componente principal. Neste sentido, há a formação de agrupamentos de acordo com sua variância ou comportamento dentro da população, evidenciando-se a variação das características

contidas em cada conjunto de dados. A representação dos dados em gráfico facilita a interpretação e reconhecimento de padrões, por conta disso os grupos com características parecidas são imediatamente identificados através da PCA. Além disso, é possível identificar quais variáveis contribuem mais para a formação dos grupos amostrais (CORREIA; FERREIRA, 2007; VARELLA, 2008).

Assim como a PCA, a análise hierárquica de cluster (HCA) facilita a classificação de elementos em grupos por suas características e é aplicável a inúmeras áreas do conhecimento, como nas ciências sociais e comportamentais, ciências biológicas, medicina, informática, entre outras. A HCA é uma técnica exploratória de dados volumosos que busca formar agrupamentos de acordo com as similaridades acumuladas, a fim de obter-se homogeneidade dentro de cada grupo e heterogeneidade entre estes. A análise de cluster criteriosa exige características como capacidade de lidar com dados em alta dimensionalidade, ser proporcional ao número de dimensões e com a quantidade de elementos a serem agrupados, habilidade de lidar com diferentes tipos de dados, definição agrupamentos de diferentes tamanhos e formas, demandar o mínimo de conhecimento para determinação dos parâmetros de entrada, ser robusto à presença de ruído e apresentar resultados consistente independente da ordem em que os dados são apresentados (DONI, 2004; ZAIANE, 2003).

A análise de cluster em parâmetros hierárquicos consiste em formar uma série de sucessivos agrupamentos ou sucessivas divisões de elementos, nos quais seus elementos podem ser agregados ou desagregados. Os grupos formados a partir dos métodos hierárquicos são geralmente representados por um diagrama bidimensional, conhecido como dendrograma. Neste, os ramos terminais representam os elementos e a raiz representa o agrupamento geral de todos os elementos em estudo. Através do dendrograma e do conhecimento prévio sobre os dados, é possível designar quais e quantos grupos formados serão explorados. A escolha dos agrupamentos é subjetiva, variável de acordo com o objetivo da análise e o número de grupos (DONI, 2004).

Freeviz é uma terceira abordagem de visualização multivariada em análises exploratórias de dados biomédicos que ainda é pouco utilizada na literatura, mas representa um método promissor na mineração de dados volumosos. Os componentes principais gerados através da PCA podem ser visualizados através da construção de scatter plots, identificando-se relações entre duas variáveis. No

entanto, raramente os dados apresentam somente duas variáveis. A relação entre mais de uma variável pode ser evidenciada com o Freeviz, pois o método revela interações em um conjunto de dados com variável de classe. Para tal, a otimização é realizada no intuito de encontrar a melhor projeção linear do conjunto de dados para uma representação bidimensional, aproximando ao máximo os elementos de mesma classe e afastando aqueles de classes distintas (DEMŠAR, LEBAN; ZUPAN, 2007).

Usualmente, estas técnicas multivariadas são empregadas a regiões específicas do espectro. Yang et al. (2014) delimitou a faixa entre 900 e 1800 cm^{-1} como região de assinatura química contendo informações úteis para análise de *Shigella sonnei* e *Escherichia coli*, a fim de distinguir as espécies utilizando seus perfis espectrais e análise multivariada. A PCA forneceu escores que representaram 67,4% da variação dos dados, cujo a projeção bidimensional obteve a clara segregação entre as diferentes espécies analisadas. Observou-se então que o FTIR combinado a PCA pôde identificar variações na quantidade e distribuição de constituintes celulares bacterianos como, por exemplo, ácidos nucleicos, proteínas, fosfolipídios, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos. Os resultados promissores gerados a partir da combinação entre a espectroscopia vibracional no infravermelho e análises multivariadas, independentemente do micro-organismo estudado, impulsionam também o interesse em testar os métodos multivariados na interpretação de dados espectrais obtidos por meio de técnicas espectroscópicas não convencionais.

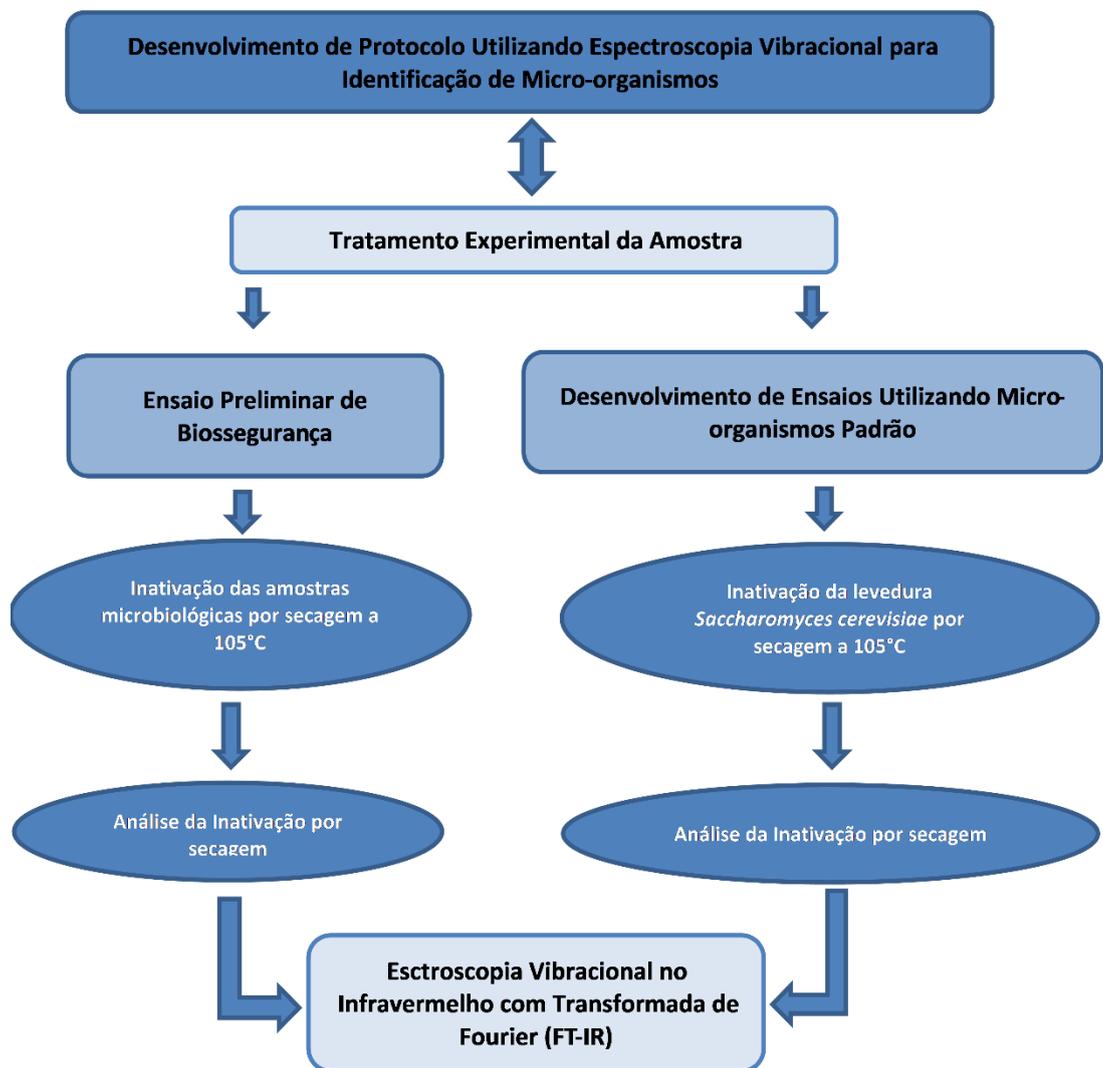
Wang et al. (2017) empregou microespectroscopia de FTIR síncrotron (SR-FTIR) com PCA. Para tal, seis perfis espectrais bacterianos foram estudados, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria innocua*, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. e *Shigella dysenteriae*. Os PC1 e PC2 representaram 61,9% da variação e a análise foi conduzida utilizando todo o espectro IR, portanto, não houve necessidade de exclusão de regiões. A projeção bidimensional dos escores da PCA demonstrou que as seis bactérias podem ser distinguidas através de seu espectro total e que SR-FTIR pode ser mais uma ferramenta na identificação e diferenciação de bactérias a nível de gênero. Já no contexto da HCA, Bastert et al. (1999) e Schmalreck et al. (1998) demonstraram primordialmente o potencial da espectroscopia no infravermelho em conjunto a construção de clusters para diferenciar micro-organismos.

Bastert et al. (1999) investigou o potencial do espectro IR no diagnóstico de fungos demartófitos a partir de isolados clínicos de *Trychophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*. Já nos estudos conduzidos por Schmalreck et al. (1998), o FT-IR foi empregado na caracterização de *Candida albicans*, *Exophiala dermatitidis* e uma alga clorofícea do gênero *Prototheca*. Ambos os autores observaram a formação de cluster para classes similares, havendo assim a separação entre grupos distintos. No entanto, não houve preocupação em delimitar regiões espectrais a serem investigadas, o que pode interferir nos resultados devido a presença de artefatos e ruídos. Além disso, os autores sugerem testes moleculares a fim de melhorar a resolução dos dados e discriminação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

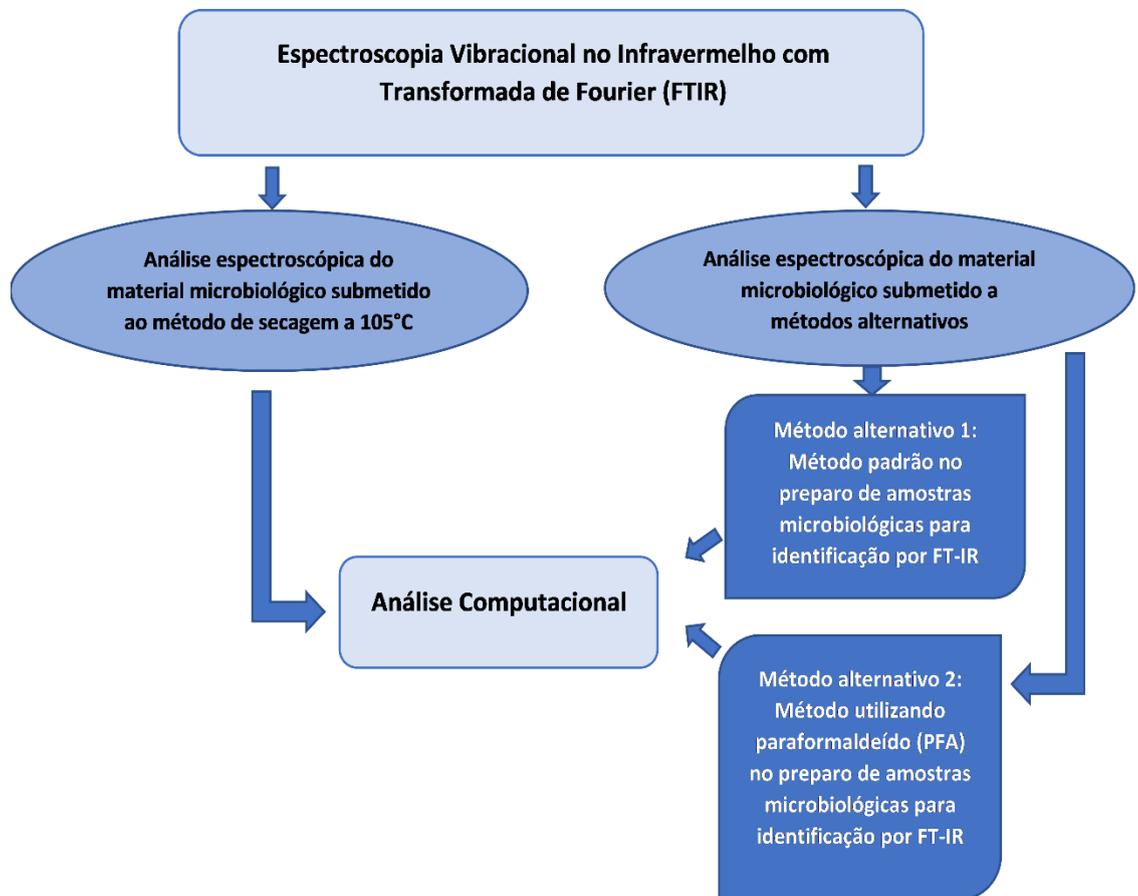
Os experimentos conduzidos estão inicialmente descritos nos fluxogramas abaixo, sendo experimentos A para o desenvolvimento de um protocolo de manipulação e análise de amostras (Figura 7) e experimento B para manipulação e tratamentos de dados (Figura 8).

Figura 7 - Fluxograma geral dos experimentos A.



Fonte: A Autora (2022).

Figura 8 - Fluxograma geral dos experimentos B.

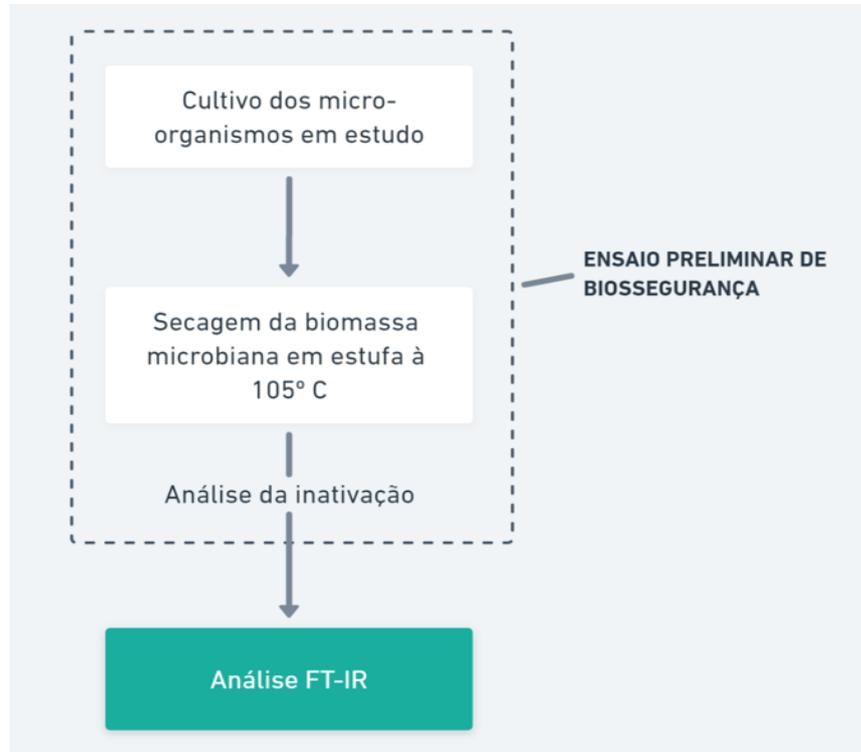


Fonte: A Autora (2022).

4.1 ENSAIO PRELIMINAR DE BIOSSEGURANÇA

O ensaio preliminar foi executado em duas etapas, a primeira correspondeu a inativação das amostras microbiológicas utilizando calor seco a 105°C e a segunda a análise da inativação (Figura 9). Este ensaio teve como intuito inativar culturas de bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras. Para tal, as bactérias foram inicialmente cultivadas em caldo Mueller Hinton a 37 °C por 24h e amostras de *Candida albicans* em caldo Sabouraud a 37 °C por 24h.

Figura 9 - Fluxograma geral do ensaio preliminar de biossegurança utilizando inativação térmica de bactérias e levedura por calor seco a 105°C.



Fonte: A Autora (2022).

4.1.1 Inativação das amostras microbiológicas por secagem de patógenos

Na primeira etapa, foram utilizados sete cepas padrões Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) (Figura 10), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA), *Serratia marcescens* (UFPEDA 398) e *Candida albicans* (UFPEDA 1007).

Figura 10 - Micro-organismos utilizados no ensaio preliminar.

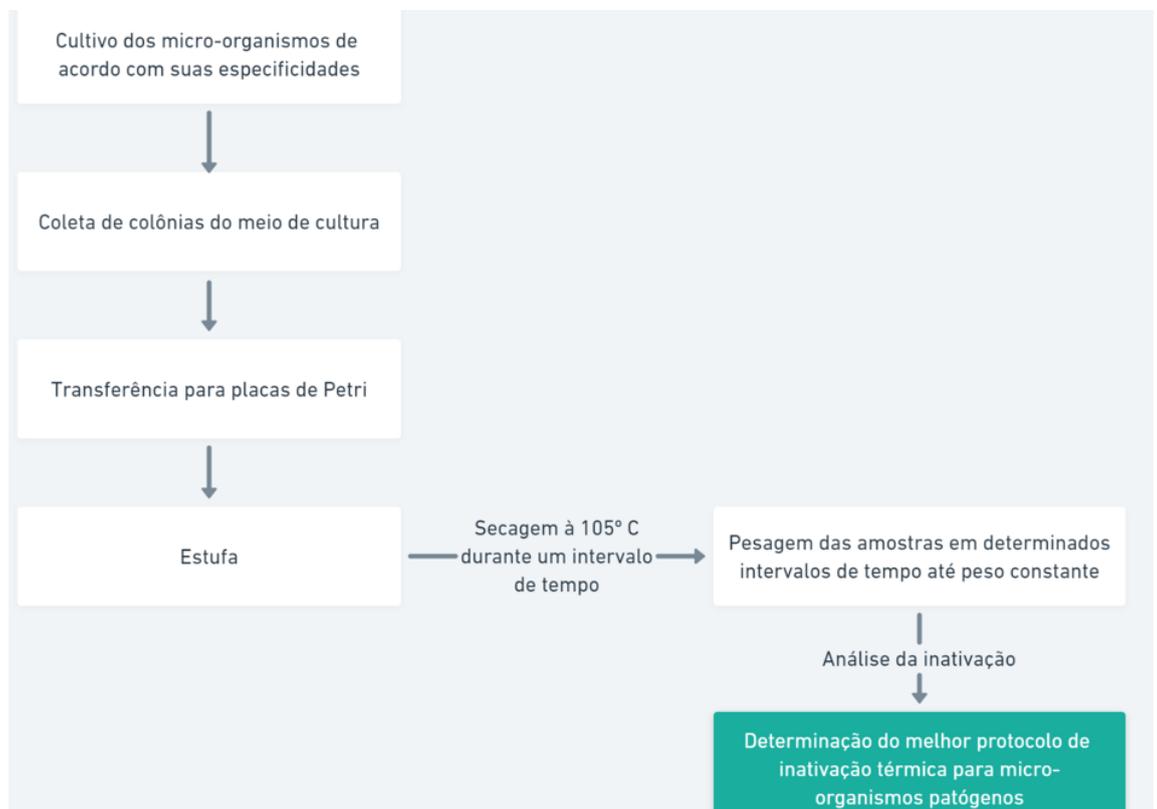
Gram-positivo	Identificação	Fungos	Identificação
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFPEDA 01	<i>Candida albicans</i>	UFPEDA 1007
<i>Micrococcus luteus</i>	UFPEDA 06		
<i>Enterococcus faecalis</i>	UFPEDA 138	Gram-negativa	Identificação
		<i>Escherichia coli</i>	UFPEDA 224
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFPEDA 396
		<i>Serratia marcescens</i>	UFPEDA 398

Fonte: A Autora (2022).

Os micro-organismos cultivados que apresentaram crescimento, tiveram suas colônias coletadas com alça Digralski esterilizada e depositadas sob lâminas em placas de Petri (60x15mm). Deste modo, foi possível direcionar o material microbiológico para inativação térmica. A secagem do material foi feita em estufa a 105°C, utilizando intervalos de tempo para pesagem e registro da redução da biomassa ao longo do processo. Cada placa de Petri contendo as amostras microbiológicas foi pesada antes de ir a estufa (0 minutos) e após os intervalos de 10, 10, 15 e 20 minutos, perfazendo assim, 55 minutos de secagem.

Desta forma, o micro-organismo secava por 10 minutos em estufa e registrava-se o peso do material, em seguida, o mesmo secava por mais 10 minutos e realizava-se uma nova pesagem e registro de biomassa. Este processo foi executado para todos os intervalos indicados na figura abaixo, totalizando assim 55 minutos (Figura 11).

Figura 11 - Fluxograma das etapas de secagem do ensaio preliminar.



Fonte: A Autora (2022).

4.1.2 Análise da inativação

A análise da inativação foi realizada após o processo de secagem visando identificar a viabilidade do material submetido a inativação térmicas e assim, investigar o potencial contaminante das amostras.

