

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

FERNANDA SANT ANA DE SIQUEIRA E OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ESPÉCIES BACTERIANAS
PATOGENICAS ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE
DISCRIMINANTE**

TESE DE DOUTORADO

**DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

São José dos Campos, Maio de 2018

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

FERNANDA SANT ANA DE SIQUEIRA E OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ESPÉCIES BACTERIANAS
PATOGENICAS ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE
DISCRIMINANTE**

TESE DE DOUTORADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado,
da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em
Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Júnior

São José dos Campos, Maio de 2018

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

FERNANDA SANT ANA DE SIQUEIRA E OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ESPÉCIES BACTERIANAS
PATOGENICAS ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE
DISCRIMINANTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado,
da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em
Engenharia Biomédica. Aprovada pela seguinte
Banca Examinadora:

Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr.
Orientador
Doutorado em Ciências

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dra. Juliana Campos Junqueira
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Prof. Dr. Cleber Frigi Bissoli
Universidade Paulista (UNIP)

Prof. Dr. Leandro Procópio Alves
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Carlos José de Lima
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (coordenação)
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dra. Adriana Barrinha Moretti
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dra. Fernanda Malagutti Tomé
Universidade Paulista (UNIP)

São José dos Campos, Maio de 2018

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

FERNANDA SANT ANA DE SIQUEIRA E OLIVEIRA

Possui graduação em Ciências Biológicas - Modalidade médica pela Universidade de Mogi das Cruzes (2000), especialização em Patologia Clínica, ênfase em microbiologia clínica pelo HC da Faculdade de Medicina da USP e Mestrado em Engenharia Biomédica pela Unicastelo. Atualmente é professor da Associação Unificada Paulista de Ensino Renovado Objetivo e biomédica responsável pela microbiologia do laboratório municipal de Jacareí.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca UAM
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48c	Oliveira, Fernanda Sant Ana de Siqueira e Caracterização bioquímica de espécies bacterianas patogênicas através da espectroscopia Raman e análise discriminante / Fernanda Sant Ana de Siqueira e Oliveira. - 2018. 89f. : il.; 30cm. Orientador: Landulfo Silveira Jr.. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembí Morumbi, São José Dos Campos, 2018. Bibliografia: f.80-89 1. Engenharia. 2. Espectroscopia Raman. 3. Discriminação bacteriana. 4. ANOVA. CDD 610.28
------	---

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

A Deus, que sempre iluminou meus caminhos.

Aos meus pais, Edson Gomes de Siqueira e Maria Rosa Sant Ana de Siqueira, por me mostrar o caminho correto, a importância dos estudos em minha vida e pela confiança, apoio e carinho.

Aos meus sogros, Sediney Pinto de Oliveira e Lígia Rosa de Oliveira (*in memoriam*), pelo apoio irrestrito.

Ao meu marido Alex por contribuir com mais este objetivo, por entender minhas ausências e por estar sempre ao meu lado, como companheiro persistente e pai exemplar. Esta conquista e todas as outras na minha vida também são suas.

Aos meus filhos Guilherme e Gustavo, razão de tudo, que trazem tanta luz e sentido para minha vida. Vocês são a lição mais profunda que vivi de amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que ouviu as minhas preces e as respondeu no momento certo.

Aos meus pais, pelo apoio irrestrito.

Aos meus sogros, principalmente à minha sogra que, entre outras coisas, sempre se disponibilizou para cuidar dos meus filhos durante o tempo necessário para a pesquisa. Divido saudososa com você esta conquista.

Ao meu marido, Alex, pela paciência nos momentos de ausência e por acreditar na minha capacidade.

Aos meus filhos, Guilherme e Gustavo, por entenderem, aos seus modos, meus momentos de distância.

Ao professor Dr. Landulfo Silveira Júnior, meu orientador. Obrigada por ter me aceitado como orientanda, pela dedicação, disponibilidade e contribuições que foram essenciais para o entendimento em uma área que se mostrou tão desafiadora para mim.

Ao Laboratório Municipal de Jacareí, por ter autorizado o uso das cepas de bactérias.

A todos os professores da Pós-Graduação de Engenharia Biomédica pela dedicação e qualidade das aulas ministradas ao longo do curso.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - concessão número 2009/01788-5 e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) processo no. 306344/2017-3.

A CAPES-PROSUP pela bolsa de doutorado.

À Universidade Anhembi Morumbi pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, na elaboração deste trabalho e que não foram aqui citados.

Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança."
Albert Eisnten

RESUMO

A espectroscopia Raman é proposta como um método rápido e simples para identificação bacteriana. Este estudo tem como objetivo obter e avaliar o padrão espectral de oito espécies e um gênero de bactérias isoladas de infecções, correlacionando os espectros Raman com a composição química de cada bactéria, e desenvolver um modelo de classificação através de análise discriminante das oito espécies e de um gênero usando seus picos mais significativos. As bactérias foram cultivadas em agar Mueller Hinton e uma amostra da colônia foi colhida e colocada em um suporte de alumínio. Um total de 475 espectros foram obtidos de 115 cepas das bactérias utilizando um espectrômetro Raman dispersivo (830 nm de excitação, 300 mW de potência e 50 s de acumulação). As intensidades dos picos foram avaliadas por ANOVA de um fator (com pós-teste de Tukey) e os picos com diferenças significativas foram relacionados às diferenças na composição bioquímica das espécies. A análise discriminante baseada na distância quadrática aplicada aos picos mais significativos e nos mínimos quadrados parciais aplicados a todo o espectro apresentou 89,5% e 90,1% de precisão, respectivamente, para a classificação dos espectros em todos os grupos. A espectroscopia Raman é uma técnica promissora para identificar diferenças espectrais relacionadas ao conteúdo bioquímico de microrganismos patogênicos e fornecer um diagnóstico mais rápido de doenças infecciosas.

