

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS**

**Raquel Perobelli de Oliveira**

**IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE LEITE DE VACAS  
COM MASTITE POR MEIO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

Juiz de Fora  
2023

**Raquel Perobelli de Oliveira**

**IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE LEITE DE VACAS  
COM MASTITE POR MEIO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Carla Christine Lange

Juiz de Fora  
2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Raquel Perobelli de.

Identificação de leveduras isoladas de leite de vacas com mastite por meio de técnicas espectroscópicas / Raquel Perobelli de Oliveira. -- 2023.

92 f. : il.

Orientador: Virgílio de Carvalho dos Anjos

Coorientadora: Carla Christine Lange

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2023.

1. Espectroscopia Raman. 2. Espectroscopia no Infravermelho - FTIR- ATR. 3. Espectrometria de massa MALDI-TOF. 4. Leveduras. 5. Mastite bovina. I. Anjos, Virgílio de Carvalho dos, orient. II. Lange Carla Christine, coorient. III. Título.

**Raquel Perobelli de Oliveira**

**Identificação de leveduras isoladas de leite de vacas com mastite por meio de técnicas espectroscópicas**

Dissertação  
apresentada ao  
Programa de Pós-  
graduação em  
Ciência e Tecnologia  
do Leite e Derivados  
da Universidade  
Federal de Juiz de  
Fora como requisito  
parcial à obtenção do  
título de Mestre  
em Ciência e  
Tecnologia do Leite e  
Derivados. Área de  
concentração: Ciência  
e Tecnologia do Leite  
e Derivados.

Aprovada em 09 de outubro de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos** - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Carla Christine Lange** - Coorientadora  
Embrapa Gado de Leite

**Profa. Dra. Maria José Valenzuela Bell**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Sandra Maria Pinto**

Juiz de Fora, 05/10/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Virgilio de Carvalho dos Anjos, Professor(a)**, em 21/11/2023, às 09:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Christine Lange, Usuário Externo**, em 21/11/2023, às 10:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Maria Pinto, Usuário Externo**, em 21/11/2023, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Valenzuela Bell, Professor(a)**, em 29/12/2023, às 10:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1512821** e o código CRC **2D2DC560**.

Dedico este trabalho  
aos meus pais Ildeu e Vanda (*in memoriam*)  
e ao meu irmão Roberto por todo o incentivo, amizade e confiança!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida, pela saúde perfeita, por me capacitar a cada dia e por me permitir a oportunidade de estar aqui, hoje, realizando esse sonho tão almejado, que é a conclusão do mestrado. É uma grande realização!

A minha eterna gratidão aos meus pais Ildeu e Vanda (*in memoriam*) que trabalharam e enfrentaram os desafios cotidianos com dignidade. Jamais esquecerei os seus olhares cheios de orgulho quando me graduei em Química, aqui nesta Universidade!

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados – PPGCTLD/UFJF pela oportunidade; ao meu orientador, Professor Virgílio, por todas as oportunidades de aprendizado, pelas orientações, paciência e também à minha coorientadora, Professora Carla, por toda a atenção, disponibilidade, orientações, ensinamentos, enfim, obrigada à todos por tanto aprendizado!

Agradeço à Embrapa - Gado de Leite, especialmente à equipe de profissionais que trabalham no Laboratório de Microbiologia do Leite e ajudaram no preparo de amostras para as análises realizadas neste trabalho. Deixo aqui o meu muito obrigada!

Agradeço à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Márcia Giambiagi de Marval e à toda a sua equipe pela parceria no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica na Universidade Federal do Rio de Janeiro (LIMM/UFRJ) para a realização das análises de identificação das amostras por MALDI-TOF MS. Muito obrigada!

Agradeço à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Marcolino Lima Cardoso pelas aulas de estatística, por toda a paciência e orientações na condução das minhas análises. Muito obrigada!

Agradeço à Prof<sup>ª</sup> Ana Paula Figueira Monti e amiga por todos os ensinamentos da língua inglesa, pela sua disponibilidade, pelo apoio e aconselhamentos nos momentos mais difíceis, por todas as formas de incentivo. Muito obrigada por tudo! Thank you, teacher!

À todos os professores e colegas do Laboratório de Espectroscopia de Materiais (LEM) do Grupo de Espectroscopia e Engenharia de Materiais (GE2M) do Departamento de Física da UFJF, expresso aqui toda a minha gratidão, estima e reconhecimento por esse tempo bom e produtivo de convivência e aprendizado! Particularmente, à amiga Dr<sup>ª</sup> Ilza Tenório Cavalcante, agradeço toda a ajuda na construção dos espectros e também na realização das minhas análises. Muito obrigada!

À todos os familiares, amigas e amigos, obrigada pelo apoio, incentivo, orações e torcida para que tudo isso fosse possível! Deixo aqui expressa toda a minha gratidão!

“La ciencia es el alma  
de la prosperidad  
de las naciones  
y la fuente de vida de todo progreso”.  
(Loius Pasteur)



## RESUMO

Uma identificação rápida e acurada de microrganismos presentes no leite é desafiadora para laboratórios de diagnóstico e de pesquisa. As técnicas espectroscópicas se destacam como uma alternativa inovadora para a identificação de microrganismos, pois utilizam uma quantidade muito pequena de biomassa e pouco ou nenhum reagente, o que reduz bastante o tempo de identificação microbiológica. O objetivo deste trabalho foi utilizar três técnicas espectroscópicas, a espectrometria de massa MALDI-TOF, a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR) e a espectroscopia Raman para a identificação de leveduras isoladas de leite de vacas com mastite. O experimento foi realizado com onze leveduras isoladas de amostras de leite obtidas de quartos mamários de vacas leiteiras. Os microrganismos foram, previamente, isolados em Ágar Infusão de Cérebro e Coração – BHI e incubados por 24 h a 35 °C. As análises por MALDI-TOF MS foram feitas no equipamento LT Microflex (Bruker Daltonics), em duplicata. As análises de FTIR-ATR foram realizadas, em triplicata, no equipamento VERTEX-70 FT-MIR (Bruker). Os espectros obtidos foram convertidos em arquivos de texto utilizando os *softwares* OPUS 6.5.97 e Origin Pro 8. As medidas Raman foram obtidas no equipamento Raman (WITEC alpha 300 AR). Por meio de MALDI-TOF MS as leveduras foram identificadas nos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Diutina*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*. Através dos espectros FTIR-ATR foi possível comparar os picos das amostras, a fim de caracterizá-las de acordo com os seus grupos químicos funcionais constituintes. A Análise de Componentes Principais (PCA) permitiu distinguir as semelhanças e diferenças entre as leveduras pela observação dos agrupamentos. Por meio da espectroscopia Raman foram obtidas imagens e espectros individuais de cada amostra, sendo possível relacionar as bandas típicas nestes espectros com os grupos químicos funcionais celulares, complementando a análise por FTIR – ATR. A PCA dos espectros por FTIR-ATR e por espectroscopia Raman, realizada através do *software* PAST versão 4.13, evidenciou que as leveduras se agruparam por semelhanças dos constituintes celulares e também por semelhanças de espécies. Este trabalho mostra como conclusão formas alternativas, eficientes e precisas para caracterizar e diferenciar espécies de leveduras tanto pela técnica de espectrometria de massa, quanto pelos métodos de espectroscopia óptica.

**Palavras-chave:** Leveduras. Mastite bovina. Espectroscopia

## ABSTRACT

The rapid and accurate identification of microorganisms present in milk poses a challenge for diagnostic and research laboratories. Spectroscopic techniques represent an innovative alternative for identifying microorganisms because they use a minimal amount of biomass and little or no reagents, reducing the time for microbiological identification. The aim of this work was to use three spectroscopic techniques, MALDI-TOF mass spectrometry, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR) and Raman spectroscopy to identify yeasts isolated from the milk of cows with mastitis. The experiment consisted in isolating eleven yeasts from milk samples taken from the milk quarters of dairy cows. The microorganisms were previously isolated on Brain and Heart Infusion Agar–BHI and incubated at 35°C for 24 hours. Analyses were performed on the LT Microflex instrument (Bruker Daltonics) in duplicate. FTIR-ATR analyses were performed in triplicate on the VERTEX-70 FT-MIR instrument (Bruker). The spectra obtained were converted to text files using OPUS 6.5.97 software and Origin Pro 8. Raman measurements were performed with the Raman device (WITEC alpha 300 AR). Through MALDI-TOF MS using Flexcontrol 3.3 Software the yeasts were identified in the genera *Candida*, *Pichia*, *Diutina*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces* and *Saccharomyces*. Using the FTIR-ATR spectra, the peaks of the samples could be compared to characterize them according to their functional chemical groups. Principal component analysis (PCA) allowed to identify the similarities and differences between the yeasts by looking at the groupings. Raman spectroscopy was used to obtain single images and spectra of each sample, allowing the typical bands in these spectra to be assigned to cellular functional chemical groups, complementing analysis by FTIR – ATR. PCA of the spectra from FTIR-ATR and Raman spectroscopy performed with the software PAST, version 4.13 showed the grouping of yeasts by similarities in cellular constituents and also by similarities in species. In summary, this work demonstrates alternative, efficient, and accurate ways to characterize and differentiate yeasts species using mass spectrometry technique as well as optical spectroscopy methods.

**Keywords:** Yeasts. Bovine mastitis. Spectroscopy.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
3.1	MICROORGANISMOS EM LEITE E DERIVADOS.....	15
<b>3.1.1</b>	<b>Leveduras.....</b>	<b>17</b>
3.2	TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS USADAS NA IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS .....	20
<b>3.2.1</b>	<b>Espectrometria de massa MALDI-TOF.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Espectroscopia Raman.....</b>	<b>33</b>
3.3	QUIMIOMETRIA.....	37
<b>3.3.1</b>	<b>Análise de Componentes Principais (PCA).....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO INICIAL DAS LEVEDURAS.....	38
4.2	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS POR MALDI-TOF MS.....	39
4.3	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO - FTIR-ATR.....	40
<b>4.3.1</b>	<b>Análise dos espectros obtidos por FTIR- ATR.....</b>	<b>41</b>
4.4	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	42
<b>4.4.1</b>	<b>Análise dos espectros obtidos pela espectroscopia Raman.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS POR MALDI-TOF MS.....	43
5.2	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS PELA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO - FTIR-ATR.....	50
<b>5.2.1</b>	<b>Análise de Componentes Principais dos dados obtidos por FTIR-ATR.....</b>	<b>62</b>
5.3	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS PELA ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	68

<b>5.3.1</b>	<b>Análise de Componentes Principais dos dados obtidos por</b>	
	<b>Espectroscopia Raman.....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Uma identificação rápida e acurada de microrganismos é um desafio tanto para laboratórios de diagnóstico, quanto para a indústria de alimentos. A identificação rotineira de patógenos e microrganismos deterioradores é baseada na avaliação morfológica do microrganismo, no seu crescimento em diferentes meios de cultivo e nas características bioquímicas do mesmo, que são procedimentos trabalhosos e demorados. No caso das leveduras, a metodologia convencional para a identificação das mesmas pode apresentar erros, pois várias espécies apresentam similaridades morfológicas nos testes bioquímicos e fisiológicos. As técnicas de biologia molecular são mais sensíveis e específicas, sendo muitas vezes utilizadas como padrão ouro na identificação de microrganismos, porém são mais difíceis de serem adaptadas em laboratórios de diagnóstico, tendo em vista o alto custo dos reagentes e equipamentos, além da necessidade de pessoal altamente qualificado.

As técnicas espectroscópicas, tais como a espectrometria de massa, espectroscopia no infravermelho e espectroscopia Raman, têm sido aplicadas na identificação de microrganismos, oferecendo uma alternativa rápida, prática e acurada na caracterização dos mesmos e, conseqüentemente, no diagnóstico de doenças e no controle de contaminações. As técnicas se baseiam na aquisição de espectros dos constituintes microbianos e a sua variabilidade é o que permite a diferenciação entre os microrganismos.

A espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry* - Ionização por dessorção a laser assistida por matriz seguida por analisador tipo tempo de voo) é a técnica mais difundida e utilizada, em virtude da disponibilidade de equipamentos comerciais específicos para a identificação de microrganismos. Um software de identificação acoplado a este equipamento permite a identificação rápida e precisa dos mesmos, desde que dados espectrais de microrganismos da mesma espécie façam parte do banco de dados do equipamento.

No caso da espectroscopia no infravermelho e espectroscopia Raman, os equipamentos podem ser utilizados para a identificação microbiana e de estruturas químicas e moleculares diversas. Estes equipamentos, entretanto, não possuem software de identificação microbiana. Neste caso, os espectros obtidos devem ser analisados por meio de comparações com outros espectros, bem como pela identificação e comparação de grupos funcionais característicos e análises quimiométricas. Análises quimiométricas, como por exemplo a Análise de Componentes Principais (PCA), são utilizadas para auxiliar na comparação entre os espectros.

Este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar as leveduras isoladas de leite bovino utilizando formas não convencionais, como as três técnicas espectroscópicas citadas e fazer a correlação dos resultados obtidos com dados encontrados na literatura científica.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi identificar, em nível de espécie, leveduras isoladas de leite de vacas com mastite utilizando três técnicas espectroscópicas: a espectrometria de massa MALDI- TOF, a espectroscopia no infravermelho e a espectroscopia Raman.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos específicos deste estudo:

- ✓ Identificar as amostras selecionadas para esta pesquisa por MALDI-TOF MS.
  
- ✓ Identificar e caracterizar as amostras selecionadas para esta pesquisa pela espectroscopia no infravermelho médio.
  
- ✓ Identificar e caracterizar as amostras selecionadas para esta pesquisa pela espectroscopia Raman.
  
- ✓ Avaliar os espectros obtidos pelas diferentes técnicas e analisá-los pelo método quimiométrico PCA (Principal Component Analysis).
  
- ✓ Constituir uma biblioteca de espectros gerados pelas diferentes técnicas a partir das leveduras analisadas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura tem por finalidade trazer informações acerca da presença de microrganismos no leite e derivados, com foco em leveduras patogênicas e também explicitar os métodos espectroscópicos utilizados na identificação e caracterização desses microrganismos.

#### 3.1 MICRORGANISMOS EM LEITE E DERIVADOS

Toda a cadeia produtiva do leite sofre a influência dos microrganismos presentes em sua constituição e estes têm participação fundamental, seja nos processos desejáveis ou inconvenientes de sua produção e manipulação. O leite apresenta-se com elevada atividade de água ( $a_w$  próximo de 1,0), ( $pH \sim 6,8$ ) próximo à neutralidade, potencial de oxidação-redução positivo ( $E^\circ +$ ) e portanto, aeróbico, além de uma grande variedade de nutrientes descritos como proteínas, carboidratos, lipídios, além de vitaminas e sais. Assim, o leite pode abrigar praticamente todos os microrganismos aeróbios conhecidos, sobretudo os mesófilos e psicrotróficos (BELOTI, 2015).

Além dos microrganismos que contaminam o leite durante os procedimentos pós-ordenha como armazenamento, transporte e manipulação na indústria, os microrganismos responsáveis por mastites ou outras doenças do animal também podem estar presentes no leite ordenhado (WEIMER, 2001). A contaminação microbiana do leite cru ocorre a partir do úbere e canal do teto, continuando a partir do ambiente, dos utensílios e equipamentos de ordenha (HAYES; BOOR, 2001). Microrganismos ambientais causam a deterioração do leite, normalmente, devido às más condições de higiene da produção, coleta e processo de transporte do leite para a fábrica. Através do teste físico-químico para aferir a acidez do leite (acidez Dornic), verifica-se que de  $14^\circ D$  a  $18^\circ D$  o leite está dentro dos padrões de consumo, pela legislação. Entretanto, valores de acidez acima de  $18^\circ D$  está relacionado com o fato de o leite ter ficado exposto à temperaturas favoráveis ao crescimento de microrganismos, nas condições de produção e armazenamento. Sendo assim, muitos inconvenientes nas fábricas de laticínios são gerados em função da acidez do leite elevada, tais como os queijos produzidos com leite ácido (legalmente, o parmesão), que podem apresentar defeitos como trincas e rachaduras. E além disso, o leite ácido cru pode contaminar com coliformes a sala de fabricação de queijos com leite pasteurizado, pois a sua manipulação, muitas vezes ocorre no mesmo local. E ainda existem laticínios que nem recebem o leite ácido por não apresentar-se em condições de ser

pasteurizado. A refrigeração na linha de produção do produto pode diminuir, gradualmente, o volume de leite ácido nas fábricas de laticínios (FURTADO, 2017).

Dentre os principais microrganismos patogênicos do leite estão as bactérias. Contudo, apesar de os vírus (bacteriófagos), fungos (bolores) e leveduras serem isolados com menos frequência, eles não deixam de ser importantes nas pesquisas relacionadas à mastite bovina. Em 1976, foi relatado o primeiro caso de mastite fúngica no Brasil causado por levedura e em mais de 95% desses casos de mastite ficou evidente que foram causadas por leveduras do gênero *Candida*, particularmente *Candida albicans*, seguido dos gêneros *Trichosporon* e *Cryptococcus*. A evolução de casos de mastite por leveduras pode levar o animal a óbito, principalmente, em casos de associação do gênero *Candida* com fungos filamentosos, como *Aspergillus* (BARONI *et al.*, 2016).

Muito embora o Brasil figure entre os cinco maiores países produtores de leite do mundo, com produção anual estimada em 35 bilhões de litros de leite, é necessário salientar que muitos avanços ainda se fazem necessários no que diz respeito à produtividade animal e agrícola, apesar de ser grande a diversidade dos sistemas de produção da pecuária leiteira (LEITE; STOCK, 2023). Dessa forma, os problemas relacionados com a produtividade e qualidade do leite cru são preocupantes, principalmente, quando o leite ainda se encontra na propriedade, após a ordenha. Promover a sua refrigeração inibe o crescimento de microrganismos aeróbios mesófilos no leite, responsáveis pela sua acidificação. Entretanto, a refrigeração não impede o crescimento dos microrganismos psicrotóxicos que produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas, contribuindo para diminuir a qualidade do produto final em seus aspectos sensoriais e de durabilidade. Sem esquecer dos microrganismos termotóxicos, que produzem enzimas deteriorantes e determinantes para diminuir a vida útil do leite pasteurizado (MARIOTO *et al.*, 2020).

O comportamento metabólico de cada microrganismo presente no leite está relacionado com a ingestão de substratos ali presentes e com a excreção de substâncias resultantes desta degradação. A densidade populacional microbiana tem estreita relação com as inúmeras transformações químicas pelas quais o leite passa, podendo ser observadas na sua composição, posteriormente. Com relação à nutrição dos microrganismos, esta ocorre através do processo conhecido por oxidação-redução. Aqueles microrganismos que utilizam o oxigênio atmosférico como aceptor e receptor de elétrons são denominados aeróbios, enquanto que são anaeróbios aqueles que fazem uso de outras substâncias. Um potencial de oxidação-redução positivo favorece o crescimento de microrganismos aeróbios, já os potenciais de oxidação-redução negativos são ideais para o crescimento dos anaeróbios estritos. Para o leite, esses potenciais em volts,



variam de + 0,20 V a + 0,30 V, sendo portanto, positivos (BELOTI, 2015).

Assim, dentro da perspectiva da segurança do alimento, o processo de pasteurização é de suma importância e eficácia para eliminação de microrganismos patogênicos do leite. Dessa forma, o alimento permanece inócuo, alterando, minimamente, a qualidade nutricional, química e sensorial do produto, garantindo a sua qualidade microbiológica e dos seus derivados (LIMA *et al.*, 2021).

### 3.1.1 Leveduras

As leveduras fazem parte do Reino Fungi e se diferenciam dos fungos por serem unicelulares, não filamentosas, normalmente esféricas ou ovais. Elas são da classe dos ascomicetos, pertencente ao filo *Ascomycota*, e sua principal característica é a produção de esporos a partir de esporângios denominados ascos (SANTOS, 2018).

As leveduras são quimioheterotróficas, de modo que os compostos orgânicos são suas fontes de carbono e energia. Elas crescem em aerobiose ou em anaerobiose facultativa, de modo que quando em presença de oxigênio elas metabolizam carboidratos, produzindo dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água. Porém, na ausência de oxigênio ocorre a fermentação dos carboidratos, resultando em etanol e (CO<sub>2</sub>). Esse é o processo de fermentação usado na fabricação de cervejas e vinhos e também nos processos de panificação em que a espécie *Saccharomyces cerevisiae* atua sobre os substratos (TORTORA *et al.*, 2017).

A natureza ubíqua dos fungos permite a sua participação ativa nos diversos ciclos da natureza, pois se proliferam com facilidade entre os animais, vegetais, no homem, no solo, em resíduos e são propagados pelo ar atmosférico pela ação dos ventos. Com relação à sua estrutura celular, são seres constituídos por células eucarióticas, ou seja, possuem núcleo que contém o material genético e é envolvido por membrana nuclear, além de apresentarem membrana plasmática e citoplasma com várias organelas. O polímero (1,4) de 2-acetamida-2-deoxi-beta-D-glicose corresponde à quitina e é o principal componente da parede celular fúngica. Entretanto, ela se encontra em menor quantidade nas leveduras, comparada aos bolores (proporção de 1:3). Os lipídios estão presentes como compostos apolares e polares representando de 1% a 2% do peso celular. Os bolores se caracterizam por serem constituídos por elementos multicelulares (em forma de tubo) representados por hifas septadas ou não-septadas, enquanto que as leveduras caracterizam-se por serem unicelulares, cumprindo funções vegetativas e reprodutivas (TRABULSI *et al.*, 1999).

A parede celular das leveduras é constituída de duas camadas e composta por três

macromoléculas, sendo elas: a manana, que é uma proteína, a glucana, que é um polissacarídeo de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glicose e a quitina, que é um polímero de  $\beta$ -1,4 N-acetilglicosamina (SANTOS, 2018). Outra característica importante das leveduras é com relação às suas dimensões. Leveduras típicas variam entre 5 e 8  $\mu$ m de diâmetro e têm formato ovalado, alongado, elíptico ou esférico (JAY, 2005). Suas formas predominantes são ovais ou elípticas e suas dimensões variam em torno de 4 a 8  $\mu$  em menor diâmetro e de 5 a 16  $\mu$  para o maior diâmetro (SANTOS, 2018).

As leveduras se reproduzem por brotamento, uma forma de reprodução assexuada, em que o fungo adulto solta brotos que se desenvolvem, podendo ou não se separar da célula de origem. Nos fungos em geral, há a formação de esporos tanto na reprodução assexuada, quanto na sexuada. As espécies de fungos patogênicos expressam dimorfismo. Nestes casos, eles podem crescer tanto na forma de fungos filamentosos, quanto na forma de levedura, reproduzindo-se por brotamento. Essa característica está intimamente ligada à temperatura, sendo que à temperatura de 37 °C o fungo se apresenta na forma de levedura, enquanto que a 25 °C apresenta-se na forma de bolor (TORTORA *et al.*, 2017).

É importante chamar a atenção para a função bioprotetora das leveduras, podendo ser utilizadas com função probiótica por trazerem benefícios ao hospedeiro, prevenirem e tratarem as desordens gastrintestinais (MARTINS *et al.*, 2005). Elas também podem ser utilizadas como agentes de biocontrole, sem oferecer riscos, pois elas têm a capacidade de não produzirem esporos como os fungos filamentosos, se diferenciam das bactérias por não sintetizarem antibióticos, além de utilizarem nutrientes simples, como resíduos industriais como fonte de carbono (SOUZA, 2014).

As leveduras mais comumente encontradas em alimentos pertencem aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Saccharomyces*.

As células do gênero *Candida* não apresentam pigmento carotenóide e seu nome genérico significa ‘branco brilhante’. Pertencem a este gênero *Candida famata*, *Candida kefir*, *Candida stellata* e *Candida holmii*. *Candida tropicalis* é a espécie mais encontrada em alimentos de forma geral. Os membros desse gênero constituem as leveduras presentes na carne de gado crua moída e também em frango. Algumas espécies estão envolvidas na fermentação de grãos como cacau, kefir, além de outros, como a cevada, que origina a cerveja, e no suco de frutas (JAY, 2005). A espécie patogênica *C. guilliermondii* foi identificada na água utilizada num centro brasileiro de tratamento de hemodiálise e comprovou-se a sua resistência ao fluconazol (MONTANARI *et al.*, 2018).

Leveduras do gênero *Cryptococcus* apresentam coloração branca, laranja ou vermelha,

podendo estar presentes no solo e em plantas, morangos e demais frutas, além de camarão, peixes do mar e carne de gado crua moída (JAY, 2005).

*Kluyveromyces* spp. produzem a enzima  $\beta$ -galactosidase e são potencialmente fermentadoras de açúcares, dentre eles a lactose. *K. marxianus* é uma das leveduras mais comuns nos derivados lácteos, envolvida na produção da lactase a partir do soro de queijo e escolhida para produzir biomassa a partir desse soro. Além disso, essa levedura possui a coenzima Q-6, que participa da fermentação da coalhada, sendo responsável pela deterioração de queijos e se faz presente em várias frutas (JAY, 2005). Cabe ressaltar que as leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulasporea*, *Trichosporon*, *Yarrowia* e *Zygosaccharomyces* são as mais encontradas em queijos, sendo que a espécie mais comumente isolada é a *Debaryomyces hansenii*. Pesquisas também mostraram que essa espécie pode interferir no crescimento de fungos filamentosos micotoxigênicos devido à sua ação eficaz como controle biológico, além de exercer atividade probiótica (ARAGÃO, 2018).

O gênero *Pichia* é o maior gênero de leveduras verdadeiras, pois se reproduzem assexuadamente por gemulação e apresenta-se na forma de chapéu. As leveduras deste gênero formam filmes em meios líquidos, têm envolvimento na produção de alimentos indígenas, sendo algumas encontradas em camarão, peixes frescos, crescem em salmoura de azeitona, além de serem deteriorantes de chucrute e picles (JAY, 2005). Espécies desse gênero foram usadas como controle biológico em grãos de café e cacau, apresentando significativo potencial inibidor de crescimento de espécies fúngicas e de esporos (SOUZA *et al.*, 2017).

*Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura que participa das fermentações da cerveja, do pão, do vinho e de espumantes, além de ser isolada em diversas frutas, em grãos de kefir, em salames curados, porém raramente causam deterioração (JAY, 2005). Agustini *et al.* (2018) utilizaram a espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de leveduras presentes nas uvas da região Sul do Brasil. Estes autores observaram que na superfície das bagas de uvas havia várias espécies de leveduras, dentre elas *Saccharomyces cerevisiae*, essencialmente, importante no processo fermentativo do mosto de uva. A constituição da *S. cerevisiae* é de 80% a 85% de polissacarídeos como glucanas e mananas (SANTOS, 2018).

A presença de fungos filamentosos e de leveduras no leite pode ser consequência de um processo inflamatório da glândula mamária, a mastite. A mastite micótica ocorre de forma esporádica e, em geral é decorrente da introdução acidental do microrganismo na glândula mamária, durante o tratamento intramamário, por meio de cânulas contaminadas. Um grande número de fungos filamentosos e de leveduras tem sido isolado de leite de vacas com mastite,

entre eles os gêneros *Trichosporon* e *Aspergillus* (fungos filamentosos) e *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e espécies de *Saccharomyces* (leveduras) (QUINN *et al.*, 1999). Apesar dos fungos filamentosos estarem amplamente distribuídos na natureza, eles são apenas isolados, esporadicamente de casos de mastite, enquanto que as leveduras estão mais frequentemente relacionadas às infecções da glândula mamária em animais produtores de leite (SPANAMBERG *et al.*, 2009). A severidade da doença vai depender do agente etiológico, podendo variar de autolimitada à mastite aguda severa que, muitas vezes, não responde ao tratamento com antimicrobianos (QUINN *et al.*, 1999).

A mastite micótica ocorre sob a forma de surtos localizados e/ou após tratamento com antimicrobianos e é classificada como primária ou secundária. A mastite primária ocorre espontaneamente, não é precedida por infecção bacteriana ou tratamento com antimicrobianos, e é mais diagnosticada durante as primeiras semanas de lactação. Já a mastite micótica secundária, que é a forma clínica mais encontrada, se desenvolve após a administração de antimicrobiano intramamário para tratamento ou prevenção de casos de mastite bacteriana (SPANAMBERG *et al.*, 2009).

Em revisão sobre a mastite micótica em ruminantes, Spanamberg *et al.* (2009) listam espécies de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* como agentes causais da mastite. O gênero mais reportado nos estudos brasileiros é *Candida*, com um grande número de diferentes espécies (COSTA *et al.*, 1995; SPANAMBERG *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2018).

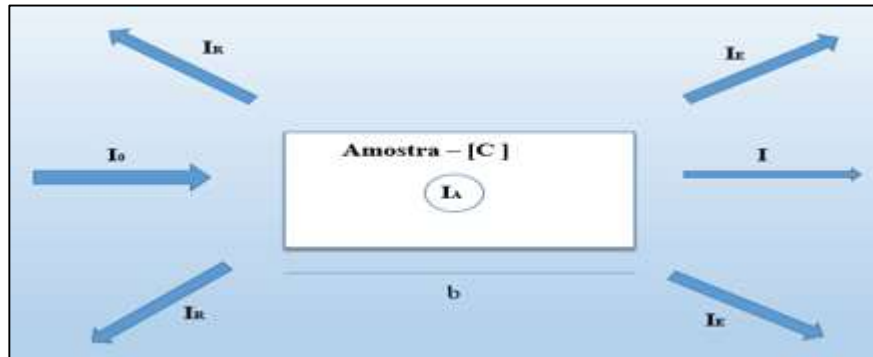
### 3.2 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS USADAS NA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A palavra espectroscopia tem origem no latim ‘*spectrum*’ cujo significado é aparição, imagem. As pesquisas envolvendo a interação da radiação com a matéria ganharam força a partir dos experimentos de Isaac Newton, em 1666, que observou, a partir da utilização de um prisma de vidro, a decomposição da luz branca em todas as cores do espectro visível. A partir da técnica de espectroscopia é possível obter informações sobre a estrutura molecular, níveis de energia e identificação e quantificação de elementos químicos e moléculas (SALA, 2008).

Como forma de definir e caracterizar a espectroscopia, ou seja, a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, a Lei de Lambert-Beer surge em consequência de estudos relacionados com essa interação. Quando a luz (radiação) -  $I_0$  - incide sobre a amostra (matéria), uma parte é absorvida -  $I_A$ , enquanto parte dela é refletida -  $I_R$ , outra é espalhada -

$I_0$  e o restante é transmitida -  $I$ , conforme esquematizado pela Figura 1.

Figura 1 - Esquema ilustrando a interação da radiação eletromagnética e matéria



Fonte: Adaptado de MENDES (2018).

É necessário considerar que a radiação  $I_0$  atravessa a amostra cujo comprimento é  $b$  e tem concentração  $[C]$ . Diante disso, como a amostra absorve parte dessa radiação, então a radiação que sai da amostra é menor, logo,  $I < I_0$ . Isso porque a energia radiante do feixe de luz diminui no processo de absorção pela amostra de parte dessa radiação (MENDES, 2018).

A Transmitância é definida como a razão entre a radiação transmitida e a radiação incidente na amostra.

$$T = \frac{I}{I_0} \Rightarrow \%T = \frac{I}{I_0} 100 \quad (1)$$

Como a Lei de Lambert-Beer considera a radiação incidente como monocromática, a absorvância está relacionada com o caminho óptico  $b$  e a concentração das espécies absorventes  $C$ . Logo, a relação fica expressa:

$$\boxed{A = a b C \quad \text{ou} \quad A = \varepsilon b C} \quad (2)$$

Onde:  $a$  = constante de proporcionalidade chamada absorvância ( $L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

$b$  = caminho óptico, recipiente (cubeta) para a amostra (cm)

$C$  = concentração em gramas/ L ou em mol/ L

$\varepsilon$  = absorvância molar

Quando a concentração da solução for dada em mol/L, a absorvância recebe a denominação de absorvância molar ( $\varepsilon$ ). Nenhuma luz é absorvida, transmitida ou espalhada quando a porcentagem de luz transmitida for igual à incidente ( $T=1$ ). Quando a Transmitância for menor que 1 ( $T < 1$ ) significa que houve absorção pelo material de uma parte da radiação emitida.

Em outro estudo, Rodrigues (2019) descreve a Lei de Lambert-Beer como sendo o decréscimo exponencial da intensidade da luz transmitida a partir do encontro com o corpo homogêneo, à medida que aumenta a sua espessura. Logo, a partir de deduções de várias equações em escalas logarítmicas é possível definir a Absorbância (A) como sendo a absorção de radiações pelos materiais em frequências próprias, logo:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon lb \quad (3)$$

onde  $\epsilon$  ( $\lambda$ ) representa o coeficiente de absorção molar, dado em  $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , diretamente proporcional ao comprimento de onda ( $\lambda$ ). O caminho óptico é dado por  $l$  em cm e  $C$  é a concentração molar da amostra em mol/L. Definindo o coeficiente de absorção pela expressão:  $\alpha = \epsilon.C.[\text{cm}^{-1}]$  temos que:

$$\begin{aligned} \ln \ln \frac{I}{I_0} &= -\alpha l \\ e^{\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)} &= e^{-\alpha l} \\ \frac{I}{I_0} &= e^{-\alpha l} \therefore I = I_0 e^{-\alpha l} \end{aligned} \quad (4)$$

A equação (4) é conhecida como Lei de Lambert-Beer. Ela apresenta limitações quanto à concentração química da amostra e mudanças no índice de refração do meio (MENDES, 2018).