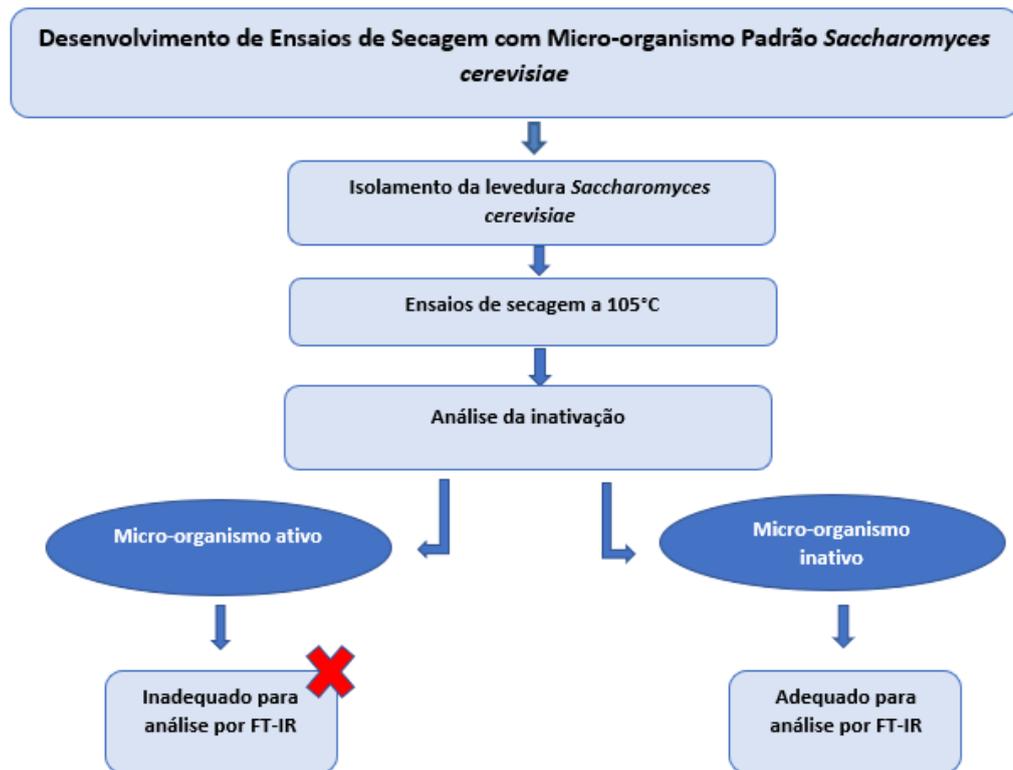
As placas retiradas da estufa contendo o micro-organismo desidratado, foram acrescidas de caldo e observou-se a turbidez do material após 24h. Em seguida, foi realizado o semeio deste caldo por esgotamento em novas placas a fim de verificar a presença de crescimento e retomada da atividade microbiana. A ausência de turbidez e crescimento nas placas foi utilizada como indicador da inativação das bactérias e leveduras. Os micro-organismos inativados pelo processo de secagem foram utilizados como base experimental para os testes seguintes.

4.2 DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE INATIVAÇÃO COM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

A partir dos ensaios iniciais com patógenos, optou-se posteriormente pela execução dos experimentos utilizando um micro-organismo modelo não patogênico. Neste sentido, foram realizados quatro ensaios de secagem voltados para a inativação, redução do teor de água e determinação do método mais adequado a ser empregado na obtenção de dados espectroscópicos microbianos. Em todos, foi utilizado o micro-organismo padrão *Saccharomyces cerevisiae* isolado do fermento comercial *Fleischmann*®.

As etapas de inativação por secagem e a análise da inativação determinaram os passos seguintes referentes aos experimentos utilizando espectroscopia infravermelho (Figura 12).

Figura 12 - Fluxograma geral do processo de secagem utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como micro-organismo padrão.

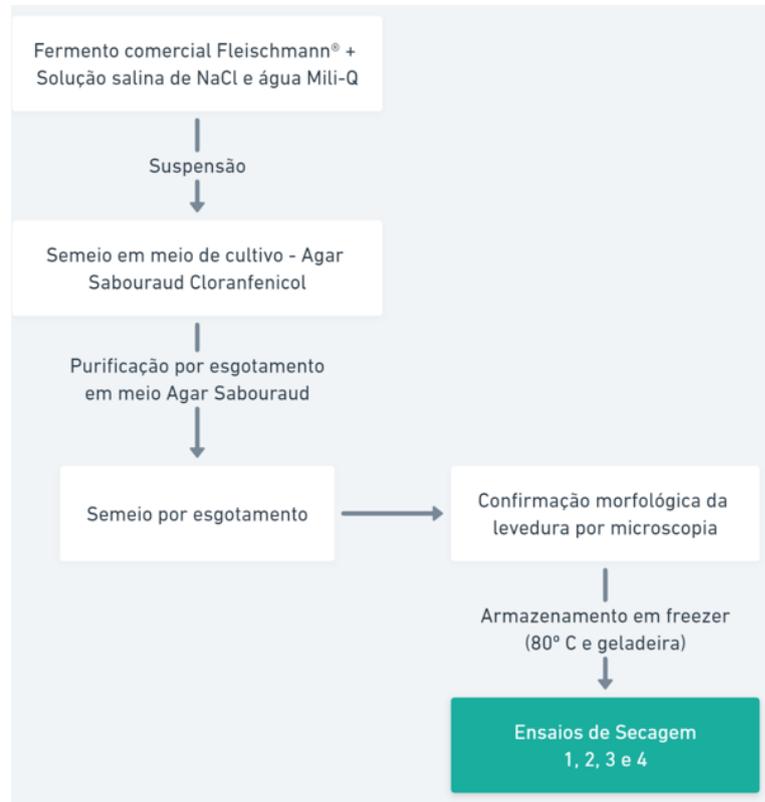


Fonte: A Autora (2022).

4.2.1 Isolamento do micro-organismo padrão *Saccharomyces cerevisiae*

Para o isolamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, inicialmente foi preparado uma suspensão de 100 mL de NaCl 9% utilizando Água Mili-Q e fermento comercial *Fleischmann*®. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos a 12.100 x g em microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi coletado através de alçadas e semeado em meio de cultura Ágar Sabouraud. As placas que apresentaram crescimento foram semeadas por esgotamento, repicadas e incubadas por 24h a 25°C (Figura 13). Posteriormente, algumas colônias foram coletadas e analisadas em microscópio óptico para verificação morfológica.

Figura 13 Fluxograma das etapas de isolamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a partir do fermento comercial Fleischmann®.

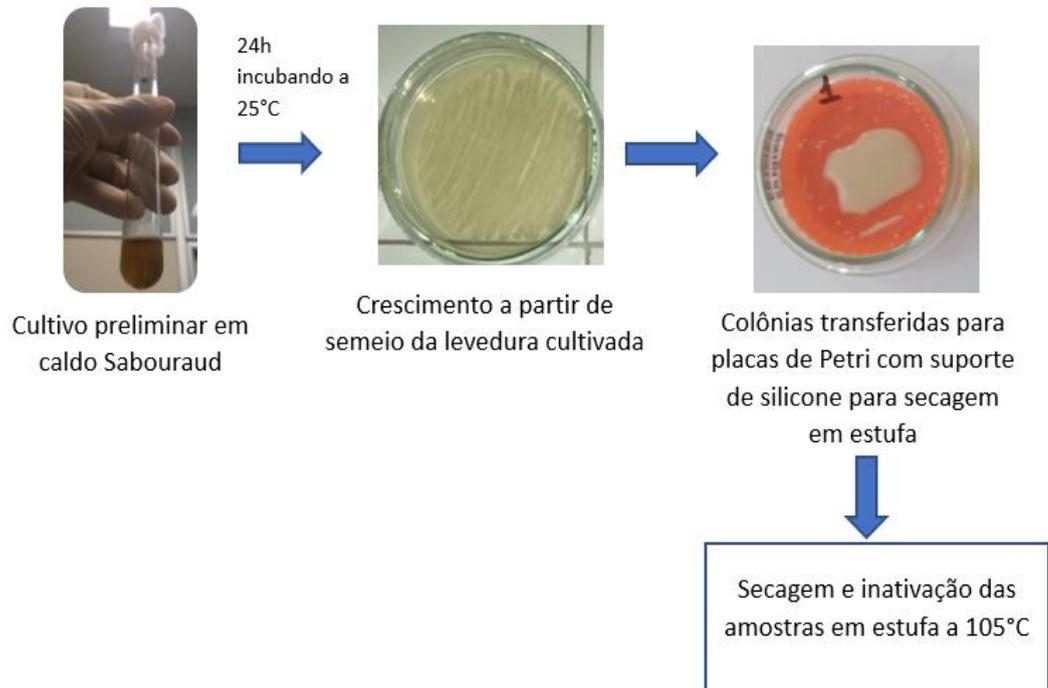


Fonte: A Autora (2022).

4.2.2 Ensaio de secagem

Os ensaios de secagem número 1, 2, 3 e 4 foram realizados utilizando a levedura isolada do fermento comercial *Fleischmann*® em placas de Petri (60x15mm), as quais foram pesadas e encaminhadas para a estufa a 105°C (Figura 14).

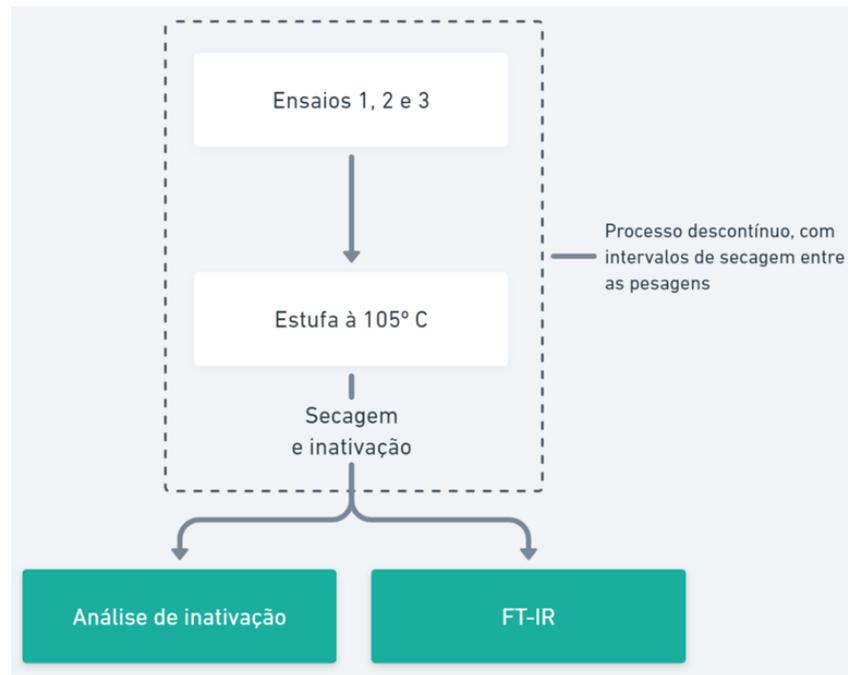
Figura 14 - Etapas gerais do processo de secagem.



Fonte: A Autora (2022).

Os ensaios 1, 2 e 3 foram realizados de maneira descontínua (Figura 15), uma vez que entre os intervalos demonstrados abaixo (Tabela 1) o material foi retirado para pesagem, a fim de acompanhar a redução de biomassa, e levado novamente para estufa até a pesagem seguinte. Cada valor de pesagem, incluindo o peso antes de iniciar a secagem e tara das placas foi registrado.

Figura 15 - Fluxograma geral dos ensaios de secagem 1,2 e 3.



Fonte: A Autora (2022).

O ensaio seguinte, designado como ensaio 4, foi realizado de maneira contínua (Figura 16). Cada amostra foi seca por um intervalo de tempo, em seguida foi realizado a pesagem e logo após a amostra seguiu para análise da inativação e espectroscopia. Sendo assim, foram seis amostras para seis intervalos de tempo de 100, 300, 600, 1000, 1500 e 2100 minutos (Tabela 1).

Tabela 1 - Intervalos de secagem para os ensaios 1, 2, 3 e 4.

ENSAIO	TIPO DE SECAGEM	TEMPO DE SECAGEM (MIN)
1	Descontínua	60, 180, 300 e 480
2	Descontínua	30, 80, 150, 240, 350, 480, 530, 800 e 990
3	Descontínua	80, 150, 240, 350, 480, 630, 800, 990, 1200, 1430, 1680, 1950, 2240, 2550, 2880 e 3230

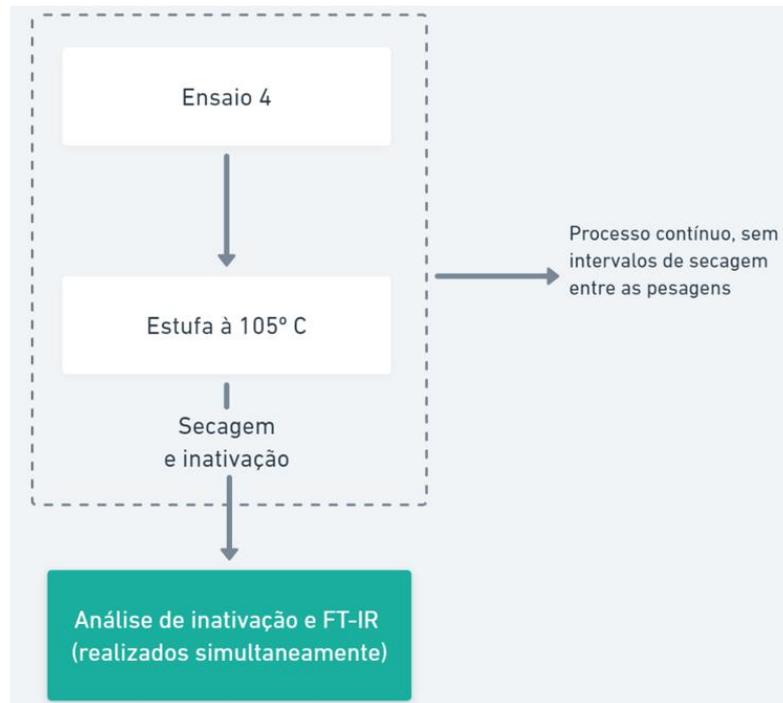
4

Contínua

100, 300, 600, 1000,
1500 e **2100**

Fonte: A Autora (2022).

Figura 16 - Fluxograma geral do ensaio de secagem 4



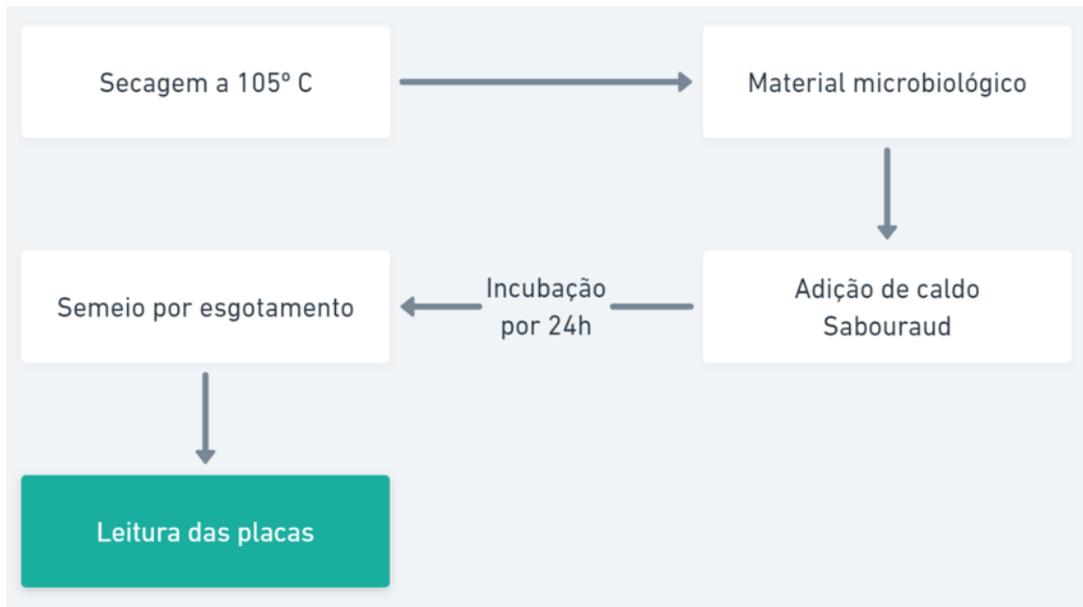
Fonte: A Autora (2022).

Em sequência ao ensaio de secagem, foi realizada a análise da inativação e a análise por FT-IR.

4.2.3 Análise da inativação

As amostras provenientes dos ensaios 1 e 2 foram acrescidas de caldo Sabouraud a fim de inserir a levedura seca em estufa novamente em meio de crescimento, em seguida foram incubadas por 24h e semeada por esgotamento. A ausência de turbidez nas amostras acrescidas de caldo indicou a inativação do micro-organismo retirado da estufa, bem como a ausência de crescimento nas placas semeadas a partir do material incubado (Figura 17).

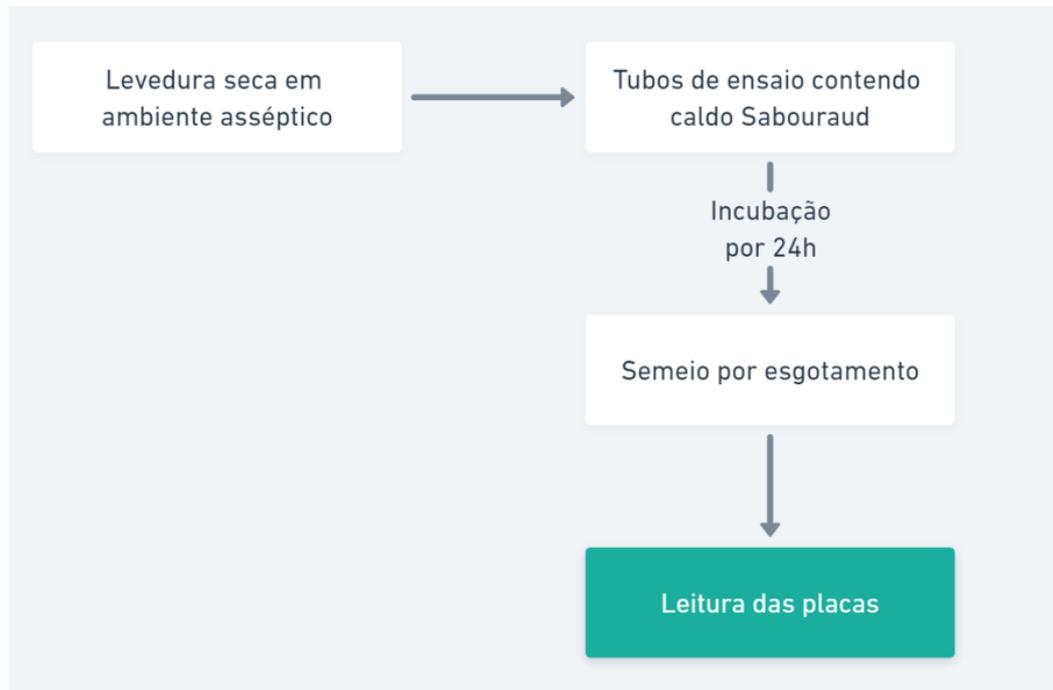
Figura 17 - Etapas da análise de inativação dos ensaios 1 e 2



Fonte: A Autora (2022).

A viabilidade celular das amostras microbianas submetidas ao ensaio 4 foi checada através da transferência de fragmentos da levedura seca em estufa para tubos contendo caldo Sabouraud, os quais foram incubados por 24 horas e semeados por esgotamento. O grau de turbidez nesses tubos após 24h e a presença de crescimento nas placas semeadas foi indicativo de viabilidade das células (Figura 18).

Figura 18 - Etapas da análise de inativação do ensaio 4



Fonte: A Autora (2022).

4.3 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO

A abordagem vibracional no infravermelho foi dividida em três protocolos gerais, um voltado a secagem da amostra fresca, outro utilizando paraformaldeído (PFA) e um terceiro padrão baseado na literatura. As etapas para cada procedimento estão descritas abaixo e levam em consideração o processo de inativação do material microbiológico a ser analisado.

4.3.1 Desenvolvimento de protocolos para análise espectral

As análises espectroscópicas foram conduzidas utilizando a técnica espectroscopia de reflectância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) combinada a análises computacionais, as quais serão descritas nos próximos tópicos. Para fins de comparações das técnicas e manipulação segura das amostras microbianas, foram desenvolvidos três procedimentos de preparo da amostra. Estes procedimentos também foram conduzidos visando garantir a melhor aquisição espectral.

Neste sentido, a metodologia de inativação térmica a 105°C designada como secagem foi uma das metodologias empregadas no tratamento prévio a análise ATR-FTIR. O segundo tratamento desenvolvido para comparação foi a inativação utilizando paraformaldeído 4% (PFA), o qual representa um dos poucos protocolos comprometidos em garantir a manipulação segura das amostras microbiológicas. Por fim, também foi utilizado um protocolo padrão na análises espectroscópicas de micro-organismos.

4.3.2 Análises espectroscópicas de amostras inativadas por secagem

Ao fim da secagem o material foi transferido diretamente da placa, com auxílio de uma pinça, até o cristal do espectrofotômetro. No entanto, foi necessário modificar esta etapa a fim de reduzir ruídos e aumentar a intensidade dos máximos observados. Neste sentido, o material microbiano seco direcionado ao espectrofotômetro precisou ser macerado. Considerando a natureza da amostra, também se fez necessário testar diferentes parâmetros de varredura e resolução. Para conclusão dos melhores parâmetros de aquisição, foram testados cinco métodos de análise espectral do material microbiológico oriundo da secagem (Figura 19).

Figura 19 - Parâmetros testados para melhor aquisição espectral



Fonte: A Autora (2022)

Sendo assim, as análises espectroscópicas foram conduzidas em um espectrofotômetro Cary 630 Agilent FTIR com módulo ATR acoplado (Figura 20). O material proveniente da secagem foi macerado e direcionado para aquisição espectral, utilizando como parâmetros de leitura 100 varreduras e resolução igual 4 cm⁻¹ (Método D).