Palavras-chave: Engenharia. Espectroscopia Raman. Discriminação bacteriana. ANOVA.

ABSTRACT

Raman spectroscopy is proposed as a fast and simple method for bacterial identification. This study aims to obtain and evaluate the differences in the Raman features of eight species and one genus of bacteria isolated from infections, correlating the spectra with the chemical composition of each bacteria, and to develop a classification model through discriminant analysis to categorize the eight species and one genus using their most significant peaks. Bacteria were cultured in Mueller Hinton agar and a sample of biomass was harvested and placed in an aluminum sample holder. A total of 475 spectra were obtained from 115 strains of the bacteria using a dispersive Raman spectrometer (830 nm of excitation, 300 mW of power and 50 s of accumulation). The intensities of the peaks were evaluated by one-way ANOVA (with Tukey post-test) and the peaks with significant differences were related to the differences in the biochemical composition of the strains. Discriminant analysis based on quadratic distance applied to the most significant peaks and on partial least squares applied to the whole spectrum showed 89.5% and 90.1% of global accuracy, respectively, for classification of the spectra in all the groups. Raman spectroscopy is a promising technique to identify spectral differences related to the biochemical content of pathogenic microorganisms and to provide a faster diagnosis of infectious diseases.

Keywords: Engineering. Raman spectroscopy. Bacterial discrimination. ANOVA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos gerais	18
1.2 Objetivos específicos	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Bactérias	20
2.2 Composição química das bactérias	21
2.2.1 Proteínas	21
2.2.2 Polissacarídeos	22
2.2.3 Lipídeos	23
2.2.4 Ácidos nucleicos	23
2.3 Classificação das bactérias	24
2.4 Métodos para identificação de bactérias	25
2.4.1 Métodos convencionais para identificação de bactérias	25
2.4.2 Aplicações da biologia molecular na microbiologia	29
2.4.3 Aplicações das técnicas ópticas na área biológica	31
2.4.3.1 Espectroscopia de fluorescência	31
2.4.3.2 Espectroscopia no infravermelho (NIRS)	32
2.4.3.2.1 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier	33
2.5 Espectroscopia Raman	34
2.6 Aplicabilidade da espectroscopia Raman na microbiologia	36
2.7 Quimiometria	41
2.7.1 Análise discriminante pelas distâncias	42
2.7.2 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Origem e cepas utilizadas no estudo	45
3.2 Preparo das amostras	46
3.3 Aquisição dos espectros	47
3.4 Pré-processamento e análise estatística dos espectros	48

3.5 Avaliação dos picos do espectro usando ANOVA	50
3.6 Discriminação bacteriana utilizando picos mais significativos pelo ANOVA e todo espectro	51
3.6.1 Discriminação pelas distâncias (dissimilaridade)	51
3.6.2 Discriminação pelo PLS	51
4 RESULTADOS	54
4.1 Espectros Raman das diferentes espécies bacterianas	54
4.2 Análise das variações bioquímicas das bactérias avaliada pelos picos Raman	61
4.3 Discriminação das cepas usando função discriminante quadrática e PLS	66
5 DISCUSSÃO	69
5.1 Caracterização das bactérias através da espectroscopia Raman	69
5.2 Correlações entre as intensidades dos picos e constituição bioquímica das bactérias	71
5.3 Discriminação das bactérias através da espectroscopia Raman	75
5.4 Trabalhos futuros	77
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Morfologia bacteriana	20
Figura 2: Esquema da célula bacteriana	24
Figura 3: Esquema das paredes bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas	25
Figura 4: Tipos de espalhamento de luz: Espalhamento Rayleigh, Stokes e anti- Stokes	35
Figura 5: Irradiação das amostras de bactérias para coleta dos espectros Raman via “Raman probe”	46
Figura 6: Diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo (modelo P-1) e foto do aparelho	47
Figura 7: Espectro de bactéria <i>S. aureus</i> demonstrando a remoção do “background” fluorescência por polinômio de ordem 7 ajustado em toda a faixa espectral	49
Figura 8: Diagrama de blocos mostrando as etapas da metodologia da pesquisa	53
Figura 9: Espectros Raman das médias das espécies bacterianas e desvios padrões no intervalo espectral de 400 a 1800 cm^{-1}	55
Figura 10: Espectros Raman das médias das cepas bacterianas no intervalo espectral de 400 a 1800 cm^{-1}	57
Figura 11: Correlação entre os picos 1 (glicosamina) e 28 (peptideoglicano)	58
Figura 12: Correlação entre os picos 7 (DNA/RNA) e 8 (RNA)	58
Figura 13: Gráficos com as intensidades médias dos picos Raman das espécies de bactérias que tiveram as maiores significância entre si	63
Figura 14: Plotagem do agrupamento das espécies de acordo com os modelos de classificação Raman com análise discriminante baseada na distância quadrática (A) e mínimos quadrados parciais (B)	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Macromoléculas (em peso seco) presente nas células bacterianas	21
Tabela 2 - Identificação bioquímica das cepas utilizadas no estudo e quantidade de cepas por grupo	45
Tabela 3 - Número de cepas e de espectros obtidos de cada espécie	54
Tabela 4 - Picos Raman dos espectros das bactérias e tentativa de atribuições das bandas baseadas na literatura	59
Tabela 5 - Comparação entre as médias das intensidades dos picos das bactérias em 540 cm^{-1}	62
Tabela 6 - Picos Raman dos espectros das bactérias que apresentaram maior significância entre pares de grupos e descrição dos elementos bioquímicos e alterações que ocorrem entre as espécies	64
Tabela 7 - Porcentagem de erros na discriminação bacteriana de acordo com a quantidade de significâncias entre os pares de grupos	66
Tabela 8 - Matriz de classificação com os resultados de acertos dos modelos de discriminação utilizando os espectros Raman das bactérias	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