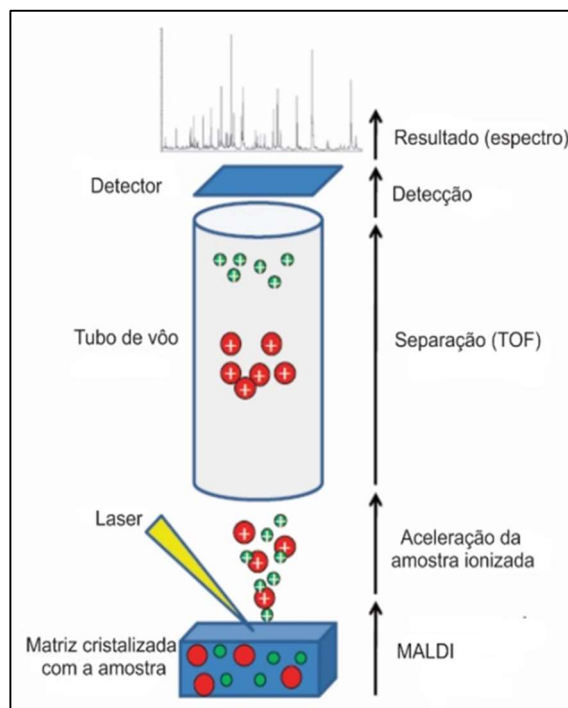
### 3.2.1 Espectrometria de massa MALDI-TOF

A espectrometria de massa é uma técnica analítica utilizada desde a década de 1970 para identificação de microrganismos, porém, foi a partir de 1987, através do químico Coichi Tanaka, que ela se desenvolveu em maiores proporções, a partir do seu experimento promovendo a ionização de grandes moléculas em meio à matriz de cobalto e glicerol (OLIVEIRA, 2020).

Três partes principais compõem o espectrômetro de massas: a fonte de íons, os analisadores e o detector. A fonte de íons provoca a ionização das moléculas gerando os íons, os analisadores separam os íons de acordo com a relação massa/carga ( $m/z$ ) em função da ação dos campos elétrico e magnético e, por fim, o detector capta os íons, amplificando-os e gerando corrente elétrica inserida no software do equipamento, onde será transformada em espectro de massa. O espectro de massa produzido tem como eixo das abcissas a relação massa-carga ( $m/z$ ) e o das ordenadas corresponde à intensidade do sinal que tem relação com a quantidade de íons

de mesma massa-carga (OLIVEIRA, 2020). A Figura 2 ilustra, esquematicamente, a técnica como representada por Croxatto, Prod'hom, Greub (2012).

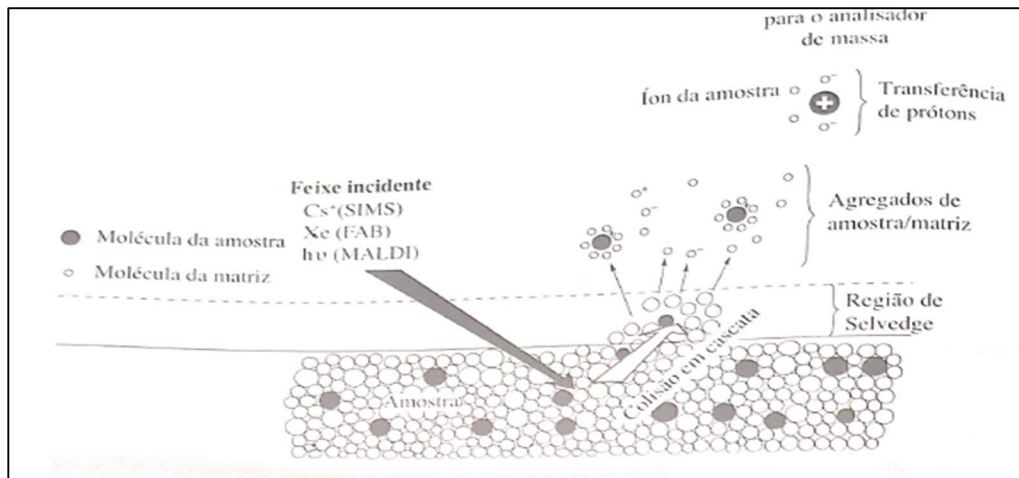
Figura 2 - Esquema ilustrando as partes principais do espectrômetro de massa MALDI-TOF



Fonte: CROXATTO, PROD'HOM, GREUB (2012).

A espectrometria por dessorção-ionização a laser assistida por matriz (MALDI, vem do inglês: *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) é um método usado para determinar, com precisão, as massas moleculares de biopolímeros polares, de modo que a substância a ser analisada é colocada em uma placa de metal, inserida numa câmara à vácuo e sobre ela incidem os fótons provenientes de um laser pulsado, devidamente focalizado sobre a amostra. Matriz e analito são colocados juntos na placa metálica para que, sob a ação do laser, aconteça o que se chama de dessorção tanto da matriz, analito e também de outros íons que podem ser oriundos do analito, conforme está representado na Figura 3. O analisador de massas usado conjuntamente com o MALDI é o analisador de tempo de voo (TOF, do inglês time of flight). As massas moleculares obtidas são dadas em Daltons (HOLLER, 2009).

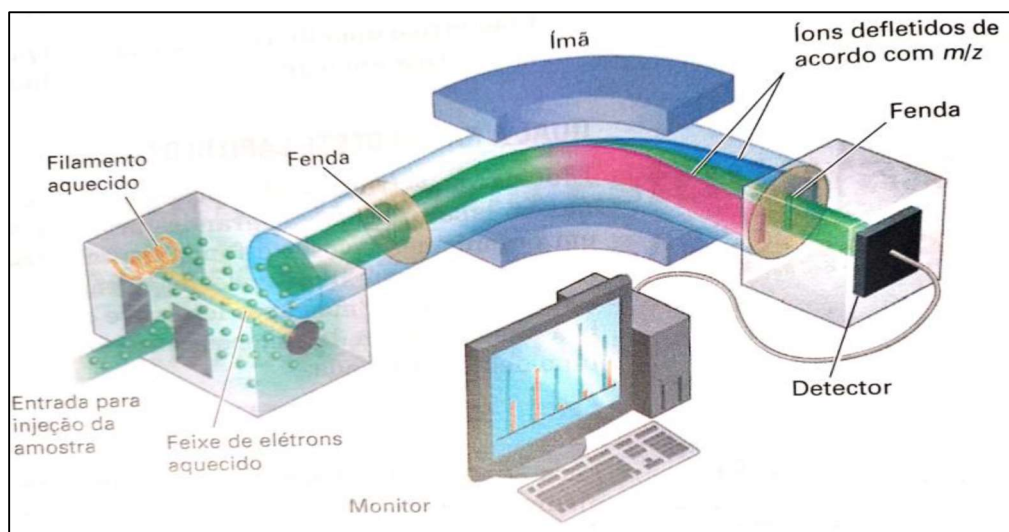
Figura 3 - Esquema da técnica de ionização por dessorção



Fonte: PAVIA *et al.* (2010).

Outro método de aplicação da espectrometria de massa consiste em introduzir a amostra gasosa no compartimento em que ela será bombardeada por um feixe de elétrons, promovendo a ionização dos átomos e moléculas do gás que se tornam prótons em função da perda de elétrons. Os íons são acelerados em direção a algumas grades, passando por fendas, estas se abrem apenas para que um feixe muito fino de íons passe e siga em uma direção curva por entre os pólos de um magneto, cuja função é desviar os elétrons por ação do campo magnético, conforme ilustra a Figura 4.

Figura 4 - Esquema de um espectrômetro de massas de ionização por feixe de elétrons de alta energia



Fonte: Mc MURRY (2011).



O grau de desvio depende da massa para íons de carga idêntica e quanto maior a massa do íon, menor o desvio. Os íons de menor massa que sofrem o maior desvio é que atingem primeiro o detector. Assim é possível determinar a massa desses fragmentos desintegrados, produzindo a ‘impressão digital química da molécula’, revelando a forma da sua ligação original (BROWN *et al.*, 2005). Pelo fato de os fragmentos dos compostos orgânicos serem únicos, é possível identificar um composto desconhecido por comparação do seu espectro de massas com um dos espectros que compõem o banco de dados do equipamento, denominado registro de dados espectrais de massas (Mc MURRY, 2011).

Em 2014, Wenning *et al.* usaram a espectrometria de massa MALDI-TOF (MALDI-TOF MS) para identificar e distinguir bactérias presentes em alimentos, concluindo que a técnica é a mais usada para identificar, especificamente, esses microrganismos.

Agustini *et al.* (2018) empregaram a espectrometria de massa MALDI-TOF para identificar várias espécies de leveduras que compõem a microflora das uvas da região Sul do Brasil. As estirpes de leveduras identificadas foram: *Candida californica*, *Zygoascus meyeriae*, *Candida akabanensis*, *Candida azyma* e *Hanseniaspora vineae*. O objetivo do trabalho foi alimentar o banco de dados do equipamento com a identificação dessas estirpes e, dessa forma, ampliar as pesquisas microbiológicas.

Angelakis *et al.* (2011) investigaram a acurácia e viabilidade da espectrometria de massa MALDI-TOF na identificação de bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus* presentes em alimentos probióticos e iogurtes, concluindo que a técnica apresentou uma especificidade de 92% quando comparada com o sequenciamento dos genes *tuf* e 16S rRNA.

Nacef *et al.* (2017) identificaram a população de bactérias ácido lácticas mesofílicas do queijo francês “Meroilles” por MALDI-TOF MS. A técnica permitiu a identificação, em nível de espécie, dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*. Os autores concluíram que a técnica é uma boa alternativa para as metodologias de identificação comumente utilizadas na indústria de alimentos.

Nogueira (2022) identificou 109 microrganismos isolados de leite cru, soro-fermento, salmoura e queijos artesanais da região da Serra da Mantiqueira por MALDI-TOF MS, nos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Corynebacterium*, *Kocuria* e *Macroccoccus*. A identificação dos últimos dois gêneros e sua diferenciação de estipes de *Staphylococcus* coagulase negativos se tornou mais frequente com a utilização da espectrometria de massas MALDI-TOF.

Também na identificação de microrganismos causadores de mastite a técnica vem

sendo amplamente empregada. Tomazi *et al.* (2014) e Cameron *et al.* (2017) utilizaram a técnica para identificar espécies de estafilococos coagulase negativos, um grupo de microrganismos de difícil identificação por técnicas microbiológicas clássicas, sendo necessário o uso de técnicas moleculares, como o sequenciamento, ou da espectrometria de massa MALDI-TOF. Nonnemann *et al.* (2019) identificaram, em nível de espécie, 93,5% de um total de 500 patógenos isolados de leite de vacas. Os espectros de massas de algumas espécies foram inseridos no banco de dados do equipamento para melhorar a capacidade de identificação da técnica. Segundo os autores, o banco de dados deve ser continuamente expandido com espectros de massas de espécies microbianas envolvidas em mastite bovina.

Oliveira *et al.* (2021) identificaram 380 bactérias isoladas de leite de vacas com mastite por espectrometria de massa MALDI-TOF. Deste total, 363 bactérias (95,5%) foram identificadas pela técnica em 12 gêneros e 37 espécies causadoras de mastite bovina, incluindo os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e gêneros relacionados e bactérias Gram-negativas. A acurácia de identificação da técnica em espécies do gênero *Staphylococcus* foi de 93,2%, quando comparada com o sequenciamento do gene 16S rRNA. Os resultados do estudo corroboraram com informações da literatura de que a espectrometria de massa MALDI-TOF é uma técnica precisa, rápida e simples para identificar patógenos de mastite bovina.

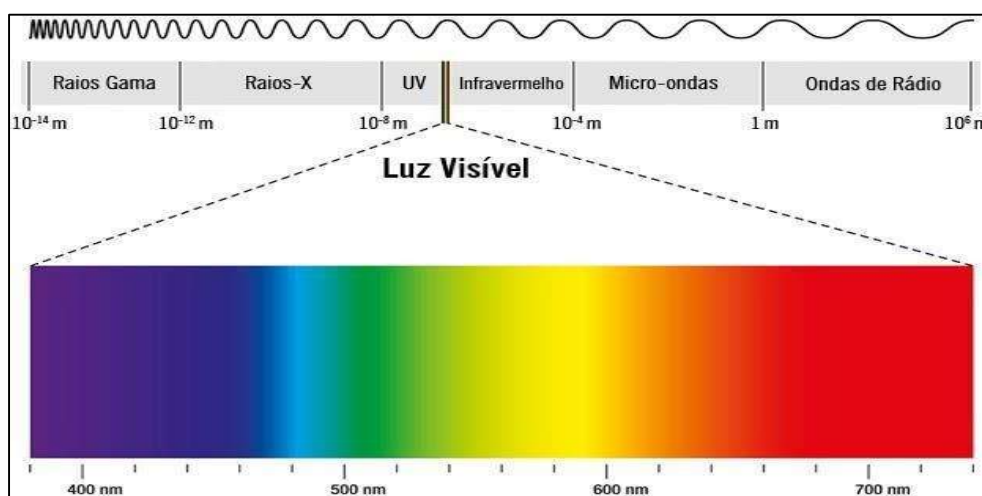
### 3.2.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Uma das principais técnicas analíticas usadas atualmente, baseada na interação entre radiação e matéria, é a espectroscopia no infravermelho. A radiação eletromagnética, ao interagir com a molécula, vai provocar a sua absorção se a frequência de radiação for correspondente à frequência de vibração da molécula. O movimento molecular próprio de cada molécula é resultante da frequência absorvida, de forma que esses movimentos são representados pelo seu espectro na região do infravermelho. Através da interpretação desses espectros é possível descobrir os tipos de ligações (grupos funcionais) característicos presentes nas moléculas e compostos estudados (Mc MURRY, 2012). Os espectros obtidos representam a ‘impressão digital’ de cada molécula e, a partir de sua análise, é possível obter informações acerca das macromoléculas que constituem as células, como as proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos e fosfatos. As células fúngicas têm sido bem identificadas através da técnica de espectroscopia por FTIR (KOGKAKI *et al.*, 2017).

Considerando o espectro eletromagnético, na Figura 5 observamos as frequências e comprimentos de onda específicos para cada região. Cabe destacar que a luz visível fica

compreendida, aproximadamente, entre 400 e 700 nm, a região do ultravioleta (UV) fica abaixo dos 400 nm e a região do infravermelho (IV) fica acima de 750 nm. Pelo espectro visualiza-se a variação da frequência de modo inverso ao comprimento de onda. A radiação gama apresenta comprimentos de onda semelhantes aos núcleos atômicos, em contrapartida, o comprimento de onda das ondas de rádio pode ser mais longo do que um campo de futebol. Pode-se considerar pequena a região que compreende a luz visível (BROWN *et al.*, 2005).

Figura 5 - Espectro eletromagnético da luz



Fonte: LUIZ (2019).

Na região do ultravioleta (UV), a radiação de comprimento de onda provoca transições eletrônicas em moléculas orgânicas, podendo até mesmo, serem decompostas por essas radiações, por elas apresentarem energia semelhante às energias de ligações covalentes. Já a radiação no infravermelho (IV), por apresentar-se com maior comprimento de onda e portanto com menor energia, interage com moléculas orgânicas, possibilitando alterações nos modos vibracionais e rotacionais das moléculas analisadas, o que a torna diferente das radiações do ultravioleta e do visível, que caracterizam-se por transições eletrônicas. Considerando as regiões espectrais no espectro do infravermelho, a região mais importante para a caracterização dos compostos orgânicos corresponde à região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , essa região apresenta bandas de absorção e não linhas, considerando que cada mudança no nível vibracional associa-se a várias transições rotacionais (BARBOSA, 2013).

A região do infravermelho corresponde à faixa espectral situada entre 12800 e 10  $\text{cm}^{-1}$  e se subdivide em três as faixas conhecidas: radiação do infravermelho próximo - NIR (*Near Infrared*), no intervalo entre 12800 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , a radiação no infravermelho médio - MIR (*Middle Infrared*) variando de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , e a radiação no infravermelho distante - FIR

(*Far Infrared*) compreendida de 400 a  $10\text{ cm}^{-1}$ . Para a análise de compostos orgânicos é mais significativa a radiação do infravermelho médio. A principal característica da espectroscopia de absorção no infravermelho é o fato da molécula e radiação vibrarem na mesma frequência. Porém, este tipo de radiação é de baixa energia, sendo suficiente apenas para provocar alterações nos modos vibracionais das moléculas. Sendo assim, o espectro no infravermelho representa a absorção de compostos diferentes em regiões específicas, o que vai caracterizar os grupos funcionais presentes no composto analisado (RODRIGUES, 2019).

A radiação ao interagir com qualquer molécula produz um efeito e no caso da radiação IV como resultado têm-se as vibrações moleculares, que por sua vez são oriundas de uma variação no momento de dipolo da molécula durante o seu movimento rotacional ou vibracional. Os átomos que constituem as moléculas não se apresentam com uma estrutura rígida, e considerando que a carga nuclear dos átomos é mais pesada em relação à massa dos elétrons pela aproximação de Born-Oppenheimer, as energias vibracionais e rotacionais, portanto, têm relação com o deslocamento dos núcleos atômicos. As moléculas homonucleares como  $\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2$  e  $\text{O}_2$  não apresentam variação no momento de dipolo, logo essas moléculas não absorvem radiação no IV (VIANA, 2018).

Com relação às ligações tríplexes, duplas e simples entre átomos iguais, observa-se que as ligações triplas absorvem em maior frequência (maior energia) do que as ligações duplas e estas mais do que as simples ligações, como pode-se observar na Figura 6. Isso se explica pela constante de força maior da ligação tripla em relação à ligação dupla e desta em relação à ligação simples. Também com relação às hibridizações dos átomos de carbono, as ligações formadas por orbitais com maior caráter  $s$  são mais fortes ( $sp > sp^2 > sp^3$ ), portanto absorvem mais energia, em maiores frequências (BARBOSA, 2013).

Figura 6 - Hibridizações dos carbonos e absorção de energia

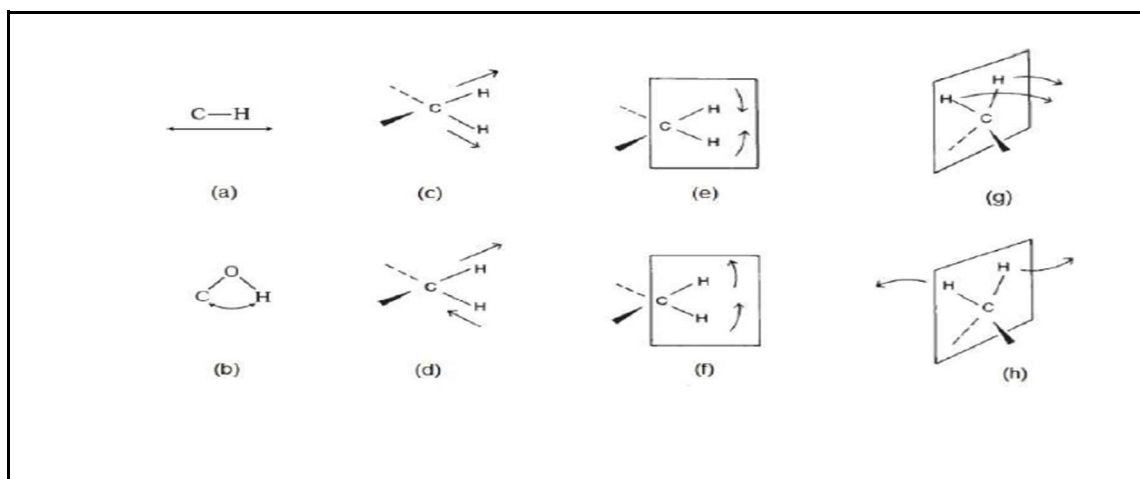
$sp$ $\equiv\text{C-H}$ $\tilde{\nu} = 3300\text{ cm}^{-1}$	$sp^2$ $=\text{C-H}$ $\tilde{\nu} = 3080\text{ cm}^{-1}$	$sp^3$ $-\text{C-H}$ $\tilde{\nu} = 2950\text{ cm}^{-1}$
---	--	--

Fonte: Adaptado de BARBOSA (2013).

Sabe-se que a incidência de qualquer radiação eletromagnética sobre um meio material irá produzir fenômenos como: absorção, transmissão, refração, reflexão e difração da luz incidente. No caso, para que uma molécula absorva radiação na região do IV é preciso que haja alteração no momento de dipolo da molécula durante o seu movimento de rotação ou translação.

De acordo com a natureza das moléculas, pode acontecer diversos tipos de vibração, como estiramento e dobramento, conforme está esquematizado na Figura 7.

Figura 7 - Representação dos diferentes tipos de vibrações moleculares

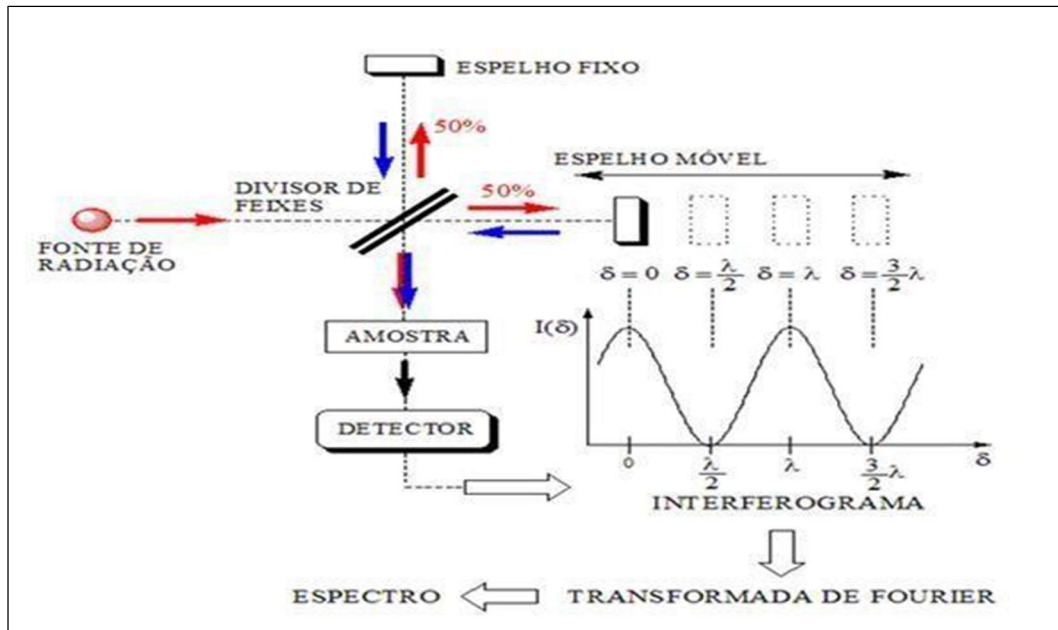


(a) Estiramento, (b) Dobramento, (c) Vibração de estiramento simétrico, (d) Vibração de estiramento assimétrico, (e) Vibração de deformação tipo tesoura (*scissoring*), (f) Vibração de deformação tipo oscilação, rotação (*rocking*), (g) Vibração de deformação tipo balanço (*wagging*), (h) Vibração de deformação tipo torção (*twisting*).

Fonte: VIANA (2018).

As técnicas espectroscópicas vem se destacando, principalmente, a partir de 1991, com o uso da técnica de IV por transformada de Fourier. Devido ao grande desenvolvimento científico e interesse de pesquisa pela técnica, equipamentos altamente sofisticados vêm sendo utilizados, o que possibilita a obtenção de dados mais precisos em pouco espaço de tempo de análise, além de viabilizar a obtenção de informações mais específicas sobre a identificação de espécies (WENNING; SCHERER, 2013). A Figura 8 mostra de forma esquematizada o mecanismo de funcionamento do equipamento, espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier.

Figura 8 - Método esquemático da Transformada de Fourier



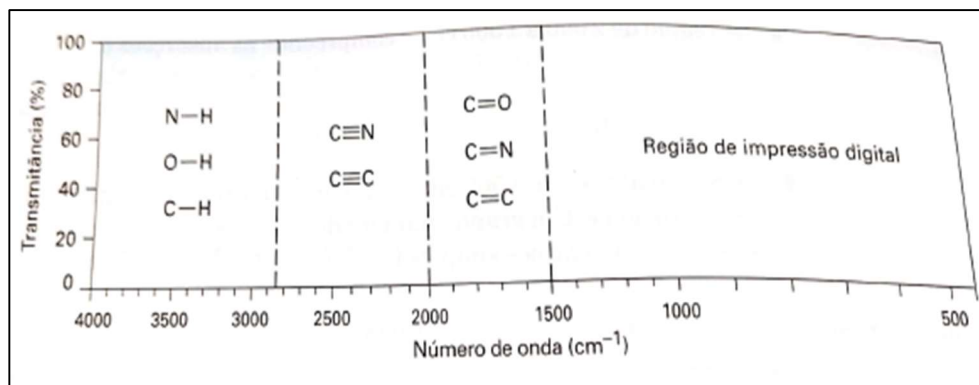
Fonte: Adaptado de RODRIGUES *et al.* (2012); VIANA (2018).

O espectrofotômetro no infravermelho por transformada de Fourier, representado, simplificada, por FTIR (sigla em inglês usada também em português), tem como princípio de funcionamento o interferômetro de Michelson. O interferômetro consiste basicamente de dois espelhos planos, sendo um fixo e outro móvel, posicionados perpendicularmente, um em relação ao outro. Alinhado com a fonte de radiação, um divisor de feixes é constituído de um material que permite que 50% da radiação seja transmitida para o espelho móvel e 50% seja refletida para o espelho fixo, de modo que os dois raios são refletidos por esses espelhos, retornando ao divisor de feixes, e se recombinando. A interferência é resultado dessa recombinação. Uma parte desta radiação, que corresponde a 50%, volta para a fonte de radiação e o raio que migra em direção à amostra e depois para o detector é denominado radiação transmitida. O interferograma é obtido como construções ou interferência destrutiva a partir da radiação monocromática de comprimento de onda  $\lambda$ , considerando a diferença do caminho óptico  $\delta$ , a partir da movimentação do espelho móvel (BARBOSA, 2013).

A Figura 9 ilustra a região do infravermelho (IV) que pode ser dividida no intervalo entre  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ , a fim de observar e caracterizar as bandas de absorção das moléculas, em quatro partes compreendidas e distintas entre ligações simples, duplas e triplas entre os elementos constituintes das moléculas, além da região de impressão digital da molécula. É importante ressaltar que as ligações simples com hidrogênio absorvem na região de maior frequência (energia mais alta). As ligações triplas também absorvem na região de maior

frequência comparada com as ligações duplas e, sucessivamente, em relação às ligações simples (Mc MURRY, 2012).

Figura 9 - Esquema das quatro regiões do espectro IV: ligações simples com hidrogênio, ligações triplas e duplas e região de impressão digital

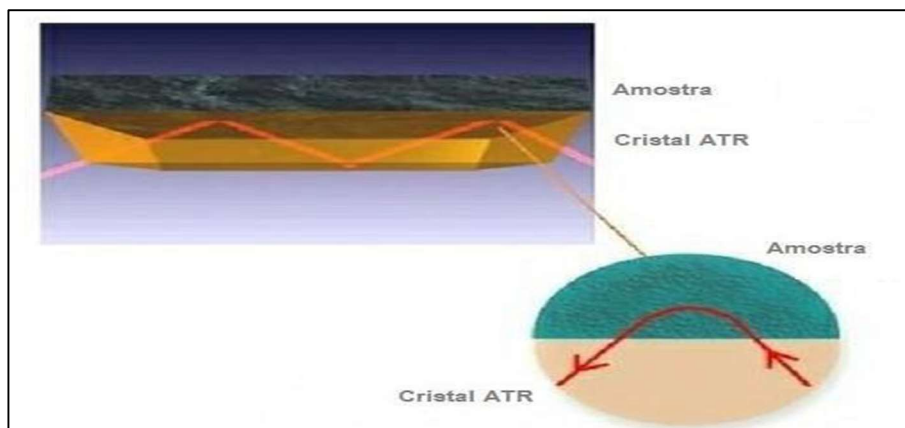


Fonte: Mc MURRY (2012).

Na técnica de Reflectância Total e Atenuada (ATR) o que acontece basicamente é que uma radiação incide sobre uma amostra a ser posicionada sobre um cristal de diamante, material com alto índice de refração, e ocorre que parte da radiação é transmitida e parte é refletida.

Pela Figura 10 observa-se que a radiação IV incide sobre o cristal de diamante penetrando na amostra, de modo que uma parte dessa radiação é absorvida e parte é refletida, e ao atingir o detector torna-se possível inferir informações sobre a amostra analisada a partir do estudo posterior do espectro obtido, a fim de caracterizar os compostos presentes na amostra. O feixe de luz que penetra a amostra na sua superfície é da ordem de 0,5  $\mu\text{m}$  - 5,0  $\mu\text{m}$  (onda evanescente). A reflectância total e atenuada é produzida a partir da intensidade das radiações ao longo de toda a superfície da amostra, originando múltiplas reflexões. Ao deixar a amostra, a radiação vai trazer informações qualitativas e quantitativas sobre a mesma, de modo que fica armazenado no banco de dados do computador esses achados e, posteriormente, eles poderão ser analisados na forma de espectros (VIANA, 2018). Segundo Almeida Junior (2018), cristais de seleneto de zinco (ZnSe), germânio (Ge), iodeto de tálio (KRS-5) e diamante podem ser usados e a incidência da radiação infravermelha aumentará no contato entre amostra e cristal à medida que o ângulo de incidência também aumenta, de modo que a partir de um ângulo crítico específico, ocorre a reflexão completa.

Figura 10 - Esquema de funcionamento do componente ATR



Fonte: Adaptado de Bruker Optics (2014); VIANA (2018).

Em um estudo relacionado à aplicação da Reflectância Total e Atenuada (ATR), Oleszko *et al.* (2017) relataram que a pesquisa de proteínas e lipídeos pode ser feita através da utilização da espectroscopia no infravermelho, em equipamento composto por ATR: **FTIR-ATR**, de modo que é possível obter a composição e estrutura das frações de HDL (high density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) e VLDL (very low density lipoprotein) e também determinar a existência de uréia, glicose e triglicerídeos em amostras de soro.

Taha *et al.* (2013) utilizaram a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) na identificação de diferentes espécies de leveduras isoladas de infecções humanas e de animais. A técnica demonstrou diferenças espectrais significantes entre as espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rodotorula* e *Geotrichum*, confirmando que FTIR é uma técnica promissora para a identificação de leveduras, por causa da sua sensibilidade, rapidez e alta capacidade de diferenciação entre os isolados, quando comparada a técnicas convencionais ou moleculares.

WANG *et al.* (2014) por sua vez demonstraram que a espectroscopia FTIR é uma ferramenta, potencialmente, útil para ajudar no diagnóstico de câncer de pulmão em humanos. Neste estudo foram obtidos espectros FTIR correspondentes aos soros de pessoas saudáveis e acometidas pela doença, e comparados os picos, a fim de observar mudanças na constituição das estruturas biológicas, como proteínas, ácidos nucleicos e grupos fosfato. Ficou evidente uma mudança na conformação na estrutura de proteína secundária ‘ $\alpha$  hélice’, ocorrendo a sua diminuição em pacientes acometidos com a doença. Assim, a importância da técnica foi destacada pela sua eficiência e praticidade.

Outro relevante trabalho de identificação e caracterização de microrganismos por microespectrometria FTIR foi desenvolvido por Ngo-Thi *et al.* (2003). Nesta pesquisa foi



utilizado um espectrômetro FTIR acoplado a um microscópio óptico com a finalidade de analisar e distinguir diferentes microrganismos, como bactérias e leveduras. Devido à alta qualidade dos espectros, foi possível diferenciar esses microrganismos e também diferenciar cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A técnica se mostrou bastante promissora por fornecer identificações e, principalmente, por permitir a diferenciação em nível de espécies e subespécies.

### 3.2.3 Espectroscopia Raman

A grande descoberta do efeito Raman ou também chamado de espalhamento inelástico ocorreu em 1928 pelo físico indiano Chandrasenkara Venkata Raman, representado na figura 11. Ele tinha grande talento para a pesquisa, chegou a trabalhar como funcionário de um banco e, posteriormente, foi convidado a ocupar a cadeira de Professor de Física da Universidade de Calcutá. Após receber o prêmio Nobel em 1930, o indiano foi nomeado diretor do Indian Institute of Science, permanecendo lá até 1948, ano em que se aposentou. Em seguida, montou o Raman Research Institute, seu centro próprio de pesquisa, no qual trabalhou até 1970, ano em que veio a falecer (KANEKO, 2012). Como a radiação incidente é espalhada por moléculas e estruturas cristalinas devido à sua interação com a radiação, observa-se uma pequena mudança na frequência dessa radiação, o que caracteriza o efeito Raman (SANTOS *et al.*, 2019). As frequências de radiação espalhadas pelas moléculas tornam evidentes os seus níveis de energia (ATKINS, 1997).