Figura 20 - Espectrofotômetro Cary 360 Agilent

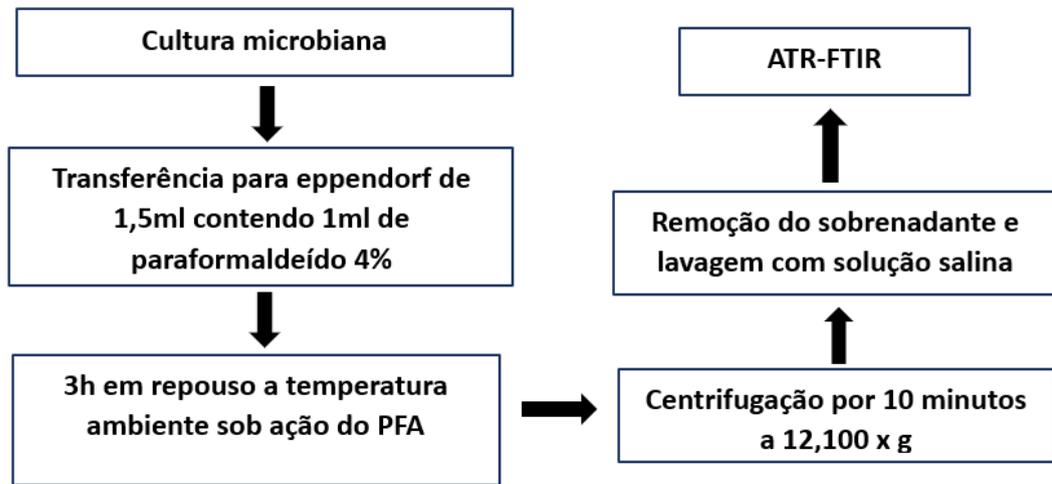


Fonte: A Autora (2022)

4.4 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS UTILIZANDO PARAFORMALDEÍDO A 4% (PFA)

A inativação das amostras microbiológicas isoladas para análises por ATR-FTIR utilizando paraformaldeído (PFA) foram conduzidas de acordo com o protocolo descrito por Costa et al. (2016), a fim de garantir a biossegurança da análise espectroscópica. Para tal, inicialmente alçadas da levedura isolada do fermento comercial *Fleischmann*® foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo solução de paraformaldeído a 4% e deixadas por 3h a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos a 12,100 x g em minicentrífuga, o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 1 mL de solução salina estéril (Figura 21).

Figura 21 - Protocolo do tratamento com PFA.



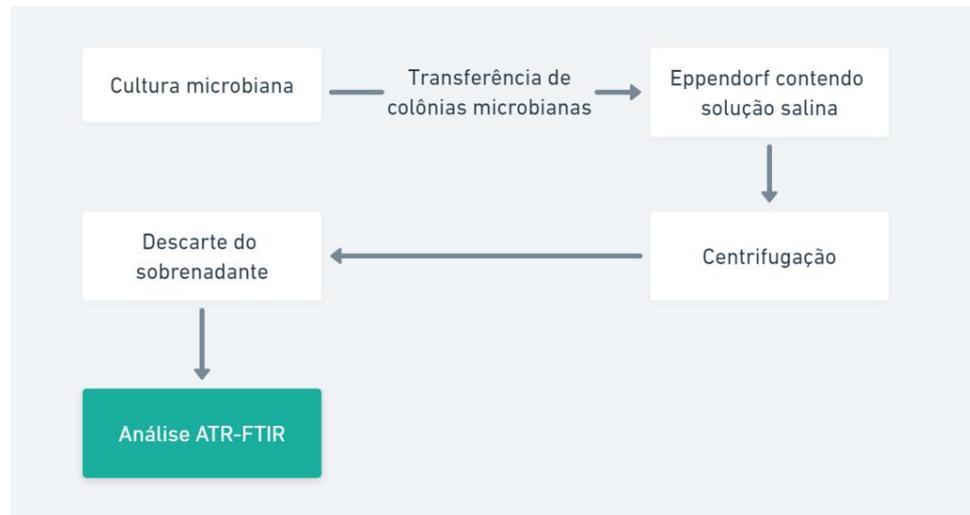
Fonte: A Autora (2022)

Após o tratamento com paraformaldeído 4%, os micro-organismos foram direcionados a leitura no espectrofotômetro Cary 630 FTIR com módulo ATR acoplado (Figura 14). Os parâmetros de leitura utilizados foram os do método D (Figura 15), também utilizado para a análise espectroscópicas dos micro-organismos inativados por secagem.

4.5 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS UTILIZANDO AMOSTRA FRESCA (PADRÃO)

A levedura fresca cultivada a partir do fermento *Fleischmann*® foi preparada para análise ATR-FTIR por meio do método proposto inicialmente por Naumman et al. (1991), no qual a amostra a ser analisada é ressuspensa em solução salina estéril. No presente trabalho, este tratamento será designado como tratamento padrão uma vez que é utilizado como referência na espectroscopia vibracional de micro-organismos. Por meio de alçadas, as colônias cultivadas são coletadas e transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo solução salina estéril, em seguida a amostra é centrifugado por 10 minutos a 12.100 x g em microcentrífuga, o sobrenadante é descartado e aproximadamente 3 µL do precipitado é resgatado e depositado no espectrofotômetro para leitura (Figura 22).

Figura 22 - Protocolo do tratamento Padrão.



Fonte: A Autora (2022).

Assim como nas outras duas técnicas, o micro-organismo foi analisado em um espectrofotômetro Cary 630 FTIR com módulo ATR acoplado (Figura 20), utilizando os parâmetros espectrais o método D (Figura 19).

4.6 ANÁLISES COMPUTACIONAIS

As análises computacionais foram realizadas com os dados espectrais obtidos a partir dos três tratamentos citados anteriormente, a inativação por secagem, por PFA e o padrão. Sendo assim, as análises multivariadas e os testes estatísticos foram executados para obtenção de dados comparativos. O pré-processamento dos espectros foi executado inicialmente a fim de padronizar e reduzir ruídos, permitindo que a informação espectral possa ser submetida a análises multivariadas.

Foram aplicados, respectivamente, correção da linha de base, normalização do espectro, filtro de Savitzky-Golay e, por fim, Gaussin Smoothing. Em seguida, os dados processados foram analisados por Análise dos Componentes Principais (PCA), Análise Hierárquicas de Cluster (HCA) e pela ferramenta Freeviz. Todas estas análises exploratórias de dados e também o pré-processamento, foram desenvolvidas utilizando a ferramenta Orange Data Mining.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção é feita a apresentação dos resultados obtidos e a discussão destes, para tal são analisados os dados gerados no processo de inativação por secagem, no método padrão comumente utilizado na literatura e no método de inativação por paraformaldeído (PFA). Além disso, para cada método testado explora-se a otimização espectral e a influência das etapas iniciais na obtenção final do perfil espectral. Em sequência, os dados espectrais obtidos em cada ensaio são comparados por meio da análise multivariada.

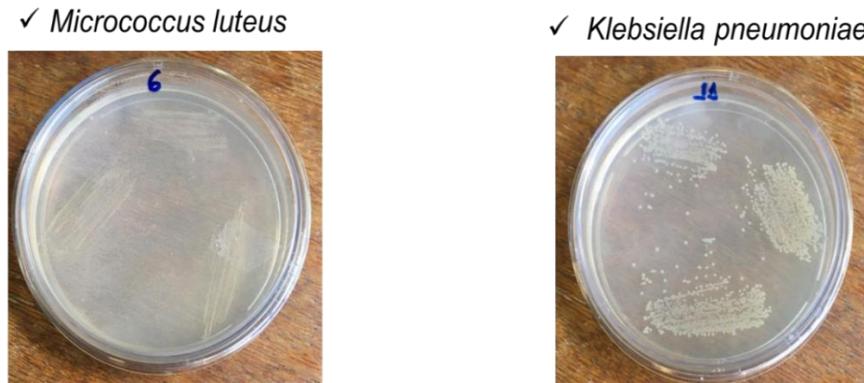
5.1 ENSAIO PRELIMINARES

Os ensaios preliminares foram essenciais para a otimização e determinação das técnicas espectroscópicas empregadas, nestes testes observou-se novos critérios a serem considerados ao testar o protocolo de secagem desenvolvido nesta dissertação. Aspectos como abundância da biomassa e tempo de secagem foram reavaliados e conduziram as etapas seguintes, assim como será descrito nas próximas seções.

5.1.1 Inativação por secagem

As análises preliminares referentes aos ensaios de biossegurança utilizando os sete micro-organismos da coleção de Micro-organismos UFPEDA não indicaram crescimento em cinco espécies, as quais foram *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*. No entanto, *Micrococcus luteus* e *Klebsiella pneumoniae* apresentaram crescimento (Figura 23). Constata-se então que 55 minutos de secagem em estufa a 105°C garantiu a inativação completa de cinco espécies.

Figura 23 - Crescimento observado nas espécies *Micrococcus luteus* e *Klebsiella pneumoniae*



Fonte: A Autora (2022).

A inativação por secagem realizada neste trabalho esteve de acordo com os resultados obtidos por Osman, Garnotel e Drancourt (2017) e Fogolari, Reis e Philippi (2012), os quais estudaram a tolerância térmica de micro-organismos. Para o gênero *Mycobacterium*, por exemplo, esta tolerância foi até temperaturas em torno de 55°C. Além disso, Garnotel; Drancourt (2017) sugere que a resistência térmica pode variar entre cepas distintas. Os resultados dos ensaios preliminares descritos nesta dissertação foram satisfatórios em relação a inativação por secagem, pois permitiram a neutralização de pelo menos cinco espécies distintas. Considerou-se então que, possivelmente, um intervalo de tempo maior de secagem inativaria também *Micrococcus luteus* e *Klebsiella pneumoniae*. Rowlands et al. (2006) sugere que as espécies de importância médica do gênero *Salmonella*, apresentam resistência térmica em temperaturas em torno de 60 e 70°C, Fogolari, Reis e Philippi (2012) observou que somente temperaturas acima de 55°C são eficientes para inativação térmica de *Escherichia coli* e Kothe (2014) sugere tratamentos térmicos acima de 60°C ou intervalos de tempo prolongados para inativação térmica de *Staphylococcus aureus*. Tendo em vista que o método desenvolvido nesta dissertação utiliza como temperatura de inativação 105°C, o mesmo pode ser uma ferramenta útil para inativar amostras microbianas e auxiliar na obtenção de perfis espectrais.

Segundo Bernardi (2017), a bactéria gram-positiva *S. aureus* apresenta resistência à desinfecção com álcool 70%. Cepas padrão de *K. pneumoniae* demonstram sensibilidade a inativação por álcool 70%, porém Guo (2015) observou que em amostras clínicas de *K. pneumoniae*, apenas 52% das bactérias são

inativadas pelo álcool. Evidencia-se que a atividade desinfetante pode variar de acordo com a cepa, devido a mecanismos de resistência adquiridas ao longo do tempo. Neste sentido, o método de inativação por secagem desenvolvido na etapa de pré-processamento pode ser uma ferramenta útil, pois seu funcionamento para cinco espécies analisadas foi satisfatório, incluindo a bactéria gram-positiva *S. aureus*, a qual segundo a literatura apresenta resistência a desinfecção com álcool 70%. Sendo assim, a inativação por secagem descrita nesta dissertação pode ser empregada com a finalidade de promover a manipulação segura de amostras microbianas direcionadas ao espectrofotômetro.

O método desenvolvido está de acordo com Oliveira et al. (2016), o qual reforça a importância da biossegurança na manipulação de patógenos microbianos, uma vez que desinfecção incompleta ou realizada de maneira equivocada pode causar contaminações e acarretar no aumento de micro-organismos resistentes. Além disso, tem como vantagem a neutralização dos micro-organismos patógenos nas etapas que antecedem a análise espectral, mesmo aqueles agentes que apresentam resistência ao método convencional de desinfecção utilizando álcool 70%. Portanto, viabiliza a redução de contaminação no equipamento espectrofotômetro e o êxito da desinfecção com álcool 70% sugerida pelos fabricantes. Assim como nesta dissertação, os métodos utilizados na literatura para reduzir riscos de contaminação em análises espectroscópicas são empregados no preparo dos agentes microbianos a serem analisados.

Ayu et al. (2018) com o objetivo de proteger o operador do espectrofotômetro do risco de contaminações, inativou *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* utilizando álcool 70% na etapa de preparo da amostra microbiana. Costa et al. (2016) utilizou como substância de inativação a solução de paraformaldeído 4%, no qual isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* permaneceram em repouso por três horas atuando em temperatura ambiente. Em contrapartida, nenhum destes autores realizou o controle de qualidade do processo de inativação e, em relação ao PFA também não houve investigação da possível influência da substância no perfil espectral do material microbiano. Neste contexto, o método desenvolvido nesta dissertação fundamenta-se em um processo de tratamento assertivo que inclui a investigação da viabilidade microbiana após a secagem. Além disso, quando comparado aos métodos de Ayu et al. (2018) e Costa et al. (2016),

demanda menos suprimentos e manipulação de reagentes para inativar o micro-organismo em questão. Em prosseguimento também será demonstrado a análise da influencia destes tratamentos na obtenção do perfil espectral.

De acordo com Berthomieu e Hienerwadel (2009), uma análise adequada utilizando FT-IR depende do teor hídrico da amostra, pois a água apresenta forte absorção e pode encobrir o sinal de outros grupos funcionais. Desta forma, o percentual de água atribuído a uma amostra microbiana pode limitar informações sobre os grupos funcionais e prejudicar a interpretação da assinatura química nas amostras. O método de inativação por secagem desenvolvido, além de contribuir minimizando o potencial contaminante da amostra microbiana levada ao equipamento, permite a retirada de água por evaporação. Sendo assim, é possível obter o perfil espectral contendo a assinatura química com baixa influência de água e assim garantir a interpretação das bandas espectrais em sua totalidade.

Novos ensaios (1, 2, 3 e 4) foram conduzidos utilizando intervalos de tempo maiores a fim de inativar os micro-organismos e reduzir o teor hídrico. Para garantir a segurança durante a operação do espectrofotômetro IR, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi escolhida como micro-organismo padrão. Segundo De Abreu, Roviada e Pamphile (2015) a levedura *S. cerevisiae*, largamente utilizada na indústria, é um dos eucariotos mais estudados por não apresentar riscos de infecção ao ser humano ou outros animais quanto pelo volume de informações conhecidas acerca de seu metabolismo. Também se constatou a necessidade de maior biomassa para ensaios de secagem, pois a redução gradativa do material interferiu nas etapas de pesagem na descontínua e implicou em variações.

5.2 ENSAIO DE SECAGEM E INATIVAÇÃO COM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

O isolamento e purificação da levedura *S. cerevisiae* foi bem-sucedido e colônias uniformes foram obtidas, quando observadas em microscópio óptico as células apresentaram-se com formato e tamanho típicos da espécie, também não foram observadas bactérias de qualquer forma e tamanho (Figura 24). Sendo assim, obtenção da levedura se deu assim como citado por BARNETT, PAYNE e YARROW (2000).

Figura 24 - Levedura *Saccharomyces cerevisiae* em microscópio óptico com aumento de 40X.

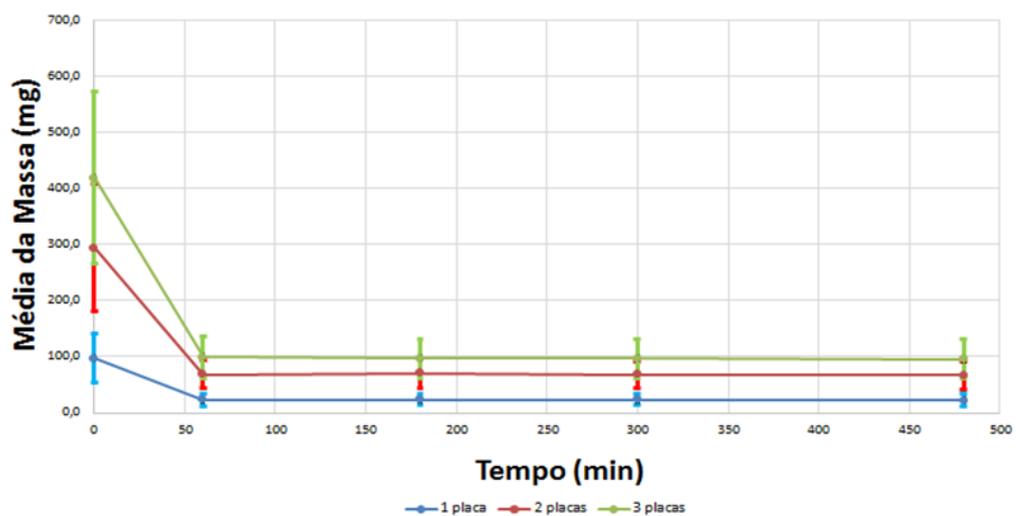


Fonte: A Autora (2022).

5.2.1 Ensaio de secagem

Os micro-organismos submetidos ao Ensaio de Secagem 1 (Figura 25) utilizando o micro-organismo padrão não apresentaram crescimento em nenhum dos materiais após a secagem, indicando que a levedura foi completamente inativada. A biomassa e o teor hídrico demonstraram reduções ao longo do tempo, porém o peso constante não foi atingido.

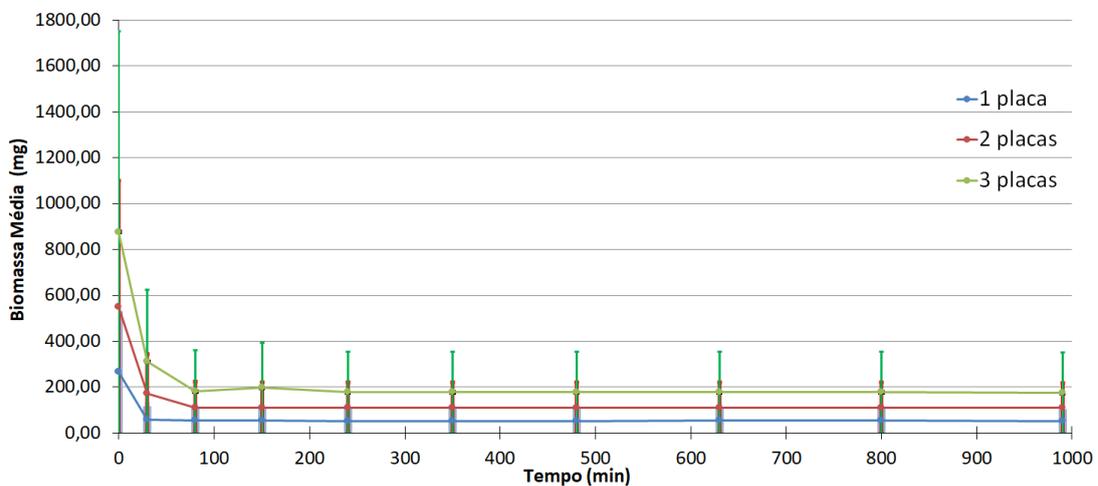
Figura 25 - Ensaio 1 de secagem de *S. cerevisiae* utilizando diferentes quantidades de massa



Fonte: A Autora (2022).

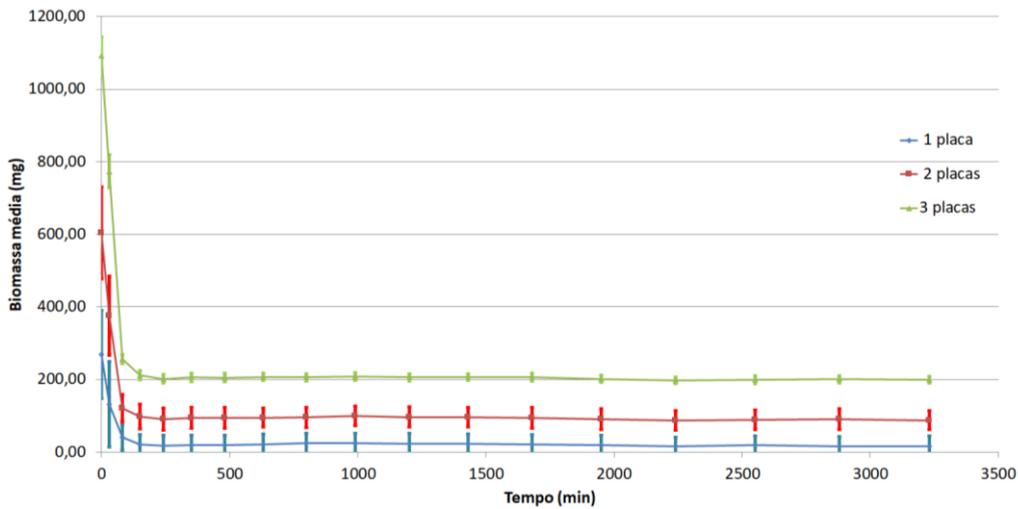
Os ensaios 2 (Figura 26) e 3 (Figura 27) evidenciaram que intervalos de tempo prolongados fornecem maiores taxas de evaporação, porém conduzem a instabilidades na aferição da biomassa inviabilizando a secagem até peso constante e a obtenção de espectros satisfatórios. Bem como indicado na tabela abaixo, o ensaio 3 exibiu maiores taxas de perda de água por evaporação, no entanto, quando comparado ao ensaio 1 e 2 apresentou o maior desvio padrão (Tabela 2). Constatou-se que a partir de um determinado momento, as oscilações observadas ao aferir a redução de biomassa são decorrentes da manipulação do experimento e não representam genuinamente a perda de água. Em relação ao ensaio 3, as maiores variações ocorreram após os 2100 minutos. Outro fator possivelmente relacionado com tais oscilações de biomassa foi observado por Koga, Echigo e Nunomura (1666), os quais citam a ocorrência de processos de desumidificação e umidificação no material analisado também por secagem seguida de pesagem da levedura por 5 horas a 105°C. Portanto, estes resultados estão de acordo com o observado por Koga, Echigo e Nunomura (1666).