sp	Espécie
spp	Espécies
cm ⁻¹	Centímetro recíproco
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLED	<i>Cystine Lactose Eletrolyte Deficient</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
NIRS	<i>Near-infrared spectroscopy</i>
FT-IR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
SERS	<i>Surface enhanced Raman spectroscopy</i>
CARS	<i>Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy</i>
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
MH	Mueller Hinton
PC	<i>Principal Component</i>
ES	<i>Escore</i>
pH	Potencial de hidrogênio iônico
O16	Antígeno O16
NaCl	Cloreto de sódio

1 INTRODUÇÃO

A identificação de bactérias que sejam clinicamente relevantes e importantes no processo saúde-doença pelo laboratório de microbiologia fornece informações primordiais que permitem o tratamento mais efetivo das infecções causadas por estes microrganismos.

As doenças infecciosas, em especial as bacterianas, são causadas por agentes que podem provocar danos ao organismo hospedeiro de diferentes maneiras, sendo responsáveis por aproximadamente 25% das mortes globais, atrás somente das doenças cardíacas, cerebrovasculares e câncer (WHO, 2004; MURRAY, 2013). A identificação do microrganismo é importante para orientar as intervenções tanto preventivas quanto terapêuticas, uma vez que há inúmeros microrganismos infecciosos para o ser humano como bactérias, fungos, vírus e parasitas e a abordagem terapêutica é diferente para cada grupo.

O tempo gasto na identificação de microrganismos infecciosos é fator determinante nas complicações de pacientes hospitalizados, já que a patogênese desenvolvida por eles varia de acordo com a espécie e seu rápido reconhecimento permite ação medicamentosa mais apropriada (IBRAHIM et al., 2000). Em análises de rotina microbiológica, a cultura se apresenta como padrão ouro para a recuperação do microrganismo para que métodos de identificação, baseados em uma série de observações quanto à morfologia e reações bioquímicas frente a diferentes substratos possam ser executadas. São rotinas amplamente utilizadas pelos laboratórios, porém há limitações no que se diz respeito ao tempo e custo.

Na prática, observa-se que a combinação de vários métodos é necessária para alcançar a identificação entre as espécies bacterianas (WALKER; HALL; HURST, 1990), demandando tempo mais prolongado para a determinação que pode trazer prejuízos ao diagnóstico clínico do paciente. Em situações em que as ações devem ser imediatas, observa-se a administração de tratamento empírico com antimicrobianos de largo espectro antes da identificação microbiana. Como efeito adverso desta prática pode ocorrer resistência aos agentes antimicrobianos, dificultando a resolução do quadro

infecioso e aumentando o risco de uma emergência de cepas multirresistentes (DOERN et al., 1994; ANDERSSON; HUGHES, 2010). A resistência aos antimicrobianos é uma das maiores ameaças globais à saúde pública, já que as infecções causadas por bactérias multirresistentes são de difícil tratamento devido à limitação das opções de antimicrobianos disponíveis, e resultam em maiores períodos de internação hospitalar, aumento das taxas de mortalidade e elevação dos custos de assistência à saúde (LAMMIE; HUGHES, 2016; WHO, 2015). Como forma de contornar esta questão, a rápida identificação é um fator importante na decisão terapêutica. Estudo conduzido por Kerremans et al. (2008) demonstrou que o menor tempo para a identificação do agente causador de uma infecção permite a administração de uma droga mais específica, aumentando as chances de cura, com menores custos e taxas de morbidade e mortalidade.

A questão da identificação rápida dos microrganismos nas rotinas laboratoriais é uma dificuldade e o desenvolvimento de novos métodos analíticos vem sendo aplicados ao longo dos anos, promovendo avanços principalmente na área da biologia molecular, com resultados de identificação destacados pela alta sensibilidade e especificidade. Como a maioria dos testes é baseada em sequências específicas do material genético, como o DNA, a especificidade observada é alta (GRUMAZ et al., 2016). Porém, trata-se de técnicas de custo elevado e que necessitam de pessoal especializado, tanto para execução dos procedimentos quanto para a análise dos dados, que frequentemente são complexos (PETTI, 2007).

Uma abordagem baseada em técnicas de espectroscopia óptica tem sido proposta para identificação de microrganismos, já que se trata de um método considerado de rápida execução, que não necessita de reagentes ou corantes, e que permite a obtenção de resultados empregando pequenas quantidades de biomassa da cultura do microrganismo (CHOO-SMITH et al., 2001; MAQUELIN et al., 2002; MAQUELIN et al., 2003; BOARDMAN et al., 2016; MUHAMADALI et al., 2016; DIECKMAN et al., 2016; LORENZ et al., 2017). Estas técnicas são baseadas na interação (absorção, emissão e espalhamento) da radiação pelas estruturas atômicas e moleculares de

compostos presentes nas estruturas das células, tais como proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos. Esta interação é responsável por fornecer informação sobre a constituição bioquímica de vários sistemas biológicos complexos, como os microrganismos e, a partir daí, oferecer informações que permitam a identificação com tempo de cultura reduzido (NELSON; MANOHARAN; SPERRY, 1992; BOARDMAN et al, 2016).