Figura 11 - Foto de C. V. Raman



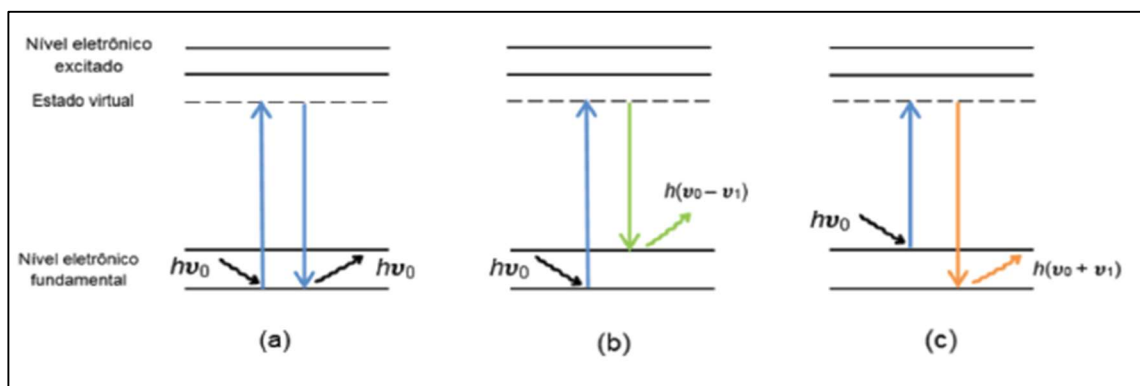
Fonte: extraído de Kaneko, (2012).

Conforme a pesquisa de Oleszko *et al.* (2017), a análise de ligações moleculares pode ser obtida e baseia-se no espalhamento inelástico de fótons sobre o material, o que caracteriza a espectroscopia Raman como um tipo de espectroscopia vibracional. A técnica de Raman oferece vantagem sobre a técnica do infravermelho na análise de amostras biológicas ricas em água. Na análise pelo Raman, os espectros mostram uma leve dispersão nas bandas quando comparada àquelas do infravermelho, cuja absorção de água é elevada. E ainda, as bandas do espectro Raman em relação às bandas do infravermelho são mais estreitas.

De acordo com Gómez-Mascaraque *et al.* (2020), através do espalhamento inelástico (efeito Raman) é possível identificar e quantificar compostos em moléculas complexas, compostas por vários constituintes, de forma menos invasiva, sem gastos, grandes investimentos ou dificuldades no preparo de amostras, e sem destruí-las.

Na espectroscopia Raman ocorre, basicamente, o espalhamento da radiação que vai ocorrer devido à interação da radiação eletromagnética monocromática com a molécula a ser analisada. Devido a este contato, o fóton da radiação incidente vai provocar uma excitação nos níveis de energia da molécula, passando do nível vibracional fundamental para o nível virtual excitado, denominado intermediário. Logo, a molécula vai responder, num tempo entre 10 e 14 segundos, de três formas diferentes, sendo o espalhamento elástico Rayleigh e os espalhamentos inelásticos Stokes e Anti Stokes, como pode ser observado na Figura 12 (SANTOS *et al.*, 2019).

Figura 12 - Ilustração do espalhamento da radiação eletromagnética: (a) espalhamento elástico (Rayleigh); (b) espalhamento inelástico (região Stokes); (c) espalhamento inelástico (região anti-Stokes)



Fonte: SANTOS *et al.* (2019).

Pelas observações de Faria (2018) e Santos (2019), no espalhamento Rayleigh o

comprimento de onda e, portanto, sua energia, não sofre alteração ao chocar-se com a molécula, mas apenas há alteração na sua direção de propagação. Já para explicar o espalhamento inelástico é preciso considerar que a partir da incidência da radiação, o dipolo induzido da molécula varia, proporcionalmente, com a polarizabilidade molecular ( $\alpha$ ) em função das vibrações dos átomos, considerando a variação da densidade eletrônica juntamente com a frequência de vibração.

A equação 5 representa o dipolo induzido na molécula, de modo em que os três termos representam as três formas de espalhamento da radiação, que varia em função da frequência da energia incidente na molécula. O primeiro termo explica o espalhamento Rayleigh, cuja frequência de radiação espalhada corresponde à frequência da radiação incidente. O segundo termo explica que a fração da radiação é espalhada com frequência menor que a frequência inicial, caracterizando o espalhamento Raman Stokes. Já o terceiro termo expressa que a frequência da radiação é espalhada com frequência maior que a frequência inicial incidente e corresponde ao espalhamento Raman Anti-Stokes, que é o menos intenso entre os tipos de espalhamento. Para que haja o espalhamento Raman é necessário que  $\partial\alpha/\partial q_i \neq 0$ . Ao analisar os espectros Raman, é possível obter informações sobre a estrutura molecular do composto analisado, já que o modo vibracional da molécula é dado pela diferença entre a frequência do fóton de radiação incidente e a frequência do fóton de radiação espalhada (FREITAS, 2015).

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi V_{ex} t) + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q_i}\right) q_i^0 E_0 / 2 \cos[2\pi(V_{ex} - V_i)t] + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q_i}\right) q_i^0 E_0 / 2 \cos[2\pi(V_{ex} + V_i)t] \quad (5)$$

Onde:

- $\alpha_0 E_0 \cos(2\pi V_{ex} t)$  é o primeiro termo
- $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q_i}\right) q_i^0 E_0 / 2 \cos[2\pi(V_{ex} - V_i)t]$  é o segundo termo e
- $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q_i}\right) q_i^0 E_0 / 2 \cos[2\pi(V_{ex} + V_i)t]$  é o terceiro termo.

As técnicas do IV e Raman são complementares pelo fato de uma mesma banda ser observada nos dois espectros, porém com intensidades diferentes, sendo que a simetria também pode contribuir para que uma banda seja observada em um espectro e no outro, não. Entretanto, um diferencial entre as duas técnicas pode ser destacado ao observar e comparar os espectros no IV e no Raman com relação à existência de bandas de água. No espectro de absorção no IV há uma grande interferência das moléculas de água e de grupos OH, provocando grande variação no momento dipolar e, conseqüentemente, as bandas se

apresentam de forma bastante intensas no espectro FTIR. Em oposição, na obtenção de espectros Raman, as moléculas de água não causam interferência, já que não há absorção e sim, espalhamento de radiação. Logo, há uma pequena variação na polarizabilidade e os espectros, dessa forma, podem ser feitos em solução aquosa sem interferência (FARIA, 2018).

Na espectroscopia Raman a presença do campo elétrico causado pela radiação incidente irá provocar um momento de dipolo induzido na molécula, ou seja, haverá um deslocamento dos centros de cargas positivas e negativas (nuvem eletrônica) em relação aos seus núcleos. Nessa técnica não é tão relevante o momento de dipolo intrínseco da ligação, e sim o momento de dipolo induzido. De modo que, a facilidade dessas cargas rearranjarem-se mediante a ação do campo elétrico, formando e reorganizando a nuvem eletrônica da molécula, diz respeito à polarizabilidade. A complexidade da banda no espectro Raman tem relação com a polarizabilidade, com a concentração do grupo ativo na molécula e com a intensidade da fonte. A concentração do analito na amostra relaciona-se, proporcionalmente, com a intensidade das bandas Raman, ao contrário da espectroscopia de absorção, em que a relação concentração/intensidade é logarítmica (AVILA, 2013).

Em uma das importantes aplicabilidades da técnica, Mendes *et al.* (2020) relatam o uso da espectroscopia Raman como ferramenta rápida e eficiente no monitoramento e quantificação de adulteração do leite cru por soro de leite. Foram realizadas análises estatísticas complementares à técnica, como as Análises de Componentes Principais (PCA) e a Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS) para a determinação e previsibilidade da quantidade de soro contida na amostra de leite analisada. Métodos quimiométricos de análise multivariada foram usados na avaliação, já que é preciso considerar as pequenas variações na espectroscopia. Esses autores concluíram que a espectroscopia Raman foi eficiente no processo de análise, com a obtenção de resultados em minutos, além de não ser necessário o investimento em reagentes para o preparo de amostras, que oneram e prolongam a obtenção dos resultados, como ocorre nos métodos analíticos convencionais. Assim, a técnica se mostrou rápida, econômica e precisa.

Fernández-Manteca *et al.* (2023), ao analisarem onze espécies do gênero *Candida*, o gênero que mais causa infecções fúngicas em todo o mundo, comprovaram que o uso da espectroscopia Raman junto com a utilização de algoritmos, pode se tornar forte aliada na rotina diária de identificação microbiana em clínicas e hospitais, tendo em vista a sua facilidade de manipulação e uso, o baixo custo e reduzido tempo de preparação de amostras, além de comprovar mais de 80% de eficácia nos testes realizados.

Hu *et al.* (2020) diferenciaram duas espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus*, *C.*

*neoformans* e *C. gatti* usando o espalhamento Raman em superfície aprimorada (SERS, Surface Enhanced Raman Spectroscopy), conjuntamente com um substrato, as nanopartículas de prata carregadas positivamente (AgNPs<sup>+</sup>). A distinção entre as espécies foi feita com a utilização da Análise de Componentes Principais, que explicaram cerca de 99 % da variância dos dados.

No trabalho de Silva (2019) foram obtidos espectros Raman de seis bactérias-padrão representantes de microrganismos isolados de leite e derivados. Os microrganismos foram diferenciados entre si, visualmente e pelas Análises de Componentes Principais (PCA) e Hierárquica de Agrupamentos (HCA). A técnica se mostrou sensível e bastante promissora para identificação de microrganismos isolados em leite e derivados.

### 3.3 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é uma ferramenta analítica que, ao longo dos anos, vem se tornando fundamental nos laboratórios de espectroscopia e de análises de processos. Segundo a ICS (*International Chemometrics Society*), a quimiometria, como uma disciplina química, define-se pelo planejamento ou seleção de experimentos, de forma otimizada, com a finalidade de extrair o máximo de informações a partir das análises de dados multivariados e, para isso, emprega métodos matemáticos e estatísticos. O avanço da quimiometria se deu entre as décadas de 1970 e 1980 com a utilização e popularização dos microprocessadores que resultaram em equipamentos analíticos mais sofisticados, liberando muitos resultados de análises de forma rápida e precisa, assim como acontece com a obtenção dos espectros de UV/Visível, de NIR, MIR e outros dados de maior complexidade (FERREIRA *et al.*, 1999; BOTELLO, 2014). Vários grupos de pesquisa nas áreas de química analítica, físico-química e química orgânica reconheceram a necessidade de introduzir essa técnica com o objetivo de obter respostas multivariadas para as amostras analisadas, principalmente. Observou-se que as análises estatísticas tradicionais com respostas univariadas não eram mais capazes de modelar experimentos químicos. Dentre as suas três linhas de evolução, o uso do design experimental se destaca como um dos mais importantes, seguido do seu uso na substituição de regras rígidas em física e química orgânica por novas correlações, por exemplo, e por fim, o seu uso em instrumentos de química analítica e, conseqüentemente, com usos industriais (GELADI, 2003).

### 3.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais é um método estatístico não parametrizado, que tem como finalidade extrair informações relevantes de dados desordenados e desalinhados, a fim de fazer a identificação de padrões, assim como também destacar as diferenças e similaridades entre as amostras analisadas (KAZNOSKA *et al.*, 2017).

A PCA constitui um dos mecanismos para análise multivariada, já que basicamente ela é montada a partir de uma matriz de dados obtida de uma combinação de variáveis, em que nas linhas posicionam-se as amostras e nas colunas estão distribuídos todos os valores registrados em um banco de dados a partir de uma análise espectroscópica, por exemplo. No caso da análise por FTIR – ATR e Raman são expressos em números de onda, em  $\text{cm}^{-1}$ . Através dessa ferramenta é possível ter uma visão geral dos dados em um novo espaço, de modo que a direção de maior variabilidade dos dados é explicada pelo primeiro componente principal, a direção da segunda maior variabilidade é explicada pelo segundo componente principal e assim, sucessivamente. Sendo assim, os primeiros componentes conseguem explicar, quase na totalidade a variância dos dados e aos últimos componentes pertencem os ruídos inerentes aos dados que não terão informações significativas à análise. Entretanto, antes de iniciar a análise é preciso ajustar os dados a fim de evitar e eliminar a existência de amostras anômalas fazendo um pré-processamento dos dados (ÁVILA, 2013).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

As leveduras foram isoladas a partir de leite de vacas, a identificação foi realizada por três métodos espectroscópicos (MALDI-TOF MS, FTIR-ATR e RAMAN) e os resultados analisados por programas estatísticos.

### 4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO INICIAL DAS LEVEDURAS

O experimento foi realizado com onze leveduras isoladas de amostras de leite obtidas de quartos mamários de vacas com ou sem sinais de mastite. Estas leveduras estão mantidas congeladas em ultrafreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite e aguardam uma identificação de gênero e espécie para que possam ser definitivamente incorporadas a uma coleção biológica. As leveduras foram isoladas de acordo com os procedimentos preconizados pelo *National Mastitis Council* (NMC, 2004). O leite

coletado diretamente da glândula mamária do animal foi cultivado em ágar sangue (Ágar Soja Tripticaseína, TSA, Oxoid, Basingstoke, Hants, Reino Unido, adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro). Os microrganismos que cresceram nesse meio foram subcultivados em Ágar Infusão de Cérebro e Coração - Brain Heart Infusion Ágar - BHI. A partir desse cultivo foram realizados esfregaços que foram corados pelo método de Gram para verificar a morfologia e coloração do microrganismo. Os microrganismos identificados como leveduras pela microscopia foram estocados em 1 ml de leite desnatado (Skim Milk, Difco, Sparks, MD, EUA) com glicerol a 10% (Cromoline, Diadema, SP, Brasil) em microtubos e acondicionados em ultrafreezer para as análises posteriores.

#### 4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS POR MALDI-TOF MS

A identificação das leveduras por MALDI-TOF MS foi realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) localizado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde está instalado o espectrômetro de massas MALDI-TOF LT Microflex (Bruker Daltonics, MA, EUA). Os dados de massa espectral foram analisados com o *software* Flexcontrol 3.3 (Bruker Daltonics, MA, EUA), que faz a identificação do microrganismo de acordo com espectros contidos no banco de dados Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, MA, EUA).

A preparação das leveduras foi realizada de acordo com Oliveira *et al.* (2021). As amostras foram inoculadas em Ágar BHI e incubadas por 24 horas a 35 °C. Com auxílio de um palito de madeira, o material de uma ou mais colônias de cada amostra foi depositado na placa de aço inoxidável do equipamento, em duplicata. A cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi utilizada como controle interno do equipamento, ou seja, o espectro das proteínas ribossômicas desta cepa foi utilizado como referência. O equipamento também faz a leitura em duplicata, de modo que ao final são obtidas quatro identificações da mesma amostra.

Após a aplicação das amostras, a placa é mantida em temperatura ambiente até a completa secagem do material depositado. Sobre cada amostra é adicionado 1  $\mu$ l de ácido fórmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que atua na lise das células e faz com que haja exposição das proteínas, em seguida as amostras são submetidas a uma segunda secagem em temperatura ambiente. Após a segunda secagem, foi depositado sobre cada amostra 1  $\mu$ l da matriz composta por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) preparado em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Estes solventes têm como finalidade penetrar na parede celular do microrganismo e extrair as proteínas intracelulares.

Após mais uma etapa de secagem, a placa foi inserida no equipamento para a leitura das amostras.

Os resultados foram gerados através do programa computacional Flexcontrol 3.3 e os valores de escores variam de 0,0 a 3,0. Escores iguais ou maiores que 2,3 são considerados como identificação altamente confiável para a espécie; entre 2,0 e 2,29 são considerados como identificação confiável para gênero e provável para espécie; escores entre 1,7 e 1,9 são considerados como identificação provável apenas para gênero, enquanto que escores de identificação abaixo de 1,69 são considerados como não confiáveis.

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO – FTIR-ATR

A obtenção e análise dos espectros no infravermelho médio foi realizada no Laboratório de Espectroscopia de Materiais (LEM) do Grupo de Espectroscopia e Engenharia de Materiais (GE2M) do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Toda a manipulação microbiana foi realizada de forma a não contaminar o ambiente. As amostras foram previamente inoculadas em Ágar BHI e incubadas por 24 horas a 35 °C no Laboratório de Microbiologia da Embrapa Gado de Leite. Posteriormente, elas foram acondicionadas em recipientes próprios para transporte e levadas ao LEM na Universidade Federal de Juiz de Fora. Foi retirado, com auxílio de uma espátula, o material de uma ou mais colônias de cada amostra e depositado sobre o cristal de diamante do equipamento VERTEX-70 FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), fabricado pela Bruker, para a obtenção das medidas na região do infravermelho médio. Sua base de funcionamento é o interferômetro de Michelson, que produz um interferograma a partir do cálculo da Transformada de Fourier, gerando espectros de absorbância e/ou transmitância. As medidas na região do infravermelho médio foram obtidas na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 0,1  $\text{cm}^{-1}$  e modo de transmissão de 32 scans. Os espectros foram obtidos em triplicata e foram feitas as correções da linha de base. Após cada manipulação, procedia-se à limpeza e desinfecção do compartimento de análise com solução de álcool 70% e álcool isopropílico. Ao final das análises, o material contaminado foi recolhido em recipiente fechado e levado para o Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite para descontaminação em autoclave e descarte apropriados.



### 4.3.1 Análise dos espectros obtidos por FTIR-ATR

Os espectros das diferentes espécies de leveduras foram obtidos em triplicata no equipamento VERTEX-70 FTIR e convertidos em arquivo de texto utilizando-se o *software* OPUS 6.5.97 e, posteriormente, o Origin Pro 8. Para verificar as bandas de número de onda que foram mais correlacionadas com as espécies, utilizou-se a Análise de Componentes Principais - PCA. Para realizar essa análise, a partir de seu embasamento teórico, foi montada uma matriz  $m \times n$ , onde  $m$  corresponde ao número de linhas (horizontal), neste caso, representados pelas amostras, ou seja, as espécies de leveduras; e  $n$  corresponde ao número de colunas (vertical), descritos como as variáveis que são os números de onda em  $\text{cm}^{-1}$  obtidos nos espectros de absorvância de cada amostra. A matriz montada foi de  $11 \times 74$ , onde tem-se 11 amostras nas linhas e 74 variáveis, ou seja, números de onda em  $\text{cm}^{-1}$  representados nas colunas. Todos os dados foram normalizados para a escala  $Z \left( \frac{x-\mu}{\sigma} \right)$ . Através da PCA é possível obter os agrupamentos das amostras, embora essa não seja sua função principal. Os valores de absorvância obtidos na faixa de números de onda compreendidas entre  $584 - 592 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1067 - 1090 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1229 - 1242 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1383 - 1398 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1402 - 1404 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1450 - 1454 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1547 - 1558 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1630 - 1645 \text{ cm}^{-1}$ ;  $2885 - 2895 \text{ cm}^{-1}$ ;  $2918 - 2982 \text{ cm}^{-1}$ ;  $3260 - 3281 \text{ cm}^{-1}$  foram submetidas aos cálculos para análise de PCA, utilizando-se o *software* PAST versão 4.13. Foram realizadas também as análises de *K-means* e Cluster para verificar as semelhanças e diferenças entre as amostras, de acordo com a faixa dos números de onda mais relevantes selecionados acima. *K-means* é uma análise não supervisionada que busca por homogeneidade e agrupa amostras usando uma medida de similaridade, como a distância euclidiana (MALIK; TUCKFIELD, 2019). Os grupos *k-means* foram usados na PCA e na Análise de Cluster. Para conduzir esta análise de agrupamento por Cluster, empregamos a métrica de distância euclidiana e o método Ward.D para agrupamento. O método de Ward é um algoritmo de agrupamento hierárquico que junta observações semelhantes em agrupamentos usando o método de variância mínima. Esse método robusto é usado, frequentemente, em aplicativos em que o número de clusters é desconhecido, antecipadamente. No caso do presente estudo, o número de clusters foi definido pela análise de *k-means*.

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

A obtenção e análise dos espectros Raman foram realizadas no LEM do GE2M no Departamento de Física da UFJF. A sala onde o equipamento se encontra é climatizada à temperatura de 19 °C. A manipulação dos microrganismos foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite.

As culturas de leveduras foram preparadas de acordo com o procedimento descrito por Huang *et al.* (2004), em que uma alíquota de 1 mL do caldo BHI cultivado foi centrifugado a 10.000 rpm por 4 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* resultante foi ressuspensionado em 0,5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) com o auxílio de um agitador de tubos tipo vortex. O procedimento de centrifugação, ressuspensão e agitação foi repetido três vezes para a lavagem das células. As lavagens foram realizadas para remover o meio de cultura e os produtos do metabolismo microbiano presentes no meio.

As células foram ressuspensionadas em 0,5 mL de solução salina estéril. Uma alíquota de 2 a 10 µL desta suspensão foi depositada numa lâmina de vidro transparente sem imperfeições e, após a secagem em temperatura ambiente, foi analisada por espectroscopia Raman.

As medições foram realizadas no equipamento Raman WITEC alpha 300 AR, equipado com um detector CCD – *Charge Coupled Device* (Andor). A fonte de excitação de luz foi um laser de diodo com comprimento de onda em 785 nm (Toptica Photonics AG). Sua calibração foi feita com silício, sendo o seu pico centrado em 521 cm<sup>-1</sup>, focalizado para a objetiva de 100x, partindo-se do alinhamento de 10x e 50x do microscópio, cuja potência corresponde a 112 mW sobre a amostra.

As medidas de cada amostra foram obtidas na região analisada pelo Raman (*range*) de 164 a 2325 cm<sup>-1</sup>. Cada amostra foi colocada no porta-amostra e foi feita a aferição pelas objetivas de 10x, 50x e 100x. A partir do foco das imagens, escolheu-se as regiões brancas da célula (citoplasma) da levedura (FERNÁNDES-MANTECA *et al.*, 2023). Posteriormente, também focalizou-se a parte escura, mais resistente, que envolve a célula. A luz espalhada, após o contato com a amostra, foi transferida por meio de um pinhole, onde foi detectada pelo detector CCD. O tempo para obtenção de cada espectro foi em torno de 40 minutos, sendo o tempo de integração de 90 s com seis acumulações. O processo de obtenção dos espectros foi centrado em quatro regiões, a saber: 520 cm<sup>-1</sup>, 1100 cm<sup>-1</sup>, 1400 cm<sup>-1</sup> e 2000 cm<sup>-1</sup>. Os espectros foram tratados e organizados de acordo com as faixas de obtenção: 250 – 1323 cm<sup>-1</sup> e de 1398 – 1664 cm<sup>-1</sup> e, posteriormente, convertidos em arquivo de texto utilizando-se o *software* Origin Pro 8.

#### 4.4.1 Análise dos espectros obtidos pela espectroscopia Raman

Os espectros obtidos foram analisados por PCA por meio do *software* PAST versão 4.13. O tratamento dos espectros, ajustes e a sua conversão em arquivo de texto foi feita utilizando o Programa Origin Pro 8.

Utilizou-se a PCA para correlacionar as bandas observadas nos espectros com os números de onda e para isso foi montada uma matriz  $m \times n$ , onde  $m$  corresponde às espécies de leveduras representadas nas linhas; e  $n$  representam os números de onda em  $\text{cm}^{-1}$  e descrevem as variáveis obtidas nos espectros de absorbância, nas colunas. A matriz elaborada foi de  $10 \times 98$ , onde tem-se 10 amostras *versus* 98 números de onda (variáveis) utilizados na análise. Considerando todo o embasamento teórico, os dados foram normalizados para a escala  $Z \left( \frac{x-\mu}{\sigma} \right)$  utilizada para a normalização de dados. Foram obtidos valores Raman Shift ( $\text{cm}^{-1}$ ) na faixa de números de onda – ‘range’ - compreendidas entre  $552 - 578 \text{ cm}^{-1}$ ;  $702 - 727 \text{ cm}^{-1}$ ;  $843 - 853 \text{ cm}^{-1}$ ;  $988 - 989 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1003 - 1094 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1160 - 1161 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1234 - 1238 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1422 - 1473 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1503 - 1593 \text{ cm}^{-1}$ ;  $1601 - 1646 \text{ cm}^{-1}$ . Esses dados foram submetidos à PCA utilizando-se o *software* PAST versão 4.13. Com a finalidade de descobrir semelhanças e diferenças entre as amostras, considerando a faixa de números de onda descritos, foram realizadas as análises de *K-means* e Cluster. A distância euclidiana, usada como medida de similaridade foi utilizada na análise *K-means* para agrupar as amostras (MALIK; TUCKFIELD, 2019).

Tanto na análise de PCA, quanto na Análise de Cluster, os grupos *k-means* foram usados. Foi empregado a métrica de distância euclidiana e o método Ward.D para agrupamento por Cluster. O método de Ward é robusto por ser um algoritmo de agrupamento hierárquico que junta observações semelhantes em agrupamentos usando o método de variância mínima. Nessa análise, o número de clusters foi definido pela análise de *k-means*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir estão descritos os resultados obtidos com a identificação e caracterização das leveduras utilizando-se as técnicas de MALDI-TOF MS, FTIR-ATR e espectroscopia Raman.

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS POR MALDI-TOF MS

Os resultados da identificação de onze leveduras pela técnica de MALDI-TOF MS estão

apresentados na Tabela 1, juntamente com os escores de identificação.

Tabela 1 - Identificação de onze leveduras isoladas de leite bovino por MALDI-TOF MS

Número	Identificação	Escore de identificação
4289	<i>Pichia kudriavzevii</i>	1,94
5287	<i>Candida metapsilosis</i>	2,02
5395	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,96
5396	<i>Pichia kudriavzevii</i>	1,91
5431	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,03
5442	<i>Candida albicans</i>	1,93
5443	<i>Candida albicans</i>	1,88
5444	<i>Diutina rugosa</i>	1,71
5533	<i>Candida palmioleophila</i>	2,06
5534	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2,09
5535	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,99

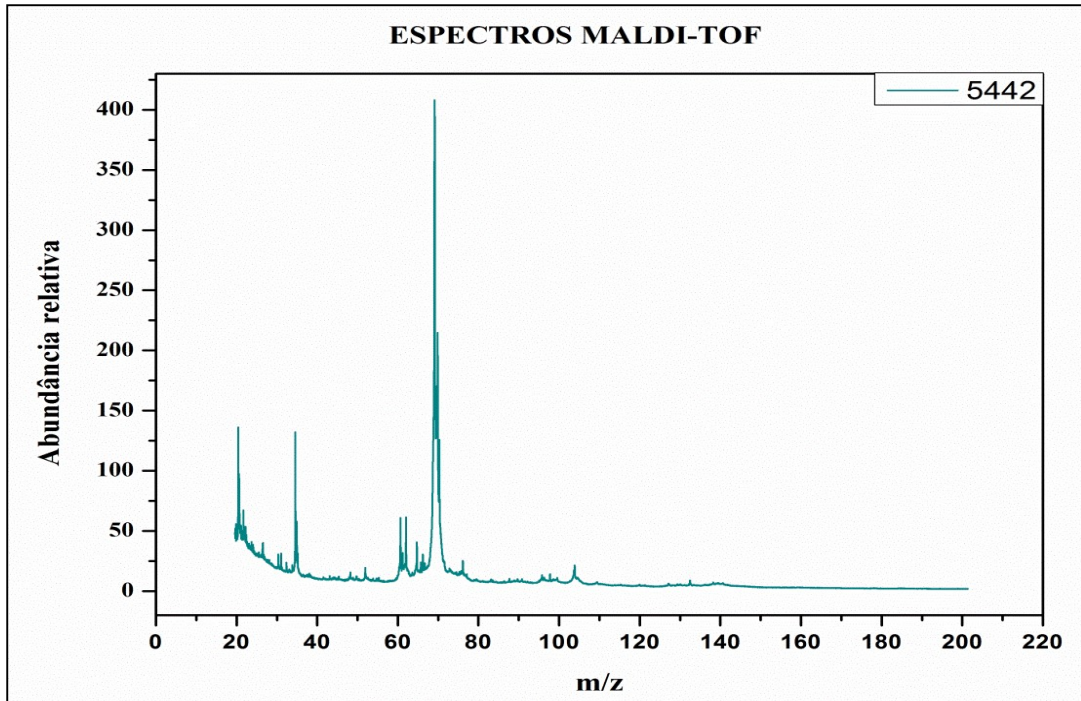
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A técnica de MALDI-TOF MS identificou quatro leveduras do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. palmioleophila* e *C. metapsilosis*), duas do gênero *Pichia* (*P. kudriavzevii*), duas do gênero *Kluyveromyces* (*K. marxianus*), uma como *Saccharomyces cerevisiae*, uma como *Cryptococcus neoformans* e uma como *Diutina rugosa*.

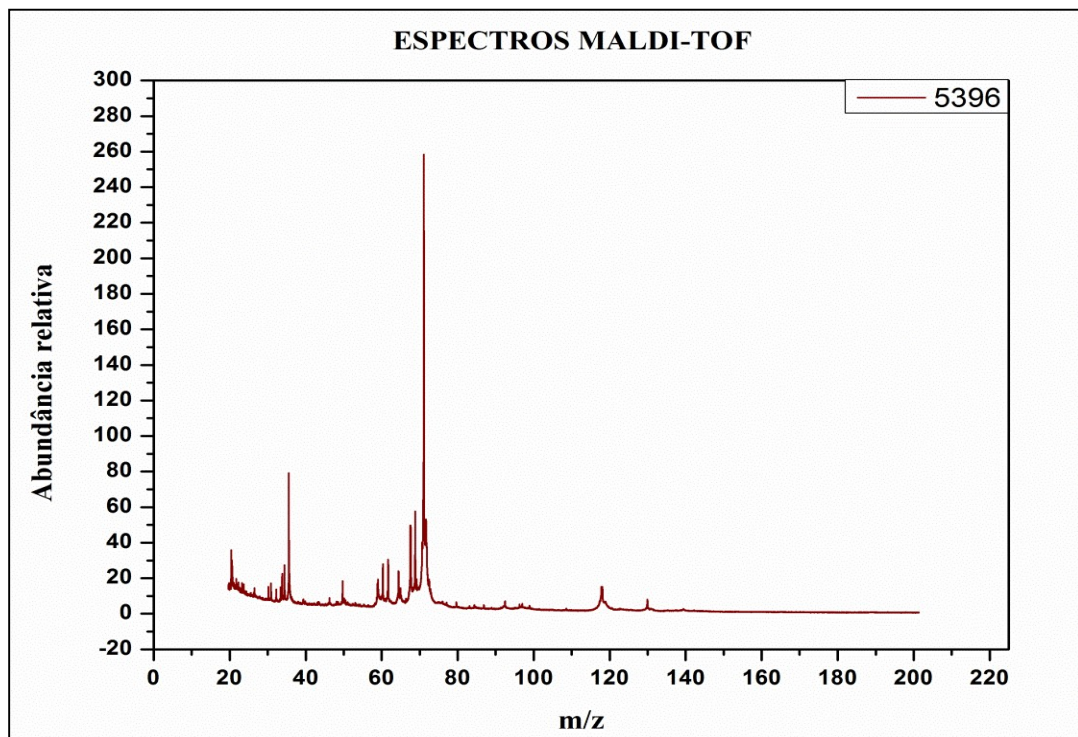
As amostras 5431, 5533, 5534 e 5287 apresentaram identificação confiável para gênero e provável para espécie, enquanto que as demais amostras apresentaram identificação provável para gênero. Nenhuma das amostras apresentou escore de identificação acima de 2,3, que representa uma caracterização confiável para gênero e espécie. Desta forma, a identificação dessas espécies será confirmada com o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade ribossomal 28S do gene de RNA. Aparentemente, o banco de dados do equipamento utilizado não tem um grande número de espectros de leveduras. Uma baixa discriminação (escore entre 1,7 e 1,9) pode indicar que a base de dados não está adequada para a identificação de determinadas espécies (NONEMANN *et al.*, 2019), sugerindo a necessidade de uma expansão desta base de dados.

No sul do Brasil, Agustini *et al.* (2014) desenvolveram uma base de dados suplementar à base de dados comercial do espectrômetro de massa MADI-TOF para ampliar e melhorar a identificação taxonômica de leveduras isoladas de mosto de uva.

Os espectros de massa MALDI-TOF obtidos das onze leveduras estão apresentados nas Figuras 13 a 23.