Figura 26 - Ensaio 2 de secagem da levedura *S. cerevisiae* em 990 minutos utilizando diferentes quantidades de biomassa



Fonte: A Autora (2022).

Figura 27 - Ensaio 3 de secagem da levedura *S. cerevisiae* em 3230 minutos utilizando diferentes quantidades de biomassa



Fonte: A Autora (2022).

Tabela 2 - Tabela referente ao teor de umidade médio perdido ao longo do processo de secagem e ao desvio padrão de cada experimento. s = desvio padrão.

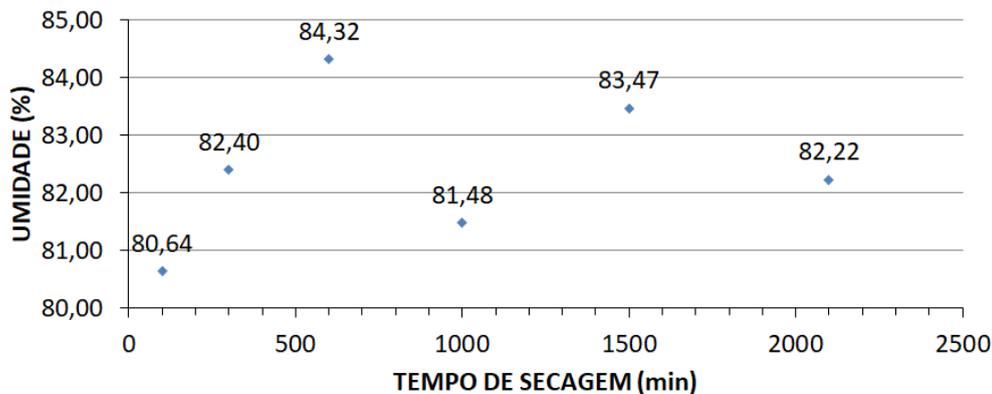
MASSA	1 ENSAIO (480 MIN)		2 ENSAIO (990MIN)		3 ENSAIO (3230 MIN)	
	s	% evaporação	s	% evaporação	s	% evaporação
1 PLACA	0,00428	77,06	0,00181	80,18	0,05743	92,05
2 PLACAS	0,00872	77,21	0,00311	80,23	0,01540	85,65
3 PLACAS	0,00757	77,18	0,00477	80,07	0,00314	81,68

Fonte: A Autora (2022).

Neste sentido, o ensaio de secagem 4 (Figura 28) foi realizado de forma contínua a fim de reduzir as variações evidenciadas nos últimos experimentos. Observou-se então que o intervalo de tempo ideal para alcance do peso constante e máxima retirada de água está em torno dos 600 minutos, pois aferições realizadas posteriormente a esse intervalo acumularam maiores variações. A redução do teor de umidade permaneceu aumentando até atingir valores de 84,32% em torno dos 600 minutos, após esse intervalo os valores tornaram-se instáveis. Tal qual observado nos ensaios anteriores, intervalos de tempo prolongados conduziram a instabilidades no procedimento de secagem. Por meio deste último ensaio, foi possível protocolar o modelo de inativação por secagem a ser utilizado na manipulação dos micro-organismos e assim, garantir a manipulação segura durante

a análise por espectroscopia vibracional no infravermelho.

Figura 28 - Ensaio 4: Teor de umidade das amostras do ensaio de estabilidade do perfil espectral por FT-IR.



Fonte: A Autora (2022).

Nos quatro ensaios citados anteriormente, ao analisar a inativação das amostras não foi observado a presença de crescimento de micro-organismos, indicando que as leveduras foram inativadas com êxito. A secagem do material microbiano desenvolvida nesta dissertação promove mudanças fisiológicas responsáveis por inativar a célula, de acordo com Koga, Echigo e Nunomura (1666) o consumo de oxigênio decresce com a redução do teor de água. Ao atingir valores abaixo de 20%, o consumo de oxigênio cessa e não observa-se mais atividade metabólica. Possivelmente isso ocorre, pois, a água fornece um meio contínuo, no qual as reações bioquímicas podem acontecer, especialmente aquelas relacionadas com a mudança de conformação dos polímeros constituintes. Além disso, as células inativadas por desidratação apresentam rupturas de membranas nucleares e citoplasmáticas (BEKER; RAPOPORT, 1987). Portanto, estas alterações contribuem para inativação das leveduras estudadas.

Durante o processo de secagem, a célula da levedura passa por diferentes estágios. O estágio inicial é caracterizado predominantemente por mudanças fisiológicas, mas ao reduzir o teor de água a valores menores que 20% também ocorrem modificações físico-químicas. Este estágio é observado nos quatro ensaios descritos e é caracterizado pela queda abrupta de biomassa. Quando a célula alcança teor hídrico entre 10% e 5%, a água perde seus diferentes modos de movimentação molecular e passa a ter menor influência (KOGA, ECHIGO e

NUNOMURA, 1666). A biomassa microbiana é constituída de 70% a 90% por água, localizada no meio intracelular associada a proteínas, ácidos nucleicos, membranas ou substâncias de relevância estrutural, sendo conhecida comumente como água ligada.

Beker e Rapoport (1987) demonstram que o procedimento de secagem ocasiona primeiramente um rápido decréscimo linear no teor de umidade da biomassa, caracterizado pela evaporação da água livre e água intercelular. Em seguida, quando a água ligada começa a evaporar a taxa de secagem diminui e torna-se constante. Em todos os ensaios de secagem descritos anteriormente, foi possível observar a redução inicial de biomassa e após um intervalo de tempo valores constantes de biomassa. Portanto, observa-se que os ensaios de secagem 1, 2, 3 e 4 conduzidos neste trabalho estão de acordo com o esperado na literatura.

5.3 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO

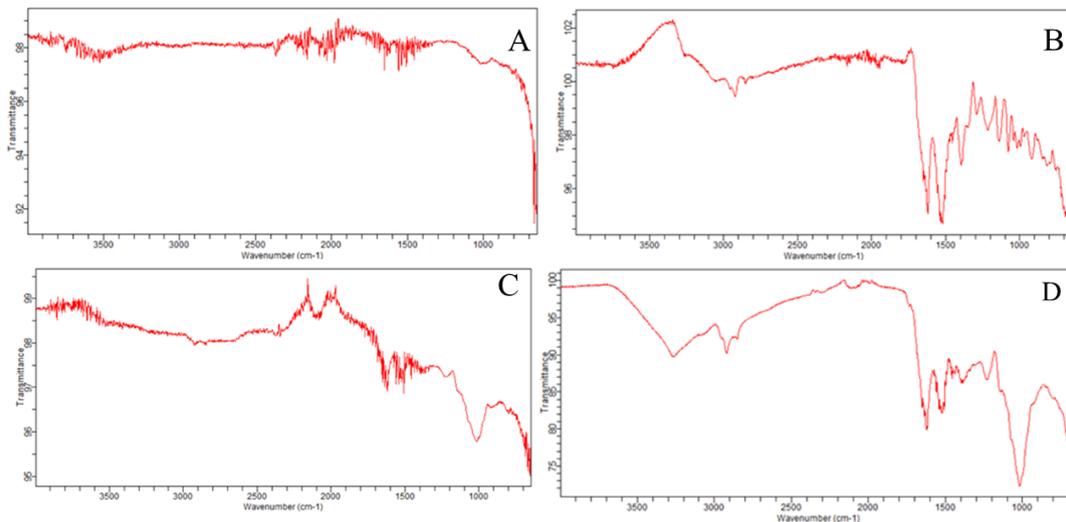
A análise dos dados espectroscópicos na região do infravermelho foi facilitada pelos parâmetros de leitura empregados, os quais podem variar de acordo com o método utilizado. Por conta disso, foi essencial a etapa de otimização e determinação da técnica. Nesta foi possível identificar os perfis espectrais com escores satisfatórios e definir o fluxo de trabalho máxima qualidade espectral.

5.3.1 Otimização e determinação da técnica

A espectroscopia na região do infravermelho tem sido amplamente utilizada como método confiável na análise de compostos e matrizes complexas, permitindo que substâncias orgânicas possam ser identificadas através de seus modos vibracionais (SILVERSTEIN; BASSLER, 1962). Para tal, é necessário construir ajustes que otimizem a aquisição dos espectros e sejam capazes de fornecer dados satisfatórios. Espectros em boa qualidade permitem a identificação correta das bandas, fornecendo informações químicas ou estruturais do material estudado e indispensavelmente devem apresentar o menor ruído possível (BENETTI et al., 2010).

A obtenção de espectros satisfatórios também se deu devido a maceração do conteúdo microbiano, realizada anteriormente a análise no espectrofotômetro. O melhor parâmetro de aquisição espectral foi o designado como método D (Figura 29), no qual foram utilizadas 100 varreduras e resolução igual 4 cm^{-1} . O método D apresentou maior reprodutibilidade e intensidade das bandas para os tratamentos de secagem, padrão e o com PFA, portanto, foi o método escolhido para dar prosseguimento aos ensaios. Na literatura observa-se que os parâmetros de análise variam de acordo com o material estudado e o espectrofotômetro utilizado.

Figura 29 – Espectros de *Saccharomyces cerevisiae* sob diferentes métodos de leitura. A figura D apresenta menos ruído e bandas mais definidas e representa o método D.



Fonte: A Autora (2022).

Preliminarmente, os espectros provenientes dos ensaios de secagem demonstraram instabilidade e pouca reprodutibilidade, produzindo leituras com fortes ruídos e baixa intensidade das bandas. Há dois parâmetros básicos de aquisição do equipamento espectrofotômetro relacionados com a qualidade de sinal abordados neste estudo, o número de varreduras e a resolução. Na literatura, assim como proposto por Benetti et al. (2010), citam-se os mesmos padrões explorados nesta dissertação e a velocidade do espelho móvel como parâmetro ajustável, mas este último não exigiu modificações neste trabalho. Segundo Canevarolo Jr (2014), no espectrofotômetro é possível efetuar varreduras e acumular interferogramas correspondentes, este processo é conhecido como co-adição. O acréscimo da co-adição traz como vantagem o aumento da relação sinal/ruído, produzindo um espectro final com menos ruídos.

Nesta dissertação, foi possível otimizar esta relação aumentando o número de varreduras de 16 por 100. Comumente, recomenda-se valores menores de resolução a fim de identificar melhor a posição dos picos e aumentar a relação sinal/ruído. No entanto, a escolha da resolução depende da amostra e do tipo de informação desejada do espectro. Neste caso, a análise da matriz complexa microbiana apresentou bons resultados com resolução igual a 4 cm^{-1} e esteve de acordo com os valores observados na literatura (SANTOS et al., 2012; SAKANE, MATSUURA; SIMIONI, 2019). Sakane, Matsuura e Simioni (2019) e Puzey et al. (2008), por exemplo, analisaram amostras complexas, como fitoterápicos e células microbianas e, ao contrário do método descrito nesta dissertação, os mesmos utilizaram números de varredura igual a 12 e não houve interferência na análise. Já Santos et al. (2012) e Rodriguez et al. (2018) empregaram como número de varredura valores superiores iguais a 32 e 64, respectivamente. Provavelmente, estas divergências são decorrentes da utilização de equipamentos distintos e da natureza da amostra analisada.

No contexto dos experimentos de inativação por secagem, a comparação entre valores de varreduras distintos foi determinante para a qualidade espectral, pois fundamentar-se nos parâmetros descritos na literatura não foi suficiente para protocolar os ajustes necessários. A resolução também é variável na literatura, entre valores iguais a 2 e 4 cm^{-1} , mas utiliza-se com maior frequência a resolução igual a 4 cm^{-1} e nesta dissertação, esteve de acordo com o observado na literatura (SANTOS et al., 2012; SAKANE, MATSUURA; SIMIONI, 2019). Sendo assim, os parâmetros desenvolvidos neste trabalho têm como vantagem a sua reprodutibilidade para diferentes tratamentos e aplicabilidade para análise de matrizes complexas.

5.3.2 Aquisição dos espectros FTIR com diferentes tratamentos de inativação

O espectro médio da levedura submetida aos tratamentos designados como Padrão, PFA e Secagem está ilustrado nas Figuras 30, 31 e 32 estão de acordo com o observado na literatura. A Tabela 3 evidencia a interpretação dos perfis espectrais e a assinatura química observada em cada tratamento. As bandas entre as faixas de 3700 e 3000 cm^{-1} representam vibrações simétricas de estiramento dos grupamentos OH presente em ácidos graxos, ésteres e aminoácidos (PAVIA et al., 2014; DE ROSSI, 2018). Já as bandas próximas a região de 2920 cm^{-1} são atribuídas a

ligações de estiramento assimétrico C-H nos três tratamentos, decorrente principalmente da presença de lipídios e representadas pelos máximos de 2924 cm^{-1} no tratamento padrão e PFA, enquanto na secagem por 2921 cm^{-1} (PAVIA et al., 2014; MOLON; ZEBROWISK, 2017).

Em contrapartida, bandas próximas das faixas de 2850 cm^{-1} possivelmente são atribuídas a estiramento C-H simétrico, com presença de deslocamento para valores menores nos tratamentos PFA e de secagem. A secagem destaca-se pela presença de duas bandas com máximos de 2304 cm^{-1} e 2112 cm^{-1} , as quais possivelmente estão associadas a presença de alcinos de acordo com a literatura e levando em consideração a banda de 2304 cm^{-1} como resultado do deslocamento a números de onda maiores (PAVIA et al., 2014). Absorção gerada entre 1800 e 1700 cm^{-1} com máximo observado em torno dos 1740 cm^{-1} no tratamento PFA, padrão e na secagem são resultantes da presença de C=O de carbonilas ésteres resultantes da absorção da cabeça hidrofílica de fosfolipídios (BERTERAME et al., 2016; CASAL; MANTSCH, 1984).

Os picos observados entre 1650 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} são atribuídos a presença de ligações C=O e N-H, responsáveis pela sobreposição de ligações de estiramento C-N e representam amida I e amida II de peptídeos (SILVERSTEIN, WEBSTER; KIEMLE, 2005; MOLON; ZEBROWISK, 2017). As bandas presentes entre 1450 e 1370 cm^{-1} possivelmente estão relacionadas a ligações C-H de dobramento resultantes da presença de lipídios (PAVIA et al., 2014; SILVERSTEIN, WEBSTER; KIEMLE, 2005; BERTERAME et al., 2016). A região fingerprint entre 1300 e 1200 cm^{-1} com bandas de baixa intensidade pode estar associada a sobreposição da absorção de proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (MOLON; ZEBROWISK, 2017).

Os máximos observados em 1077 cm^{-1} e 1043 cm^{-1} no tratamento padrão, 1029 cm^{-1} e 991 cm^{-1} no tratamento de secagem são resultantes do conteúdo de ácidos nucleicos, correspondendo a absorção de grupos fosfatos e ácidos nucleicos. As bandas do tratamento padrão citadas anteriormente e o máximo 1029 cm^{-1} do tratamento por secagem podem ser resultantes do estiramento C-O e atribuídas a furanose, já 991 cm^{-1} da secagem pode ser atribuída a vibrações de cadeia ribose-fosfato. A banda de 1082 cm^{-1} observada no tratamento com PFA também é resultante da absorção de DNA e RNA da levedura, associado a ligações P-O (BERTERAME et al., 2016; BANYAY, SARKAR; GRASLUND, 2003).

O tratamento com PFA destacou novos máximos, sugerindo uma maior interação com os ácidos nucleicos. Neste tratamento, observa-se bandas em 1046 cm^{-1} e 1025 cm^{-1} atribuídas a estiramento C-O de furanoses, as quais usualmente resultam da conformação Z-DNA. A absorção em 977 cm^{-1} atribui-se a vibrações de estiramento C-C da cadeia B-DNA e em 933 cm^{-1} a estrutura Z-DNA. No tratamento padrão, o máximo 913 cm^{-1} possivelmente está relacionada a vibração da molécula de ribose. Em todos os tratamentos as bandas próximas a região de 800 cm^{-1} parecem estar associadas ao estiramento O-P-O, resultante da vibração de agrupamento fosfodiéster (BANYAY, SARKAR & GRASULUND, 2003; SILVERSTEIN, WEBSTER; KIEMLE, 2005).

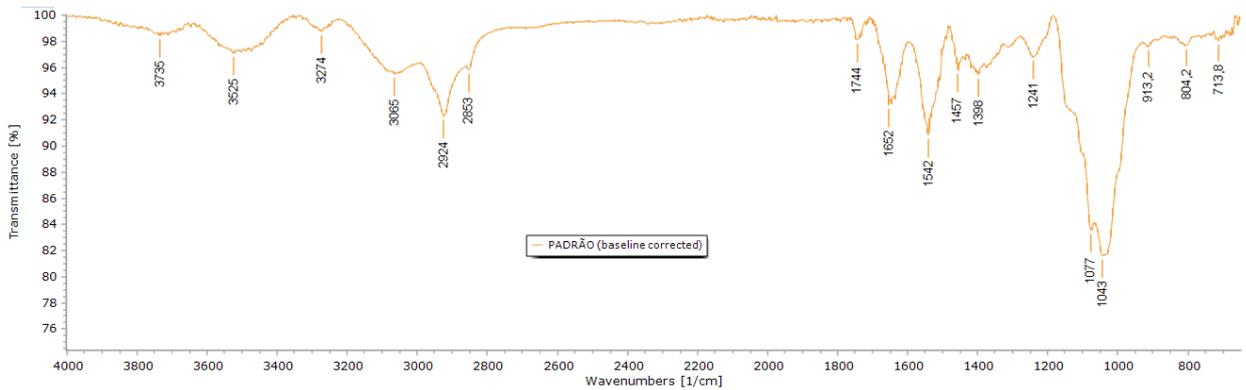
Tabela 3 - Número de onda associado aos grupos funcionais obtidos a partir do FT-IR.

Número de Onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Tratamento	Considerações
3700 a 3000	O-H associado	Padrão, PFA e Secagem.	Ligado a ácidos graxos, ésteres e aminoácidos. No PFA e Secagem foi observado deslocamento de banda.
2920	C-H alifático assimétrico	Padrão, PFA e Secagem.	Resultante principalmente da presença de lipídios. Apresentou deslocamento de banda para um número de onda menor.
2850	C-H alifático simétrico	Padrão, PFA e Secagem.	Breve deslocamento para valores menor foi observado no PFA e na secagem.
1740	estiramento C=O	Padrão, PFA e Secagem.	Associada a presença de fosfolipídios.
1650 e 1540	C=O e N-H (amida I e amida II)	Padrão, PFA e Secagem.	Presença de peptídeos.
1450 e 1370	dobramento C-H	Padrão, PFA e Secagem.	Associado a presença de lipídios, com ocorrência de deslocamento de banda nos três tratamentos.
1300 a 1200	x	Padrão, PFA e secagem.	Possivelmente associado a sobreposição de proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos.
1077 e 1043	Estiramento C-O	Padrão.	Absorção dos fosfatos e ácidos nucleicos (furanose).

1029 e 991	Respectivamente, estiramento C-O e cadeia ribose-fosfato	Secagem.	Absorção dos fosfatos e ácidos nucleicos (furanose).
1082	P-O	PFA.	Absorção do DNA e RNA.
1046 e 1025	Estiramento C-O	PFA.	Furanose associada a conformação Z-DNA.
977	Estiramento C-C	PFA.	Atribuída a vibração da conformação B-DNA.
933	x	PFA.	Conformação Z-DNA.
800	O-P-O	Padrão, PFA e Secagem.	Absorção do grupo fosfodiéster.

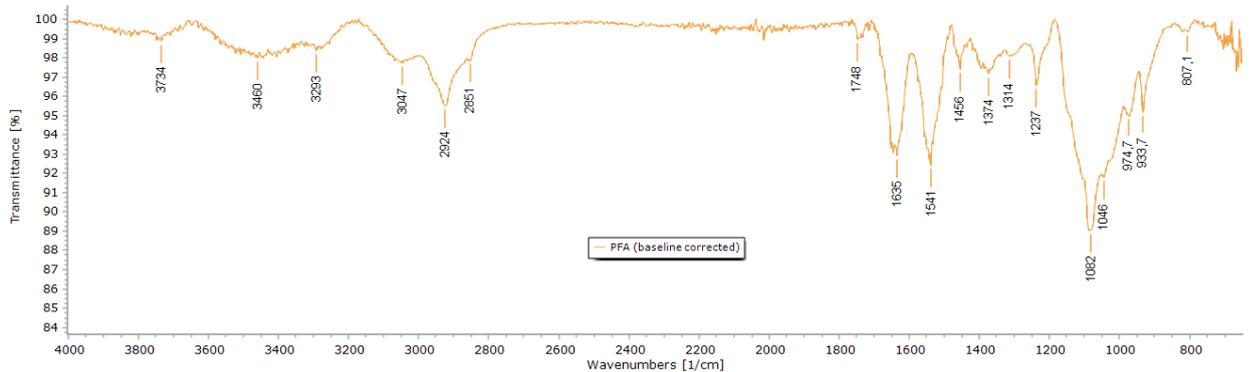
Fonte: A Autora (2022).