Dentre as técnicas ópticas, a espectroscopia Raman destaca-se por tratar-se de uma técnica de medição da energia vibracional das ligações químicas das moléculas dos componentes celulares permitindo obter informações sobre a estrutura molecular dos compostos sob análise. O espalhamento Raman é um fenômeno de troca de energia entre o fóton monocromático incidente e os estados vibracionais da molécula e depende da mudança na polarizabilidade a que se sujeita a nuvem eletrônica, mudança esta induzida pela vibração da molécula quando polarizada pelo laser. A diferença de energia entre os estados vibracionais fundamental e excitado representa o espalhamento inelástico do material analisado (HANLON et al., 2000). Neste contexto, a utilização de técnicas ópticas, em especial a espectroscopia Raman, é uma alternativa na identificação de microrganismos relevantes e isto torna interessante analisar sua aplicação na identificação e discriminação de cepas clínicas de diferentes espécies bacterianas.

1.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho é avaliar a aplicação da espectroscopia Raman na definição do padrão espectral de oito espécies e um gênero de bactérias isoladas de infecções (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*).

1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- identificar quais picos apresentam diferenças estatisticamente significativas entre as espécies bacterianas pelo método ANOVA;
- correlacionar a informação espectral presente nestes picos com a composição química de cada bactéria em particular;
- desenvolver modelo de classificação por análise discriminante utilizando os picos mais significativos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bactérias

As bactérias são seres unicelulares de estrutura simples, procariotos, que podem ser encontrados isoladamente ou associados a outros microrganismos. O tamanho de sua célula pode variar, mas de maneira geral tem entre 0,2 a 2 μm de diâmetro e 1 a 6 μm de comprimento, podendo agir como saprófitas e patogênicas no meio ambiente. (TORTORA et al., 2002; KAYSER et al., 2005).

A morfologia básica das bactérias pode ser classificada nas formas de cocos, bacilos e espirilos (Figura 1). Os cocos são normalmente redondos, podendo ser ovais ou alongados, enquanto os bacilos assemelham-se a bastonetes e os espirilos assemelham-se a vírgulas ou vibriões. Outra característica também utilizada para a classificação, principalmente nos cocos, são seus arranjos após sua divisão, que podem se apresentar aos pares (conhecidos como diplococos), em cadeias ou filas (estreptococos), grupos de quatro (tétrades) ou oito (sarcinas) ou em cachos (estafilococos). Os bacilos podem se apresentar em pares reconhecidos como diplobacilos ou em cadeias, como estreptobacilos, no entanto a maioria se encontra em isolados. (KONEMAN et al., 2001).

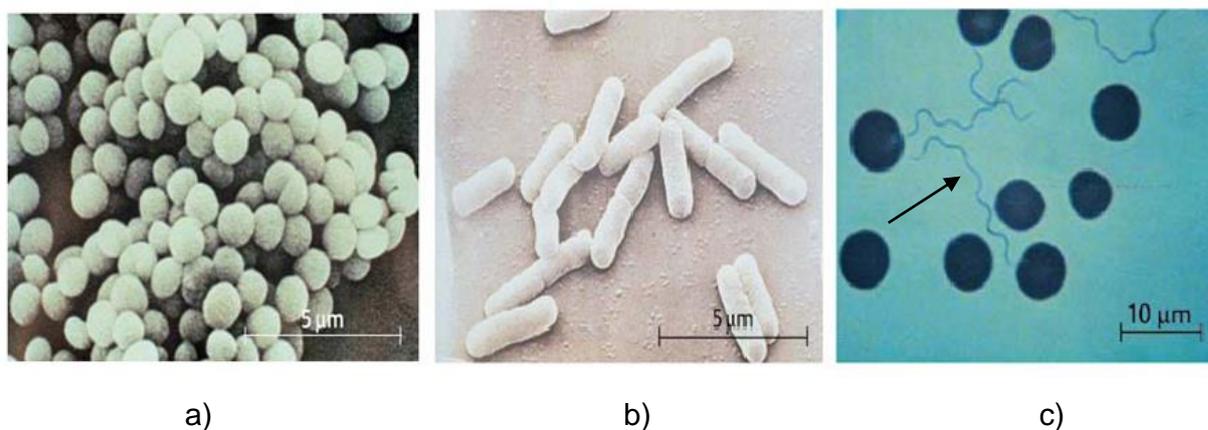


Figura 1 - Morfologia bacteriana: a) cocos, b) bacilos, c) espirilos (seta).
Fonte: KAYSER et al., 2005.

2.2 Composição química das bactérias

Os microrganismos, assim como as demais células, são constituídos por compostos químicos, tanto os inorgânicos (sódio, potássio, ferro, cálcio, cloro) quanto os orgânicos (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) (MARZOCCO; TORRES, 2005). Dos compostos inorgânicos, a água tem papel primordial, representando de 65 a 75% da composição da célula bacteriana, com papel na dissociação e separação das moléculas polares, agindo como solvente dentro do citoplasma (MADIGAN et al., 2016). No entanto, ao se retirar toda a água presente na célula, verifica-se que mais de 96 % do seu peso seco é formado por macromoléculas, em especial as proteínas que correspondem a mais de 50%, seguida pelos ácidos nucleicos, lipídeos e polissacarídeos, conforme demonstrado na Tabela 1. As macromoléculas estão presentes nestas células na forma de associações químicas de compostos orgânicos e grupos funcionais ricos em carbono, com diversas funções na fisiologia bacteriana.