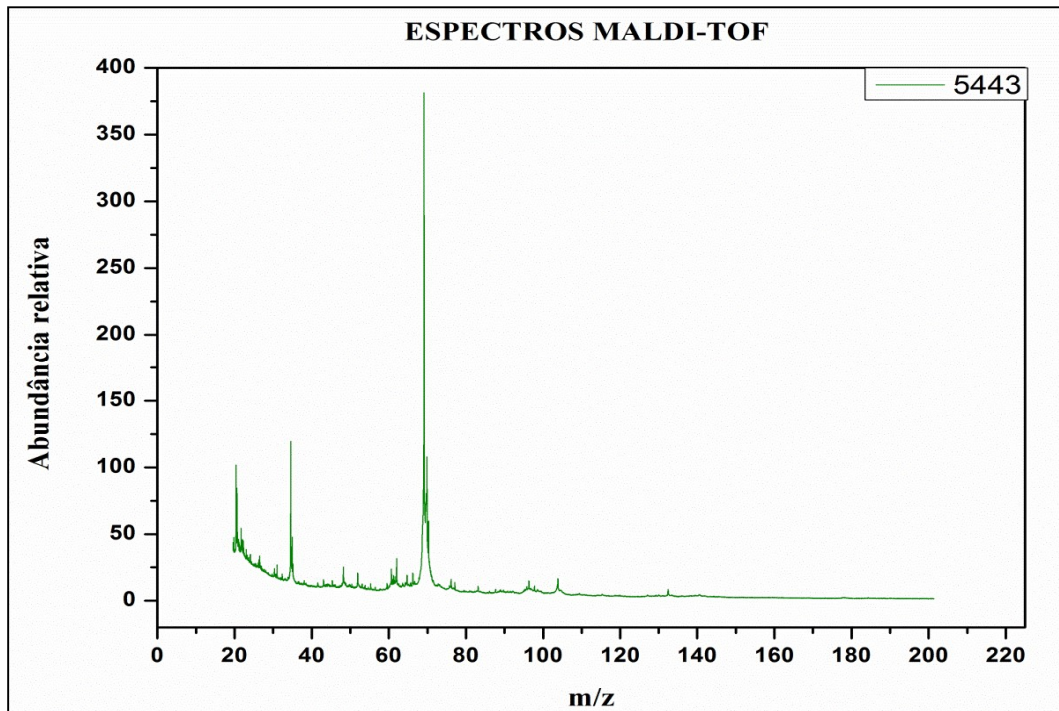
Figura 13 - Espectro de massa MALDI-TOF da levedura 5442, *Candida albicans*

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 14 - Espectro de massa MALDI-TOF da levedura 5396, *Pichia kudriavzevii*

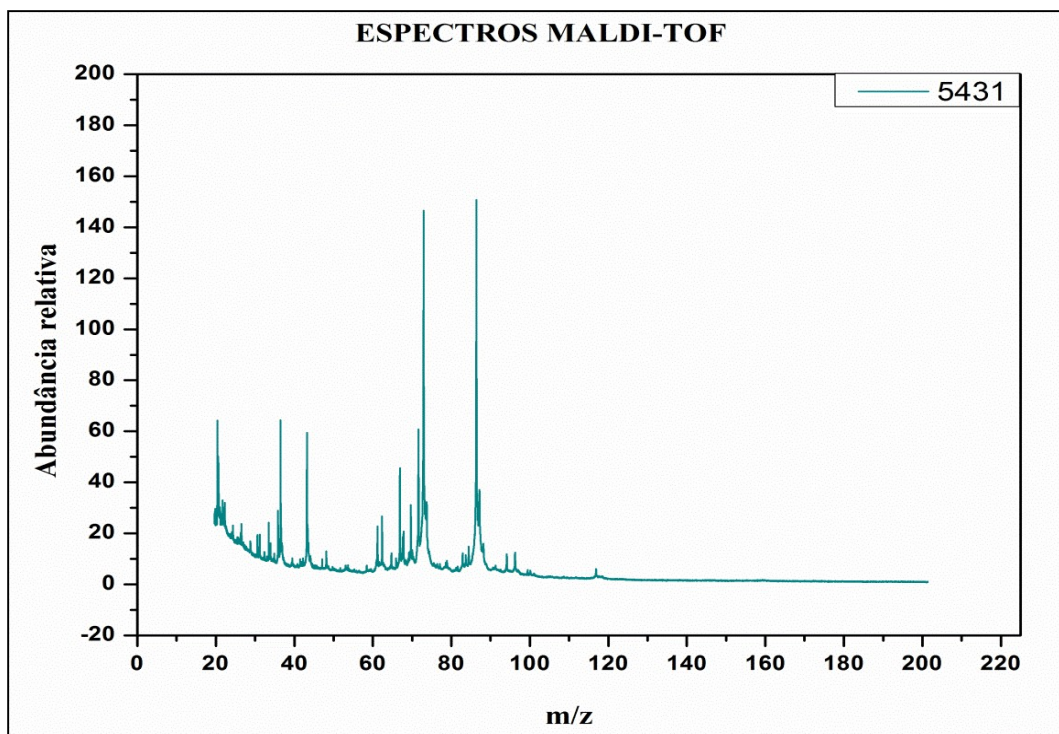
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 15 - Espectro de massa MALDI-TOF da levedura 5443,  
*Candida albicans*



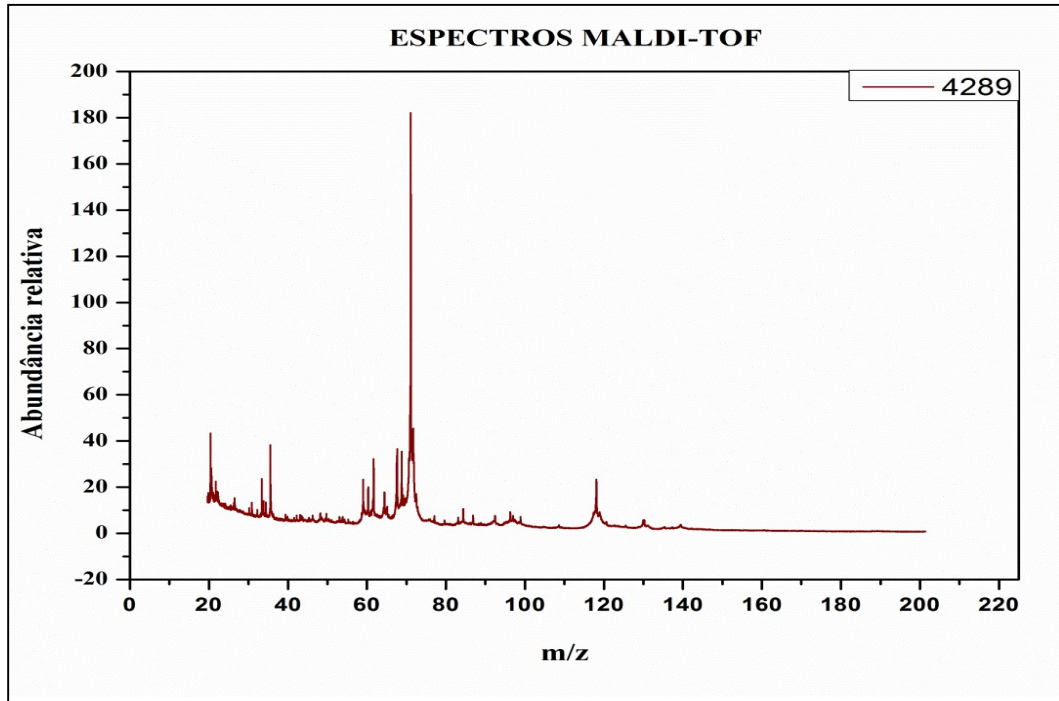
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 16 - Espectro de massa MALDI-TOF da levedura 5431, *Cryptococcus  
neoformans*



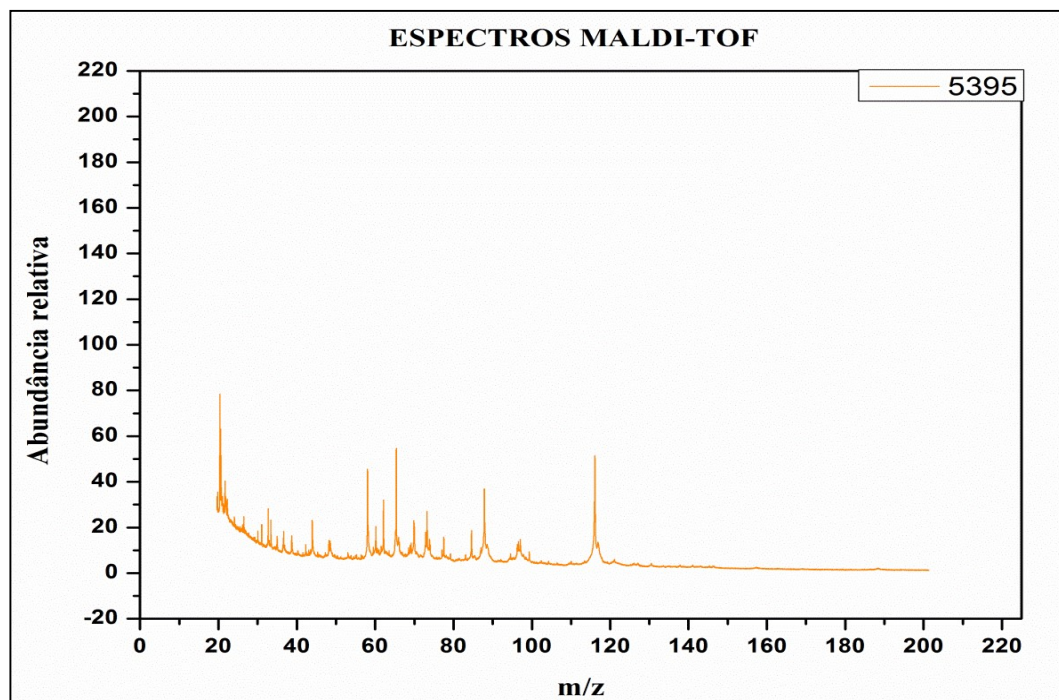
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 17 - Espectro de massa MALDI-TOF da levedura 4289, *Pichia kudriavzevii*



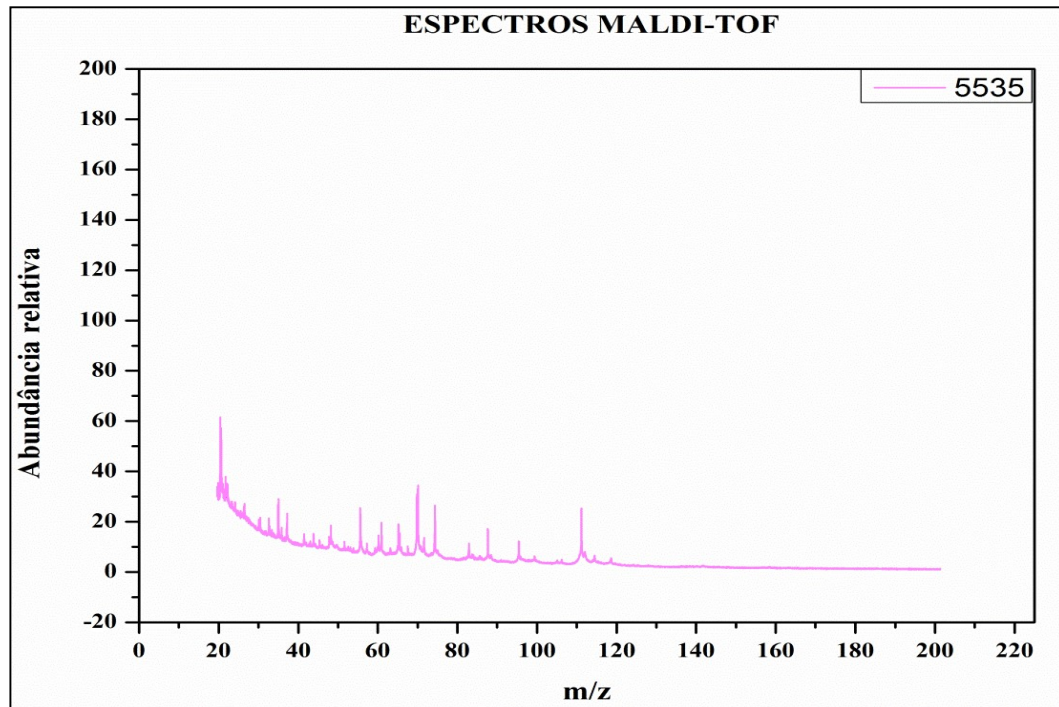
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 18 - Espectro de massa MALDI-TOF da levedura 5395, *Saccharomyces cerevisiae*



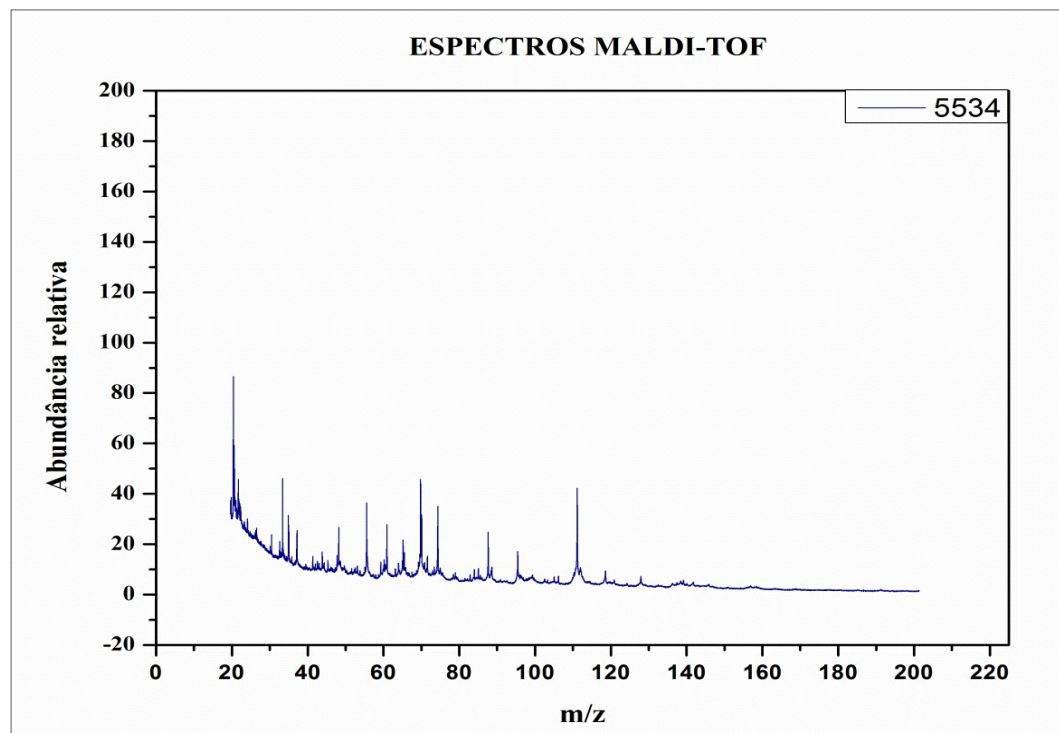
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 19 - Espectro de massa MALDI-TOF da levedura 5535, *Kluyveromyces marxianus*



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

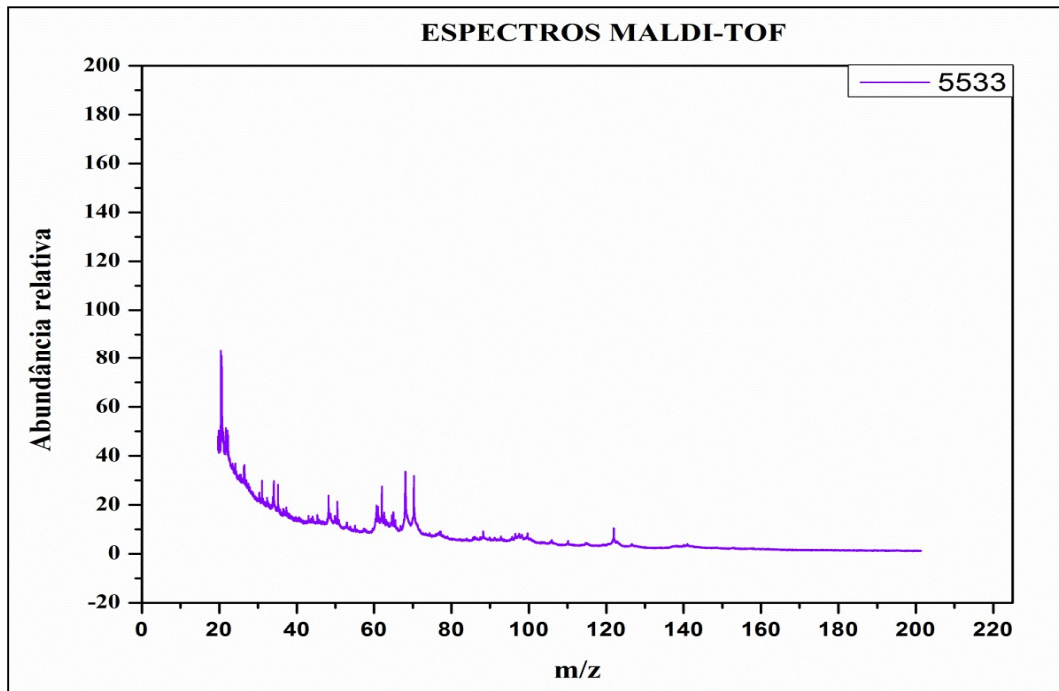
Figura 20 - Espectro de massa MALDI-TOF da levedura 5534, *Kluyveromyces marxianus*



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

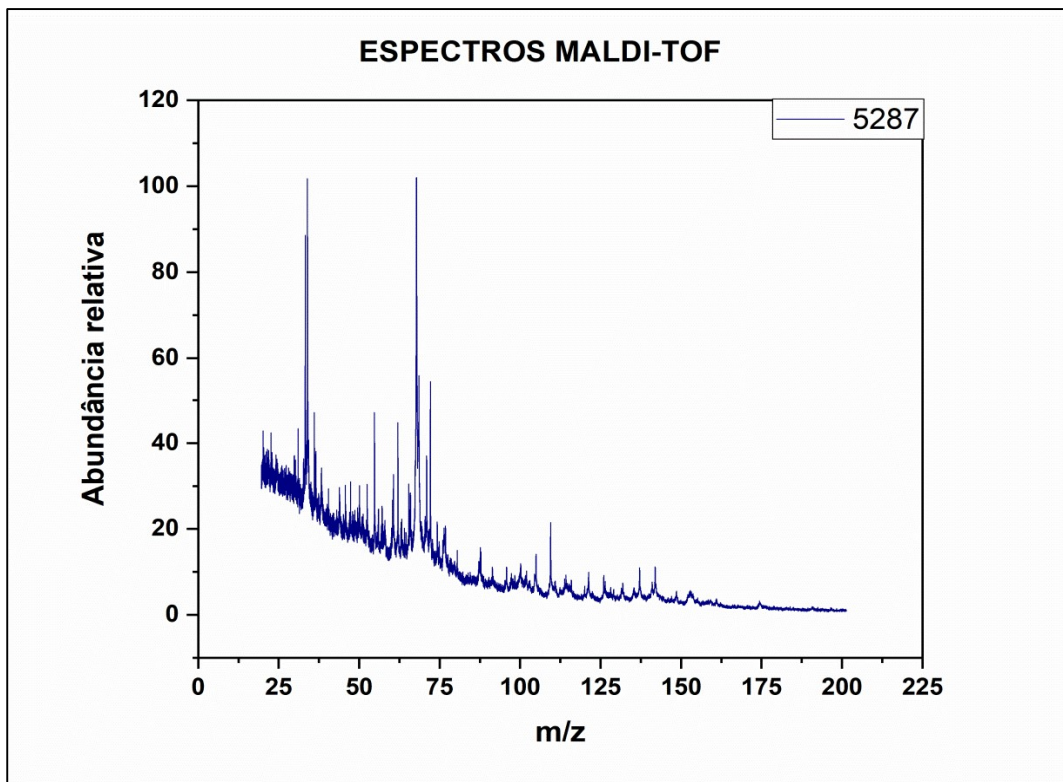


Figura 21 - Espectro de massa MALDI-TOF da levedura 5533,  
*Candida palmioleophila*



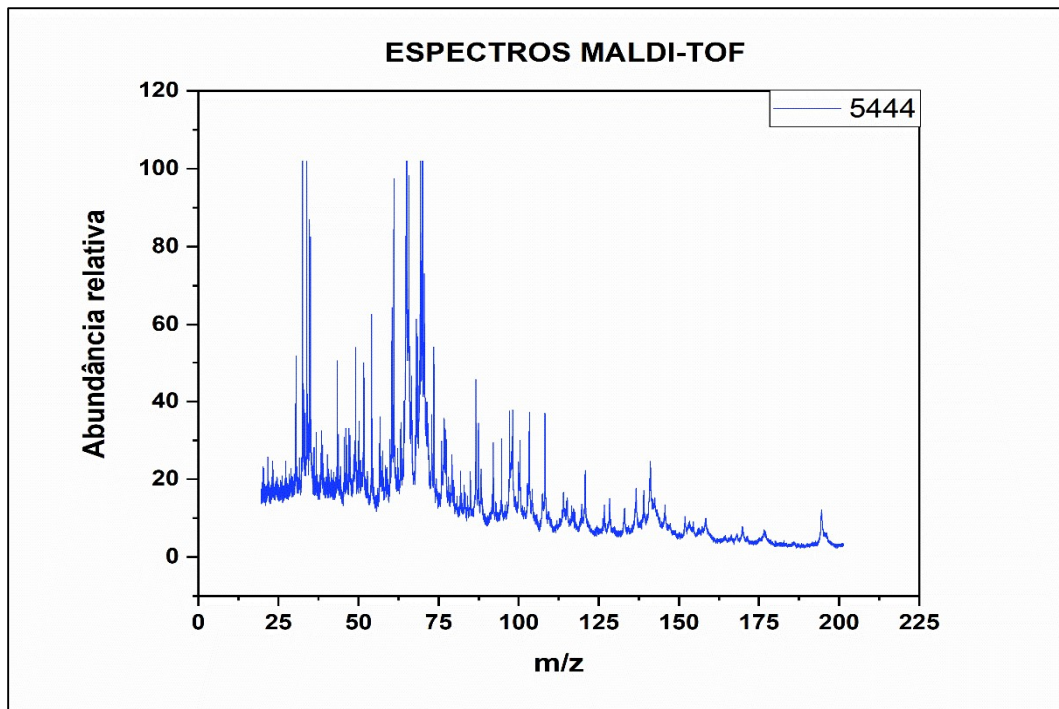
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 22 - Espectro de massa MALDI-TOF da levedura 5287, *Candida metapsilosis*



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 23 - Espectro de massa MALDI-TOF da levedura 5444, *Diutina rugosa*

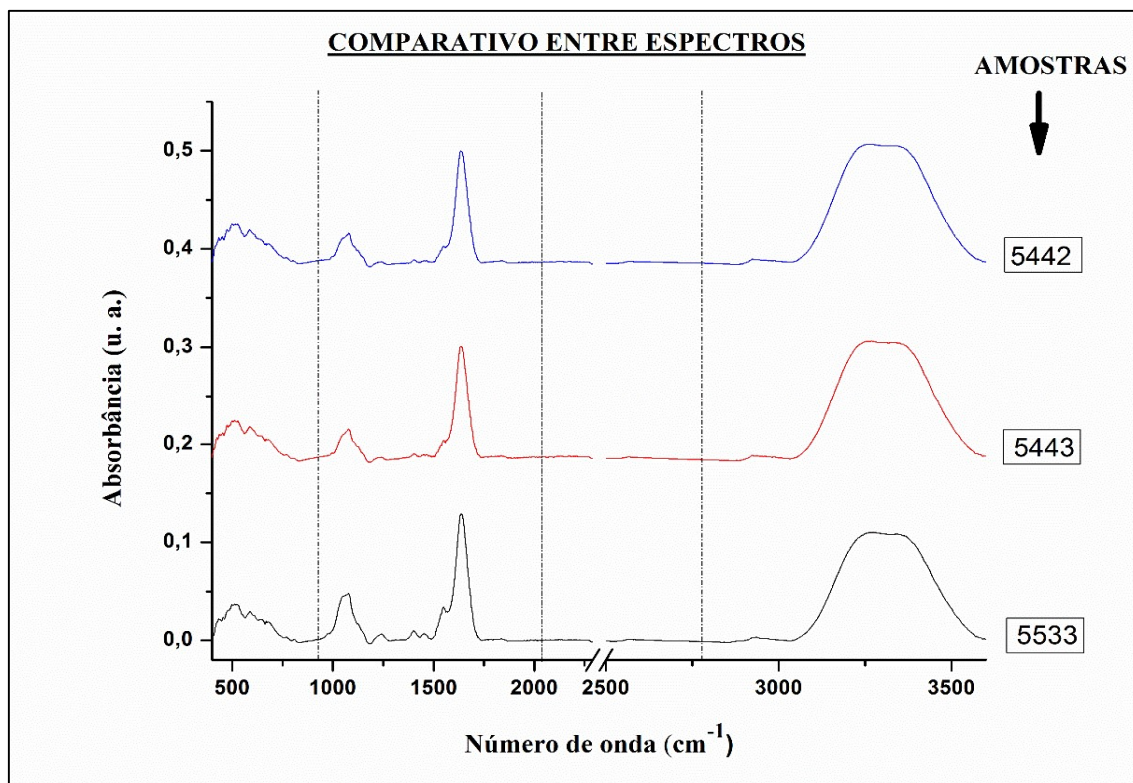


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS PELA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO – FTIR - ATR

Os espectros médios das leveduras estão apresentados a seguir. Na figura 24 são apresentados os espectros médios das amostras *Candida albicans* 5442, *Candida albicans* 5443 e *Candida palmioleophila* 5533.

Figura 24 - Espectros médios de FTMIR das amostras 5442 - *Candida albicans*, 5443 - *Candida albicans* e 5533 - *Candida palmioleophila*



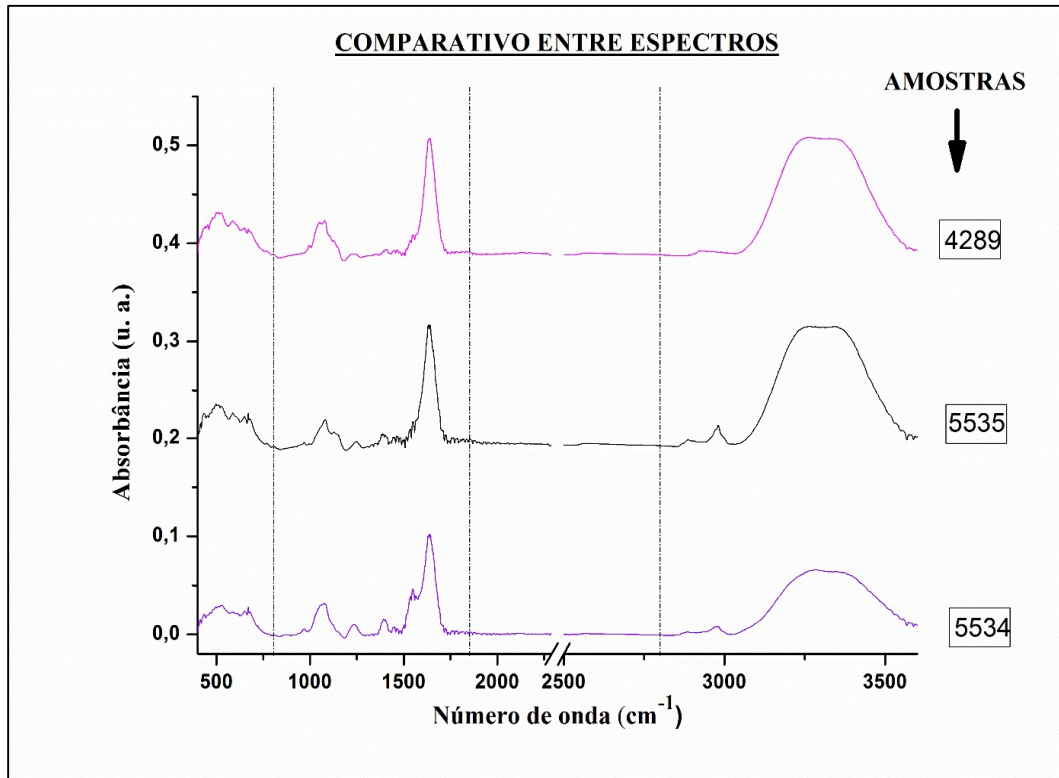
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Cabe destacar a proximidade dos valores obtidos em número de onda (cm<sup>-1</sup>) para cada amostra. As amostras 5443 (*Candida albicans*) e 5533 (*Candida palmioleophila*) apresentam uma banda idêntica em 509,31 cm<sup>-1</sup>, sendo que a amostra 5442 (*Candida albicans*) apresenta uma banda semelhante em 516,55 cm<sup>-1</sup>, indicando a presença de alquenos e aromáticos, devido a deformações angulares fora do plano das ligações (=CH) (BARBOSA, 2007). Considerando o intervalo de 2000 cm<sup>-1</sup> a 1000 cm<sup>-1</sup>, em que está contida a região denominada de ‘impressão digital’ (1300 – 900 cm<sup>-1</sup>), as amostras 5443 (*Candida albicans*) e 5442 (*Candida albicans*) apresentam bandas idênticas em 1075,19 cm<sup>-1</sup>, em 1233,53 cm<sup>-1</sup> e em 1633,82 cm<sup>-1</sup>, mostrando grande semelhança nas suas estruturas composicionais. A amostra 5533 (*Candida palmioleophila*) apresentou as bandas com absorção em 1067,95 cm<sup>-1</sup>, em 1241 cm<sup>-1</sup> e em 1633,82 cm<sup>-1</sup>, com características de grupos funcionais semelhantes às outras duas. De acordo com Santos *et al.* (2012) as bandas com absorção em 1075,19 cm<sup>-1</sup> e 1067,95 cm<sup>-1</sup> indicam a presença de deformações angulares de C-O-C e C-O-H de carboidratos presentes na parede celular, além de estiramento simétrico da ligação P=O do grupo fosfato característico dos ácidos nucleicos, logo caracterizando essas estruturas. Entretanto, as bandas com absorções em 1233,53 cm<sup>-1</sup> e 1241 cm<sup>-1</sup> estão dentro da região de deformação angular dos grupos CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> dos ácidos graxos; estiramento simétrico de C=O de carboxila (COO<sup>-</sup>); amida III de proteínas;

estiramento assimétrico da ligação P=O dos compostos com grupo fosfato. Em relação à banda cuja absorção se dá em  $1633,82\text{ cm}^{-1}$ , esta é característica de estiramento da ligação C=O do grupo éster e de ácidos nucleicos; amidas I e II de proteínas. A amostra 5533 (*Candida palmioleophila*) apresentou bandas na região de  $1399,92\text{ cm}^{-1}$  e  $1452,97\text{ cm}^{-1}$ , típicas da deformação angular dos grupos CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> dos ácidos graxos; estiramento simétrico de C=O de carboxila (COO<sup>-</sup>); amida III de proteínas; estiramento assimétrico da ligação P=O dos compostos com grupo fosfato. Além dessas, essa amostra também apresentou uma banda em  $1558,27\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento da ligação C=O do grupo éster e de ácidos nucleicos; amidas I e II de proteínas. No segmento de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $2900\text{ cm}^{-1}$  observou-se a presença de uma banda larga semelhante nas três amostras. Uma banda cuja absorção ocorre em  $3263,65\text{ cm}^{-1}$  nas amostras 5442 (*Candida albicans*) e 5443 (*Candida albicans*), típica de OH referente ao estiramento da ligação O-H de grupo hidroxila, presente em água, álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos; estiramento da ligação N-H de amida de proteínas. A amostra 5533 (*Candida palmioleophila*) apresentou a banda com característica semelhante em  $3265,70\text{ cm}^{-1}$ . Também observa-se a presença de uma banda de formato semelhante e pouco intenso nas amostras 5442 (*Candida albicans*) e 5443 (*Candida albicans*) na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$ , mas de valores iguais a  $2918,66\text{ cm}^{-1}$  e  $2932\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Entretanto, a amostra 5533 (*Candida palmioleophila*) apresenta uma banda fraca em  $2930\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença de lipídeos, grupamento de alcanos e ácidos graxos (OLESZKO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2014).

Outro comparativo entre espectros pode ser observado na figura 25 em que são apresentados os espectros médios da amostra 4289 *Pichia kudriavzevii*, 5535 *Kluyveromyces marxianus* e 5534 *Kluyveromyces marxianus*.