Figura 30 - Espectro da levedura *S. cerevisiae* submetida ao tratamento padrão



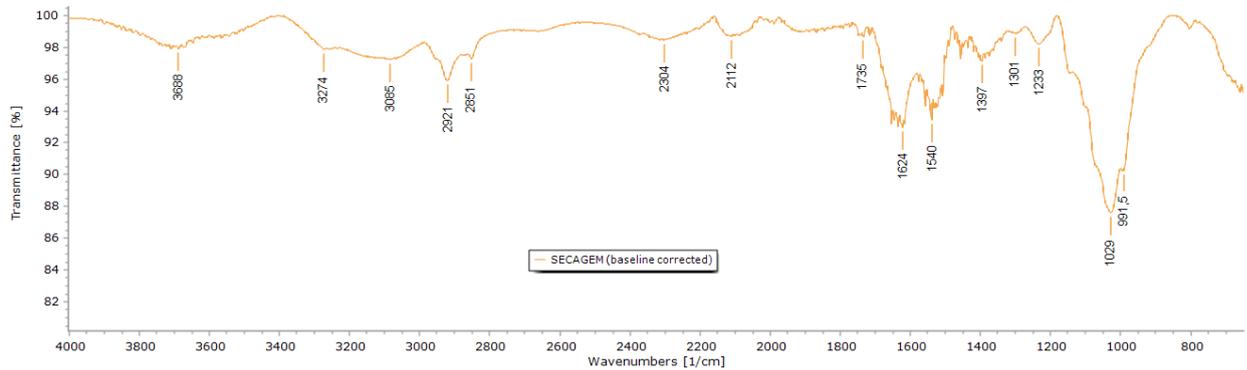
Fonte: A Autora (2022).

Figura 31 - Espectro da levedura *S. cerevisiae* submetida ao tratamento com PFA



Fonte: A Autora (2022).

Figura 32 – Espectro da levedura *S. cerevisiae* submetida ao tratamento de secagem



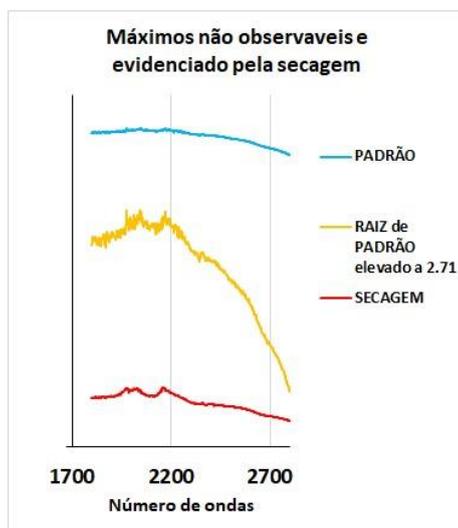
Fonte: A Autora (2022).

Comparando-se os gráficos obtidos a partir das médias de cada tratamento, observou-se que existiam máximos evidentes observáveis no tratamento por secagem, os quais eram pouco evidentes no gráfico das médias do tratamento padrão e o com PFA. Para verificar a presença destes máximos pouco evidentes, provavelmente devido a presença da molécula da água, dados da região entre 2700 e 1700 número de ondas foram transformados pela equação:

$$x = \sqrt{y^{2,71}} \quad (7)$$

Os dados transformados indicam a presença dos máximos observados no processo de secagem na média das amostras padrão (Figura 33). Contata-se então que o tratamento de secagem além de permitir a inativação do micro-organismo, evidencia novos máximos que podem contribuir na obtenção de assinaturas químicas das amostras analisadas. Em relação ao tratamento padrão proposto inicialmente por Naumman et al. (1991), a metodologia desenvolvida nesta dissertação confere novas perspectivas de interpretação do perfil espectral de uma amostra microbiana. Silverstein, Webster e Kiemle (2005) e Pavia (2014) sugerem que bandas na região de 2304 e 2112 cm^{-1} podem ser atribuídas a presença de alcinos, porém não foi possível estabelecer esta relação no presente trabalho por conta do aspecto da banda.

Figura 33 - Gráfico referente a máximos evidenciados a partir do processo de secagem.



Fonte: A Autora (2022).

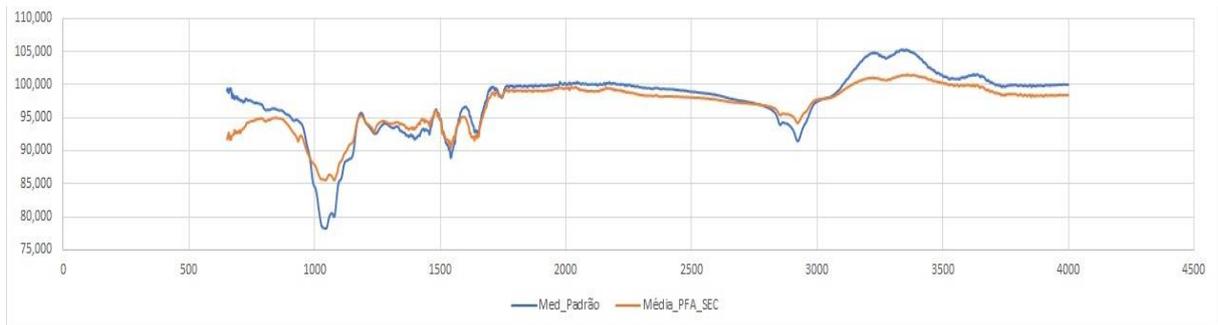
Por meio da inspeção visual direta é possível observar que, embora a região entre 1200 e 1700 cm^{-1} evidencie máximos menos intensos em relação ao tratamento padrão e o com PFA, ainda é possível observar coerência entre a assinatura química obtida (Tabela 3).

5.4 ANÁLISES COMPUTACIONAIS

Os testes iniciais utilizando análises multivariadas apresentaram oscilações de dados e foram incapazes de fornecer agrupamentos consistentes sobre cada tratamento. O emprego da abordagem estatística demonstrou-se essencial para identificar regiões anômalas responsáveis por interferir na obtenção destes dados. Neste sentido, a compreensão das regiões espectrais divergentes entre os tratamentos PFA, padrão e secagem, foram evidenciadas por métodos estatísticos tradicionais.

Observou-se ainda quando a média computando todos os tratamentos (secagem + PFA) se aproxima bastante daquele observado da média dos tratamentos padrão (Figura 34).

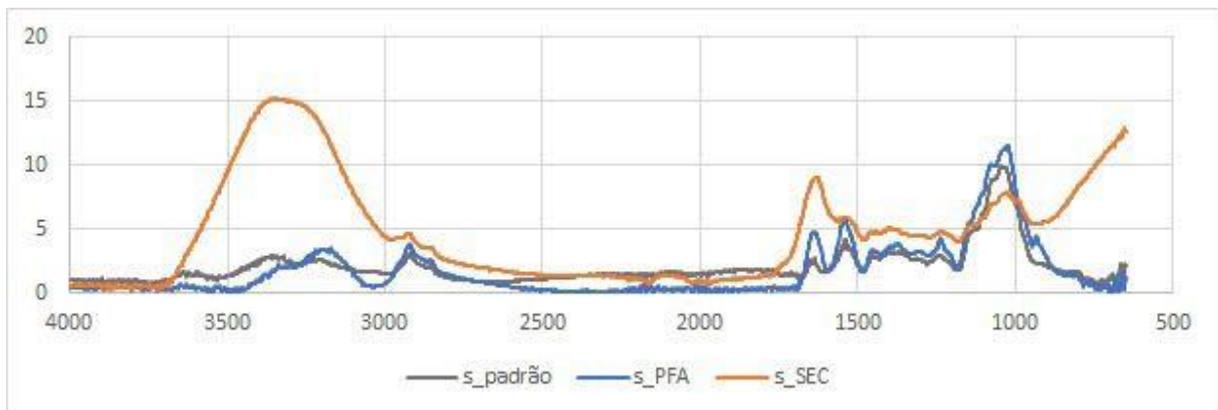
Figura 34 - Gráfico das médias referentes dos dois tratamentos (secagem e PFA) x padrão.



Fonte: A Autora (2022).

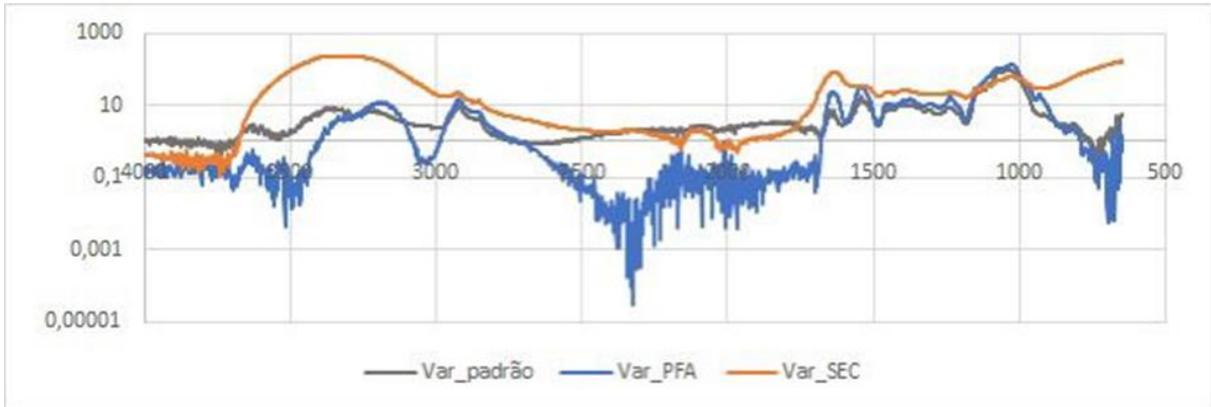
O gráfico de variância do conjunto de dados para cada tratamento destaca as regiões espectrais de 1100 a 1200 cm^{-1} , 1500 a 1700 cm^{-1} e 3500 a 3700 cm^{-1} como faixas representativas de maior variação dos valores. No que se refere ao desvio padrão, as faixas espectrais correspondentes aos maiores valores de desvio em relação à média central são de 1000 a 1100 cm^{-1} e 3300 a 3500 cm^{-1} . O desvio padrão e a variância de cada um dos tratamentos estão representados abaixo (Figura 35 e 36).

Figura 35 - Desvio padrão em relação a cada tratamento



Fonte: A Autora (2022).

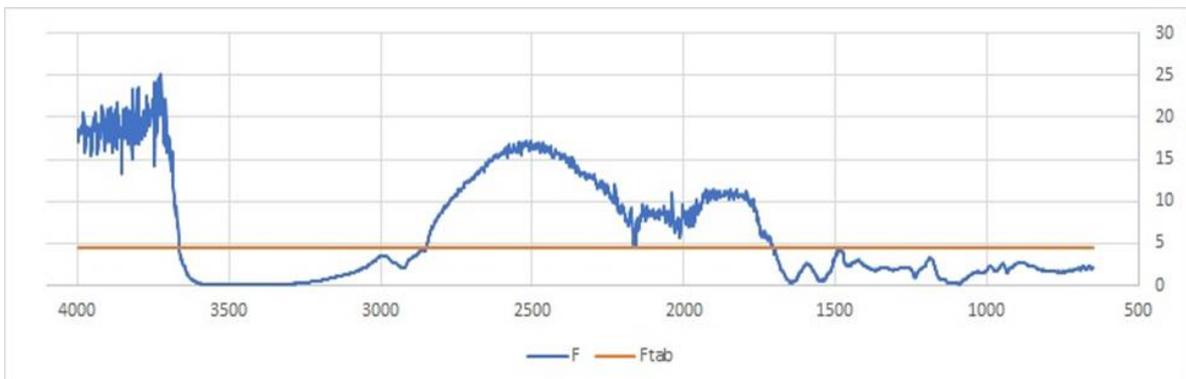
Figura 36 - Variância em relação a cada tratamento



Fonte: A Autora (2022).

O teste-F (Figura 37) evidenciou quais são as regiões espectrais com maiores diferenças significativas entre os três métodos, estas regiões estão entre as faixas de 1700 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} e a partir de 3700 cm^{-1} . As bandas indicadas com valores abaixo de 5 não apresentam diferenças significativas entre as técnicas.

Figura 37 - Gráfico gerado a partir do teste-F.



Fonte: A Autora (2022).

Através do teste-T (Figura 38 e 39) com nível de significância de 10% foi possível comparar o grupo padrão com o PFA e a secagem, identificando as divergências entre os tratamentos. Os espectros médios da secagem diferem do tratamento padrão entre as regiões espectrais de 1700 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} e a partir da região 3700 cm^{-1} , já o método PFA diverge entre as regiões 2600 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} . Em relação aos valores de variância, a secagem difere do padrão nas faixas de 700 cm^{-1} a 900 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} a 3600 cm^{-1} e o PFA difere nas faixas de 600 cm^{-1} a 700 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} a 2500 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} a 3600 cm^{-1} .

Figura 38 - Teste-T em relação as médias da secagem e PFA.



Fonte: Autora, 2022.

Figura 39 - Relação entre as variâncias de cada tratamento.



Fonte: A Autora (2022).

O gráfico representativo do desvio padrão e da variância para cada tratamento demonstram que as regiões com valores acima de 10 parecem estar associadas a maior dispersão dos dados amostrais e são associadas ao tratamento de secagem. O teste-T destaca regiões similares as evidenciadas pelo desvio padrão e a variância, corroborando com a provável interferência do tratamento de secagem na variabilidade dos dados.

Os dados observados a partir da variância sugerem uma maior variação associada a sobreposição de carboidratos, lipídios, absorção de nucleotídeos, peptídeos e O-H associado a moléculas de ácidos graxos ou aminoácidos. Já em relação ao evidenciado pelo desvio padrão, as faixas espectrais mais variáveis em relação a média passam a ser aquelas associadas a absorção de fosfatos e ao anel de furanose de nucleotídeos, também se observa que a variância associada a absorção de O-H está presente tanto nas análises de variância como no desvio padrão (PAVIA et al., 2014; DE ROSSI, 2018; BERTERAME et al., 2016; SILVERSTEIN, WEBSTER; KIEMLE, 2005; MOLOM; ZEBROWISK, 2017).

Já o teste-F evidencia que as variações significativas são resultantes da absorção de fosfolipídios e O-H associado para todos os métodos. A comparação

dos métodos de secagem e o PFA com o método padrão, demonstraram que o PFA difere do método tradicional predominantemente nas faixas de absorção de resultantes de ligações de O-H associado, enquanto a secagem acumula mais diferenças em relação ao padrão nas regiões provenientes da absorção de fosfolipídios e O-H associado. Sendo assim, percebe-se que ambos os tratamentos possivelmente apresentam divergências relacionadas ao mesmo padrão de absorção molecular, porém a secagem parece ter uma contribuição maior sobre a variação dos dados. Parte da variação observada no processo de secagem pode ser consequência do surgimento de novos máximos de absorção, os quais tornaram-se identificáveis após a redução do teor de umidade (PAVIA et al., 2014; SILVERSTEIN, WEBSTER; KIEMLE, 2005).

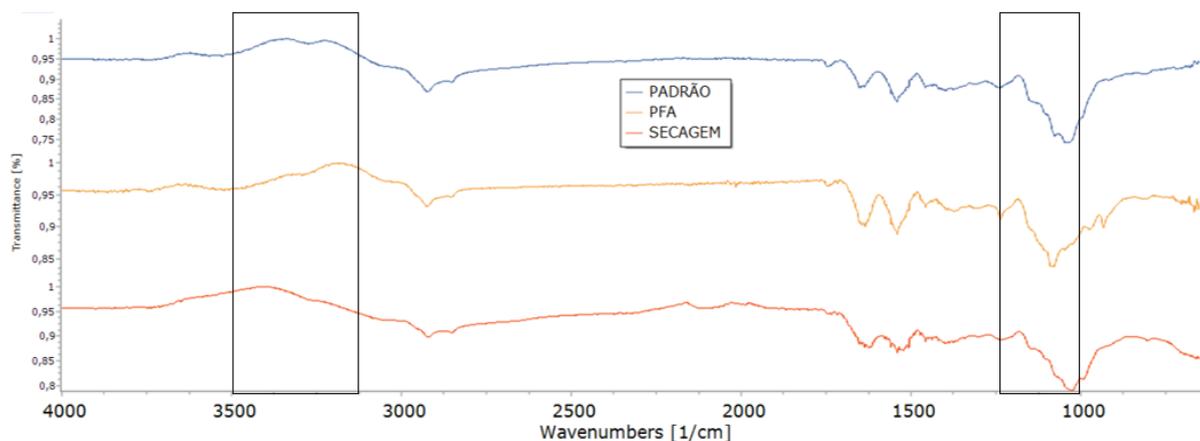
As comparações estabelecidas por meio do Teste-T entre as técnicas de secagem, o PFA e o tratamento padrão evidencia que as faixas de maior variância diferem em cada método, o que é decorrente do comportamento vibracional dos grupos funcionais submetidas as condições distintas. O paraformaldeído é largamente utilizado como agente de fixação em preparações histológicas, preservando a estrutura de tecidos biológicos e garantindo a sua integridade para diagnósticos clínicos. O tratamento com PFA acumula variações nas regiões relacionadas a absorção de ligações C-H e O-H associado, enquanto na secagem as variações são resultantes da absorção de ligações C=O, presente em fosfolipídios e O-H associado.

Os fosfolipídios determinam a expressão das propriedades funcionais das membranas celulares e quando submetidos a desidratação, podem sofrer mudanças estruturais e bioquímicas. Foi demonstrado que após a secagem, lipídios e fosfolipídios apresentam um número maior de cadeias curtas de ácidos graxos e há redistribuição de moléculas como o ácido palmitoleico. Amostras de leveduras secas mantidas em armazenamento, também apresentam aumento no número de ácidos graxos livres nas células. Outro processo observado é a dessaturação de ácidos graxos decorrente da atividade da ATPase mitocondrial, a qual tem sua produção aumentada como mecanismo de resistência à desidratação e reidratação. No entanto, ainda há escassez de estudos descritivos sobre o comportamento dos lipídios celulares quando expostos ao processo de secagem (BEKER; RAPPORT, 1987).

Sendo assim, tanto no gráfico de desvio-padrão quanto no referente a variância dos dados, o grupo padrão e PFA apresentam maior homogeneidade dos dados e provavelmente afastam-se menos dos valores esperados quando comparados com a secagem. Neste sentido, a má resolução da análise dos componentes principais (PCA) e da análise hierárquica de cluster (HCA) realizadas preliminarmente, sem os dados da estatística tradicional, foi associada as regiões anômalas e divergentes presentes no modelo experimental estudado.

Optou-se pelas análises multivariadas utilizando ferramentas de pré-processamento, como a transformação de dados, a exclusão de regiões excessivamente variadas e delimitação de linhas de base. Para tal, no programa Orange Data Mining foram realizadas exaustivas simulações empíricas de pré-processamento visando obter os agrupamentos esperados de acordo com os tratamentos executados, paralelamente também foram observados possíveis relações entre os melhores pré-processamentos com os perfis de variâncias e desvio-padrões obtidos principalmente quando se aplicava a ferramenta “cut remove” que retira da análise regiões pré-definidas. A faixa de 998 a 1077 cm^{-1} e 3140 a 3500 cm^{-1} apresentou a maior dispersão do conjunto de dados, o que foi possível identificar através do gráfico de desvio padrão. A retirada dessas regiões divergentes, designadas como anômalas, permitiu a geração de dados espectrais mais eficientes (Figura 40).

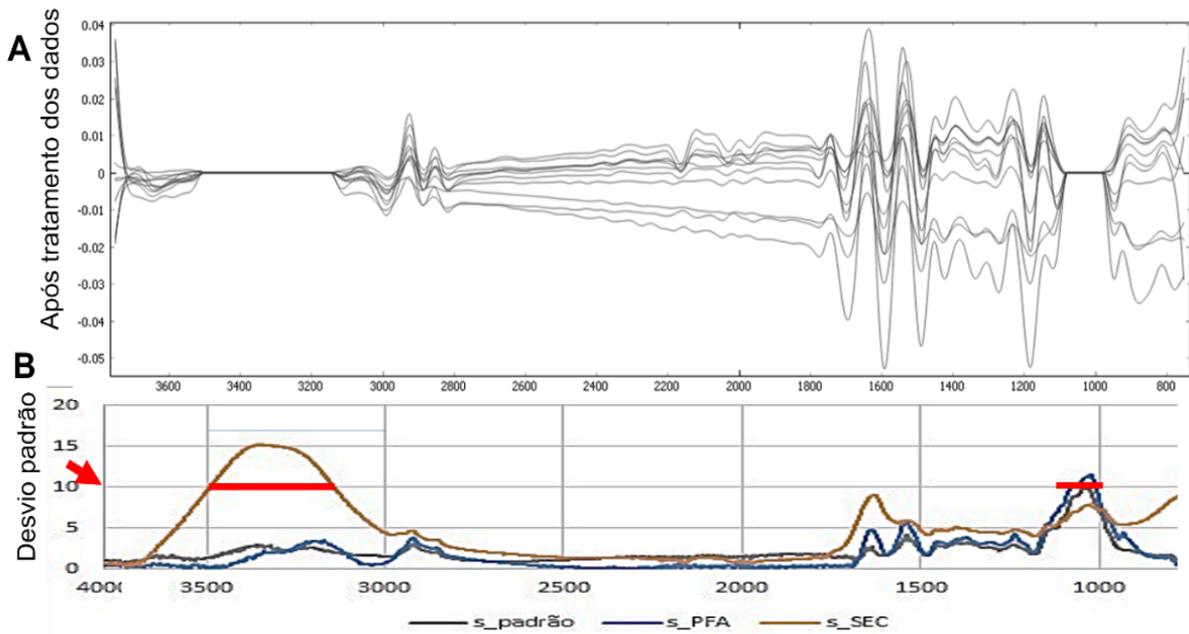
Figura 40 - Espectros FT-IR para cada tratamento evidenciando as regiões anômalas subtraídas nas etapas de pré-processamento.



Fonte: A Autora (2022).