Tabela 1 - Macromoléculas (em peso seco) presente nas células bacterianas.

Molécula	% (em peso seco)
Proteínas	55
DNA	3
RNA	21
Lipídeos	9
Polissacarídeos	5
Lipopolissacarídeos	3

Fonte: MADIGAN et al., 2016.

2.2.1 Proteínas

As proteínas são os principais componentes das paredes celulares, membranas celulares e estão no citoplasma e no exoesqueleto. Possui função enzimática como catalisadora de diversas reações químicas, estão envolvidas

na mediação de substâncias entre o meio interno e externo das células (atuando como transportadoras) e fazem parte de estruturas de locomoção e de fatores de virulência. Cumpre ainda papel como toxinas e exotoxinas nas células patogênicas (MADIGAN et al., 2016). As proteínas são estruturalmente formadas por cadeias de 100 ou mais aminoácidos ancorados por ligações peptídicas. Essas ligações unem dois ou mais aminoácidos onde o grupo amino ($-NH_2$) de um dos aminoácidos se liga ao grupo ácido carboxílico de outro aminoácido por ligações covalentes (CHAMPE et al., 2012). O número de aminoácidos na cadeia polipeptídica de uma proteína pode variar de 100 aminoácidos até 10.000 aminoácidos e é a quantidade, o tipo, a sequência e a forma com que os aminoácidos se apresentam na cadeia polipeptídica que determinarão a estrutura e a função da proteína.

2.2.2 Polissacarídeos

Os carboidratos são compostos orgânicos formados de carbono, hidrogênio e oxigênio, formando um grande número de compostos orgânicos com destaque para os açúcares e amidos que desempenham funções vitais na célula. Na sua maioria podem ser representados pela fórmula geral $(CH_2O)_n$, onde n indica as unidades de CH_2O na molécula (CHAMPE et al, 2012). Com base no tamanho da molécula são classificados em monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Cadeias relativamente menores de monossacarídeos são denominadas oligossacarídeos e alguns tem grande relevância biológica como aqueles contendo 4, 5, 6 e 7 átomos de carbono, com destaque para a glicose (C_6), por ser o mais abundante dos açúcares com função energética e para as pentoses (C_5) que são componentes básicos dos ácidos nucleicos.

Os açúcares podem ser utilizados de forma imediata no metabolismo celular ou então serem armazenados como reservas de energias na forma de macromoléculas, formando as paredes celulares das bactérias, através do peptidoglicano (MADIGAN et al., 2016). Sua versatilidade permite associar-se a outras macromoléculas formando polissacarídeos como glicoproteínas,

glicolípídeos e lipopolissacarídeos – LPS que além de papel estrutural nas bactérias, desempenham propriedades como de fatores de virulência bacterianos (KONEMAN et al., 2001).

2.2.3 Lipídeos

São moléculas apolares, insolúveis em água e com formação básica com átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. Depois das proteínas são os compostos orgânicos em maior abundância nas células vivas. Os lipídios são divididos por suas características estruturais, com fórmula geral representados por $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, onde n é usualmente um número par e aqueles de interesse biológico são classificados em triglicerídeos, fosfolipídeos e esteróis (CHAMPE et al., 2012), incluindo o colesterol, presente nas células animais e em algumas bactérias e micobactérias (MADIGAN et al., 2016).

2.2.4 Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleicos (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), são moléculas de polímeros de nucleotídeos. O primeiro é responsável por carregar todas as informações passíveis de serem transmitidas para as células filhas, e o segundo é responsável por expressar essas informações e pela biossíntese de proteínas. Os nucleotídeos, por sua vez, são formados por uma base nitrogenada, uma pentose e um grupo fosfato. As bases nitrogenadas são compostos cíclicos que podem apresentar-se de duas maneiras: as purinas, conhecidas como adenina e guanina e as pirimidinas conhecidas como citosina, timina e uracila. (ALLINGER, 1979).

As bases nitrogenadas são o que diferenciam os ácidos nucleicos já que todas possuem as bases adenina, citosina e guanina, mas a base pirimidina timina é exclusiva no DNA enquanto a uracila é exclusiva no RNA. Outra característica são suas ligações covalentes entre as bases e os açúcares pentose. O DNA se liga em uma pentose conhecida como desoxirribose

enquanto o RNA se liga a outra pentose com maior quantidade de oxigênio conhecida como ribose. (CHAMPE et al., 2012).

A célula bacteriana possui um genoma, um citoplasma, uma membrana citoplasmática, parede celular e algumas ainda possuem uma cápsula externa, fímbrias ou flagelos. No citoplasma estão presentes o cromossomo, plasmídeo, ribossomos e grânulos de depósito. A Figura 2 apresenta esquematicamente uma célula bacteriana típica com as principais estruturas externas e internas à membrana citoplasmática.