Figura 25 - Espectros médios de FTMIR das amostras 4289 - *Pichia kudriavzevii*, 5535 - *Kluyveromyces marxianus* e 5534 - *Kluyveromyces marxianus*



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

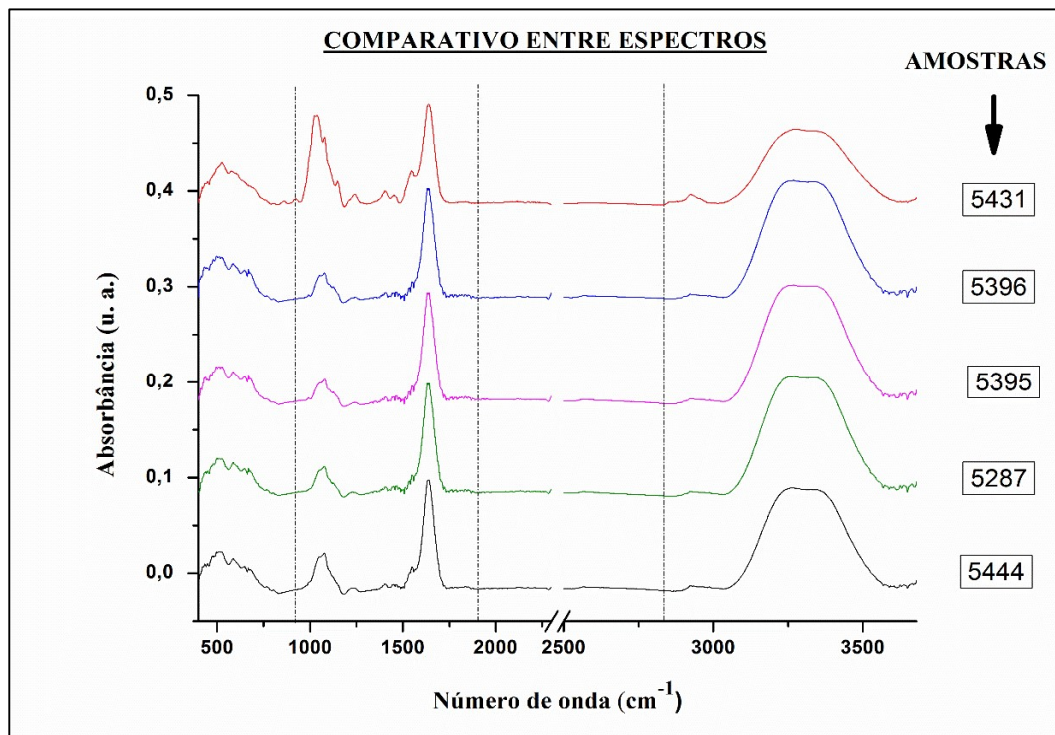
Em relação aos espectros das amostras 4289 (*Pichia kudriavzevii*), 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5535 (*Kluyveromyces marxianus*), destaca-se que na faixa de  $800 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , aproximadamente, os picos estão muito semelhantes entre as amostras 4289 (*Pichia kudriavzevii*) e 5535 (*Kluyveromyces marxianus*), com valores de número de onda de  $504,49 \text{ cm}^{-1}$  e  $578,44 \text{ cm}^{-1}$  para a amostra 4289 (*Pichia kudriavzevii*). Para a amostra 5535 (*Kluyveromyces marxianus*), os valores são de  $501,28 \text{ cm}^{-1}$  e  $592,11 \text{ cm}^{-1}$  e estão relacionados com a presença de grupos funcionais alcenos e aromáticos presentes nas leveduras na forma de aminoácidos, proteínas e lipídios em todas as suas organelas celulares (BARBOSA, 2007; TORTORA *et al.*, 2017; SANTOS, 2018). Na seleção de faixa seguinte, aproximadamente entre  $1800 - 800 \text{ cm}^{-1}$ , observa-se alguns picos que caracterizam, especificamente, cada amostra. Entre  $1250 \text{ cm}^{-1}$  a  $1000 \text{ cm}^{-1}$  as amostras 4289 (*Pichia kudriavzevii*), 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentam valores de bandas em  $1071,97 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1075,18 \text{ cm}^{-1}$  e  $1082,42 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. As mesmas amostras também apresentaram bandas em  $1234,34 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1233,53 \text{ cm}^{-1}$  e  $1248,81 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, de modo que, é importante ressaltar que nessa região ocorrem os picos característicos dos constituintes da membrana plasmática das leveduras (carboidratos, lipídeos), cuja função é permitir a entrada seletiva de nutrientes e também proteger a célula de perdas de moléculas importantes

(SANTOS, 2018; TORTORA *et al.*, 2017). Ainda dentro dessa seleção de faixa do espectro, precisamente entre 1800 – 1250  $\text{cm}^{-1}$ , a amostra 4289 (*Pichia kudriavzevii*) apresentou as bandas 1403,94  $\text{cm}^{-1}$  e 1632, 22  $\text{cm}^{-1}$ , a amostra 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentou os valores de bandas de 1399,92  $\text{cm}^{-1}$ , 1551,03 $\text{cm}^{-1}$ , 1633,82  $\text{cm}^{-1}$  e a amostra 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentou picos em 1384, 65  $\text{cm}^{-1}$  e 1633, 82  $\text{cm}^{-1}$ . Dentro desta faixa, cabe destacar como principais aqueles picos descritos em torno de 1600  $\text{cm}^{-1}$ . De acordo com Lopes *et al.* (2004) este está localizado dentro da região de estiramento de carbonila (1820 – 1630  $\text{cm}^{-1}$ ), o que corrobora para a comprovação dos grupos funcionais ácidos carboxílicos, amina, éster, amida que constituem as leveduras nas formas de aminoácidos, proteínas, glicoproteínas, carboidratos, lipídeos e polissacarídeos presentes em suas organelas celulares (SANTOS, 2018). Na faixa de seleção entre 2800 – 1800  $\text{cm}^{-1}$  não foram observadas bandas significativas e na faixa selecionada entre 3600 – 2800  $\text{cm}^{-1}$ , somente a amostra 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentou banda em 2889,57  $\text{cm}^{-1}$ , porém, as amostras 4289 (*Pichia kudriavzevii*), 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentaram bandas em 2924  $\text{cm}^{-1}$  (sinal fraco), 2980,92  $\text{cm}^{-1}$  (sinal pouco intenso) e 2975,82  $\text{cm}^{-1}$  (sinal intenso), respectivamente, indicando a presença de lipídeos, ácidos graxos de cadeia longa e grupos metila, conforme os trabalhos de Oleszko *et al.* (2017) e Wang *et al.* (2014). As mesmas amostras apresentaram valores de banda larga típica de estiramento OH em 3266,91  $\text{cm}^{-1}$ , 3287,64  $\text{cm}^{-1}$  e 3268,25  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Valores aproximados aos encontrados nas bandas das leveduras deste estudo foram reportados por Kaznowska *et al.* (2017), que fazem uma comparação dos espectros FTIR de vários tecidos do cólon humano: o de cólon saudável, o de cólon com lesão cancerosa, o de cólon pós-tratamento de quimioterapia e o de cólon com margem cirúrgica livre após ressecção de câncer colorretal. Considerando a semelhança entre as células humanas e leveduras é pertinente a associação com esta pesquisa. O estudo mostra que o tecido saudável analisado, tem o DNA representado pela presença das bandas em 1085  $\text{cm}^{-1}$  e 1249  $\text{cm}^{-1}$ , assim como nesta pesquisa a amostra 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentou bandas 1082,42  $\text{cm}^{-1}$  e 1248,81  $\text{cm}^{-1}$ , caracterizando, pois, componentes dos ácidos nucleicos e constituintes da membrana plasmática da célula. O pico típico de proteínas (amida II) está em 1550  $\text{cm}^{-1}$ , bem próximo ao valor encontrado na amostra 5534 (*Kluyveromyces marxianus*), que é 1551,03  $\text{cm}^{-1}$ . Em 1648  $\text{cm}^{-1}$  ocorre o pico típico de estiramento (C=O) de carbonila e de estiramento de ligação C-N de aminas primárias, aparecendo com valor aproximado em 1632,22  $\text{cm}^{-1}$  referente à amostra 4289 (*Pichia kudriavzevii*) e em 1633,82  $\text{cm}^{-1}$  para as amostras 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5535 (*Kluyveromyces marxianus*). As vibrações representadas pelos números de onda em 2872  $\text{cm}^{-1}$

e  $2958\text{ cm}^{-1}$  correspondem aos grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  de compostos lipídicos, de modo que somente a amostra 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentou um pico próximo em  $2889,57\text{ cm}^{-1}$ . A amostra 4289 (*Pichia kudriavzevii*) apresentou um pico aproximado em  $2924\text{ cm}^{-1}$ , já em relação à amostra 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) o valor mais próximo foi em  $2980,92\text{ cm}^{-1}$  e para a amostra 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) o pico correspondente mais próximo foi em  $2975,82\text{ cm}^{-1}$ . As vibrações correspondentes à OH de água são representadas pela banda larga em  $3250\text{ cm}^{-1}$ , sendo que o valor dessa banda é de  $3266,91\text{ cm}^{-1}$  para a amostra 4289 (*Pichia kudriavzevii*), de  $3287,64\text{ cm}^{-1}$  para a amostra 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) e de  $3268,25\text{ cm}^{-1}$  para a amostra 5535 (*Kluyveromyces marxianus*).

A figura 26 mostra o comparativo entre espectros das amostras 5431 *Cryptococcus neoformans*, 5396 *Pichia kudriavzevii*, 5395 *Sacharomyces cerevisiae*, 5287 *Candida metapsilosis* e 5444 *Diutina rugosa*.

Figura 26 - Espectros médios de FTMIR das amostras 5431 – *Cryptococcus neoformans*, 5396 – *Pichia kudriavzevii*, 5395 – *Sacharomyces cerevisiae*, 5287 - *Candida metapsilosis* e 5444 – *Diutina rugosa*



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A partir da análise comparativa entre os espectros, é possível observar bandas de carboidratos em todas as espécies, sendo que a amostra que apresentou o pico com maior

intensidade foi a 5431 (*Cryptococcus neoformans*) em 1037,24  $\text{cm}^{-1}$ . A amostra 5396 (*Pichia kudriavzevii*) apresentou o pico correspondente em 1082,42  $\text{cm}^{-1}$ , a amostra 5395 (*Sacharomyces cerevisiae*) em 1075,19  $\text{cm}^{-1}$ , a amostra 5287 (*Candida metapsilosis*) em 1075,19  $\text{cm}^{-1}$  e por fim, a amostra 5444 (*Diutina rugosa*) em 1082,42  $\text{cm}^{-1}$ . De acordo com os achados de Plata *et al.* (2013), que realizaram análise de espectroscopia no infravermelho médio para determinação de carboidratos em amostra de *Sacharomyces cerevisiae*, os picos entre 1250 e 900  $\text{cm}^{-1}$  correspondem à região de ocorrência de carboidratos. Já pelos estudos reportados por Taha *et al.* (2013) que utilizaram também a análise por FTIR para identificação de leveduras isoladas em humanos e animais, a região característica dos carboidratos é de 900 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Esses trabalhos corroboram para a ocorrência dos carboidratos nas regiões analisadas.

As características relacionadas às vibrações das moléculas devido ao grupo fosfato dos ácidos nucléicos ( $\text{PO}_2$ ) das células pode ser comprovada pela banda na amostra 5431 (*Cryptococcus neoformans*) em 1244,83  $\text{cm}^{-1}$ , de maior intensidade comparada às demais. Na amostra 5396 (*Pichia kudriavzevii*) em 1233,53  $\text{cm}^{-1}$ , na amostra 5395 (*Sacharomyces cerevisiae*) em 1241,57  $\text{cm}^{-1}$ , na amostra 5287 (*Candida metapsilosis*) em 1226,30  $\text{cm}^{-1}$  e na amostra 5444 (*Diutina rugosa*) em 1233,53  $\text{cm}^{-1}$ , conforme pode ser atestado pelo trabalho de Taha *et al.* (2013).

Especificamente, com relação à banda de amida II, somente a amostra 5431 (*Cryptococcus neoformans*) apresentou uma vibração nessa região em 1548,96  $\text{cm}^{-1}$ . De acordo com Taha *et al.* (2013), as vibrações referentes a essa estrutura aparecem na região entre 1480 e 1600  $\text{cm}^{-1}$ .

Com relação aos picos indicativos de amida I de proteínas características nas amostras, a amostra 5431 (*Cryptococcus neoformans*) apresentou um pico intenso em 1640  $\text{cm}^{-1}$  e as demais amostras: 5396 (*Pichia kudriavzevii*), 5395 (*Sacharomyces cerevisiae*), 5287 (*Candida metapsilosis*) e 5444 (*Diutina rugosa*) apresentaram um pico intenso em 1633,82  $\text{cm}^{-1}$ . Os trabalhos reportados por Plata *et al.* (2013) e por Taha *et al.* (2013) mencionam as contribuições dos espectros devido às ligações peptídicas de amida I na região de 1660  $\text{cm}^{-1}$  e na região entre 1600 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, ratificando a existência dessas estruturas nessa região.

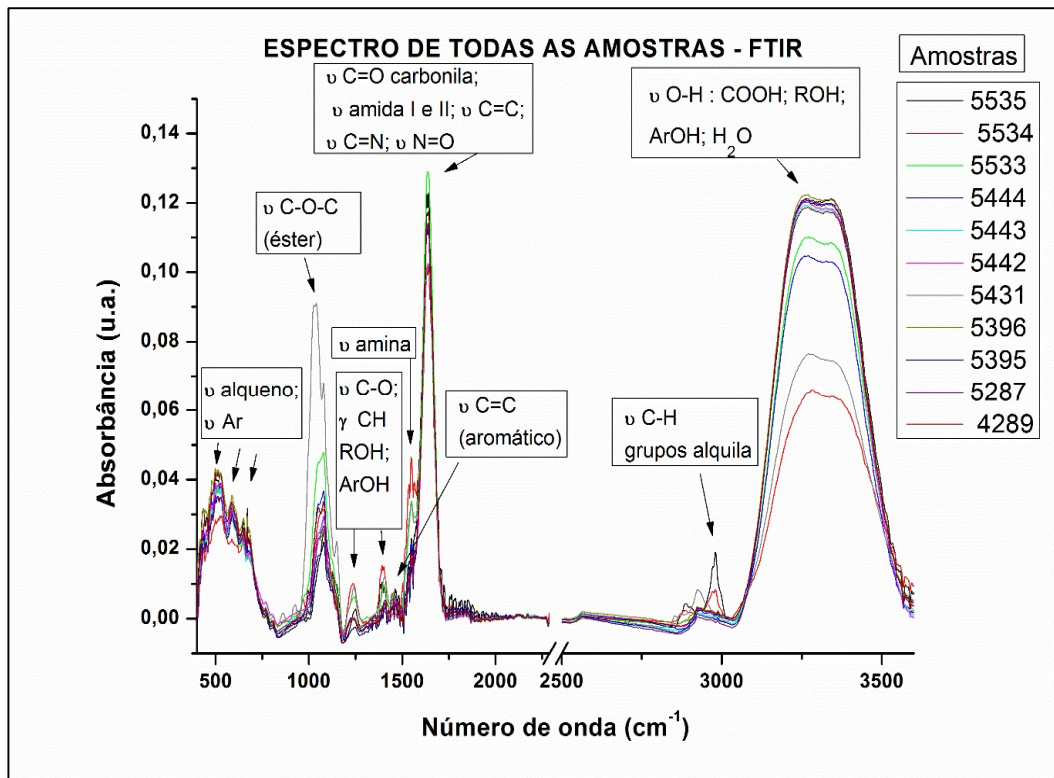
Todas as amostras apresentaram uma banda na região de 2900  $\text{cm}^{-1}$ . Para essa comparação, o pico da amostra 5431 (*Cryptococcus neoformans*) foi mais intenso, ocorrendo em 2923,25  $\text{cm}^{-1}$ , sendo que a amostra 5395 (*Sacharomyces cerevisiae*) também apresentou esse pico, porém de menor intensidade. O pico da amostra 5396 (*Pichia kudriavzevii*) ocorreu em 2928,36  $\text{cm}^{-1}$ , assim como o da amostra 5444 (*Diutina rugosa*). Já a amostra 5287 (*Candida*



*metapsilosis*) apresentou o pico correspondente em  $2937,54\text{ cm}^{-1}$ . De acordo com os dados reportados por Wang *et al.* (2014), a região de estiramentos assimétricos C-H de lipídeos vai de  $2997$  a  $2887\text{ cm}^{-1}$ , comprovando, assim, a ocorrência dessas estruturas nas amostras pela representação espectral.

Os espectros correspondentes às análises de todas amostras estão representados na Figura 27, com destaque para as regiões de absorção características de grupos funcionais específicos para as amostras de leveduras analisadas. É importante ressaltar que na região de  $2500\text{ cm}^{-1}$  foi feito um corte devido ao aparecimento de sinais de ruídos que não trouxeram informações significativas para a interpretação do espectro. Outra característica importante a se destacar é que, em torno de  $3263,65\text{ cm}^{-1}$ , especificamente para este trabalho, há a presença de bandas OH (hidroxila) de água e que são atestadas pelos estudos de Vinciguerra *et al.*, (2019) e Kaznowska *et al.* (2017), na região entre  $3700 - 3000\text{ cm}^{-1}$  e em  $3250\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, e representam os números de onda de vibrações dos grupos OH pertencentes à água. Nos espectros de infravermelho a água é a grande limitação da técnica, causando interferências nas análises e resultados, sobrepondo-se a outras bandas de grande importância para a caracterização de compostos. Na região destacada próximo a  $3000\text{ cm}^{-1}$ , onde há os estiramentos de ligação C-H de grupos alquila, é preciso enfatizar que esses picos identificam-se como típicos de ácidos graxos e lipídeos, pois como atesta Santos *et al.* (2012), essa é a região que vai de  $3000$  a  $2800\text{ cm}^{-1}$  correspondente aos estiramentos de grupos ( $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ) de ácidos graxos. Por fim, os picos que ocorrem na região de  $1660$  (mais intenso do espectro) a  $1550\text{ cm}^{-1}$  são devido à existência de estruturas proteicas, onde há o estiramento de ligações C=O de carbonila, contribuindo para a formação de estruturas de amina, éster, amida I e amida II, conforme reportado por Plata *et al.* (2013).

Figura 27 - Espectros médios de FTMIR das onze leveduras analisadas neste estudo



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Considerando o conjunto das principais bandas observadas nos espectros da figura 27, fez-se necessário elaborar uma tabela que possibilita fazer uma correlação das regiões de absorção no FTMIR, em  $\text{cm}^{-1}$ , com estruturas representativas de importância biológica nas estruturas celulares das leveduras.

A Tabela 2 estabelece uma conexão entre as principais regiões de absorção das amostras com os modos vibracionais e grupos funcionais característicos de composição química das estruturas das biomoléculas constituintes das leveduras deste estudo.

Tabela 2 – Relação entre modos vibracionais, grupos funcionais e estrutura de biomoléculas no espectro FTMIR - ATR

<b>Absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Modos Vibracionais</b>	<b>Grupo Funcional</b>	<b>Estrutura de importância biológica</b>
<b>509 - 511</b>	Deformação angular C-H alqueno/ aromático	<b>H-C = C-H/</b> ArOH	Aminoácidos Proteínas Lipídeos
<b>592</b>	Deformação angular C-H alqueno/aromático	<b>H-C = C-H/</b> ArOH	Aminoácidos Proteínas Lipídeos
<b>658 – 584</b>	Deformação angular C-H alqueno/aromático	<b>H-C = C-H/</b> ArOH	Aminoácidos Proteínas Lipídeos
<b>1034 – 1082</b>	Estiramento C-O-C (éster)	R-COO-R'	Membranas plasmáticas de células eucarióticas (lipídeos, carboidratos)
<b>1234</b>	Estiramento C-O álcool; C-O fenol Vibrações PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	R-OH e/ou ArOH R-PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Lipídeos Carboidratos ATP/DNA

(continuação)

<b>Absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Modos Vibracionais</b>	<b>Grupo Funcional</b>	<b>Estrutura de importância biológica</b>
<b>1396,7</b>	Estiramento C-O álcool; C-O fenol	R-OH e/ou ArOH	Lipídeos Carboidratos Proteínas
<b>1465 – 1370</b>	Vibrações de dobramento C-H de grupos metila/ etila	CH <sub>2</sub> / CH <sub>3</sub>	Lipídeos Carboidratos Proteínas
<b>1551</b>	Estiramento N-H: Def. angular N-H	R-CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Proteínas
<b>1600 – 1450</b>	Estiramento C=C (aromático)	ArOH	Ácidos nucleicos (DNA e RNA)
<b>1633</b>	Estiramento C=O (carbonila)	RCOOR' ; RCOOH ; RCOH; NH <sub>2</sub> -RHCOOH	Ácidos graxos Lipídeos Proteínas Carboidratos Ácidos nucleicos (DNA, RNA)
<b>2983,88</b>	Estiramento C-H grupos CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> e CH alcanos e grupos alquila	RCH <sub>3</sub> / RCH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Lipídeos Carboidratos Proteínas
<b>3262 – 3268</b>	Estiramento OH (Hidroxila)	COOH; ROH; ArOH; H <sub>2</sub> O	Lipídeos, carboidratos proteínas ácidos nucleicos (DNA, RNA)

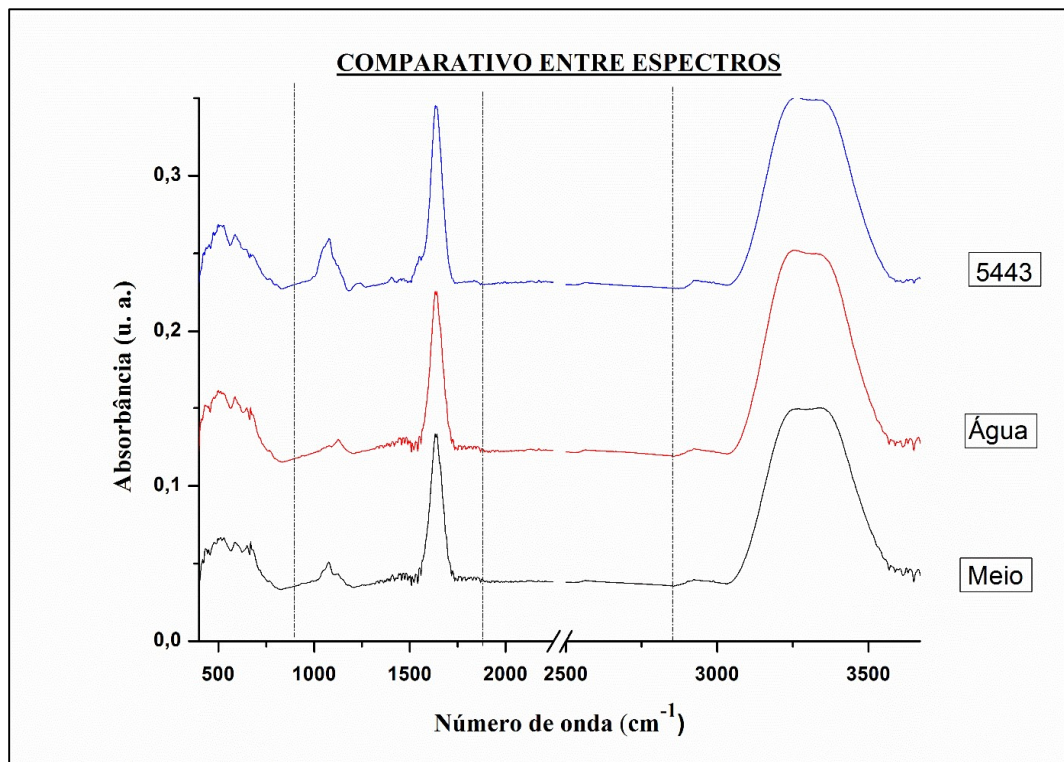
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

De acordo com Santos (2018), os polissacarídios presentes nas células de *Saccharomyces cerevisiae* estão presentes constituindo de 80% a 85% de sua parede celular, na forma de glucanas, mananas e de um polímero de N-acetilglicosamina, enquanto que os carboidratos constituem de 45 a 55% da sua composição. Glicoproteínas, lipídeos e ergosterol constituem a membrana plasmática. Enzimas, aminoácidos livres e lipídeos fazem parte da composição do núcleo. No citoplasma da célula há grandes quantidades de ribossomos e polifosfato, além de enzimas, carboidratos (glicogênio e trealose) e estima-se que de 1% a 5% do DNA das leveduras estão nessa organela. As leveduras também apresentam elevadas concentrações de vitaminas do complexo B, ácidos graxos de cadeia curta, nucleotídeos (ácidos nucleicos) e menos de 1% de fibra bruta.

As moléculas orgânicas são constituídas por átomos de carbono, basicamente, ligados ao átomo de hidrogênio, formando a cadeia ‘esqueleto de carbonos’, denominada como cadeia carbônica ‘hidrocarbonetos’. À medida que os átomos de hidrogênios dessa cadeia carbônica vão sendo substituídos por outros átomos como oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, por exemplo, vão surgindo os grupos funcionais característicos dos álcoois, ácidos carboxílicos, aminas, amidas, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, tiocompostos, fosfatos que, por sua vez, vão designar propriedades diferentes às moléculas orgânicas, de modo que algumas terão propriedades ácidas ou básicas, a depender do meio em que reagem (TORTORA *et al.*, 2017). Logo, a partir do agrupamento dos grupos funcionais formam-se as estruturas biológicas constituintes de todos os seres vivos.

Na figura 28, faz-se um comparativo entre os espectros obtidos da água destilada, do meio de cultura (BHI) e de uma das amostras, a 5443 *Candida albicans*, com o objetivo de observar semelhanças e diferenças nos espectros, além de possíveis interferências. A presença da banda larga na região de  $3263,65\text{ cm}^{-1}$  comprova a semelhança entre os analitos, atestando que a presença de água nesta região constitui o interferente nesta técnica.

Figura 28 - Espectros médios de FTMIR da água destilada, meio de cultura (BHI) e a amostra 5443 - *Candida albicans*



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

### 5.2.1 Análise de Componentes Principais dos dados obtidos por FTIR - ATR

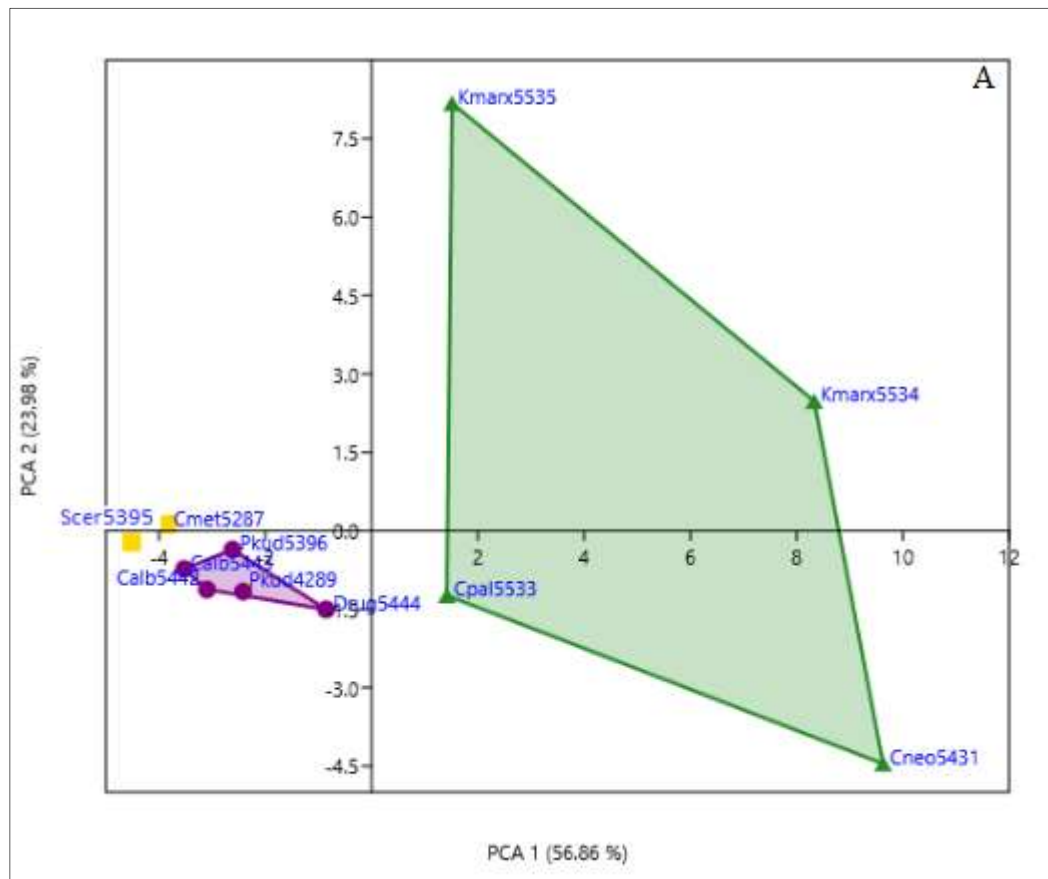
Os dois primeiros eixos da PCA explicaram 80,84 % da distribuição das amostras (56,86 % e 23,98 %), conforme pode ser observado na figura 29A.

A análise de *K-means* indicou a presença de três grupamentos, de acordo com as faixas de números de onda utilizados (figuras geométricas na Figura 29A). Um grupamento com as amostras de *Cryptococcus neoformans*, *Candida palmioleophila* e *Kluyveromyces marxianus* (duas amostras: 5534 e 5535) (figura em cor verde destacada). Outro grupamento formou-se com duas amostras de *Pichia kudriavzevii* (4289 e 5396), duas amostras de *Candida albicans* (amostras 5442 e 5443) e uma amostra de *Diutina rugosa* (5444) (figura em cor roxa destacada). E outro grupamento com duas amostras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida metapsilosis* (representadas em cor amarela).

Observa-se que, apesar de a PCA ter um fator de explicação alto nos dois primeiros eixos, a análise de identificação por semelhanças e distinção das espécies por números de ondas não foi suficiente para separar e agrupar por completo as espécies, embora pela análise de Cluster, os grupamentos fiquem mais evidentes. Entretanto, os resultados destacam a

proximidade de semelhanças entre algumas leveduras como as duas espécies de *Pichia kudriavzevii*, as duas espécies de *Candida albicans* e a *Diutina rugosa*, além das duas espécies de *Kluyveromyces marxianus* encontradas nas amostras de leite de vacas provenientes dos rebanhos analisados. As figuras 29 A e B trazem o resultado da análise de componentes principais (PCA) para as amostras analisadas.

Figura 29A - Resultado da Análise de Componentes Principais referente aos três grupos de leveduras agrupadas por similaridade



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A figura 29 B mostra o BIPLLOT, sendo possível observar a contribuição dos números de onda agrupados ao redor dos eixos X e Y e inferir, a partir da análise da figura 29A que, o grupamento constituído por *Kluyveromyces marxianus* (5534), *Kluyveromyces marxianus* (5535), *Cryptococcus neoformans* (5431) e *Candida palmioleophila* (5533) correlaciona com as faixas de números de onda descritos próximos ao eixo X, nos quadrantes superior e inferior direito, dentro da faixa que engloba, pela observação visual, de 1234 a 1541  $\text{cm}^{-1}$ ; e também com os números de onda descritos próximos ao eixo Y, nos quadrantes superior e inferior

direito, considerando a faixa representada no gráfico que mostra, pela inspeção visual direta, o  $2972\text{ cm}^{-1}$ ,  $2982\text{ cm}^{-1}$ ,  $1067\text{ cm}^{-1}$ ,  $1076\text{ cm}^{-1}$  e o  $2926\text{ cm}^{-1}$ . Logo, essas variáveis vão caracterizar essas amostras de acordo com os grupos funcionais químicos que elas representam e, conseqüentemente, irão se assemelhar por seus constituintes celulares. As amostras *Saccharomyces cerevisiae* (5395) e *Candida metapsilosis* (5287) estão muito próximas ao eixo X pelo lado esquerdo e, por isso, podem ser correlacionadas, pela inspeção direta, aos números de onda na faixa de  $3260 - 3281\text{ cm}^{-1}$ , além do  $1636\text{ cm}^{-1}$ , embora a amostra *Saccharomyces cerevisiae* (5395) esteja visualmente posicionada próxima ao eixo X voltada para o quadrante inferior e logo, pode ser caracterizada também pelas variáveis  $584\text{ cm}^{-1}$  e  $592\text{ cm}^{-1}$ . Assim também, o grupo das amostras de *Candida albicans* (amostras 5442 e 5443), *Pichia kudriavzevii* (4289 e 5396) e *Diutina rugosa* (5444), por estarem posicionadas próximas ao eixo X, no quadrante inferior esquerdo, sofrem influência dos números de onda  $584\text{ cm}^{-1}$  e  $592\text{ cm}^{-1}$ .

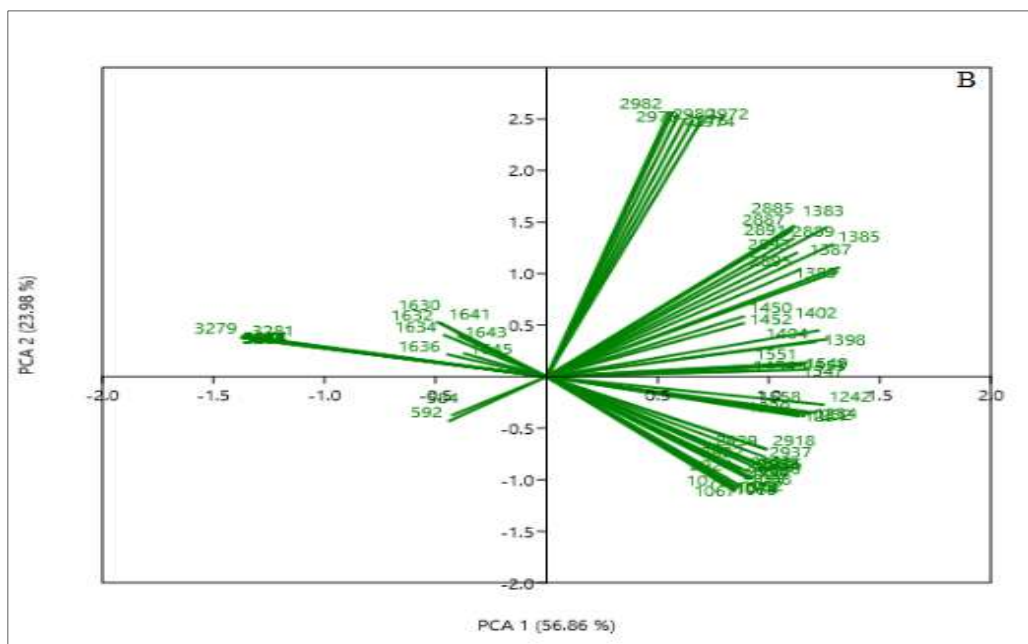
Sendo assim, diante dos agrupamentos observados na análise de PCA, verificou-se que as amostras representadas pela cor amarela, *Saccharomyces cerevisiae* (5395) e *Candida metapsilosis* (5287), agruparam-se no entorno no eixo X, sendo caracterizadas pelas variáveis ao redor de  $3200\text{ cm}^{-1}$  que, como já discutido, anteriormente, corresponde à região de estiramento de ligação O-H de grupo hidroxila, com interferência de banda de água e, possivelmente, por isso também a dificuldade de ocorrer agrupamentos mais específicos, mas confirmando que nessas amostras há a presença da carbonila (C=O), que sinaliza para comprovação das funções ácido carboxílico, amidas e ésteres, constituindo as proteínas e lipídeos dessas amostras (BARBOSA, 2007). Contudo, a amostra *Saccharomyces cerevisiae* (5395), pela sua localização na Figura 29A, também sofre influência das variáveis que caracterizam o grupo das amostras de *Candida albicans* (5442 e 5443), *Pichia kudriavzevii* (4289 e 5396) e *Diutina rugosa* (5444) (representado pela cor roxa), sendo os números de onda  $584\text{ cm}^{-1}$  e  $592\text{ cm}^{-1}$  os de maior explicação para essas amostras. Conforme reportado por Barbosa (2013), os números de onda representados dentro da região de  $900 - 500\text{ cm}^{-1}$  constituem bandas intensas e são típicas de deformação angular fora do plano de ligações =C-H, representando tanto compostos heteroaromáticos, quanto alquenos e têm, fundamentalmente, um caráter confirmativo de todas as demais bandas do espectro sinalizadas entre  $4000 - 1300\text{ cm}^{-1}$ . Ademais, Plata *et al.* (2013) em seus achados, a partir da aquisição do espectro no infravermelho médio para amostras de *Pichia pastoris* sob diferentes formas de cultivo, reportaram, a partir da observação de bandas na região de impressão digital ( $900 - 1800\text{ cm}^{-1}$ ) um novo método para distinguir células dessa espécie.