Observou-se então que as melhores etapas de pré-processamento foram, respectivamente, filtro Savitzky-Golay, Cut remove, Cut remove, Gaussian smoothing e Baseline Correction (Figura 41A). Este processamento foi empregado conjuntamente a exclusão de regiões de valores de desvio-padrão, acima de 10 (Figura 41B), correspondente a região aproximada de 998 a 1077 cm^{-1} e 3140 a 3500 cm^{-1} . Desta forma, os dados foram submetidos a PCA, HCA e Freeviz. De acordo com Canevarolo (2017), Wenning e Scherer (2013), o pré-processamento dos dados é fundamental para identificação de amostras a partir de espectros FT-IR. As transformações essencialmente relevantes para o processamento prévio correspondem a suavização, normalização e o cálculo derivativo, neste último procedimento, usualmente utiliza-se o algoritmo desenvolvido por Savitzky e Golay (1964).

Figura 41 - Desenvolvimento de critérios para processamentos de dados de FTIR. A) Dados de FTIR após pré-processamento. B) Regiões excluídas a partir da avaliação de valores do desvio-padrão.



Fonte: A Autora (2022).

No entanto, os tratamentos espectrais variam de acordo com o objetivo do estudo, devendo-se evitar excessos. A normalização, por exemplo, não se mostrou eficaz na metodologia desenvolvida pois não foi capaz de agrupar os tratamentos estudados na PCA. Neste sentido, exaustivas combinações com as ferramentas de pré-processamento espectral foram necessárias até que fosse possível gerar

escores eficientes na separação dos tratamentos estudados por meio da PCA. Estes esforços, assim como sugere Canevarolo (2017), são necessários a fim de destacar a aparência e extrair mais informações do espectro, bem como reduzir a interferência de ruídos e artefatos no perfil espectral. Desta forma, foi possível obter espectros adequados para metodologias com potencial distintivo e torná-los reproduzíveis utilizando ferramentas de análise multivariada.

A PCA dos espectros gerados após o pré-processamento permitiu a obtenção dos escores de quatro componentes, o primeiro componente principal (PC1), o segundo componente principal (PC2), o terceiro componente principal (PC3) e o quarto componente principal (PC4).

Uma vez que a PCA reduz a dimensionalidade dos dados a componentes principais, é possível analisá-los em um *Scatter Plot* (Figura 42) neste estudo, 98% das informações espectrais relevantes são representadas no *Scatter Plot* utilizando PC1 e PC2.

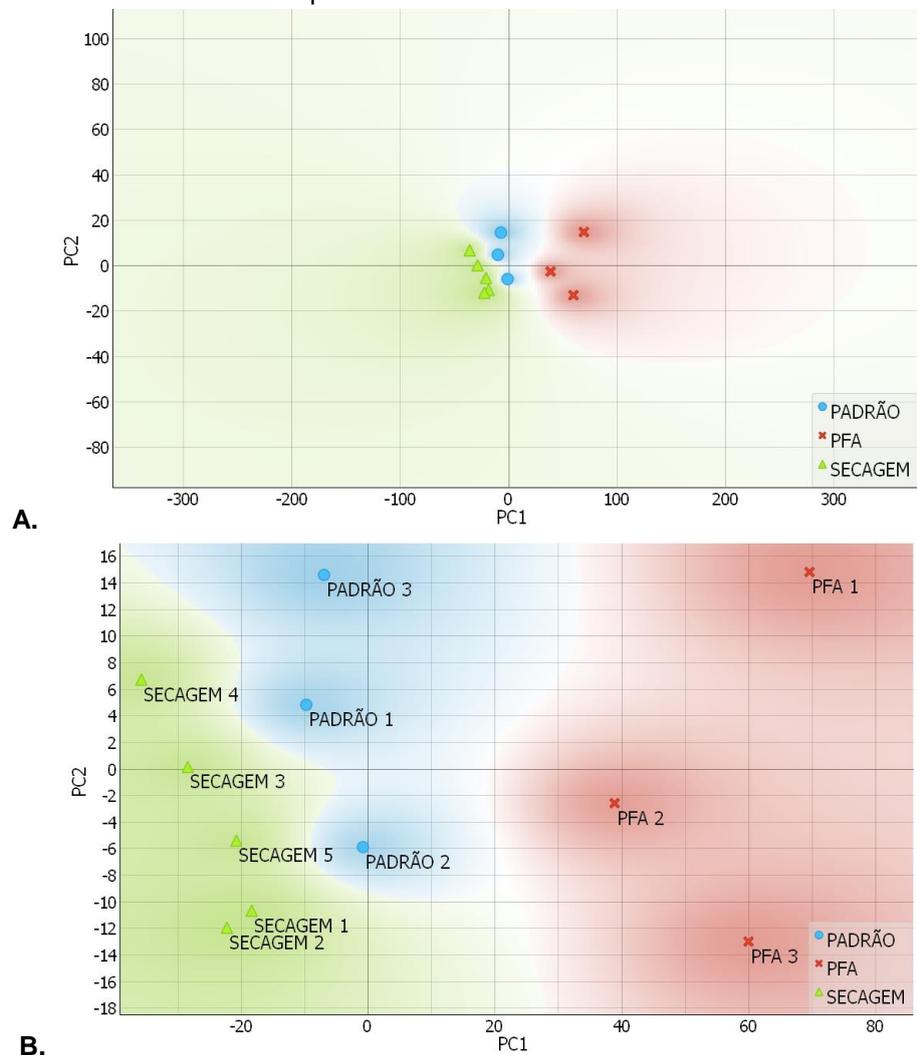
Neste gráfico de dispersão foi possível identificar a formação de agrupamentos (indicados por cores) entre classes similares, que correspondem a amostras do mesmo tratamento (Figura 42A), deste modo, os pontos amostrais formam três grupos que correspondem aos tratamentos Padrão, PFA e Secagem (Figura 42B).

A análise multivariada realizada através da PCA permite duas interpretações iniciais, a primeira refere-se ao tratamento predominante na informação espectral redimensionada e que possivelmente apresenta maior contribuição na variabilidade dos dados, a segunda evidencia o potencial distintivo da técnica.

A disposição bidimensional dos tratamentos no *scatter plot* sugere que o PFA apresenta maior relação com o PC1 indicado pelos valores mais altos ao longo do eixo e, portanto, acumula a maior variabilidade dos dados representado pelo PC1 que apresentou escore 0,851 (Figura 43). Sendo assim, provavelmente, o PFA nesta análise acumula boa parte da variância dos dados, enquanto PC2 representa os grupos Padrão e Secagem.

Através do *scatter plot* também se constata que os escores atribuídos ao PC1 e PC2 permitem a formação de agrupamentos entre pontos amostrais de mesma classe, indicando o potencial distintivo da metodologia utilizada para identificar diferenças entre os tratamentos para cada tipo de amostra microbiana.

Figura 42 - *Scatter plot* gerado a partir dos escores PC1 (0,851) e PC2 (0,061). A) *Scatter plot* evidenciando a distribuição dos pontos amostrais e a formação dos grupos entre os mesmos tipos de tratamento. B) *Scatter plot* evidenciando a distribuição dos pontos amostrais com legenda para cada ponto amostral.



Fonte: A Autora (2022).

Os escores gerados pela PCA após o pré-processamento estão representadas no quadro abaixo, assim como os valores obtidos ao realizar a análise sem retirada das regiões anômalas (Figura 43). Observando os escores constata-se que a exclusão das regiões anômalas aumentou os valores de PC1 e diminuiu dos demais componentes o que refletiu um melhor agrupamento posterior no *scatter plot*. Sem a exclusão das regiões anômalas, as quatro componentes principais representam 97% dos dados, após a exclusão, as mesmas componentes representam 98,4% das informações. Ao comparar os valores de PC1, o mesmo aumentou de 69,1% para 85,1%.

Embora a variância, teste-T e teste-F tenham indicado inicialmente faixas possivelmente atribuídas a má resolução dos dados, apenas a retirada das regiões espectrais com valores de desvio padrão maiores que dez destacou-se na obtenção dos dados. Portanto, a faixa examinada pelo critério de desvio padrão parece estar mais relacionada com incongruência das análises de PCA, pois sua supressão produziu agrupamentos bem definidos entre tratamentos de mesma classe.

Figura 43 - Quadro referente aos valores dos escores gerados pela PCA antes e após a retirada das regiões anômalas.

Escore para cada componente principal (PC)	PC1	PC2	PC3	PC4
Antes da retirada das regiões anômalas	0,691	0,181	0,061	0,045
Após a retirada das regiões anômalas	0,851	0,061	0,057	0,014

Fonte: A Autora (2022).

O emprego da PCA no estudo espectroscópico de micro-organismos permite a formação de agrupamentos entre classes similares, gerando dados para identificação e caracterização de células microbianas. Este método além de ser factível na análise de diferenças entre tratamentos, também pode contribuir na identificação de diferentes espécies ou cepas microbianas. No estudo conduzido por ADT et al. (2010), a espectroscopia vibracional no infravermelho foi utilizada na discriminação entre *Saccharomyces cerevisiae* e levedos de outras espécies, bem como na discriminação entre cepas de *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *S. carlsbergensis*.

A região espectral escolhida por ADT et al. (2010) foi a faixa de 900 a 1200 cm^{-1} a qual, segundo os autores, é atribuída a presença de polissacarídeos componentes da parede celular da levedura, sendo considerada por eles a faixa de *assinatura* para diferenciação das cepas. No entanto, ao levar em consideração a composição bioquímica na delimitação das regiões a serem analisadas por PCA, se faz necessária a interpretação correta das bandas espectrais e conhecimentos específicos sobre o material estudado. Na investigação desenvolvida nesta dissertação a região subtraída foi de 1000 a 1200 cm^{-1} e 3100 a 3500 cm^{-1} , tendo como critério os resultados gerados pelo desvio padrão.

O emprego da abordagem desenvolvida utilizando estatística tradicional permitiu a determinação de regiões promissoras na diferenciação de tratamentos distintos e matrizes complexas, a partir de dados brutos espectrais factíveis de serem obtidos por qualquer equipamento espectrofotômetro. Sendo assim, a interpretação espectral na metodologia apresentada nesta dissertação, surge como elemento complementar a fim de garantir a riqueza da análise e não como etapa fundamental para distinção dos grupos. Neste contexto, a investigação por estatística convencional também pode ser empregada e revelar novas assinaturas espectrais relevantes para estudos de classificação.

Os escores gerados de PC1 e PC2 na análise de PCA de ADT et al. (2010), corresponderam a pelo menos 71,2% da variação total dos dados para espécies de gêneros diferentes, enquanto no presente estudo as duas primeiras componentes representaram em torno de 91% da variação dos dados para amostras de *S. cerevisiae* submetidas a diferentes tratamentos. Observa-se que mesmo com a exclusão de uma faixa menor do espectro, ADT et al. (2010) obtiveram uma representação dos dados inferior em número do que a apresentada neste trabalho.

Ressalta-se que a PCA desenvolvida nesta dissertação esteve de acordo com o que é observado na literatura (ADT et al., 2010; GRANATO et al., 2018; YANG et al., 2014; WENNING et al., 2013) além de possibilitar a redução de dados com amplo aproveitamento das informações, sendo capaz de identificar classes similares e construir agrupamentos.

Uma vez que o perfil espectral de cada amostra frequentemente irá apresentar diferenças não identificáveis por inspeção visual direta, a análise estatística tradicional permite investigar variações em relação à média dos dados, bem como identificar regiões com diferenças significativas e faixas divergentes, aprimorando a etapa de delimitação das regiões a serem estudadas por análise multivariada.

No contexto de micro-organismos responsáveis por infecções fúngicas, Santos et al. (2012) comparou métodos estatísticos de análise multivariada e métodos não-estatísticos de ajuste de curva utilizando espectros infravermelhos de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis* a fim de testar o potencial da análise multivariada para discriminação de células microbianas por meio da utilização da análise de componentes principais e pela análise hierárquica de cluster.

Para tal, Santos et al. (2012) optou pela investigação das regiões de 4000 a 1000 cm^{-1} , com exclusão da região de 2600 a 2300 cm^{-1} referente a dióxido de carbono e de 1710 e 1590 cm^{-1} . A exclusão desta última região se deu através de inspeção visual direta, neste caso a faixa foi atribuída a banda de amida I e apresentou um aspecto visual similar entre os espectros estudados. Este método tem como desvantagem a não consideração da variância do conjunto de dados espectrais, os quais apresentam divergências e outras informações não verificáveis de imediato. Além disso, as interpretações bioquímicas dos perfis espectrais frequentemente podem apresentar divergências na literatura conduzindo a interpretações equivocadas.

A análise de PCA conduzida nesta dissertação, utilizando os quatro primeiros componentes principais, representou 99% das informações iniciais assim como nos estudos realizados por Santos et al. (2012). No entanto, estes últimos obtiveram dados unicamente voltados as variáveis espectrais responsáveis pela formação das quatro componentes.

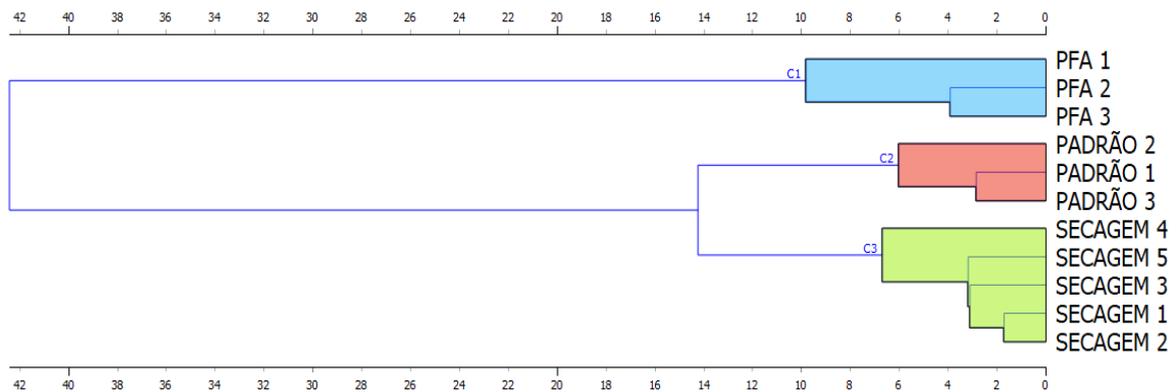
Deste modo, foi necessário a complementação dos dados de PCA através da análise de cluster. Nesta dissertação, embora tenham sido consideradas as quatro componentes principais para representar 99% das informações iniciais, a utilização de PC1 e PC2 permitiu não só identificar qual componente é responsável pela separação dos espectros, mas também formar agrupamentos entre tratamentos espectrais similares, favorecendo a distinção inicial dos grupos. Deste modo, já foi possível a distinção dos grupos estudados nesta etapa da PCA, o que não foi observado nos resultados de Santos et al. (2012).

A saída de dados gerados na PCA foi direcionada para realização da análise hierárquica de cluster (HCA), responsável pela obtenção de um dendrograma por agrupamento hierárquico. Para tal, foi utilizado o algoritmo *Ward*, considerado um eficiente método de agrupamento. Segundo Everitt (1994) e Ward (1963), este algoritmo é capaz de construir clusters minimizando o desvio padrão entre os dados de cada grupo. Todavia, os agrupamentos gerados nesta dissertação por meio da HCA só foram possíveis devido as etapas de pré-processamento desenvolvidas, as quais fundamentaram-se nas faixas com desvio padrão maior que dez e possibilitaram a identificação de novos padrões. Deste modo, assim como proposto por Baker et al. (2014) a determinação e seleção das regiões a serem analisadas foram importantes mesmo utilizando um algoritmo de alta eficiência e estiveram de

acordo com a literatura (CANEVAROLO, 2014; MARIEY, 2001; YANG et al., 2020).

O dendrograma gerado evidencia a clara distinção entre os três tratamentos, constata-se assim, que existem diferenças significativas identificáveis entre os mesmos por meio da HCA e que é possível agrupar tratamentos similares nas mesmas classes (Figura 44). O comportamento dos agrupamentos observado no gráfico de dispersão gerado pela PCA mostra-se de acordo com o observado no dendrograma da análise de cluster, neste é possível observar a formação de grupos entre classes similares de tratamento. Além disso, assim como sugerido pelos autovalores da PCA desenvolvida nesta dissertação, o tratamento PFA é o que apresenta menos similaridades em relação ao tratamento Padrão e Secagem.

Figura 44 - Dendrograma gerado pela HCA. C1: cluster 1 referente aos PFA, C2: cluster 2 referente ao padrão, C3: cluster 3 referente a secagem.



Fonte: A Autora (2022).

A formação dos clusteres pela HCA baseia-se no conceito de similaridade, o qual por definição matemática, refere-se a semelhança entre dois objetos determinada pela sua distância. Neste sentido, os agrupamentos emergem baseados na distância calculada pelo algoritmo e de acordo com a métrica utilizada. Usualmente, utiliza-se a distância métrica euclidiana, porém no presente trabalho a *Manhattan* foi preterida por não depender da padronização dos dados. A disposição bidimensional dos pontos amostrais presentes no *scatter plot* da PCA não influencia nas distâncias dos clusters gerados (Figura 38A e 38B), porém é possível observar semelhança entre a disposição destes pontos com a formação dos agrupamentos evidenciados no dendrograma (Figura 41). A HCA descrita nesta dissertação gerou três clusters, o cluster 1 (C1) definido pelas amostras tratadas

com PFA e delimitado até valores iguais a 10, o cluster 2 (C2) e 3 (C3) referentes, respectivamente, as amostras submetidas ao tratamento padrão e secagem alocados em valores próximos a 6 (Figura 41).

O grupo formado pelo PFA apresenta menor similaridade em relação aos tratamentos de secagem e o padrão, no dendrograma é possível observar que sua distância é maior em relação aos outros grupos e o mesmo é posicionado como um *outgroup*. As amostras referentes ao PFA 2 e 3, cuja distância é inferior a do PFA 1 e igual a 4, também apresentam menor similaridade em relação ao C2 e C3 e possivelmente acumulam mais similaridade entre si do que com o PFA 1. No C2 referente ao tratamento padrão, a amostra padrão 2 é a que mais afasta-se do grupo como um todo, enquanto as amostras 2 e 3 acumulam maior similaridade entre si. Por último, no C3 referente ao tratamento de secagem, a amostra 4 é a que mais afasta-se do grupo como um todo e é possível observar a formação de dois subgrupos, um entre as amostras 5 e 3 e um segundo entre as amostras 1 e 2 (Figura 41).

Somente após o pré-processamento desenvolvido nesta dissertação foi possível construir clusters entre amostras das mesmas classes de tratamento, indicando que o pré-processamento influencia na identificação das distâncias significativas de similaridades e dissimilaridades. O tratamento dos dados espectrais é importante, assim como o seu fluxo de trabalho, pois garante a retirada de artefatos, ruídos ou qualquer outro elemento que possa prejudicar a análise. Nesta dissertação, o método desenvolvido forneceu os espectros de acordo com o esperado para a construção das análises multivariadas de maneira eficiente, assim como sugere Segundo Baker et al. (2014). Neste sentido, foi possível gerar dados espectrais com a resolução necessária, permitindo que a HCA fosse capaz de extrair o máximo de informações durante o processamento das distâncias.

Santos et al. (2012) ao conduzir análises de agrupamento utilizou as quatro componentes a fim de representar 99% dos dados reduzidos. Na metodologia desenvolvida nesta dissertação, a formação de agrupamentos por meio da PCA dependeu apenas da PC1 e PC2, assim como a obtenção dos clusters através da HCA. Além disso, embora a HCA possa ser construída em função da saída de dados da PCA no programa *Orange Data Mining*, o desenvolvimento do tratamento espectral adequada permitiu a construção do dendrograma e de agrupamentos satisfatórios independentes dos escores gerados pelas componentes.

Sousa et al. (2006) utilizou HCA na classificação de amostras de água de coco processada (ACP) e água de coco natural (ACN), considerando teores de Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, Al, Se, Cd e Pb. Para tanto, foi gerado um dendrograma que formou agrupamentos incluindo as amostras analisados em clusters de ACP e ACN. Neste estudo, a HCA cumpriu sua função distintiva com êxito e separou as amostras de acordo com o tipo de processamento. O dendrograma desenvolvido para diferenciação entre os tratamentos PFA, padrão e secagem (Figura 41) está de acordo com o obtido por Sousa et al. (2006) e demonstra como as amostras submetidas ao mesmo tratamento podem estar relacionadas e que as mesmas também podem apresentam dissimilaridades formando subgrupos.

Além disso, Sousa et al. (2006) identificou um outgroup interpretado como um conjunto de amostras com baixa similaridade e de composição química diferenciada em relação aos outros dois clusters produzidos. O outgroup observado por meio da HCA conduzida nesta dissertação foi o referente ao tratamento com PFA, o qual também parece estar mais relacionado com a variância identificada pelos escores gerados através da PCA, afastando-se mais dos tratamentos de secagem e o padrão (Figura 39A e 39B). Sendo assim, Sousa et al. (2006) também utiliza da identificação de um outgroup para constatar quais amostras se afastam mais do conjunto de dados.

HCA também é amplamente utilizada para avaliar a associação multivariada entre componentes bioativos, bioatividade de alimentos, bebidas e seus extratos. É o caso dos trabalhos de Kaskoniene et al. (2014), Sánchez-Salcedo et al. (2016) e Fan and Beta (2017), nos quais parâmetros como conteúdo fenólico total, atividade antioxidante e o conteúdo de ácidos fenólicos foram utilizados para classificar amostras de chás e vegetais juntamente com análise por PCA. Nestes trabalhos, utilizando o algoritmo *Ward*, identifica-se a formação de dendrogramas semelhantes ao construído nesta dissertação, também é possível observar que a análise de cluster é eficiente para o estudo distintivo de matrizes complexas como produtos acabados.