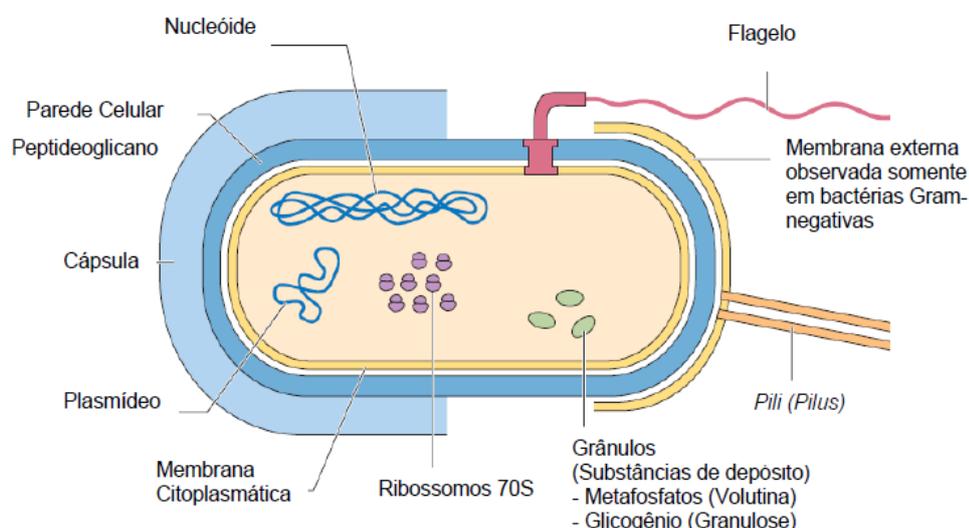


Figura 2 - Esquema da célula bacteriana.
Fonte: KAYSER et al., 2005.

2.3 Classificação das bactérias

As bactérias se diferenciam pela estrutura da parede celular, seus componentes e fisiologia. Em relação à estrutura de parede celular são classificadas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, de acordo com a capacidade de retenção do corante de Gram. Nas bactérias Gram-positivas, aproximadamente 90% da parede são compostos de peptideoglicano e além desta macromolécula, são encontradas proteínas e ácidos teicóicos que podem representar até 50% da massa seca da parede. Já a parede celular das bactérias Gram-negativas tem uma composição química mais complexa

conferindo propriedades bioquímicas e fisiológicas diferenciadas, com o espaço perioplasmático formando um compartimento que contém uma alta concentração de enzimas de degradação e proteínas de transporte (JAWETZ et al., 1998). Estas diferenças entre as paredes das bactérias estão demonstradas na Figura 3.

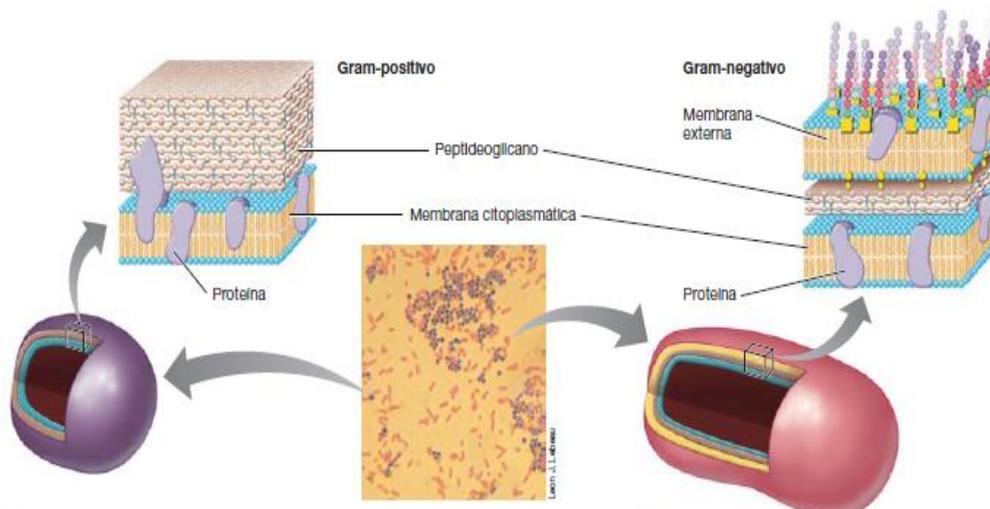


Figura 3 - Esquema das paredes bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas. Fonte: MADIGAN et al., 2016.

2.4 Métodos para identificação de bactérias

2.4.1 Métodos convencionais para identificação de bactérias

A identificação microbiológica ainda é vista como um grande desafio na área diagnóstica, necessitando de experiência laboratorial por parte do profissional e a utilização de métodos presuntivos. Quase sempre a identificação se baseia na investigação de características fenotípicas dos microrganismos, no seu tempo de crescimento, na especificidade do meio de cultura e na morfologia da colônia microbiana após o crescimento.

De uma maneira geral as rotinas de identificação das bactérias são baseadas nas características fenotípicas, que requerem o uso de várias técnicas para a determinação bacteriana guiados pelo *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. O princípio essencial é a definição de uma cultura

desconhecida dentro do sistema de classificação taxonômica com base na observação de um conjunto de características que permitam a classificação.

Os laboratórios clínicos trabalham com meios de cultura que permitem o crescimento e a manutenção de bactérias para que reações básicas como as de oxidase, catalase, taxa de fermentação ou a ausência dela, auxiliem na investigação microbiana. Estas técnicas de identificação geralmente requerem uma primeira cultura onde as amostras de fluidos biológicos (sangue, urina, líquido cefalorraquidiano etc.) são semeadas em meio de enriquecimento para que ocorra o crescimento do microrganismo. Após esta fase são utilizados os meios seletivos que permitem o isolamento de microrganismos relevantes na análise e, a partir deste isolamento serão realizados os testes morfológicos e bioquímicos para a identificação. Estes sistemas exigem um tempo de crescimento de 18 a 24 h para cada fase, resultando em dias para que se obtenha o resultado, que podem variar de acordo com as necessidades da bactéria avaliada. Neste contexto, o período que se leva para realizar a identificação desde o recebimento do material do paciente até a liberação do resultado é aproximadamente cinco dias, dependendo da categoria da bactéria presente e da experiência do microbiologista ao analisar a amostra. Existem alternativas relacionadas aos tipos de meios de cultura, como aqueles que apresentam em sua formulação substâncias indicadoras das principais espécies bacterianas envolvidas nos processos infecciosos, porém o custo destas metodologias é alto e, embora possam ser mais rápidos, não são tão aplicados devido dificuldades de acesso de alguns laboratórios (D'SOUZA; CAMPBELL; BARON, 2004).