Em contrapartida, para o grupo de amostras representado pela cor verde, composto por



*Cryptococcus neoformans* (5431), *Candida palmioleophila* (5533) e *Kluyveromyces marxianus* (5534 e 5535), é possível considerar a influência das variáveis  $1234\text{ cm}^{-1}$ ,  $1242\text{ cm}^{-1}$  e  $1558\text{ cm}^{-1}$ , no entorno do eixo X, quadrante inferior direito, para as amostras 5431 e 5533. Picos em torno de  $1249\text{ cm}^{-1}$  denotam vibrações relativas às moléculas de DNA e outro próximo a  $1550\text{ cm}^{-1}$ , remete à região típica de grupo funcional de proteína, especificamente, amida secundária (KAZNOWSKA *et al.*, 2017). Com relação à amostra *Kluyveromyces marxianus* (5535), pela sua localização, será fortemente influenciada pelas variáveis próximas ao eixo Y, no quadrante superior direito, sendo elas  $2982\text{ cm}^{-1}$ ,  $2972\text{ cm}^{-1}$ ,  $2980\text{ cm}^{-1}$ ,  $2974\text{ cm}^{-1}$  e outras. Como reportado nos trabalhos de Santos *et al.* (2012) e Oleszko *et al.* (2017), bandas na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$  revelam a ocorrência de vibrações de estiramento simétrico e assimétrico de grupos metila de ácidos graxos, bem como lipídeos, ésteres de colesterol e aminoácidos. Por fim, devido ao posicionamento da amostra *Candida palmioleophila* (5533) nas proximidades do eixo Y, no quadrante inferior direito, ela é fortemente influenciada pelas variáveis  $1067\text{ cm}^{-1}$ ,  $1076\text{ cm}^{-1}$ ,  $2926\text{ cm}^{-1}$  e outras, de modo que esses números de onda são característicos da ocorrência de estiramento simétrico de fosfolipídeos e também pelas vibrações de estiramento assimétrico de grupos metila, de lipídeos e de ácidos graxos de cadeia longa (OLESZKO *et al.*, 2017).

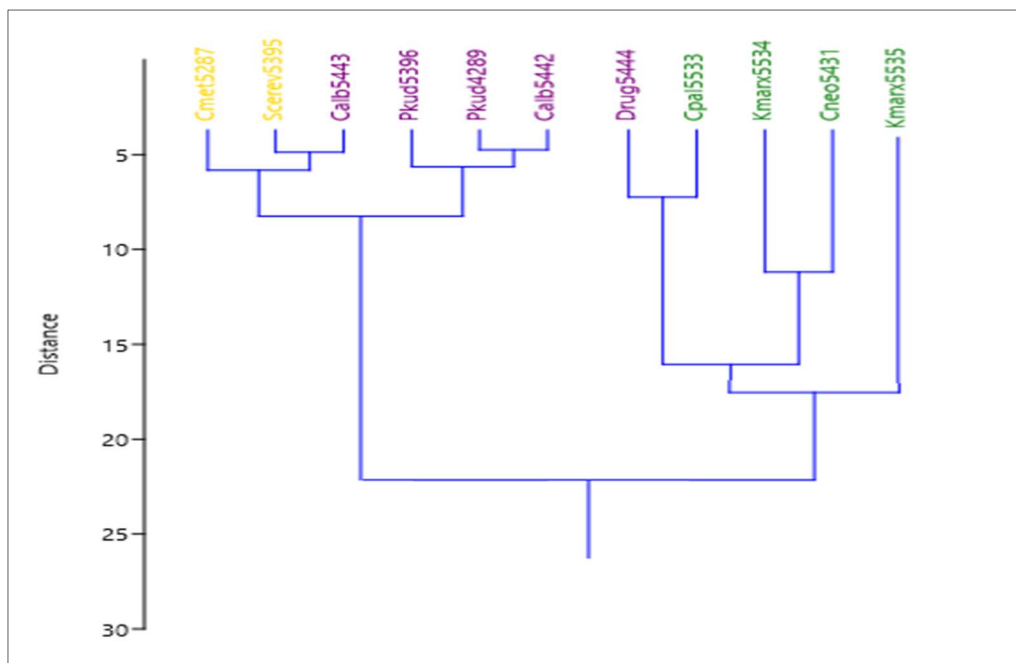
Figura 29B - Análise de Componentes Principais representada através do BIPLLOT, observando-se a contribuição dos números de onda no entorno dos eixos 1 e 2



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A figura 30 descreve os clusters relacionando as espécies de leveduras aos números de onda em  $\text{cm}^{-1}$  (variáveis) das amostras analisadas e separados por grupos de maior afinidade. Através dos clusters é possível observar essas diferenças mais claramente, por comparação das distâncias entre os nós dos três grupamentos. O grande grupo representado pelas amostras de *Candida albicans* (5442 e 5443), *Candida metapsilosis* (5287), *Saccharomyces cerevisiae* (5395) e *Pichia kudriavzevii* (4289 e 5396) compõe um nó indicando semelhanças entre elas. O outro grupo representado pelas amostras de *Kluyveromyces marxianus* (5534 e 5535), *Candida palmioleophila* (5533), *Cryptococcus neoformans* (5431) e *Diutina rugosa* (5444) mostram semelhanças entre si e diferenças em relação ao outro grupo, por seus nós estarem numa distância maior em relação ao outro grupo. Assim, verifica-se que o diferencial entre esses dois grupos fica marcado pela distância entre os nós, pois quanto maior a distância entre os nós de ligação das amostras, maior é a diferença entre os grupos, embora eles estejam ligados entre si e com um padrão de agrupamento idêntico à análise de *k-means*.

Figura 30 - Cluster das espécies de leveduras analisadas com base nos números de onda selecionados das amostras



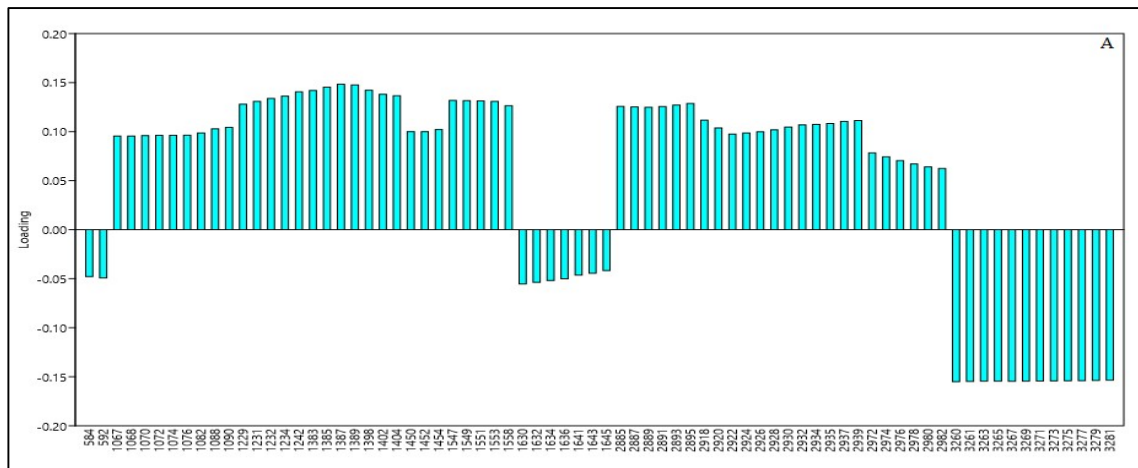
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A descrição dos números de onda das amostras podem ser correlacionados pela observação da figura 31 A e B do maior pico tanto na PCA 1, quanto na PCA 2, respectivamente. Para o primeiro eixo, o número de onda de maior importância foi 1387

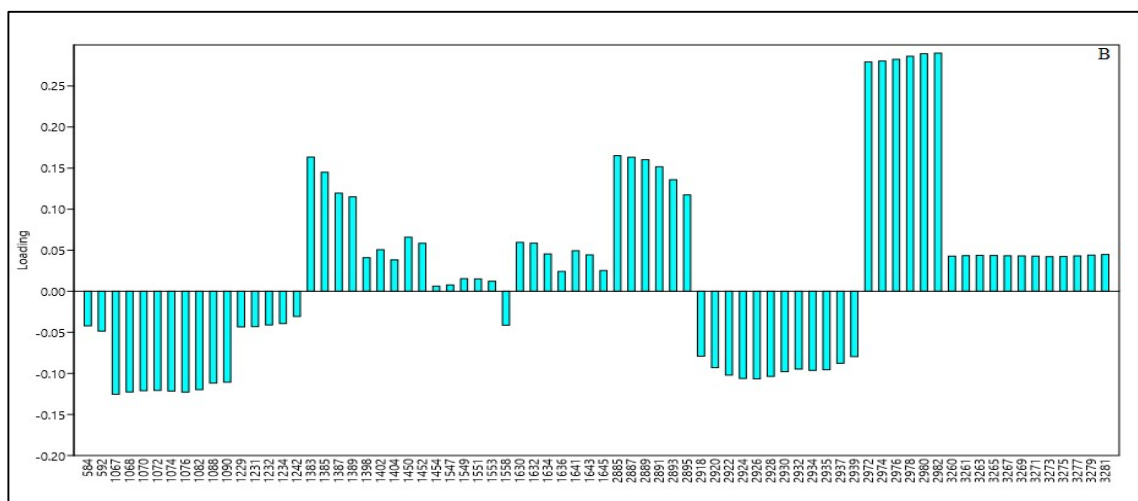
(correspondente à faixa entre 1383 – 1398  $\text{cm}^{-1}$ ), apresentando uma correlação de 0,15 (Figura 31 A). Para o segundo eixo, o número de onda de maior relevância foi 2982 (correspondente à faixa entre 2918-2982), com correlação de 0.30 (Figura 31 B).

O número de onda na região de 1300  $\text{cm}^{-1}$  é característico de grupamento fosfato de ácidos nucleicos, enquanto o número de onda na faixa de 3050 – 2800  $\text{cm}^{-1}$  caracteriza-se pela presença de grupos funcionais típicos de ácidos graxos, conforme reportado por Taha *et al.* (2013).

Figura 31 - (A) Gráfico correspondente ao *loading* PCA 1. (B) Gráfico correspondente ao *loading* PCA 2



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

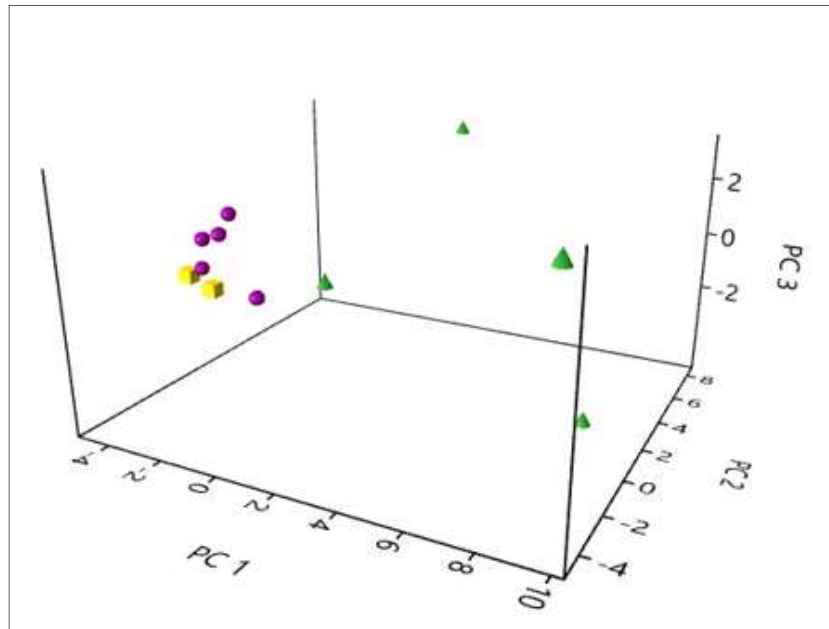


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A figura 32 mostra o resultado da PCA das amostras em um gráfico 3D, onde é possível observar a contribuição dos três eixos PC1, PC2 e PC3, sendo que a soma dos dois primeiros

eixos tem maior peso sobre o resultado, tendo em vista que o somatório das porcentagens de variância dos demais eixos não influenciam no resultado final da análise.

Figura 32 - Resultado da PCA em um gráfico 3D

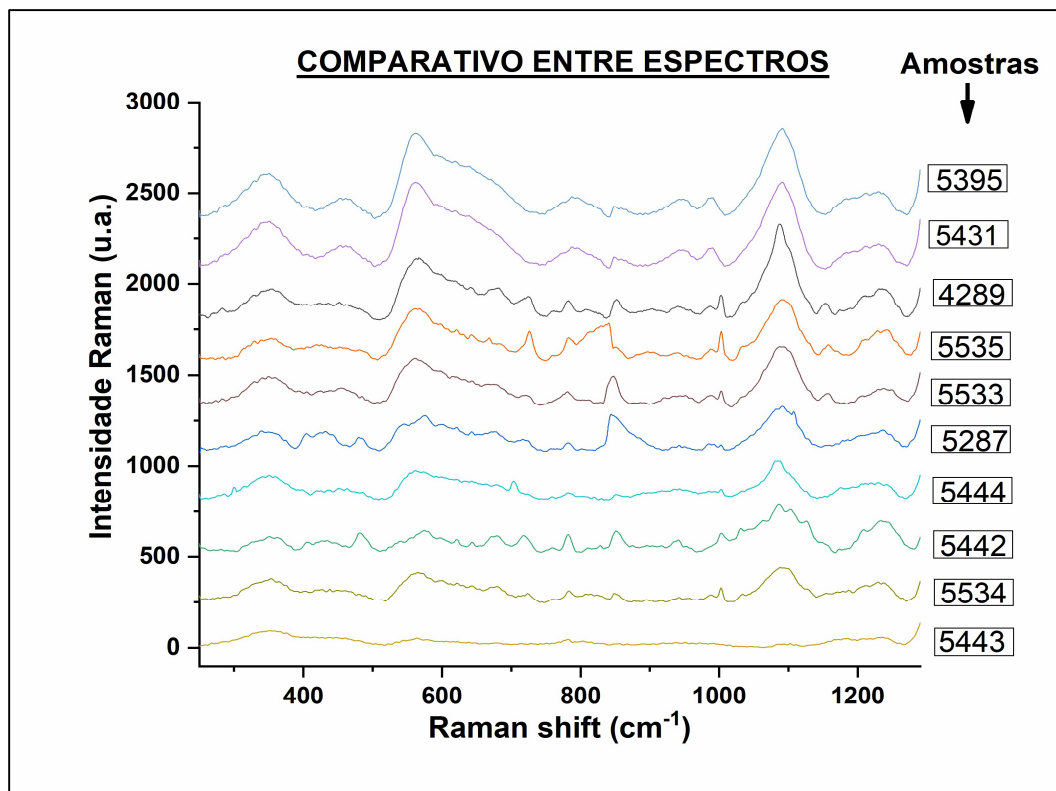


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS PELA ESPECTROSCOPIA RAMAN

Através do comparativo dos espectros Raman observado na figura 33 para dez amostras analisadas, na faixa de números de onda – ‘range’ entre 250 e 1323  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar que boa parte das amostras apresentaram picos evidentes com valores próximos ou semelhantes.

Figura 33 - Espectros médios Raman na região entre 250 e 1323  $\text{cm}^{-1}$  das amostras 5395 - *Saccharomyces cerevisiae*, 5431 - *Cryptococcus neoformans*, 4289 - *Pichia kudriavzevii*, 5535 - *Kluyveromyces marxianus*, 5533 - *Candida palmiophila*, 5287 - *Candida metapsilosis*, 5444 - *Diutina rugosa*, 5442 - *Candida albicans*, 5534 - *Kluyveromyces marxianus*, 5443 - *Candida albicans*



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

As amostras 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*), 5431 (*Cryptococcus neoformans*), 4289 (*Pichia kudriavzevii*) e 5443 (*Candida albicans*), apresentaram uma banda em  $563 \text{ cm}^{-1}$ . De acordo com as investigações de Lemma *et al.* (2019), os sinais de bandas nesta região podem ser atribuídos à timina (T), citosina (C) e guanina (G), que são os nucleotídeos constituintes da dupla fita de DNA da célula, embora estejam misturados aos modos de estiramentos C-C do aminoácido Phenilalanina – Phe. Valores de bandas próximas a esta foram encontrados para as amostras 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5444 (*Diutina rugosa*) em  $566,1 \text{ cm}^{-1}$  e para as amostras 5287 (*Candida metapsilosis*) e 5442 (*Candida albicans*) em  $575,3 \text{ cm}^{-1}$ . A amostra 5533 (*Candida palmiophila*) apresentou uma banda em  $560 \text{ cm}^{-1}$  e a amostra 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentou a banda em  $569,2 \text{ cm}^{-1}$ , indicando características semelhantes de composição. Correlação semelhante pode ser feita com a pesquisa de De Gelder *et al.* (2007), que descreveram referências de espectros Raman de moléculas biológicas, os

componentes do DNA e RNA presentes nas células, de modo que os nucleotídeos apresentam os valores de bandas: adenina (A) em  $560\text{ cm}^{-1}$ , citosina (C) em  $568\text{ cm}^{-1}$ , guanina (G) em  $563\text{ cm}^{-1}$ , timina (T) em  $561\text{ cm}^{-1}$  e uracila (U) em  $556\text{ cm}^{-1}$ .

Também foram observados valores de números de onda na região de  $720\text{ cm}^{-1}$ . As amostras 4289 (*Pichia kudriavzevii*), 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentaram uma banda comum em  $726,3\text{ cm}^{-1}$ , enquanto as amostras 5533 (*Candida palmioleophila*) e 5287 (*Candida metapsilosis*) apresentaram uma banda em  $723,3\text{ cm}^{-1}$ . Entretanto, as amostras 5442 (*Candida albicans*) e 5443 (*Candida albicans*) apresentaram uma banda idêntica em  $717,1\text{ cm}^{-1}$  e a amostra 5444 (*Diutina rugosa*) apresentou uma banda em  $704,8\text{ cm}^{-1}$ . Os estudos de Fernández-Manteca *et al.* (2023), Lemma *et al.* (2019) e Samek *et al.* (2014) atribuem a banda observada em  $725\text{ cm}^{-1}$ ,  $724\text{ cm}^{-1}$  e  $720\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, ao componente adenina (A) presente no DNA das células.

Algumas bandas de número de onda  $846,6\text{ cm}^{-1}$  foram comuns às amostras 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*), 5431 (*Cryptococcus neoformans*), 5533 (*Candida palmioleophila*) e 5287 (*Candida metapsilosis*), ao passo que outras apresentaram bandas em  $852,7\text{ cm}^{-1}$ , sendo elas: 4289 (*Pichia kudriavzevii*), 5444 (*Diutina rugosa*) e a 5442 (*Candida albicans*). A amostra 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentou a banda, nesta região, em  $843,5\text{ cm}^{-1}$  e a amostra 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentou a banda em  $849,7\text{ cm}^{-1}$ . A partir da pesquisa de De Gelder *et al.* (2007), referente à espectroscopia Raman de moléculas biológicas, pode-se inferir que essas bandas são referentes aos aminoácidos Glicina, L-Alanina, L-Valina, L-Serina, L-Glutamato, L-Arginina, L-Phenylalanina, L-Tirosina, L-Triptofano, L-Histidina e L-prolina, que constituem as proteínas das células das leveduras.

A fenilalanina é um importante aminoácido aromático por ser essencial às funções metabólicas das células, estando presente nas proteínas e enzimas, de forma geral. As amostras 4289 (*Pichia kudriavzevii*), 5535 (*Kluyveromyces marxianus*), 5533 (*Candida palmioleophila*), 5444 (*Diutina rugosa*), 5442 (*Candida albicans*) e 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentaram um pico comum e bem definido em  $1003,8\text{ cm}^{-1}$  típico desse aminoácido. Enquanto as amostras 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*), 5431 (*Cryptococcus neoformans*) e 5287 (*Candida metapsilosis*) apresentaram o pico correspondente a este aminoácido em  $988,4\text{ cm}^{-1}$ . Os trabalhos de Chouthai *et al.* (2015), De Gelder *et al.* (2007), Lemma *et al.* (2019) e Fernández-Manteca *et al.* (2023) reportam as bandas referentes à fenilalanina em  $1003\text{ cm}^{-1}$ ,  $1004\text{ cm}^{-1}$ ,  $1003\text{ cm}^{-1}$  e  $1009\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, o que corrobora para a efetividade deste estudo. Com relação ao pico correspondente à fenilalanina, o trabalho de Hu *et al.* (2020), ao utilizar o espalhamento Raman (SERS) para identificar e distinguir espécies de *Cryptococcus*

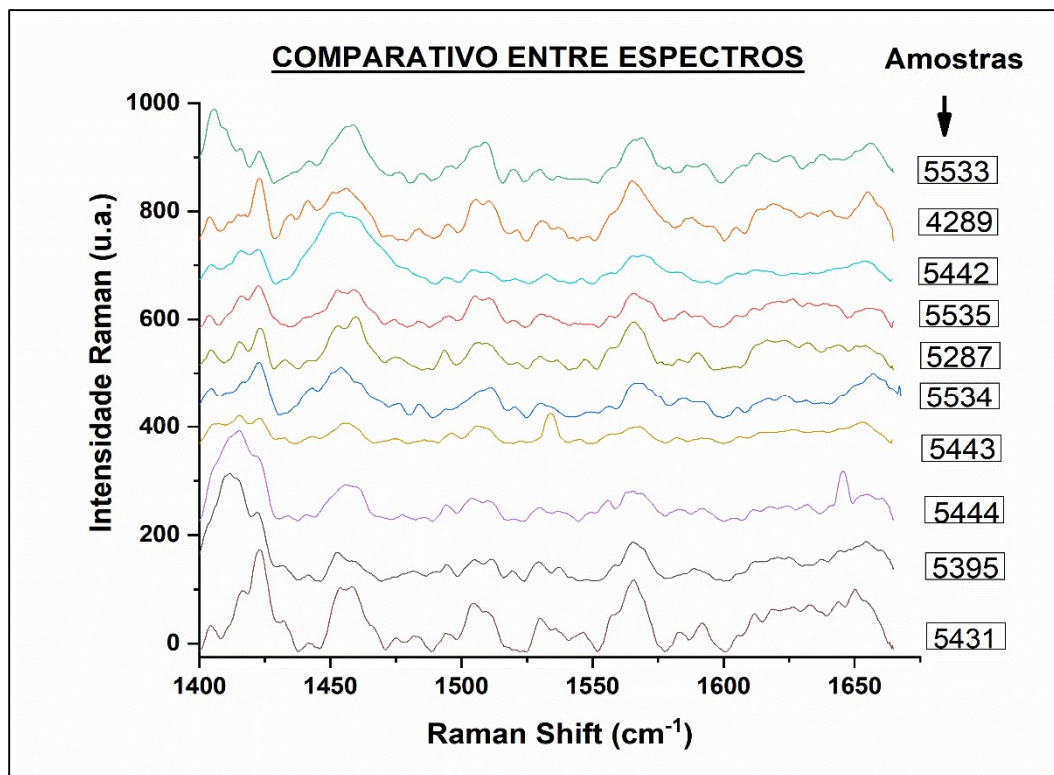
*neoformans* e *Cryptococcus gattii* por meio de nanopartículas de prata, destaca o pico em 1008  $\text{cm}^{-1}$  para este aminoácido, um valor bem próximo ao encontrado neste trabalho para a amostra 5431 (*Cryptococcus neoformans*), que foi em 988,4  $\text{cm}^{-1}$ .

Com relação às bandas atribuídas às proteínas, devido ao estiramento C-N, ácidos nucleicos, ácidos graxos e gordura, temos as amostras 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*), 5533 (*Candida palmioleophila*) e 5287 (*Candida metapsilosis*), que apresentaram uma banda em 1090,1  $\text{cm}^{-1}$ ; as amostras 5431 (*Cryptococcus neoformans*), 4289 (*Pichia kudriavzevii*) e 5442 (*Candida albicans*), que apresentaram a banda correlacionada em 1087,0  $\text{cm}^{-1}$ ; as amostras 5535 (*Kluyveromyces marxianus*), 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5443 (*Candida albicans*), que apresentaram a banda em 1093,2  $\text{cm}^{-1}$  e, por fim, a amostra 5444 (*Diutina rugosa*) apresentou uma banda em 1083,9  $\text{cm}^{-1}$ , região próxima às demais. Relacionados a esses achados, Fernández-Manteca *et al.* (2023) destacam na região de 1090  $\text{cm}^{-1}$  uma banda devido ao estiramento C-N; de Lemma *et al.* (2019) atribuem as bandas em 1089  $\text{cm}^{-1}$ , 1091  $\text{cm}^{-1}$  e 1092  $\text{cm}^{-1}$  às ligações ( $\text{PO}_2^-$ ) constituintes do grupo fosfato que compõe o DNA da célula. Além desses, a investigação de De Gelder *et al.* (2007) correlacionou bandas em 1084  $\text{cm}^{-1}$ , 1092  $\text{cm}^{-1}$ , 1099  $\text{cm}^{-1}$  e 1100  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos ácidos graxos saturados como láurico, mirístico, palmítico e esteárico.

Por fim, as amostras apresentaram bandas na região de 1200  $\text{cm}^{-1}$ , que são típicas dos sacarídeos (carboidratos). As amostras 5431 (*Cryptococcus neoformans*), 4289 (*Pichia kudriavzevii*), 5533 (*Candida palmioleophila*), 5287 (*Candida metapsilosis*), 5444 (*Diutina rugosa*), 5442 (*Candida albicans*), 5534 (*Kluyveromyces marxianus*), 5443 (*Candida albicans*) apresentaram uma banda comum em 1238,1  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto a amostra 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*) apresentou uma banda em 1235  $\text{cm}^{-1}$  e a amostra 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentou banda em 1241  $\text{cm}^{-1}$ . Foi reportado por De Gelder *et al.* (2007), ao realizar as comparações com vários sacarídeos, que suas bandas variam de 1222  $\text{cm}^{-1}$  à 1272  $\text{cm}^{-1}$ , incluindo a  $\beta$ -D-glucose, a lactose, celulose, dentre outros. Contudo, a pesquisa de Lemma *et al.* (2019) destacou que bandas de leveduras entre 1241  $\text{cm}^{-1}$  e 1245  $\text{cm}^{-1}$ , conforme apresentou a amostra 5535 (*Kluyveromyces marxianus*), pode ser atribuída ao estiramento assimétrico do íon  $\text{PO}_2^-$  do grupo fosfato (DNA) e também ao grupo Amida III componente do grupo das proteínas.

Na Figura 34 pode ser observado o comparativo dos espectros Raman para dez amostras analisadas, na faixa de números de onda – ‘range’ entre 1398 a 1664  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 34 - Espectros médios Raman na região entre 1398 a 1664  $\text{cm}^{-1}$  das amostras 5533 - *Candida palmioleophila*, 4289 - *Pichia kudriavzevii*, 5442 - *Candida albicans*, 5535 - *Kluyveromyces marxianus*, 5287 - *Candida metapsilosis*, 5534 - *Kluyveromyces marxianus*, 5443 - *Candida albicans*, 5444 - *Diutina rugosa*, 5395 - *Saccharomyces cerevisiae*, 5431 - *Cryptococcus neoformans*



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

As amostras 5431 (*Cryptococcus neoformans*), 5443 (*Candida albicans*), 5287 (*Candida metapsilosis*), 4289 (*Pichia kudriavzevii*) e 5533 (*Candida palmioleophila*) apresentaram uma banda comum em  $1423,2 \text{ cm}^{-1}$ , além das amostras 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*), 5444 (*Diutina rugosa*), 5534 (*Kluyveromyces marxianus*), 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5442 (*Candida albicans*), que apresentaram a banda comum em  $1422,4 \text{ cm}^{-1}$ , características de proteínas, lipídeos e açúcares, pois, de acordo com a pesquisa de De Gelder *et al.* (2007), bandas em torno de  $1300$  e  $1655 \text{ cm}^{-1}$  atestam para a ocorrência de proteínas devido à presença dos grupos funcionais amida I e amida II. Neste mesmo estudo, a ocorrência de bandas típicas em torno de  $1300$  e  $1440 \text{ cm}^{-1}$  evidencia e possibilita a distinção dos ácidos graxos puros e gorduras, além de também ser possível caracterizar os carboidratos (açúcares) devido ao aparecimento de bandas na região entre  $1300$  e  $1500 \text{ cm}^{-1}$ .

As bandas de lipídeos, proteínas e carboidratos podem ser caracterizadas pela



ocorrência de bandas na região de  $1450\text{ cm}^{-1}$  por todas as amostras, conforme atesta De Gelder *et al.* (2007) e outros autores. O trabalho de Radić *et al.* (2017), que utilizaram espécies de *Candida* como meio de evitar a contaminação do solo com metal pesado usando a espectroscopia Raman, mostra que picos Raman em  $1442\text{ cm}^{-1}$  são devido aos lipídeos e vibrações de  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  de moléculas de proteínas. E a pesquisa de Lemma *et al.* (2019) mostra que picos entre  $1452\text{ cm}^{-1}$  e  $1461\text{ cm}^{-1}$  estão associados aos ácidos nucleicos observados em três leveduras isoladas de cerveja, a partir da identificação usando a espectroscopia Raman (SERS). As amostras 5431 (*Cryptococcus neoformans*), 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*) (um pico suave) e 5533 (*Candida palmiroleophila*) apresentaram uma banda comum em  $1458,2\text{ cm}^{-1}$ ; as amostras 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*) e 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) (um pico intenso), além da amostra 5287 (*Candida metapsilosis*) (um pico suave), e a amostra 5442 (*Candida albicans*) apresentaram o pico comum em  $1452,5\text{ cm}^{-1}$ . Já as amostras que apresentaram o sinal do Raman (pico intenso) em  $1459,87\text{ cm}^{-1}$  são 5444 (*Diutina rugosa*), 5287 (*Candida metapsilosis*) e 5535 (*Kluyveromyces marxianus*). A amostra 5443 (*Candida albicans*) apresentou uma banda em  $1455,8\text{ cm}^{-1}$  e a amostra 4289 (*Pichia kudriavzevii*) apresentou um pico mais intenso em  $1456,6\text{ cm}^{-1}$ .

Os grupos funcionais específicos dos lipídeos, ácidos graxos, aminoácidos e carboidratos caracterizam as bandas em torno de  $1500\text{ cm}^{-1}$ . As amostras 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*), 5444 (*Diutina rugosa*), 5535 (*Kluyveromyces marxianus*), 5442 (*Candida albicans*), 4289 (*Pichia kudriavzevii*) e 5533 (*Candida palmiroleophila*) apresentam um pico comum em  $1504,7\text{ cm}^{-1}$ . As amostras 5443 (*Candida albicans*) e 5287 (*Candida metapsilosis*) apresentam banda comum em  $1506,3\text{ cm}^{-1}$ , enquanto as amostras 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) e 4289 (*Pichia kudriavzevii*) num pico intenso apresentam banda comum em  $1511,2\text{ cm}^{-1}$ . A amostra 5533 (*Candida palmiroleophila*) apresenta um pico intenso em  $1509,6\text{ cm}^{-1}$  e a amostra 5431 (*Cryptococcus neoformans*) apresenta um pico em  $1503,9\text{ cm}^{-1}$ . Fernández-Manteca *et al.* (2023) destacam em sua pesquisa que a banda Raman em  $1458\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação C-H de lipídeos, o que pode caracterizar os resultados das bandas obtidas nesse trabalho, embora os valores não sejam iguais, mas próximos. No trabalho de De Gelder *et al.* (2007) as bandas típicas de ácidos graxos estão descritas na faixa entre  $1400$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$ , as bandas de aminoácidos estão entre  $1420$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ , além das bandas do grupo dos carboidratos estarem localizadas entre  $1300$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ , o que corrobora para caracterizar as bandas descritas neste trabalho.