Usualmente, na identificação de micro-organismos são utilizadas duas ou mais ferramentas multivariadas, por conta disso, são escassos trabalhos empregando apenas a HCA. Em linhas gerais, estas ferramentas podem ser a Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Hierárquica de Cluster (HCA), Análise Discriminante Linear (LDA), Análise Discriminante por Mínimos Quadrados

Parciais (PLS-DA), Máquinas de Vetores Suporte (SVM), Algoritmo de Projeções Sucessivas (SPA), Análise Discriminante Quadrática (QDA), Algoritmo Genético (GA), Rede Neural Artificial (ANN), entre outras e, normalmente não são conduzidas isoladamente (COSTA et al., 2016; MARIEY et al., 2001). A escolha do método quimiométrico a ser empregado varia de acordo com o objetivo da análise, nesta dissertação a utilização da PCA e HCA se deu devido a sua versatilidade, reprodutibilidade, confiabilidade nível de compreensão e por serem referências no que tange a identificação e caracterização de micro-organismos ou matrizes complexas por FT-IR.

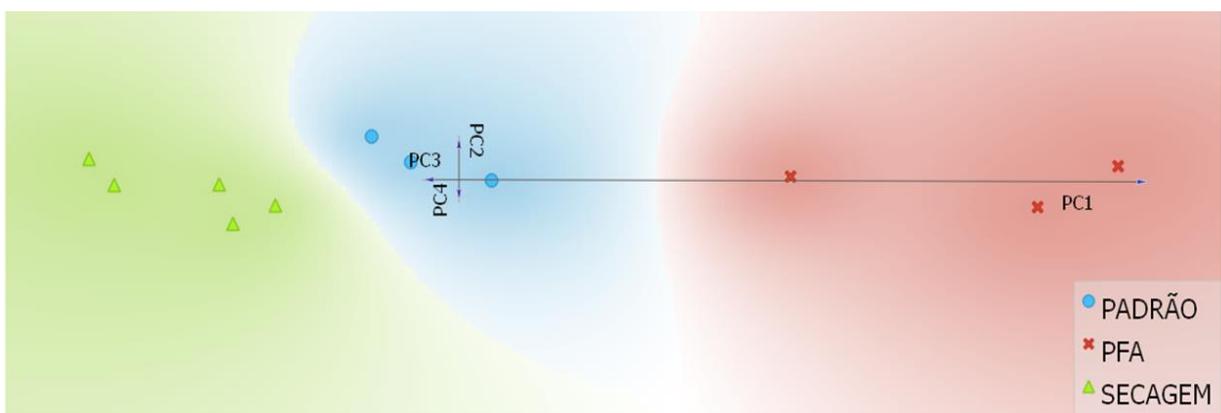
Tanto a PCA como a HCA tradicionalmente são análises multivariadas desenvolvidas através da construção de algoritmos utilizando linguagens de programação como Python, R ou C++. Nesta dissertação, as análises foram realizadas utilizando o programa *Orange Data Mining*, o qual não depende diretamente da delimitação de algoritmos específicos e oferece uma série de ferramentas de visualização, mineração de dados e aprendizado de máquina (ALENCAR, BARROSO; ABREU, 2013). Desta forma, a metodologia desenvolvida também tem como vantagem a facilidade de ser reproduzida por qualquer profissional interessado em realizar a mineração de dados, independentemente do seu nível de conhecimento sobre programação. Reforça-se assim, mais um critério decisão na escolha da metodologia adotada para identificação de diferentes tratamentos, bem como a possibilidade de classificar micro-organismos utilizando programa simples e coerente.

Os espectros referentes para cada tratamento também foram explorados por meio do algoritmo Freeviz, capaz de otimizar uma projeção linear e exibir os dados projetados em um gráfico de dispersão. A vantagem de utilizar esta ferramenta, assim como sugere Demsar, Leban e Zupan (2007), é devido a possibilidade da análise de um conjunto de dados em função de inúmeras variáveis. Neste sentido, os autovalores gerados na PCA podem ser expressos em um gráfico representando 98% das informações reduzidas e explorar a influência de cada variável na disposição das amostras de cada tratamento. Os pontos amostrais de mesma classe são dispostos de maneira mais próxima, enquanto os de classes distintas podem ser projetados em lados opostos ou de maneira mais afastada e a sua disposição será influenciada pelo carregamento das componentes.

O gráfico gerado pela ferramenta Freeviz (Figura 45) evidencia a tendência dos pontos amostrais se aproximarem das componentes que estão mais relacionadas, no qual o tratamento PFA apresenta altos valores associados ao PC1 dispõe-se ao longo deste eixo, enquanto os tratamentos de secagem e o padrão estão alocados ao redor das PC2, PC3 e PC4. Observa-se então, a correspondência da visualização gerada pelo algoritmo Freeviz com o *scatter plot* (Figura 42) obtido a partir da PCA. Cada componente corresponde a uma variável, PC1 apresenta valor igual a 0,851 em relação a sua variância acumulada, enquanto PC2, PC3 e PC4 correspondem, respectivamente a 0,061, 0,057 e 0,014 e os pontos amostrais aos tratamentos.

Os eixos das componentes estão de acordo com a sua importância para definir as classes, ou seja, quanto maior um eixo, maior sua importância para definir uma classe. Por conta disso, o eixo PC1 apresenta maior extensão. Constata-se então que PC1 possui a maior contribuição para delimitação dos agrupamentos e o tratamento PFA é a classe mais relacionada a esta componente. Estes dados são semelhantes ao que é visto na PCA e na HCA, uma vez que há a separação entre classes divergentes com agrupamentos entre classes similares, bem como é possível identificar a maior relação do tratamento PFA com a PC1.

Figura 45 - Gráfico gerado a partir do algoritmo Freeviz; os eixos dos componentes principais foram dispostos ortogonalmente e as dimensões dos eixos foram proporcionais a contribuição de cada componente PC1 (0,851); PC2 (0,061); PC3 (0,057) e; PC4 (0,014)



Fonte: A Autora (2022).

Demsar, Leban e Zupan (2007) resgataram dados de medicina clínica e veterinária, disponíveis no repositório de aprendizado de máquina UCI, com o objetivo de construir estudos de casos que ilustrassem a aplicabilidade do Freeviz

como ferramenta para construir análises exploratórias e mineração de dados supervisionada. Independente das variáveis utilizadas, observou-se a forte influência destas na formação de grupos entre pontos amostrais semelhantes e na identificação de correlações. Constatou-se então, que o gráfico gerado pela Freeviz nesta dissertação está adequado ao que se espera da ferramenta segundo a literatura. Por outro lado, a abordagem aqui apresentada distingue-se dos estudos de caso da literatura pois foi utilizada a saída de dados da PCA, tendo como vantagem a maior representação dos dados originais, aperfeiçoamento da visualização dos dados no gráfico.

Diferente metodologia por HCA desenvolvida nesta dissertação, o algoritmo Freeviz consegue formar grupos com constituintes similares em função das variáveis analisadas. Neste sentido, através do Freeviz é possível enxergar padrões e entender o quanto um conjunto de dados se relaciona com cada variável de acordo com a sua disposição e pela extensão do eixo da variável. Ainda que não seja possível formar subgrupos tal qual na análise de cluster, ao observar o gráfico é possível inferir a existência de alguns pontos amostrais mais relacionados com determinadas variáveis do que outras e identificar quais variáveis influenciam mais na separação dos grupos. No gráfico obtido por meio da Freeviz o PC1 apresenta maior influência (Figura 45), de acordo com o esperado ao enxergar os padrões no *scatter plot* anterior (Figura 42). Sendo assim, a partir do tratamento espectral e exclusão das regiões espectrais com alta variabilidade foi possível obter agrupamentos distintos correspondentes ao tratamento empregado nas amostras.

Tal ferramenta desenvolvida nesta dissertação, pode ser tornar objeto de interesse para análise FT-IR de matrizes complexas como produtos naturais, alimentos, cosméticos, fármacos e dispositivos biomédicos, podendo serem analisados pela tecnologia combinada a PCA, HCA e Freeviz. Para testar esta hipótese foram realizados ensaios preliminares em substitutos temporários de pele contendo agarose e extratos de *Anthurium affine* em três diferentes níveis de concentração (0, 25, 50 e 100 mg.mL⁻¹), onde observou-se que a tecnologia desenvolvida foi capaz de delimitar dois grupos. O primeiro agrupamento constituído dos dispositivos sem extrato, com menor nível de concentração e um segundo grupo com concentrações de 50 e 100 mg.mL⁻¹. (Apêndice 1). Os experimentos utilizando filmes com diferentes concentrações de extratos de *Anthurium affine* demonstram que a metodologia descrita nesta dissertação é capaz de separar amostras com

concentrações variadas, identificando dissimilaridades e similaridades significativas entre os grupos.

Viapiana et al. (2016) utilizou PCA e HCA com o objetivo de associar a relação entre a composição fenólica e atividade antioxidante, mediada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), atividade sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e redutor/antioxidante férrico (FRAP) de amostras de camomila (*Matricaria chamomilla* L.) comercializadas como chás terapêuticos. O potencial para classificar as amostras comerciais com base na assinatura química do HPLC não foi identificado por estes autores, uma vez que nenhuma diferenciação entre as amostras foi identificada. O pré-tratamento adotado nesta dissertação possivelmente destaca-se em relação ao método conduzido por Viapiana et al. (2016) na obtenção dos agrupamentos de acordo com o observado na literatura, pois os pré-tratamentos dos cromatogramas para a realização do PCA e HCA se deu unicamente através de ajustes de alinhamento.

Neste contexto, a mineração de dados por métodos quimiométricos depende da qualidade dos dados de entrada. Os três dendrogramas obtidos nos testes com diferentes faixas orientadas pelos valores de desvio padrão, também reforçam a relevância da seleção de dados na construção de agrupamentos congruentes (Apêndice 1). Embora a obtenção dos dados espectrais realiza por Viapiana et al. (2016) não tenha sido por meio de FT-IR, Nayik e Nanda (2016) também constata o potencial distintivo da PCA e HCA em análises de mesma natureza.

6 CONCLUSÕES

O calor seco inativou o material biológico estudado e pode ser aplicado para caracterizar amostras de micro-organismos utilizando espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FT- IR) acoplado a análises multivariadas.

Os perfis espectrais obtidos pela secagem evidenciaram novos máximos provavelmente resultantes da retirada de água quando comparados aos perfis do material fresco e, de maneira geral, os máximos de absorção apresentados pelo tratamento com PFA foram mais divergentes que os demais tratamentos quando observadas nas regiões estudadas.

A escolhas das regiões dos espectros foi importante para a análise, sendo os valores de desvio padrão critério relevante para delimitações destas regiões. A definição dos pré-processamento de dados também se mostrou relevante para a formação dos agrupamentos.

REFERÊNCIAS

- ADT, Isabelle et al. **FTIR spectroscopic discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* strains**. Canadian journal of microbiology, v. 56, n. 9, p. 793-801, 2010.
- ADT, Isabelle, et al. "**FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans***." Archives of microbiology 185.4 (2006): 277-285.
- AHMED, M. Khalique; AMIAMA, Frank; SEALY, Earl A. **Unique spectral features of DNA infrared bands of some microorganisms**. Spectroscopy, v. 23, n. 5-6, p. 291-297, 2009.
- ALENCAR, B. J.; BARROSO, Leônidas Conceição; ABREU, J. F. **Análise multivariada de dados no tratamento da informação espacial: uma abordagem com análise de agrupamentos**. Revista Iberoamericana de Sistemas, Cibernética e Informática, v. 10, n. 2, p. 6-12, 2013.
- ALMASOUD, Najla et al. **Discrimination of bacteria using whole organism fingerprinting: the utility of modern physicochemical techniques for bacterial typing**. Analyst, v. 146, n. 3, p. 770-788, 2021.
- ATKINS, P.; de PAULA, J. Atkins: **Físico-Química**. Volume 1. 8ª Edição. LTC, 2008.
- AYU, Suntsova et al. **Identification of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy**. Bulletin of Russian State Medical University, n. 4, 2018.
- BASTERT, J. et al. **Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)**. Mycoses, v. 42, n. 9-10, p. 525-528, 1999.
- BANYAY, Martina; SARKAR, Munna; GRÄSLUND, Astrid. **A library of IR bands of nucleic acids in solution**. Biophysical chemistry, v. 104, n. 2, p. 477-488, 2003.
- BAKER, Matthew J. et al. **Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials**. Nature protocols, v. 9, n. 8, p. 1771-1791, 2014.
- BEKER, Martin J.; RAPOPORT, Alexander I. **Conservation of yeasts by dehydration**. In: **Biotechnology Methods**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1987. p. 127-171.
- BENETTI, Carolina et al. **Determination and optimization of ATR-FTIR parameters for bone tissue analysis**. Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento. 2010.
- BERNARDI, Gisele Aparecida; COSTA, Tania Carla Moura. **Avaliação da atividade antimicrobiana do álcool 70% em superfícies contaminadas**. 2017.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W. e YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification. 3ed.** Cambridge, U.K. ; New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2000. ix, 1139 p. p

BERTERAME, Nadia Maria et al. **Protein aggregation and membrane lipid modifications under lactic acid stress in wild type and OPI1 deleted *Saccharomyces cerevisiae* strains.** Microbial Cell Factories, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2016.

BERTHOMIEU, Catherine; HIENERWADEL, Rainer. **Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy.** Photosynthesis research, v. 101, n. 2, p. 157-170, 2009.

CHALMERS, John; GRIFFITHS, Peter. **Handbook of Vibrational Spectroscopy**, 5 volumes set. Wiley, 2002.

CANEVAROLO, S. V. C. Jr. **Técnicas de Caracterização de Polímeros.** Artliber editora Ltda, 3ª reimpressão, 2017.

CARBONELLE, Etienne, et al. **"MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory."** Clinical biochemistry 44.1 (2011): 104-109.

CASAL, Hector L.; MANTSCH, Henry H. **Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes, v. 779, n. 4, p. 381-401, 1984.

CHEN, Yanyan et al. **Applications of micro-fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the geological sciences—a review.** International journal of molecular sciences, v. 16, n. 12, p. 30223-30250, 2015.

CLARO, Paulo Ribeiro. **Espectroscopia Vibracional.** Revista de Ciência Elementar, v. 6, n. 2, 2018.

CORREIA, Paulo RM; FERREIRA, Márcia. **Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos.** Química Nova, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.

COSTA, Fernanda SL et al. **Attenuated total reflection Fourier transform-infrared (ATR-FTIR) spectroscopy as a new technology for discrimination between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*.** Analytical Methods, v. 8, n. 39, p. 7107-7115, 2016.

DE ABREU, JÉSSICA ALINE SOARES; ROVIDA, AMANDA FLÁVIA DA SILVA; PAMPHILE, JOÃO ALENCAR. **Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas.** Revista UNINGÁ Review, v. 21, n. 1, 2015.

DE OLIVEIRA, Ariela Dutra Norberto et al. **Análise da ação antibacteriana de desinfetantes de uso doméstico e desafios no uso correto: uma revisão.** REMAS-Revista Educação, Meio Ambiente e Saúde, v. 6, n. 1, p. 22-31, 2016.

DE ROSSI, Andrea et al. **Chromium (VI) biosorption by Saccharomyces cerevisiae subjected to chemical and thermal treatments**. Environmental Science and Pollution Research, v. 25, n. 19, p. 19179-19186, 2018.

DEMŠAR, Janez; LEBAN, Gregor; ZUPAN, Blaž. **FreeViz—An intelligent multivariate visualization approach to explorative analysis of biomedical data**. Journal of biomedical informatics, v. 40, n. 6, p. 661-671, 2007.

DIEM, Max. **Modern vibrational spectroscopy and micro-spectroscopy: theory, instrumentation and biomedical applications**. John Wiley & Sons, 2015.

DONI, Marcelo Viana. **Análise de cluster: métodos hierárquicos e de particionamento**. São Paulo: Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2004.

ERUKHIMOYITCH, Vitaly, et al. **"FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections."** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 37.5 (2005): 1105-1108.

EVERITT, Brian S. **Statistical methods for medical investigations**. London: Edward Arnold, 1994.

FOGOLARI, Odinei; REIS, Crisleine Zottis dos; PHILIPPI, Luiz Sérgio. **Determinação de parâmetros cinéticos da inativação térmica de Escherichia coli em lodo de esgoto**. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 17, p. 255-262, 2012.

FORATO, Lucimara Aparecida et al. A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. **Embrapa Instrumentação-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

GRANATO, Daniel et al. **Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective**. Trends in Food Science & Technology, v. 72, p. 83-90, 2018.

GUO, Wei et al. **Determining the resistance of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae to common disinfectants and elucidating the underlying resistance mechanisms**. Pathogens and global health, v. 109, n. 4, p. 184-192, 2015.

HAACK, Micheli de Souza. **Análise de materiais por espectroscopia no infravermelho dentro do sistema de gestão de qualidade conforme ABNT NBR ISO/IEC 17025**. 2010.

HONGYU, Kuang; SANDANIELO, Vera Lúcia Martins; DE OLIVEIRA JUNIOR, Gilmar Jorge. **Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação**. E&S Engineering and science, v. 5, n. 1, p. 83-90, 2016.

Kaškonienė, V., Ruočkusienė, G., Kaškonas, P., Akuneca, I., & Maruška, A. (2014). **Chemometric analysis of bee pollen based on volatile and phenolic compound compositions and antioxidant properties.** *Food Analytical Methods*, 8(5), 1150-1163.

KOTHE, Caroline Isabel. **Condições higiênic-sanitárias de ambulantes que comercializam cachorro-quente na cidade de Porto Alegre, RS e inativação térmica de Staphylococcus coagulase positiva e Escherichia coli.** 2014.

KOGA, Shozo; ECHIGO, Akira; NUNOMURA, Kazuko. Physical properties of cell water in partially dried *Saccharomyces cerevisiae*. *Biophysical Journal*, v. 6, n. 5, p. 665-674, 1966.

MAQUELIN, Kees et al. **Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy.** *Journal of microbiological methods*, v. 51, n. 3, p. 255-271, 2002.

MARIEY, L. et al. **Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics.** *Vibrational spectroscopy*, v. 26, n. 2, p. 151-159, 2001.

MOLON, Mateusz; ZEBROWSKI, Jacek. **Phylogenetic relationship and Fourier-transform infrared spectroscopy-derived lipid determinants of lifespan parameters in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast.** *FEMS Yeast Research*, v. 17, n. 4, 2017.

NAYIK, Gulzar Ahmad; NANDA, Vikas. **A chemometric approach to evaluate the phenolic compounds, antioxidant activity and mineral content of different unifloral honey types from Kashmir, India.** *LWT*, v. 74, p. 504-513, 2016.

NAUMANN, Dieter; HELM, Dieter; LABISCHINSKI, Harald. **Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy.** *Nature*, v. 351, n. 6321, p. 81-82, 1991.

NAUMANN, Dieter. **"Infrared spectroscopy in microbiology."** *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation* (2006).

ORÉFICE, R. L. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações.** Editora Guanabara, 2012.

OLIVEIRA, Luiz F. C. **Espectroscopia Molecular.** ReaserchGate, 2001.

OSMAN, Djaltou Aboubaker; GARNOTEL, Eric; DRANCOURT, Michel. **Dry-heat inactivation of "Mycobacterium canettii".** *BMC research notes*, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2017.

PUZEY, K. A. et al. **Automated species and strain identification of bacteria in complex matrices using FTIR spectroscopy.** In: **Chemical, biological, radiological, nuclear, and explosives (CBRNE) sensing IX.** International Society for Optics and Photonics, 2008. p. 695412.

PENNA, P. M. M. et al. **Biossegurança: uma revisão. Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 555-565, 2020.

VARELLA, CARLOS ALBERTO ALVES. **Análise multivariada aplicada as ciências agrárias: análise de componentes principais**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro–UFRRJ. Seropédica–RJ, 2008.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2ª Edição. Editora Unesp, 2011.

Savitzky A, Golay MJE (1964) **Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures**. Anal Chem 36:1627–1639.

SCHMALRECK, Arno F. et al. **Differenzierung und Charakterisierung von humanpathogenen Hefen (Candida albicans, Exophiala dermatitidis) und tierpathogenen Algen (Prototheca spp.) mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) im Vergleich zu konventionellen Methoden: Differentiation and characterization of Candida albicans, Exophiala dermatitidis and Prototheca spp. by Fourier-transform infrared Spectroscopy (FT-IR) in comparison with conventional methods**. Mycoses, v. 41, p. 71-77, 1998.

WARD, J. & "Hierarchical grouping to optimize an objective function." & "J. of the Amer. Stat. Assn, v. 58, p. 236-244, 1963.

WENNING, Mareike; SCHERER, Siegfried. **Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method**. Applied microbiology and biotechnology, v. 97, n. 16, p. 7111-7120, 2013.

YANG, Huayan et al. **Bacterial Typing and Identification Based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy**. 2020.

YANG, Li Jun, et al. "Rapid differentiation and identification of Shigella sonnei and Escherichia coli O157: H7 by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate statistical analysis." Advanced Materials Research. Vol. 926. Trans Tech Publications Ltd, 2014.

YOSHIMURA, E. M. **Física das Radiações: interação da radiação com a matéria**. Revista Brasileira de Física Médica. 2009; 3(1):57-67.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. S.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. 4ª Edição. **Introdução à Espectroscopia**. CENAGE, 2010.

PAVIA, Donald L. et al. **Introduction to spectroscopy**. Fifth edition. Cengage learning, 2014.