Como dito anteriormente, as bactérias podem ser classificadas em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas e esta diferença é evidenciada na coloração idealizada por Christian Gram já que as positivas são coradas em roxo e as negativas em vermelho (McCLELLAND, 2001). O perfil morfológico pode ser fundamentado tanto na observação de estruturas microscópicas quanto nas características que as colônias tomam ao crescer em meios de cultura. Para algumas espécies pode-se utilizar dos chamados meios seletivos que permitem o crescimento de determinados grupos, porém sem fornecer

identificação entre as espécies (MURRAY et al., 1999). Há ainda os meios de cultura diferenciais, nos quais são adicionados algum substrato cromogênico ou fluorogênico que, hidrolisados por enzimas específicas das células bacterianas, permitem a identificação macroscópica presuntiva de algumas espécies (FALLON et al., 2003). No entanto, em determinadas situações, métodos adicionais baseados em outros perfis como o bioquímico deverão ser utilizados para a completa elucidação. Para isto, têm-se à disposição os testes de fermentação de carboidratos apresentados geralmente na forma de kits comerciais disponibilizados para este fim (SNYDER et al., 2008).

A caracterização bacteriana patogênica é de extrema importância na definição das doenças infecciosas e diversos estudos são conduzidos para esta pesquisa. Como exemplo, a ocorrência de *Legionella pneumophila* foi avaliada em amostras de pacientes hospitalizados com suspeita de infecção do trato respiratório inferior e em amostras de água que supriam este hospital, uma vez que se trata de bactéria normalmente isolada de meios aquáticos artificiais. Neste estudo a metodologia aplicada foi manual, com a semeadura em meios seletivos e a identificação através de perfis morfológicos e bioquímicos. As amostras foram submetidas à incubação em estufa a 37°C por sete dias, sendo que o aparecimento de colônias sugestivas ocorreu de três a quatro dias pós-incubação. Como parte do protocolo, as colônias foram re-semeadas e, a partir deste crescimento, foram realizadas as provas bioquímicas para a confirmação da etiologia (CHAUDHURY et al., 2010). Calcula-se que, do recebimento da amostra até a liberação do resultado transcorreu aproximadamente sete dias, levando a uma terapia empírica até a determinação da etiologia da infecção.

Gilligan et al. (2004) avaliaram a prevalência de *Enterococcus* spp. com sensibilidade reduzida à vancomicina em amostras de parturientes atendidas em um hospital universitário, casos em que a colonização por *Streptococcus agalactiae* também pode trazer sérios prejuízos ao neonato. Como forma de profilaxia, a terapia com penicilina, eritromicina ou clindamicina é indicada, no entanto como a resistência a estes antimicrobianos tem aumentado, a utilização da vancomicina tem sido sugerida na prática clínica. O risco deste

procedimento, baseados em protocolos empíricos, é favorecer o aparecimento de cepas resistentes a esta droga e a transmissão do gene responsável a outras bactérias Gram-positivas. Kumar et al. (2006) realizaram um estudo retrospectivo avaliando as complicações do choque séptico e o início da antibioticoterapia em 2.731 pacientes atendidos em diferentes unidades de saúde no período entre julho de 1989 a junho de 2002, mostrando a importância da terapia nas primeiras horas da admissão hospitalar a fim de diminuir os índices de mortalidade. A rápida identificação da bactéria para posterior teste de sensibilidade é muito importante para a escolha do melhor antimicrobiano e as técnicas rotineiras de confirmação da espécie bacteriana levam vários dias para conclusão.

Como alternativa para redução dos tempos empregados nas rotinas microbiológicas encontra-se disponível comercialmente os meios de cultura chamados de cromogênicos, que surgiram da necessidade de se abreviar o tempo necessário para obtenção dos resultados analíticos e simplificar o trabalho. Estes meios empregam substâncias que identificam atividades enzimáticas diferentes e, a partir da interpretação das cores que a colônia assume, podem sugerir o gênero e, em alguns casos, até a espécie bacteriana. Fallon et al. (2001) compararam o desempenho de três diferentes meios cromogênicos na identificação de microrganismos causadores de infecções urinárias. Para as infecções que tinham como agente *Escherichia coli*, o valor preditivo positivo para estes meios foi superior a 97%, enquanto que, com o uso do meio tradicional para pesquisa de patógenos urinários (CLED), este valor foi de 78%. No entanto, para as amostras que apresentaram microbiota mista por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, estas últimas apresentaram dificuldades no crescimento e na identificação demonstrando que, embora seja um recurso que consiga diminuir o tempo de identificação bacteriana, para algumas espécies o resultado é duvidoso e como é baseada na percepção das cores das colônias pelo analista, pode se tornar subjetivo tendo que se recorrer a provas bioquímicas para confirmação.