Os carboidratos na forma de exopolissacarídeos podem ser representados pelas bandas que aparecem na região de  $1550\text{ cm}^{-1}$ , conforme o estudo de Fernández-Manteca *et al.* (2023).

Neste trabalho, as amostras 5431 (*Cryptococcus neoformans*), 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*), 5287 (*Candida metapsilosis*), 5535 (*Kluyveromyces marxianus*), 5442 (*Candida albicans*) e 4289 (*Pichia kudriavzevii*) apresentam bandas comuns em  $1565,2\text{ cm}^{-1}$ ; as amostras 5443 (*Candida albicans*), 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5533 (*Candida palmioleophila*) apresentam bandas comuns em  $1566\text{ cm}^{-1}$ , a amostra 5444 (*Diutina rugosa*) apresenta banda em  $1563,6\text{ cm}^{-1}$  e a amostra 5533 (*Candida palmioleophila*) apresenta um pico mais intenso em  $1569,3\text{ cm}^{-1}$ .

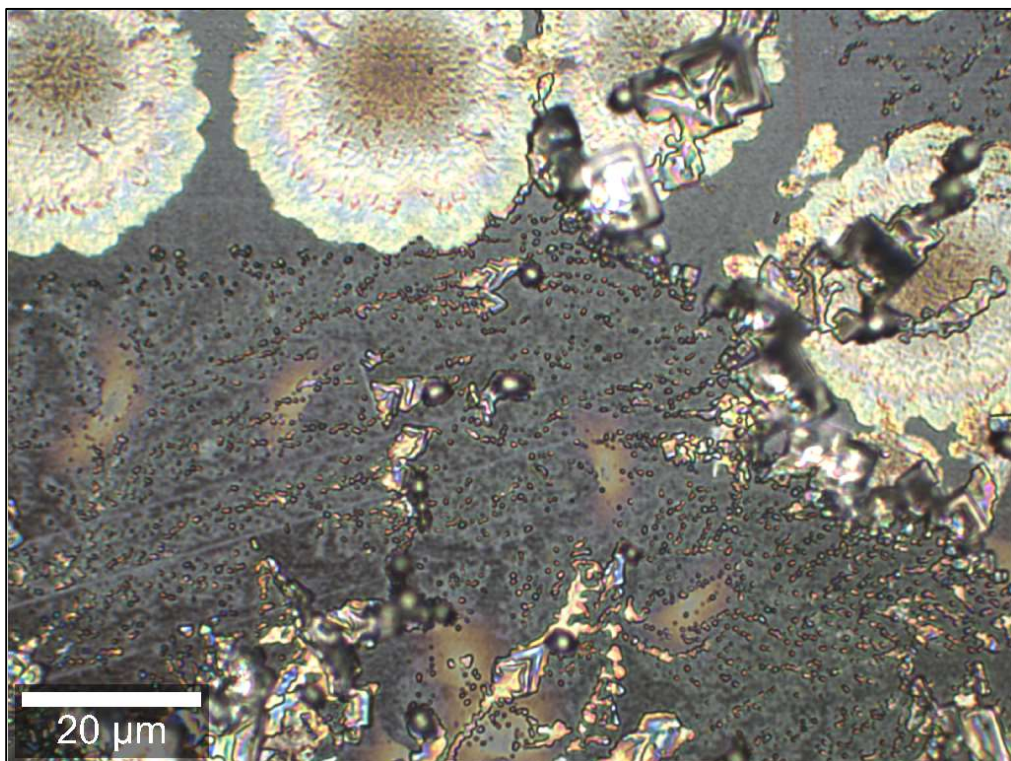
O citocromo de proteínas pode ser comprovado pela presença de bandas em  $1592\text{ cm}^{-1}$  a partir do estudo de identificação de espécies do gênero *Candida* realizado por Fernández-Manteca *et al.* (2023). Em outro trabalho, Zhu *et al.* (2021) ao analisar o soro sanguíneo de camundongos na identificação de *Cryptococcus neoformans* como agente causador de infecção pulmonar através da espectroscopia Raman (método SERS), mostrou, nos espectros correspondentes, que a posição do pico em  $1581\text{ cm}^{-1}$  descreve o modo vibracional correspondente à deformação angular da ligação C=C do aminoácido fenilalanina. Neste trabalho, as amostras apresentaram uma proximidade nos picos na região compreendida entre  $1581\text{ cm}^{-1}$  e  $1592\text{ cm}^{-1}$ . As amostras 5431 (*Cryptococcus neoformans*), 5444 (*Diutina rugosa*) e 5533 (*Candida palmioleophila*) apresentaram picos em  $1592,1\text{ cm}^{-1}$ ; as amostras 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentaram bandas em  $1584,8\text{ cm}^{-1}$ ; as amostras 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*) e 4289 (*Pichia kudriavzevii*) apresentaram bandas em  $1588\text{ cm}^{-1}$ ; a amostra 5443 (*Candida albicans*) apresentou banda em  $1582,3\text{ cm}^{-1}$ ; a amostra 5287 (*Candida metapsilosis*) apresentou uma banda em  $1591,2\text{ cm}^{-1}$  e a amostra 5533 (*Candida palmioleophila*) apresentou uma banda em  $1585,6\text{ cm}^{-1}$ . Neste sentido, os valores encontrados estão próximos ou idênticos ao reportado por Fernández-Manteca *et al.* (2023).

Com relação aos picos Raman descritos na região em torno de  $1640\text{ cm}^{-1}$ , as amostras apresentaram sinais variados. A amostra 5431 (*Cryptococcus neoformans*) e a 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*) apresentaram o pico comum em  $1644,2\text{ cm}^{-1}$ ; as amostras 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5533 (*Candida palmioleophila*) apresentaram o pico comum em  $1637,8\text{ cm}^{-1}$ ; as amostras 4289 (*Pichia kudriavzevii*) e a 5442 (*Candida albicans*) apresentaram o pico comum em  $1640,2\text{ cm}^{-1}$ ; enquanto a amostra 5444 (*Diutina rugosa*) apresentou pico em  $1645\text{ cm}^{-1}$ , a amostra 5443 (*Candida albicans*) apresentou pico em  $1652,4\text{ cm}^{-1}$ , a amostra 5287 (*Candida metapsilosis*) apresentou pico em  $1643,4\text{ cm}^{-1}$  e a amostra 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) apresentou pico em  $1642,6\text{ cm}^{-1}$ . No trabalho de Samek *et al.* (2014), que aborda a identificação da espécie de *Candida parapsilosis* pela espectroscopia Raman, a presença de

amida I e lipídeos é assinalada pelo pico entre  $1660$  e  $1670\text{ cm}^{-1}$  e, especificamente, neste trabalho, a amostra 5287 (*Candida metapsilosis*) apresentou o pico correspondente a essas estruturas, próximo a essa faixa, precisamente em  $1634,4\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1652\text{ cm}^{-1}$  ocorrem as vibrações devido ao estiramento C=C de fosfolipídeos, conforme atestado por Radić *et al.* (2017), valor que se aproxima da maioria dos picos obtidos e coincide com o pico da amostra 5443 (*Candida albicans*). Já em  $1655\text{ cm}^{-1}$  ocorre o modo de vibração de estiramento C=O de colágeno e alfa-hélice de proteínas, conforme mostra o trabalho de Zhu *et al.* (2021) e ratifica a presença desses componentes bioquímicos nas amostras analisadas, considerando a proximidade dos valores das bandas encontradas.

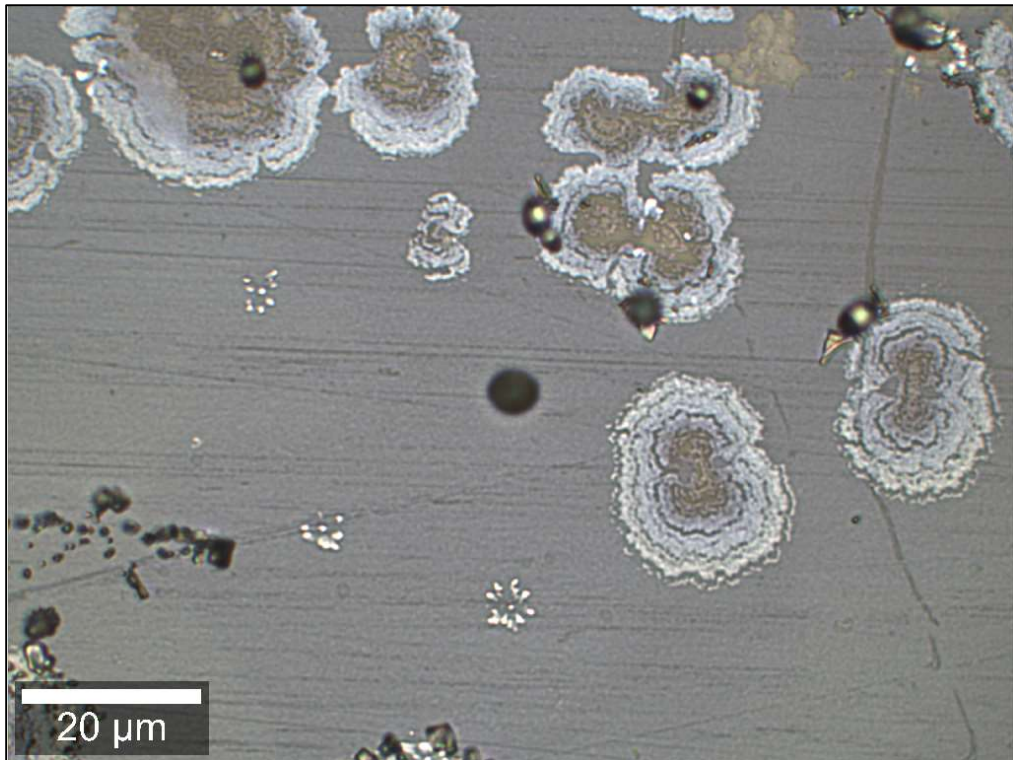
As imagens de dez leveduras analisadas que foram obtidas pelo equipamento Raman WITEC alpha 300 AR estão representadas pelas figuras 35 a 44.

Figura 35 - Imagem da amostra 5534 *Kluyveromyces marxianus*



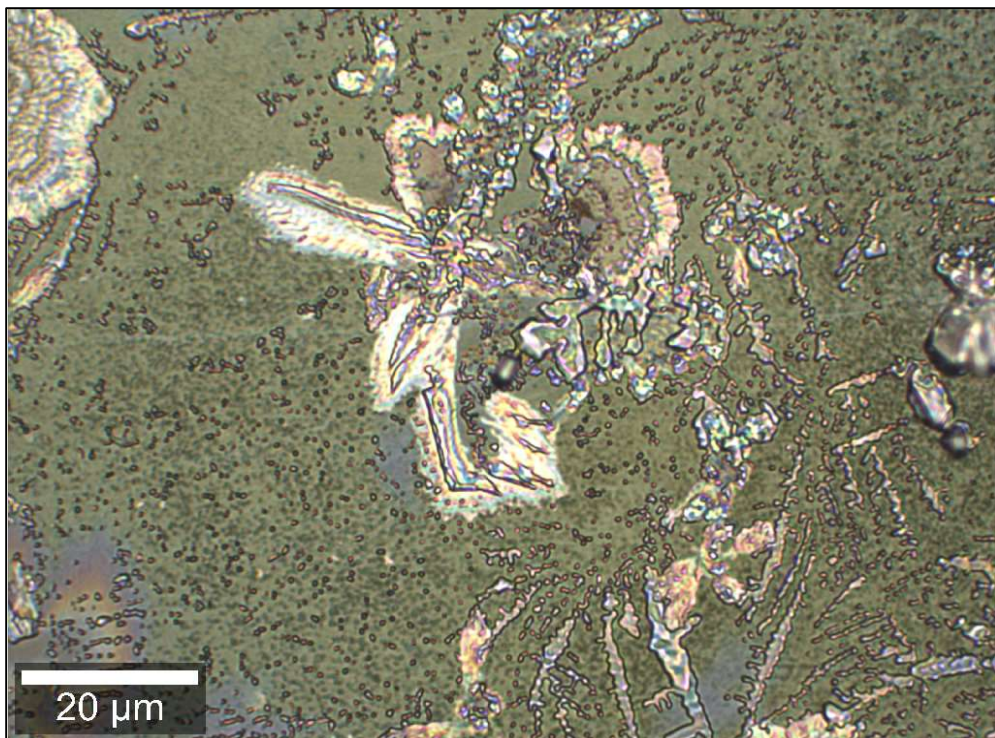
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 36 - Imagem da amostra 5287 *Candida metapsilosis*



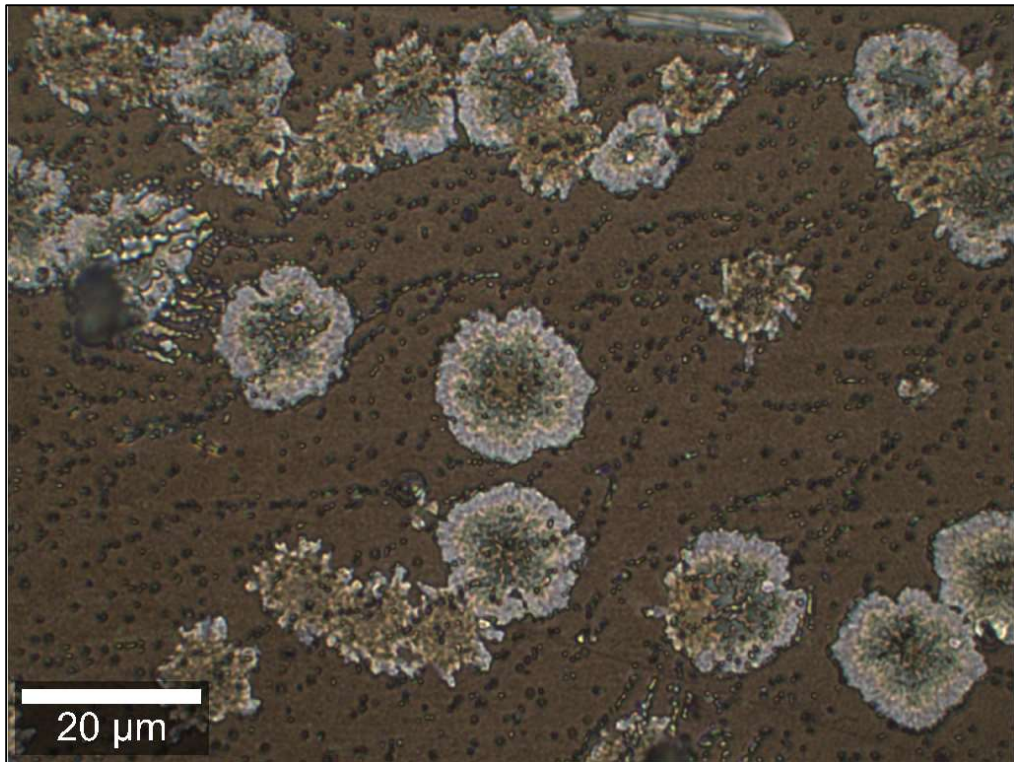
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 37 – Imagem da amostra 5444 *Diutina rugosa*



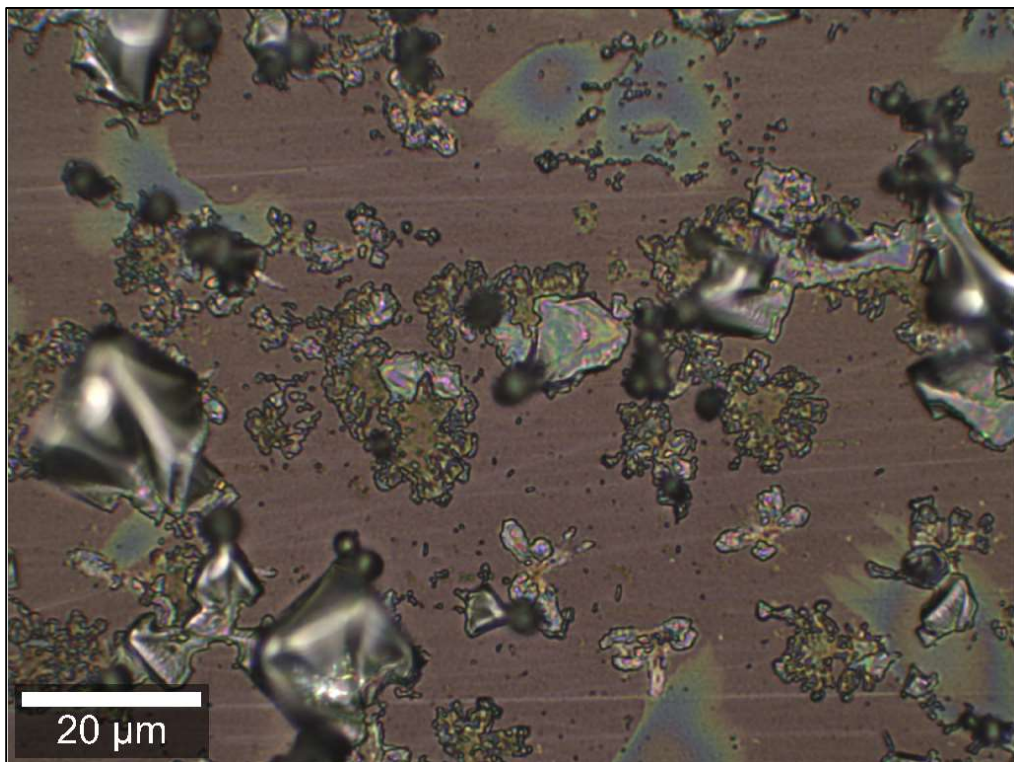
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 38 – Imagem da amostra 5431 *Cryptococcus neoformans*



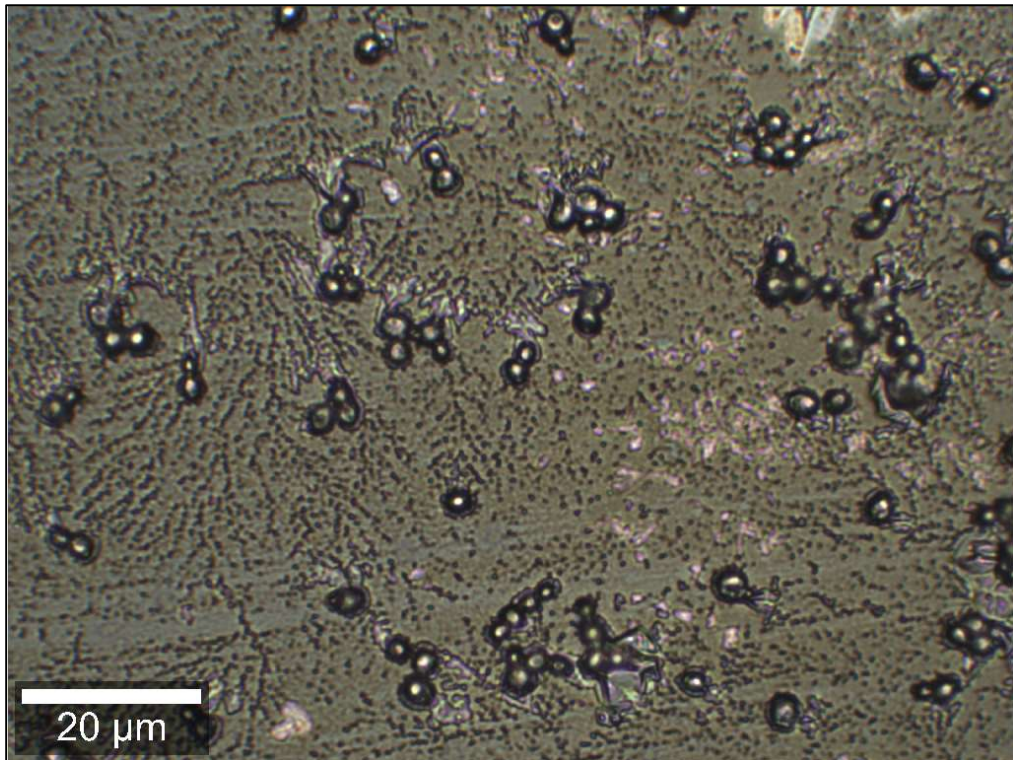
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 39 – Imagem da amostra 5442 *Candida albicans*



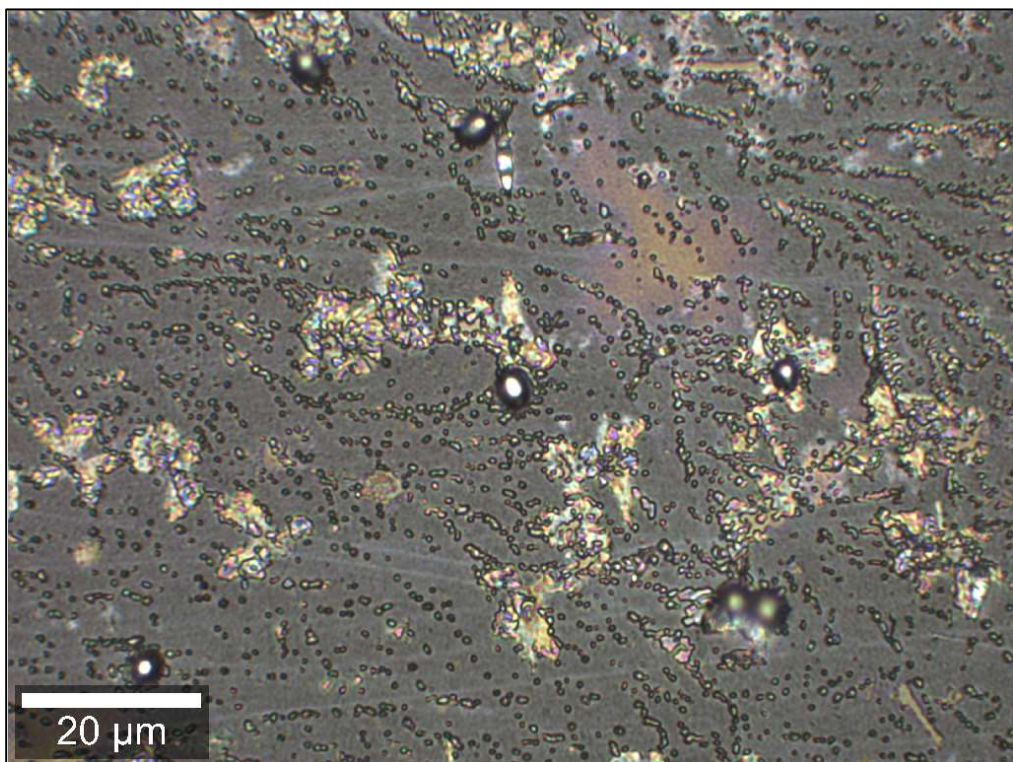
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 40 – Imagem da amostra 5533 *Candida palmioleophila*



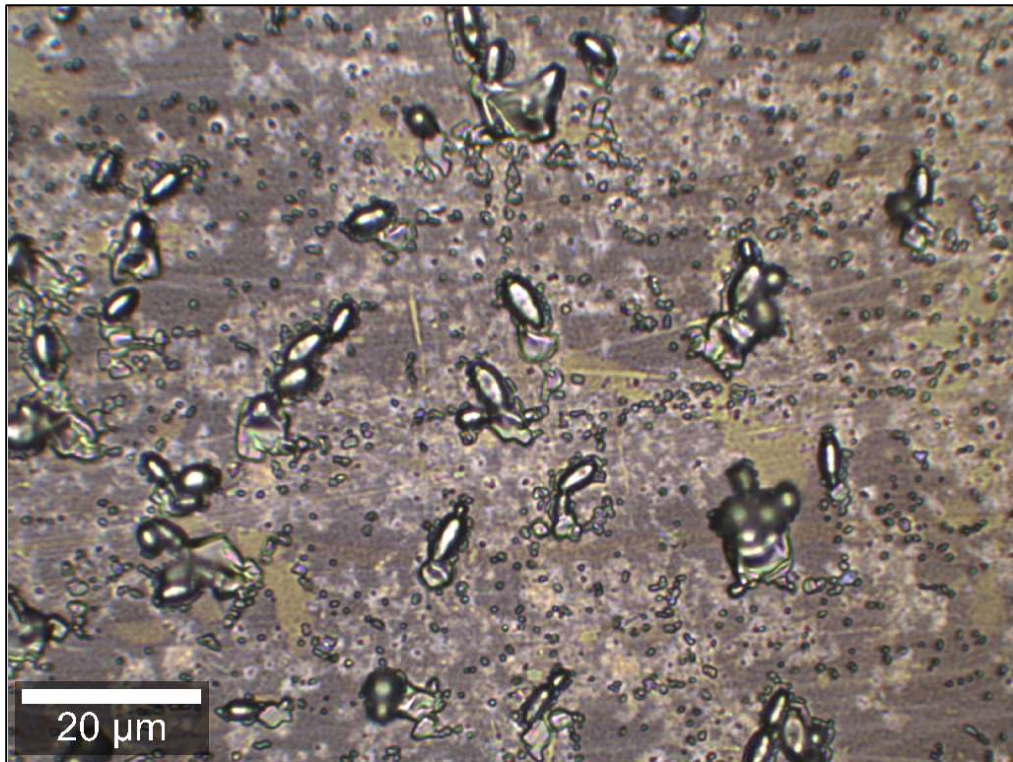
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 41 – Imagem da amostra 5396 *Pichia kudriavzevii*



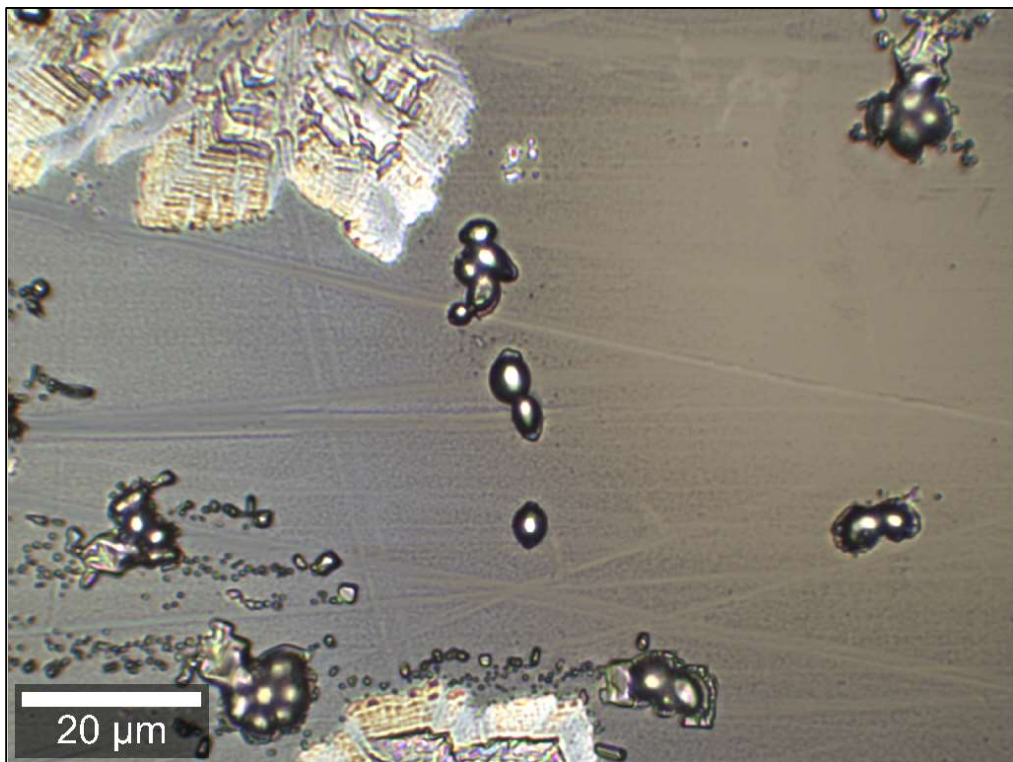
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 42 – Imagem da amostra 4289 *Pichia kudriavzevii*



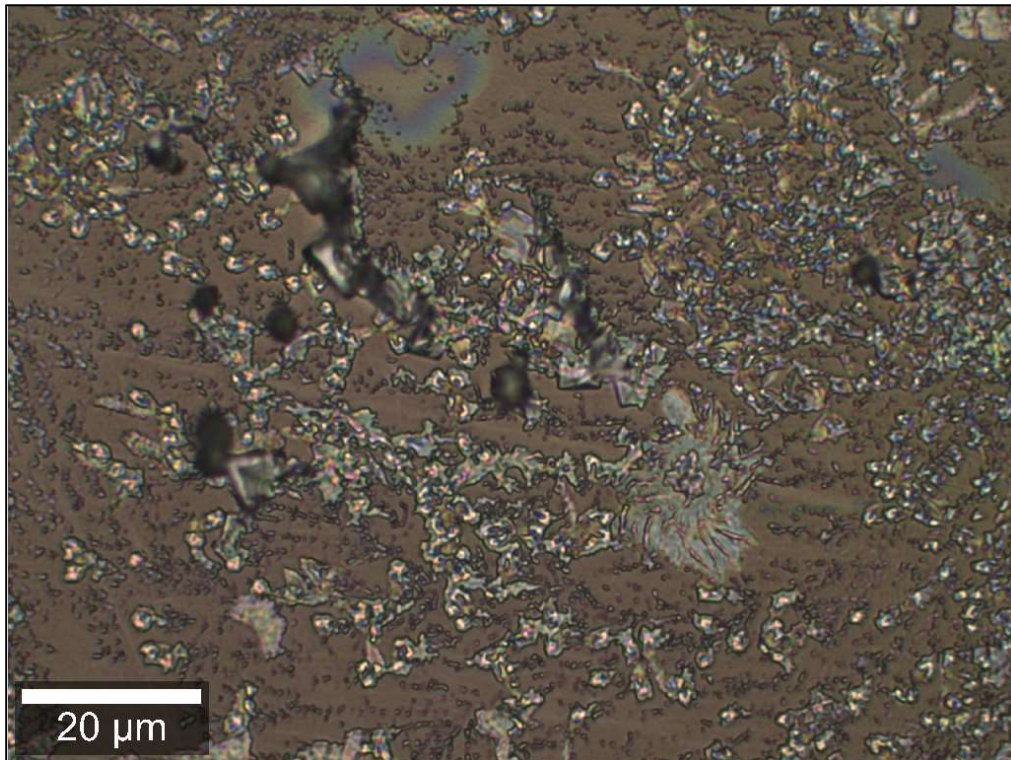
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 43 – Imagem da amostra 5535 *Kluyveromyces marxianus*



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 44 – Imagem da amostra 5443 *Candida albicans*



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

### 5.3.1. Análise de Componentes Principais dos dados obtidos por espectroscopia Raman

Os dois primeiros eixos da PCA explicaram 65,99% da variância dada pela distribuição das amostras (48,19% e 17,81%), conforme pode ser observado pela figura 45 A.

A partir da análise de *K-means* foi possível observar a presença de três grupamentos com base nos números de onda utilizados para a análise selecionados dentro da faixa de 560  $\text{cm}^{-1}$  a 1646  $\text{cm}^{-1}$ , mais relevantes considerando os espectros obtidos.

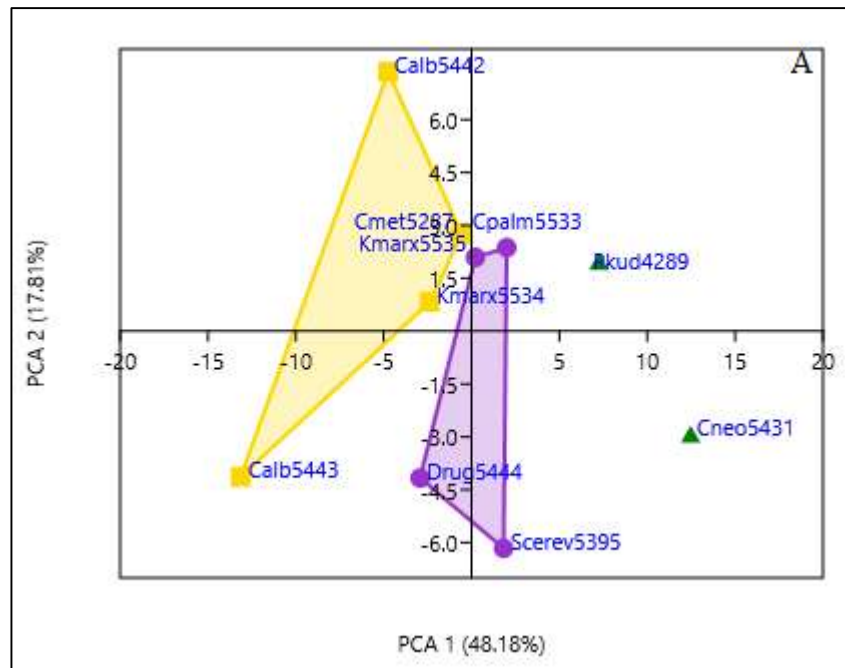
Um grupamento com semelhanças constituído pelas amostras 5431 (*Cryptococcus neoformans*) e 4289 (*Pichia kudriavzevii*), representado pela cor verde. Outro grupamento formado pelas amostras 5442 (*Candida albicans*), 5443 (*Candida albicans*), 5287 (*Candida metapsilosis*), 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) destacados em cor laranja. E o terceiro grupo representado pelas amostras 5444 (*Diutina rugosa*), 5533 (*Candida palmioleophila*), 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*) unidos e em destaque pela cor roxa.