PUZEY, K. A. et al. **Automated species and strain identification of bacteria in complex matrices using FTIR spectroscopy**. In: **Chemical, biological, radiological, nuclear, and explosives (CBRNE) sensing IX**. International Society for Optics and Photonics, 2008. p. 695412.

RANDALL HM, Smith DW, Colm AC, Nungester WJ (1951) **Correlation of biologic properties of strains of Mycobacterium with infrared spectrum**. Am Rev Tuberc 63:372–380.

RICHMOND, Jonathan Y.; MCKINNEY, Robert W. **Biosafety in microbiological and biomedical laboratories**. US Government Printing Office, 2009.

RODRIGUES, F. G. F.; BRIZOLA, A. **Radiação de baixa frequência e possível influência nociva a sistemas biológicos**. Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 41, 2019.

SANTOS, Patrícia Marcondes dos et al. **Using FT-IR microspectroscopy for testing statistical algorithms for differentiation of *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida parapsilosis***. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v. 28, n. 4, p. 398-409, 2012.

SOUSA, Rafael Arromba de et al. **Classificação de água de coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICP OES**. Química Nova, v. 29, p. 654-656, 2006.

SILVERSTEIN, Robert M.; BASSLER, G. Clayton. **Spectrometric identification of organic compounds**. 1963.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X; KIEMLE, David J. **Spectrometric identification of organic compounds**. Seventh edition. New York, John Wiley & Sons: 2005.

SAKANE, Kumiko Koibuchi; MATSUURA, Eiji Nitta; SIMIONI, Andreza Ribeiro. **ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COMO FERRAMENTA PARA DIFERENCIAÇÃO DE CHÁ VERDE DE AGRICULTURA ORGÂNICA E CONVENCIONAL**. Revista Tecnologia e Tendências, v. 10, n. 2, p. 59-74, 2019.

SIEBERT, F. & HILDEBRANDT, P. **Vibrational Spectroscopy in Life Science**. Editora Wiley-VCH, 2008.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

THOMPSON, James M. **Infrared spectroscopy**. CRC Press, 2018.

WANG, Ya-Di et al. **Discrimination of foodborne pathogenic bacteria using synchrotron FTIR microspectroscopy**. Nuclear Science and Techniques, v. 28, n. 4, p. 1-6, 2017.

WILSON, E. B., DECIUS, J. C., CROSS, P. C., 1955, “**Molecular Vibrations: The Theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra**”, McGraw-Hill, New York.

ZAIANE, Osmar R. et al. **On data clustering analysis: scalability, constraints and validation**. Edmonton Alberta, University of Alberta, 2003.

APÊNDICE A – APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO NA DETERMINAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FILMES DE *ANTHURIUM AFFINE*

Para testar a capacidade de agrupamento de tratamentos semelhantes em matrizes complexas foram realizados testes computacionais com dados provenientes do Laboratório de Biomateriais Naturais DEBM.

Realizou-se leituras espectroscópicas no infravermelho com filmes contendo zero, 25, 50 e 100 mg de extrato de *A affine*.mL⁻¹, cada qual apresentando três repetições e um gráfico com os desvios padrões médios foi gerado (Ilustração 1). O pré-tratamento espectral foi idêntico ao desenvolvido nesta dissertação (Ilustração 2), o qual foi necessário para a construção das análises multivariadas por PCA, HCA (Ilustração 3) e Freeviz (Ilustração 4). A utilização do método descrito nesta dissertação permitiu identificar dois agrupamentos (Ilustração 4), o primeiro referente as amostras de baixa concentração e o segundo as amostras de alta concentração. Observou-se que as identificações das regiões anômalas por meio de desvio-padrão foram essenciais para obtenção destes dados.

Ilustração 1 Região excluída devido ao seu desvio padrão (preta) acima de 10 em amostras de filmes contendo zero, 25, 50 e 100 mg de extrato de *A affine*/mL.

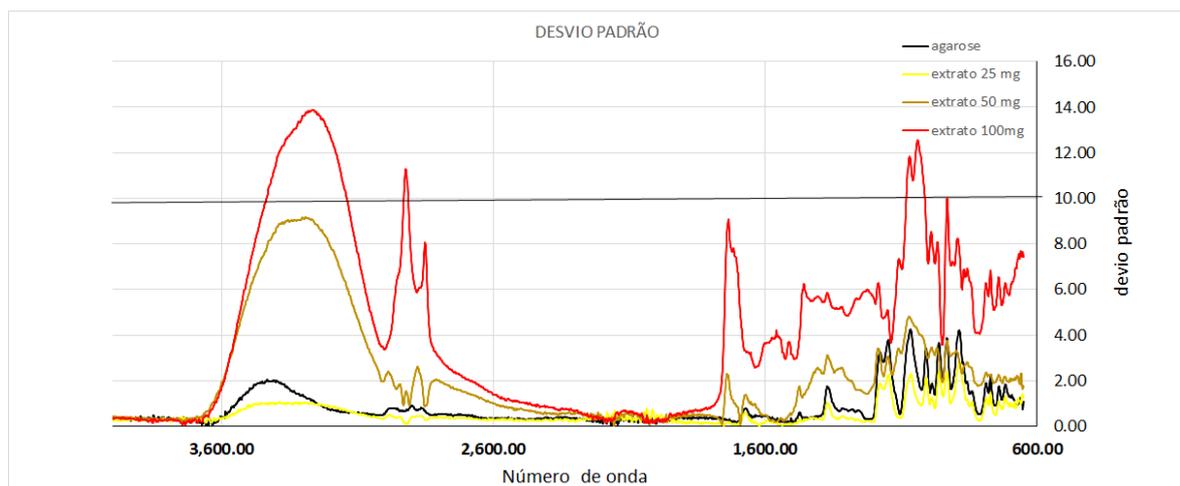


Ilustração 2 Pré-processamento espectral evidenciando as etapas do cut-off da região 10 do desvio padrão de filmes contendo zero, 25, 50 e 100 mg de extrato de *A. affine*/mL. A) Dados espectrais inseridos no pré-processamento B) Regiões excluídas a partir da avaliação dos valores identificados no desvio-padrão.

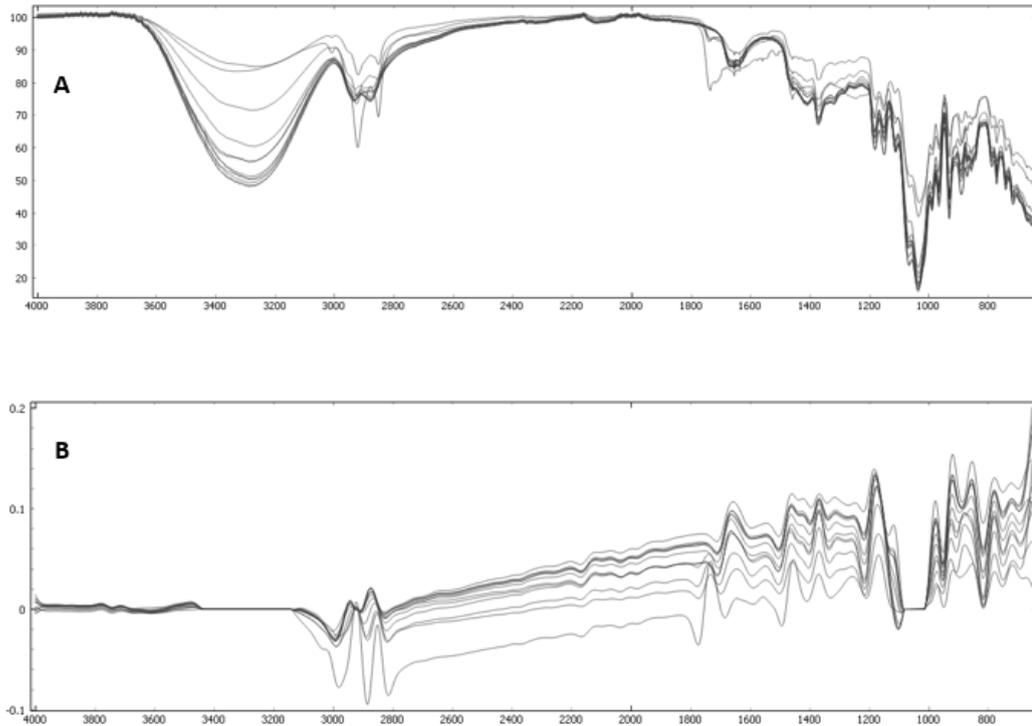


Ilustração 3 Scatter plot obtido a partir dos escores das componentes PC1 (0,808) e PC2 (0,150) gerados pela PCA.

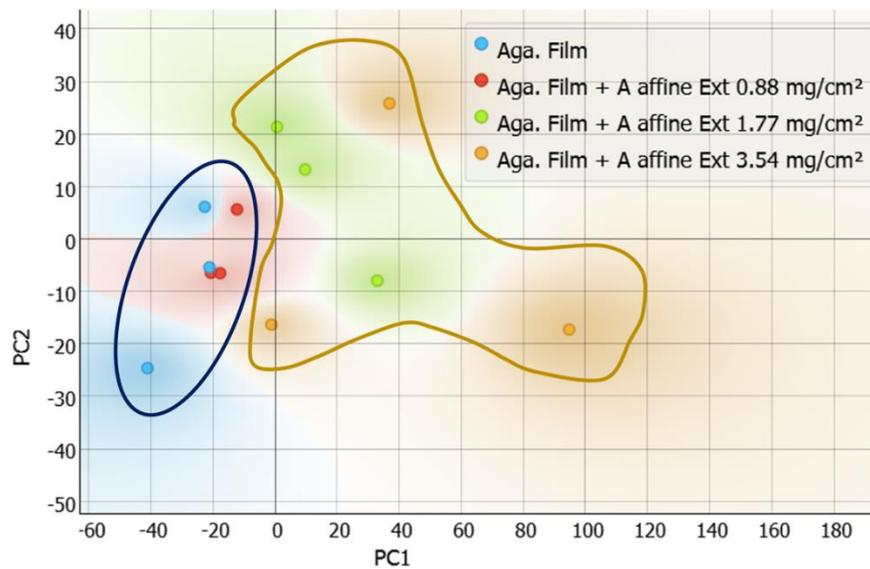


Ilustração 4 Dendrograma obtido a partir da HCA utilizando como ponte do corte a região acima de 10 identificada através do desvio-padrão. de filmes contendo zero, 25, 50 e 100 mg de extrato de *A. affine*/mL.

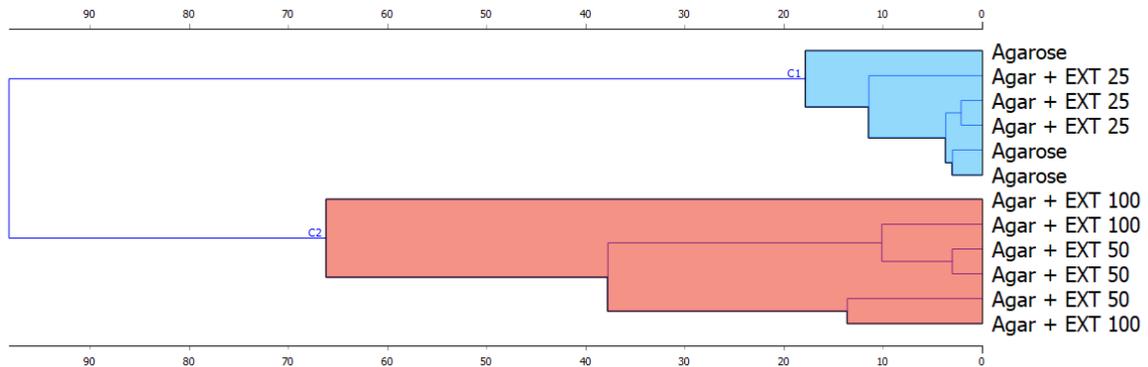
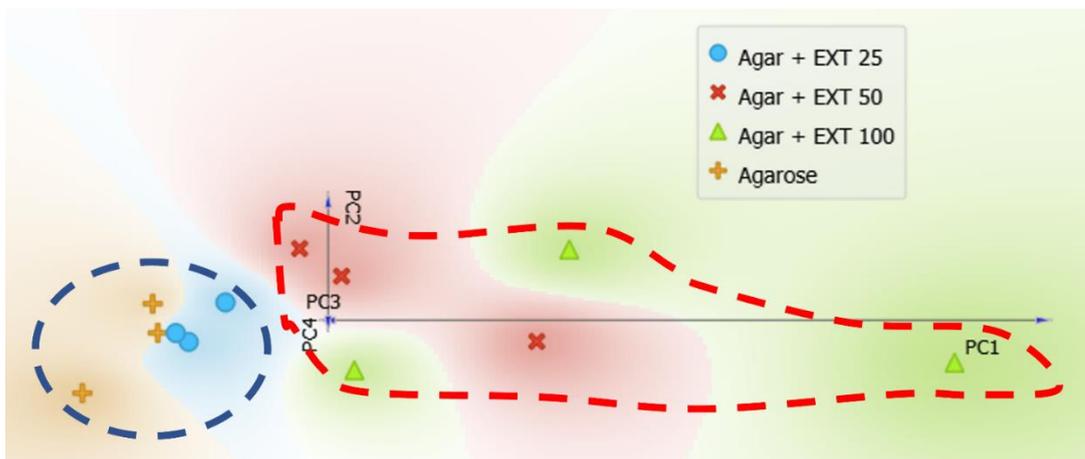


Ilustração 5 Gráfico gerado a partir do aplicativo Freeviz; os eixos dos componentes principais foram dispostos ortogonalmente e as dimensões dos eixos foram proporcionais a contribuição de cada componente (PC1 0,808) (PC2 0,150) (PC3 0,023) (PC4 0,013)



Para testar a influência da análise do desvio padrão na formação dos clusters, outros dois pontos de exclusão de acordo com o gráfico médio de desvio padrão foram investigados. O primeiro ponto de exclusão foi a região espectral com valores acima de 7,5 de desvio padrão (Ilustração 6), no qual foi obtido um dendrograma com formação de agrupamentos arbitrários sem a separação dos grupos que apresentaram concentrações similares. O segundo ponto de exclusão foi a região espectral com valores superior a 5 de desvio padrão, novamente ao realizar a HCA, obteve-se um dendrograma onde as clusters observados não compartilhavam semelhanças em relação a sua concentração. E por fim, também foi realizada a HCA nos dados espectrais sem retirada de regiões anômalas indicadas pelos gráficos do desvio padrão. Neste último, também não houve a formação de clusters de acordo

com o que foi esperado.

Uma vez que foi possível construir grupos entre amostras de baixa concentração e alta concentração de filmes contendo extrato de *A affine*/mL, estes resultados sugerem que possivelmente as regiões com ponto de corte acima de 10 em relação ao desvio padrão, conferem os melhores resultados para a construção de clusters quando comparados aos pontos de corte acima de 7,5, 5 e nenhum ponto de corte. Sendo assim, identifica-se o possível potencial do método desenvolvido nesta dissertação para o controle de qualidade em substitutos de peles temporários, ainda que o modelo inicialmente tenha sido elaborado para leveduras.

Ilustração 6 Região excluída com desvio padrão (preta) acima de 7,5 referente aos filmes contendo zero, 25, 50 e 100 mg de extrato de A affine/mL.

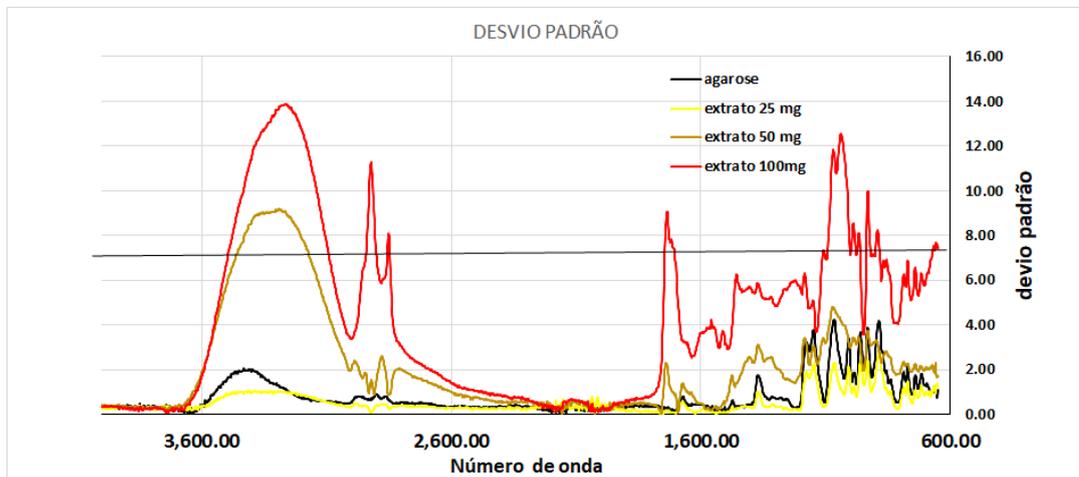


Ilustração 7 Região excluída com desvio padrão (preta) acima de 5 referente aos filmes contendo zero, 25, 50 e 100 mg de extrato de A affine/mL.

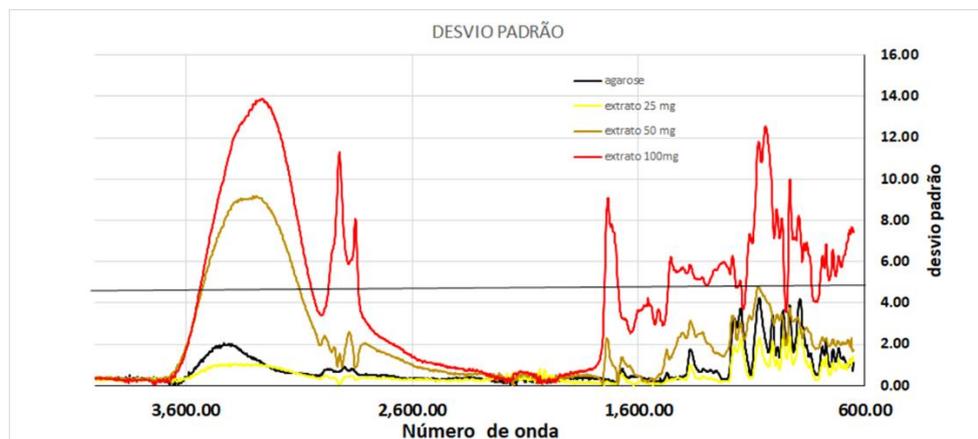


Ilustração 8 Dendograma obtido a partir da HCA utilizando como ponte do corte a região acima de 7,5 identificada através do desvio-padrão de filmes contendo zero, 25, 50 e 100 mg de extrato de *A. affine*/mL.

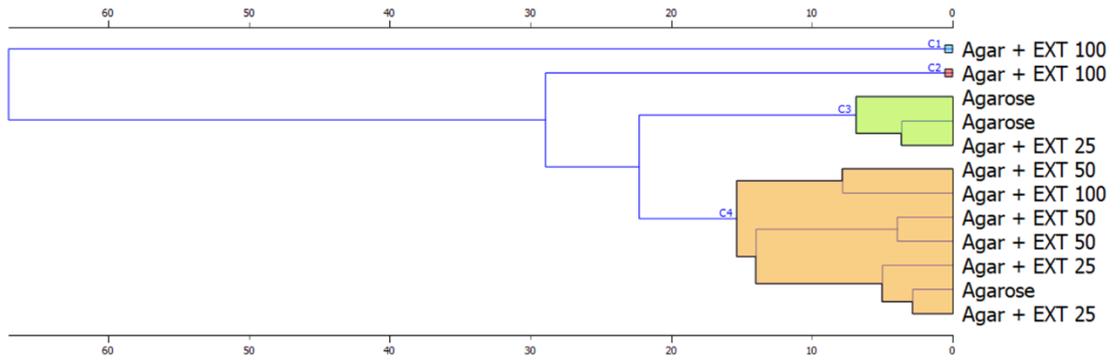


Ilustração 9 Dendrograma obtido a partir da HCA utilizando como ponte do corte a região acima de 5 identificada através do desvio-padrão de filmes contendo zero, 25, 50 e 100 mg de extrato de *A. affine*/mL.

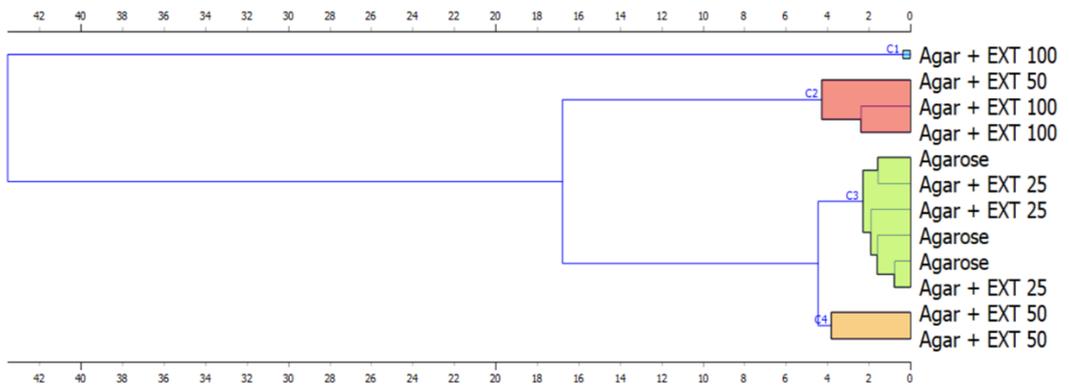


Ilustração 10 Dendrograma obtido a partir da HCA sem a exclusão de nenhuma região espectral de filmes contendo zero, 25, 50 e 100 mg de extrato de *A. affine*/mL.