Observa-se pela análise de PCA que os grupamentos formados apresentam semelhanças, tanto por serem constituídos por leveduras de mesma espécie, quanto por apresentarem semelhanças na constituição de suas estruturas biológicas, fator que se mostra



preponderante. As figuras 45 A e B trazem o resultado da análise de componentes principais (PCA) para as amostras analisadas.

Figura 45 A - Resultado da Análise de Componentes Principais (PCA) referente aos três grupos de leveduras agrupadas por similaridade

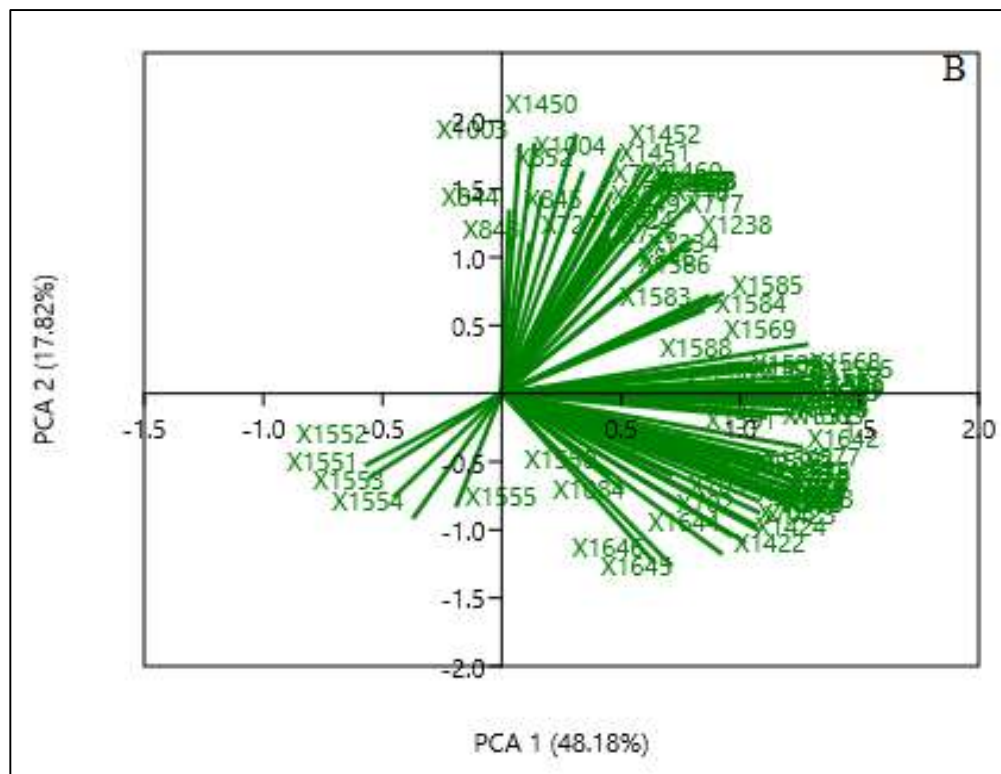


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Ao analisar o BIPLLOT, figura 45 B, é possível observar a influência dos números de onda correlacionando com a posição das amostras em torno dos eixos X e Y, para a caracterização das leveduras. As amostras sinalizadas em cor verde, 4289 (*Pichia kudriavzevii*) e 5431 (*Cryptococcus neoformans*) se assemelham pelo fato de serem explicadas pelas estruturas biológicas representadas pelos números de onda próximos ao eixo X, sendo que eles oscilam de 1422 a 1585  $\text{cm}^{-1}$ . E como essas amostras apresentam picos próximos dentro dessa faixa, pode-se dizer que elas se assemelham pelo fato desses picos representarem estruturas de aminoácidos, proteínas, ácidos graxos, lipídeos e carboidratos, constituindo suas células. As amostras representadas pela figura em cor roxa, 5444 (*Diutina rugosa*), 5533 (*Candida palmioleophila*), 5535 (*Kluyveromyces marxianus*) e 5395 (*Saccharomyces cerevisiae*) têm similaridade devido aos números de onda próximos ao eixo Y, nos quadrantes superior e inferior, oscilando de 844 a 1583  $\text{cm}^{-1}$ ; de 1422 a 1646  $\text{cm}^{-1}$  e pelos números de onda na faixa de 1554 a 1555  $\text{cm}^{-1}$ . Essas amostras se assemelham por apresentarem em suas composições celulares as estruturas de aminoácidos, proteínas (amida I e II), ácidos graxos, lipídeos e

carboidratos. E as amostras 5442 (*Candida albicans*), 5443 (*Candida albicans*), 5287 (*Candida metapsilosis*), 5534 (*Kluyveromyces marxianus*) destacados em cor laranja são explicados pelos números de onda muito próximos do eixo Y (quadrante superior), sendo eles: 844  $\text{cm}^{-1}$ , 1003  $\text{cm}^{-1}$ , 1004  $\text{cm}^{-1}$ , 1450  $\text{cm}^{-1}$  e no quadrante inferior pela faixa que vai de 1551 a 1555  $\text{cm}^{-1}$ . Logo, essas amostras se assemelham por apresentarem nesta região picos característicos de aminoácidos, ácidos nucleicos, lipídeos, fosfolipídeos e carboidratos (DE GELDER *et al.*, 2007).

Figura 45 B - Análise de Componentes Principais (PCA) representada através do BIPLLOT, observando-se a contribuição dos números de onda no entorno dos eixos 1 e 2

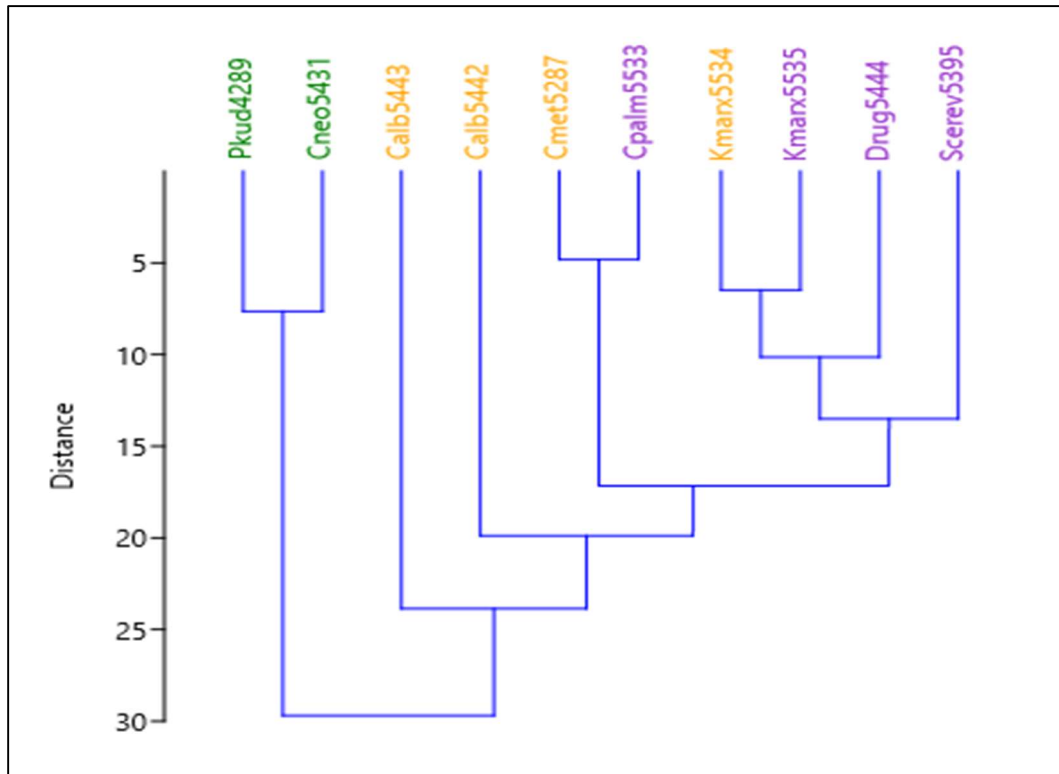


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Na Figura 46, pode-se observar os clusters onde estão agrupadas as espécies de leveduras por maior afinidade. É importante destacar que quanto maior a distância entre os nós de um grupo comparado a outro, maior é a diferença entre aquelas espécies. No caso, as espécies representadas pela cor verde apresentam o maior nó em relação aos outros grupos representados pelas cores laranja e roxo, que estão mais próximos entre si. Logo, o grupo em cor verde representado pelas amostras *Pichia kudriavzevii* (4289) e *Cryptococcus neoformans* (5431) apresentam a maior distância do nó em relação aos outros grupos, portanto eles se assemelham

mais entre si e se distinguem, de certa forma dos demais, apesar de estarem ligados entre si e com o mesmo padrão de agrupamento feito pelo *k-means*.

Figura 46 - Cluster das espécies de leveduras com base nos números de onda seleccionados das amostras

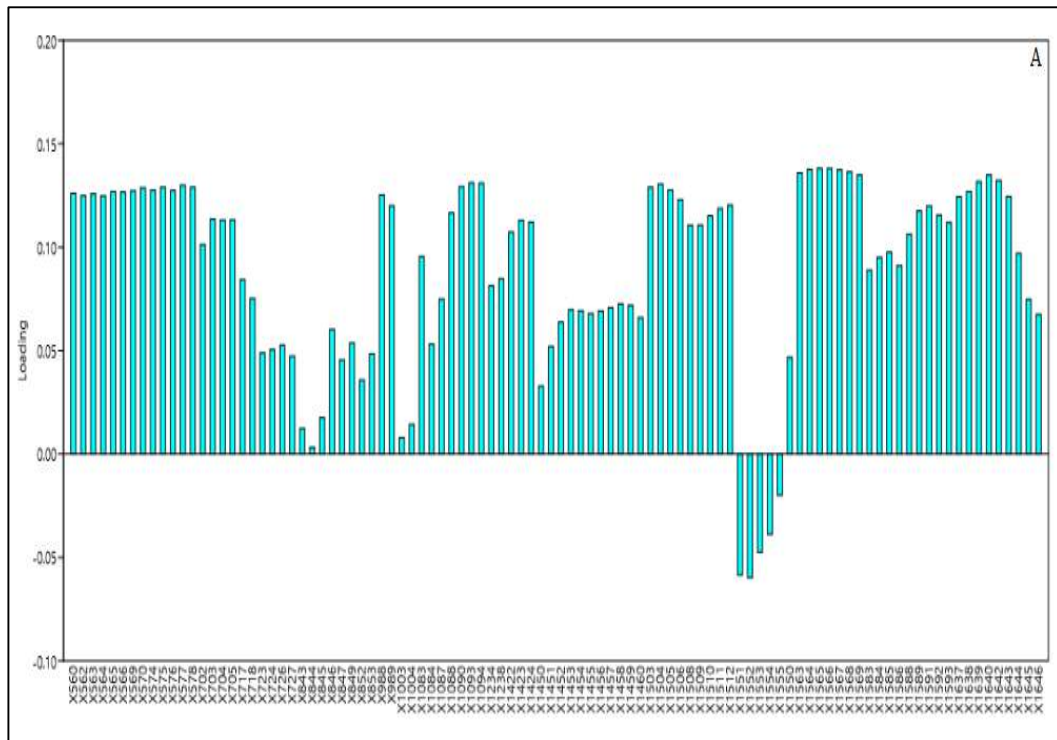


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

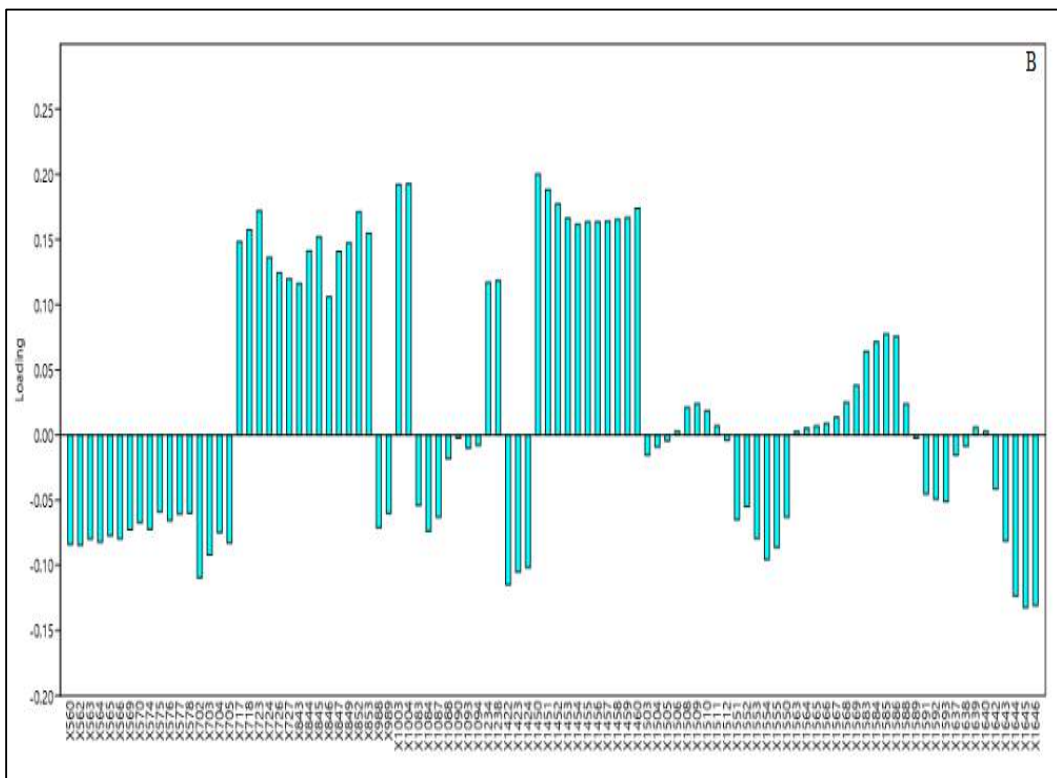
A descrição dos números de onda analisados das amostras podem ser correlacionados pela observação da figura 47 A e B do maior pico tanto na PCA 1, quanto na PCA 2, respectivamente. Para o primeiro eixo, o número de onda de maior importância foi  $1566\text{ cm}^{-1}$  (correspondente à faixa entre  $1503 - 1593\text{ cm}^{-1}$ ), apresentando uma correlação de 0.13. Para o segundo eixo, o número de onda de maior relevância foi  $1450\text{ cm}^{-1}$  (correspondente à faixa entre  $1422-1473$ ), com correlação de 0.20. Os três agrupamentos mostram um padrão de semelhança ao da análise por *K-means*.

O número de onda  $1566\text{ cm}^{-1}$  é típico da estrutura de carboidratos e o número de onda  $1450\text{ cm}^{-1}$  caracteriza a deformação C-H de lipídeos (FERNÁNDES-MANTECA *et al.*, 2023).

Figura 47- (A) Gráfico correspondente ao *loading* PCA 1. (B) Gráfico correspondente ao *loading* PCA 2



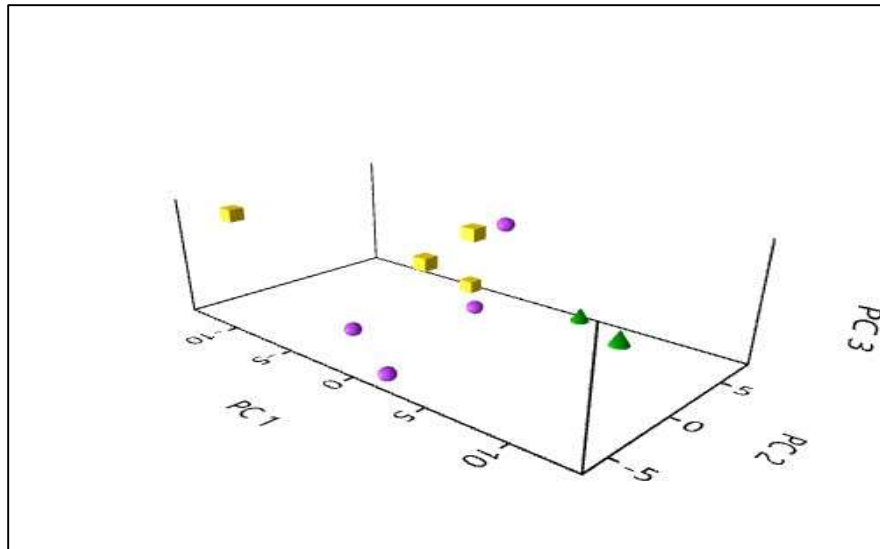
Fonte: Elaborada pela autora (2023).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A figura 48 mostra o resultado da análise de componentes principais (PCA) das amostras em um gráfico 3D, onde é possível observar a contribuição dos três eixos PC1, PC2 e PC3, em que soma dos dois primeiros eixos relacionado à porcentagem de variância tem maior peso sobre o resultado final da análise.

Figura 48- Resultado da PCA em um gráfico 3D



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

## 6 CONCLUSÃO

A espectrometria de massa MALDI-TOF identificou as onze leveduras isoladas de leite de vacas com mastite nos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Diutina*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*. As técnicas de espectroscopia no infravermelho médio (FTIR-ATR) e a espectroscopia Raman forneceram informações dos grupamentos químicos funcionais das leveduras e, com o auxílio da Análise de Componentes Principais, ambas classificaram as leveduras em três diferentes agrupamentos permitindo observar a tendência delas em se agruparem tanto por semelhança de espécies, quanto pelos constituintes celulares. Este trabalho mostra como conclusão formas alternativas, eficientes e precisas para caracterizar e diferenciar espécies de leveduras tanto pela técnica de espectrometria de massa, quanto pelos métodos de espectroscopia óptica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUSTINI, B. C.; SILVA, L. P.; BLOCH JR, C.; BONFIM, T. M. B.; SILVA, G. A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, p. 5645-5654, 2014.
- AGUSTINI, B. C.; SILVA, G. A.; BONFIM, T. M. B. MALDI-TOF MS Supplementary database for species identification employing the yeast diversity encountered on southern Brazil grapes. **Folia Microbiologica**, v. 63, p. 685-693, 2018.
- ALMEIDA JÚNIOR, J. C. **Determinação do teor de proteína em concentrado proteico de soro de leite por FT-MIR-ATR combinada com calibração multivariada**, 78 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.
- ANGELAKIS, E.; MILLION, M.; HENRY, M.; RAOULT, D. Rapid and accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, p. M568-M572 2011, 2011.
- ARAGÃO, M. O. P. **Diversidade de fungos filamentosos e leveduras em queijo Minas artesanal das microrregiões do Serro e Serra da Canastra**, 118 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.
- ATKINS, P. W. **Físico-Química**. 6.ed. Volume 2. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 1997. 382p.
- AVILA, T. C. Espectroscopia Raman e Quimiometria como ferramentas no monitoramento *ON LINE* do processo fermentativo da glicose pela *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 2013, 135p.
- BARBOSA, L. C. A. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2013, 189 p.
- BARONI, F. A.; ABREU, D. P. B.; LIMA, D. M.; CAMPOS, S. G.; PAULA, C. R.; CAMPBELL, R. C.; BOTTEON, M. Complexo *Cryptococcus humicola* isolado no pré e no pós-tratamento de mastite em vacas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, supl. 2, p. 17-21, nov. 2016.
- BELOTI, V. Micro-organismos de importância no leite. In: Beloti, V. (Ed.). Leite: obtenção, inspeção e qualidade. Londrina: Editora Planta, p. 109-221, 2015, 417p.
- BELOTI, V.; JÚNIOR, J. C. R.; TAMANINI, R.; ARAÚJO, J. P. A.; YAMADA, A. K.; ANTÔNIO, N. A. Enumeração de microrganismos psicrotóxicos e termotóxicos psicrotóxicos de leite: comparação de metodologias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes: Juiz de Fora**, v. 70, n.1, p. 17-23, 2015.
- BOTELLO, G. B. **Desenvolvimento e validação de métodos para análise direta de alimentos usando ferramentas quimiométricas, espectroscopia no infravermelho e imagens digitais**. 136 p. Tese (Doutorado em química), Universidade Federal de Minas

Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BROWN, T. L.; EUGENE LeMAY, H., BURSTEN, B. E. Química, a Ciência Central. 9. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005. 972 p.

CAMERON, M.; BARKEMA, H. W.; DE BUCK, J.; DE VliegHER, S.; CHAFFER, M.; LEWIS, J.; KEEFE, G. P. Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 2137–2147, 2017.

CHOUTHAI, N. S.; SHAH, A. A.; SALIMNIA, H.; PALYVODA, O.; DEVPURA, S.; KLEIN, M.; ASMAR, B. Use of Raman Spectroscopy to Decrease Time for Identifying the Species of *Candida*. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 7, n. 1, 2015.

COSTA, E. O.; GANDRA, C. R.; PIRES, M. F.; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M. Survey of mycotic bovine mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 124, p. 13-17, 1993.

CROXATTO, A.; PROD`HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 380-407, 2012.

DE GELDER, J.; DE GUSSEM, K.; VANDENABEELE, P.; MOENS, L. Reference database of Raman spectra of biological molecules. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 38, p. 1133-1147, 2007.

FARIA, D. L. A. Espectroscopia Raman e a Ciência do Patrimônio: aspectos gerais e panorama atual na América do Sul. **In: Cadernos do Lepaarq**, v. XV, n.30, p.344-365, Jul-Dez. 2018.

FERNÁNDES-MANTECA, M. G.; OCAMPO-SOSA, A. A.; ALEGRÍA-PUIG, C. R.; ROIZ, M. P.; RODRÍGUEZ-GRANDE, J.; MADRAZO, F.; CALVO, J.; RODRÍGUEZ-COBO, L.; LÓPEZ-HIGUERA, J. M.; FARIÑAS, M. C.; COBO, A. Automatic classification of *Candida* species using Raman spectroscopy and machine learning. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 290, 2023.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22 n. 5, p. 724-731, 1999.

FREITAS, A. M. **Estudo dos Parâmetros de Emissão Laser de Vidros Fosfatos Dopados com Nanocristais de ZnTe e Co-dopados com íons de Yb<sup>3+</sup>**. 141 p. Tese (Doutorado em Física), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

FURTADO, M. M. Principais Problemas dos Queijos: Causas e Prevenção. 3. ed. São Paulo: Setembro Editora. 2017, 255 p.

GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 58, n. 5, p. 767-782, 2003.

- GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; KILCAWLEY, K.; HENNESSY, D.; TOBIN, J. T.; O'CALLAGHAN, T. F. Raman spectroscopy: A rapid method to assess the effects of pasture feeding on the nutritional quality of butter. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 10, p. 8721-8731, 2020.
- HAYES, M. C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. (Eds.). **Applied Dairy Microbiology**, 2 ed. New York: Marcel, p. 59-76, 2001.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Princípios de análise instrumental. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 1056p.
- HU, S.; GU, F.; CHEN, M.; WANG, C.; LI, J.; YANG, J.; WANG, G.; ZHOU Z.; YANG, Y. A novel method for identifying and distinguishing *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by surface-enhanced Raman scattering using positively charged silver nanoparticles. **Scientific Reports**, 10: 12480, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68978-0>
- HUANG, W.; GRIFFITHS, R.; THOMPSON, I. P.; BAILEY, M.; WHITELEY, A. S. Raman microscopic analysis of single microbial cells. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 15, p. 4452-4458, 2004.
- JAY, J. M. Microbiologia de alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.
- KANEKO, U. F. **Sondando estruturas cristalinas e interações magnéticas em perovskitas com Espectroscopia Raman**. 80 p. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- KAZNOWSKA, E; DEPCIUCH, J.; SZMUC, K.; CEBULSKI, J. Use of FTIR spectroscopy and PCA-LDC analysis to identify cancerous lesions within the human colon. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 134, p. 259-268, 2017.
- KOGKAKI, E. A.; SOFOULIS, M.; NATSKOULIS, P.; TARANTILIS, P. A.; PAPPAS, C. S.; PANAGOUE, E. Z. Differentiation and identification of grape-associated black aspergilli using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy analysis of mycelia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 259, p. 22-28, 2017.
- LEITE, J. L. B; STOCK, L. A. A balança comercial de lácteos nos últimos 10 anos. In: **Anuário Leite 2023 - EMBRAPA**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2023, 120 p.
- LEMMA, T.; WANG, J.; ARSTILA, K.; HYTÖNEN, V. P.; TOPPARI, J. J. Identifying yeasts using surface enhanced Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 218, p. 299-307, 2019.
- LIMA, J. S.; SAMPAIO, A. P. P. O.; SILVA, P. S.; DUFOSSÉ, M. C. S., ROSA, A. M. B. P., MORAES, C. M.; ROOS, T. B. (2021). Evaluation of alkaline phosphatase detection methods in bovine, buffalo and goat milk. **Brazilian Journal of Food Technology**, 24, e2020130. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.13020>



LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LUIZ, L. C. **Curiosidades em Física das Radiações**. Rio de Janeiro: Editora Multifoco, 2019.

MALIK, A.; TUCKFIELD, B. Applied unsupervised learning with R: Uncover hidden relationships and patterns with k-means clustering, hierarchical clustering, and PCA. **Packt Publishing Birmingham**, 2019, 322p.

MARIOTO, L. R. M.; DANIEL, G. C.; GONZAGA, N.; MAREZE, J.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrófica, termodúrica e esporulada no leite cru. **Ciência Animal Brasileira/ Brazilian Animal Science**, v. 21, n. 1, 2020. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/44034>. Acesso em: 21 ago.2022.

MARTINS, F. S.; TIAGO, F. C. P.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n.2, 2005.

Mc MURRY, J. Química Orgânica. 7. ed. Norteamericana. v. 1., v. 2. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 1141 p.

MENDES, G. A. **Espectroscopia óptica para discriminação de misturas de café arábica e robusta**. 70 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

MENDES, J. F.; GONÇALVES, C. L.; FERREIRA G. F.; ESTEVES, I. A.; FREITAS, C. H.; VILLAREAL, J. P. V.; MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A.; NASCENTE, P. S. Antifungal susceptibility profile of different yeasts isolates from wild, cow's milk subclinical mastitis and hospital environment. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78. n. 1, p. 68-75, 2018.

MENDES, T. O.; RODRIGUES, B. V. M.; PORTO, B. L. S.; DA ROCHA, R. A.; DE OLIVEIRA, M. A. L.; DE CASTRO, F. K.; DOS ANJOS, V. C.; BELL, M. J. V. Raman spectroscopy as a fast tool for whey quantification in raw milk. **Vibrational Spectroscopy**, v. 111, p. 1-6, 2020.

MONTANARI, L. B.; SARTORI, F. G.; RIBEIRO, D. B.M.; LEANDRO, L. F.; PIRES, R. H.; MELHEM, M. S. C.; MELLO, C. A.; MARTINS, C. H. G. Yeasts isolation and identification in water used in a Brazilian hemodialysis unit by classic microbiological techniques and Raman spectroscopy. **Journal of Water and Health**, v. 16, n. 2, p. 311-320, 2018.

NACEF, M.; CHEVALIER, M.; CHOLLET, S.; DRIDER, D.; FLAHAUT, C. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 247, p. 2-8, 2017.

NMC – National Mastitis Concil (2004). Microbiological Procedures for the Diagnosis of bovine Udder Infection and Determination of Milk Infection and Determination of Milk Quality, 4 ed. Verona: National Mastitis Concil.

NOGUEIRA, J. S. **Perfil de resistência aos antimicrobianos e presença do gene *mecA* em cocos Gram-positivos catalase positivos isolados de queijos artesanais e ingredientes utilizados na sua produção.** 64 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2022.

NONNEMANN, B.; LYHS, U.; SVENNESEN, L.; KRISTENSEN, K. A.; KLAAS, I. C.; PEDERSEN, K. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 2515–2524, 2019.

NGO-THI, N. A.; KIRSCHNER, C.; NAUMANN, D. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. **Journal of Molecular Structure**, 661-662, p. 371-380, 2003.

OLESZKO, A.; HARTWICH, J.; WÓJTOWICZ, A.; GASIOR-GLOGOWSKA, M.; HURAS, H.; KOMOROWSKA, M. Comparison of FTIR-ATR and Raman spectroscopy in determination of VLDL triglycerides in blood serum with PLS regression. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 183, p. 239-246, 2017.

OLIVEIRA, T. C. A. **Identificação de patógenos isolados de mastite bovina por testes bioquímicos e MALDI-TOF MS.** 82 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2020.

OLIVEIRA, T. C. A.; BRITO, M. A. V. P.; GIAMBIAGI-deMARVAL, M.; VICENTINI, N. M.; LANGE, C. C. Identification of bovine mastitis pathogens using MALDI-TOF mass spectrometry in Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 88, p. 302-306, 2021.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010, 700p.

PLATA, M. R.; KOCH, C.; WECHSELBERGUER, P.; HERWIG, C.; LENDL, B. Determination of carbohydrates present in *Saccharomyces cerevisiae* using mid-infrared spectroscopy and partial least squares regression. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 8241- 8250, 2013.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, R. G. Clinical Veterinary Microbiology. Edimburgh: Mosby, 1999, 684 p.

RADIĆ, D. S.; PAVLOVIĆ, V. P.; LAZOVIĆ, M. M.; JOVIČIĆ-PETROVIĆ, J. P.; KARLIČIĆ, V. M.; LALEVIĆ, B. T.; RAIČEVIĆ, V. B. Copper-tolerant yeasts: Raman spectroscopy in determination of bioaccumulation mechanism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 21885 – 21893, 2017.

RODRIGUES, C. L. V. **Estudo das propriedades físico-químicas de diferentes tipos de cafés através de técnicas termoanalíticas e espectroscópicas.** 71 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.

RODRIGUES, A. G.; GALZERANI, J. C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 4, 4309, p. 1-9, 2012.

RODRIGUES, L. N. **Espectroscopia por FTIR de variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados para produção de etanol celulósico**. 144 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2 ed. Ed. Unesp, 2008.

SAMEK, O.; MLYNARIKOVÁ, K.; BERNATOVÁ, S.; JEZEK, J.; KRZYZANEK, V.; SILER, M.; ZEMÁNEK, P.; RUZIEKA, F.; HOLÁ, V.; MAHELOVÁ, M. *Candida parapsilosis* Biofilm Identification by Raman Spectroscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 23924-23935, 2014. <https://doi:103390/ijms151223924>

SANTOS, C. D. **Uso de extrato de levedura (*S. cerevisiae*) como probiótico na nutrição de cães**. 77 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

SANTOS, A. R.; MENEZES, D. B.; ELLENA, J.; ANDRADE, M. B. Aplicação da Espectroscopia Raman na caracterização de minerais pertencentes a uma geocoleção. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 489-496, 2019.

SANTOS, P. M.; CARDOSO, M. A. G.; KHOURI, S.; JÚNIOR, A. R. P.; UEHARA, M.; SAKANE, K. K. Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para teste de algoritmos estatísticos na diferenciação dos micro-organismos *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 28, n. 4. p. 398-409, 2012.

SANTOS, W. B. R.; OLIVEIRA, N. C.; VIEIRA, M. L.; RIBEIRO, J. C.; CEZÁRIO, A. S.; OLIVEIRA, E. M. B.; CAMARGOS, A. S.; VALENTE, T. M. P. Mastite bovina: uma revisão. **Colloquium Agrariae**, v. 13, número especial, p. 301-314, 2017.

SILVA, C. A. **Identificação de bactérias comumente isoladas de leite cru e queijo artesanal por espectroscopia Raman**. 74 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.

SOUZA, M. L. **Biocontrole *in vitro* de fungos toxigênicos utilizando leveduras isoladas do café e do cacau**. 124 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SOUZA, M. L.; PASSAMANI, F. R. F.; ÁVILA, C. L. S.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F.; SILVA, C. F. Use of wild yeasts as a biocontrol agent against toxigenic fungi and OTA production. **Acta Scientiarum, Agronomy**, Maringá, v. 39, n. 3, p. 3499-358, 2017.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E. M. C.; SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 282-290, 2009.

TAHA, M.; HASSAN, M.; ESSA, S.; TARTOR, Y. Use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for rapid and accurate identification of yeasts isolated from human and animals. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 1, p. 15-20, 2013.

TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; BRAGA, P. A. C.; SILVA, L. F. P.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1658-1663, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, 935p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; CANDEIAS, J. A. N.; GOMPertz, O. F. Microbiologia. 3.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999, 586p.

VIANA, C. C. R. **Caracterização de fórmulas infantis para lactentes usando espectroscopia no infravermelho médio**. 99 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

VINCIGUERRA, L. L.; MARCELO, M. C. A.; MOTTA, T. M. C.; MENEGHINI, L. Z.; BERGOLD, A. M.; FERRÃO, M. F. Chemometric tools and FTIR-ATR spectroscopy applied in milk adulterated with cheese whey. **Química Nova**, v. 42, n. 3, p. 249-254, 2019.

WANG, X.; SHEN, X.; SHENG, D.; CHEN, X.; LIU, X. FTIR spectroscopic comparison of serum from lung cancer patients and healthy persons. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.122, p. 193-197, 2014.

WEIMER, P. J. Microbiology of the Dairy Animal. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. (Eds.). **Applied Dairy Microbiology**, 2. ed. New York: Marcel, p. 59-76, 2001.

WENNING, M.; BREITENWIESER, F.; KONRAD, R.; HUBER, I.; BUSH, U.; SCHERER S. Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 44-52, 2014.

WENNING, M.; SCHERER, S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7111- 7120, 2013.