Ainda neste contexto, também está disponível meio de cultura que permite o crescimento seletivo e a identificação presuntiva de uma única

espécie bacteriana. Em 2010 Louie et al. realizaram a identificação de 243 isolados de estreptococo de 1025 amostras biológicas encaminhadas para análise, utilizando o método convencional e o meio cromogênico. Após 48 horas de incubação, o agar seletivo recuperou 240 cepas (98,8%) enquanto que a técnica convencional identificou 201 isolados (82,7%), indicando uma maior sensibilidade quando comparado as técnicas de rotina. No entanto, 50 amostras (6,4%) que foram identificadas presuntivamente como *Streptococcus agalactiae* eram outras espécies de estreptococos e *Enterococcus* spp.

A identificação das espécies de bactérias pode ser realizada por diferentes métodos e, em várias situações um método é complementar ao outro, de modo que estudos devem ser ampliados nesta área a fim de obter métodos de identificação mais rápidos e precisos.

2.4.2 Aplicações da biologia molecular na microbiologia

A partir da década de 80, as técnicas moleculares começaram a ser utilizadas como uma alternativa aos métodos fenotípicos na identificação microbiana, permitindo aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas. Avanços nos estudos de biologia molecular propiciaram o desenvolvimento e emprego de vários métodos de tipagem molecular e estas técnicas tem-se demonstrado bastante úteis na identificação e discriminação entre espécies com características semelhantes e naquelas de difícil cultivo e isolamento (WANG et al., 2011).

Técnicas genotípicas referem-se à caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou total de um microrganismo, que são características bem estáveis e estas técnicas moleculares tem aplicação direta na detecção e caracterização de bactérias patogênicas. Dentre essas se destacam as fundamentadas na amplificação de sequências do DNA pela reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) (MALORNY et al., 2003), que é uma técnica altamente sensível, onde pequenas quantidades de sequências de DNA ou RNA específicas podem ser

enzimaticamente amplificadas até que sejam obtidas milhões de cópias da sequência alvo, tornando-se a técnica genética mais utilizada em diagnóstico microbiológico (TANG et al., 1997; KONEMAN et al., 2001)

Segundo trabalho de Haijing et al. (2009), a técnica da PCR permitiu a caracterização de diferentes espécies de micobactérias, com concordância em 99,3% comparada à técnicas usuais. Tendo em vista que se trata de um microrganismo fastidioso que, em condições normais levam de quatro a oito semanas para formar colônias viáveis para análise, a redução do tempo de identificação resulta em terapia mais adequada com mais chances de resolução do quadro infeccioso.

Um estudo realizado por Brigante et al. (2008) comparou duas metodologias para a identificação fenotípica de espécies de *Staphylococcus* spp coagulase negativa. Foram avaliados 200 isolados bacterianos, sendo que 23 (11,5%) foram discordantes. Mesmo realizando a repetição dos testes, a definição das espécies só foi alcançada realizando-se testes genotípicos. Law et al. (2015) compararam várias metodologias baseadas em biologia molecular na detecção de patógenos envolvidos em contaminação de comida, avaliando estes métodos como rápidos, mais sensíveis e específicos quando comparados à metodologia clássica de identificação porém a necessidade de profissional especializado e a instrumentação podem dificultar o acesso a essas metodologias.

A biologia molecular tem se mostrado como uma ferramenta promissora no campo microbiológico, quando aplicada em casos que a metodologia de identificação microbiana convencional apresenta resultados inconclusivos. Embora seja possível adquirir resultados rápidos com as técnicas, estudos empregando as técnicas moleculares têm apontado dificuldades nestas abordagens, principalmente em relação ao custo dos materiais empregados, como por exemplo, dos “primers”, a complexidade na interpretação dos dados e na metodologia dos procedimentos e a necessidade de pessoas preparadas na manipulação e realização das técnicas. Tendo isto em vista, Wu et al. (2007) desenvolveram uma metodologia baseada na identificação genotípica de espécies de micobactérias que, comparada às

técnicas manuais, apresentou alto índice de sensibilidade e especificidade, com coerência de 99,1%. No entanto, mesmo necessitando de menos recursos, ainda seria necessária a amplificação através da PCR.

Diante das dificuldades metodológicas na identificação microbiana, devem ser avaliadas e propostas técnicas que sejam rápidas, com custos reduzidos, que proporcionem resultados reprodutíveis e de baixa complexidade dos procedimentos laboratoriais, a fim de melhorar e facilitar o diagnóstico dos agentes etiológicos das principais doenças infecciosas.

2.4.3 Aplicações das técnicas ópticas na área biológica

A interação da luz com tecido tem sido usada para reconhecer alterações biológicas desde meados da década de 1800 (MANTSCH et al., 1996). Com o desenvolvimento de novas fontes de luz, lasers, detectores e fibras ópticas, a partir de meados dos anos 1990, estas interações puderam ser medidas quantitativamente auxiliando na obtenção de informações sobre a estrutura bioquímica e alterações fisiológicas ou patológicas dos tecidos estudados. O processo de interação entre a radiação eletromagnética e a matéria é analisado pela espectroscopia e o registro desta interação é dado pelo espectro. De um modo geral, a incidência da radiação sobre a molécula pode gerar uma transição entre os estados energéticos da mesma, de acordo com a energia da radiação incidente sobre esta molécula. As transições entre os estados ocorrem de maneira diferenciada, sendo transições eletrônicas, vibracionais e/ou rotacionais. Para análise de cada um desses tipos de transições é utilizada uma técnica específica: espectroscopia de fluorescência, espectroscopia Raman, espectroscopia no infravermelho (NIRS) entre outras (RICHARDS-KORTUM et al., 1996).

2.4.3.1 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é um método que vem sendo explorado pelos cientistas para estudar funções e as modificações estruturais

de biomoléculas em soluções desde 1950 (TOURKYA et al., 2009) e diversos trabalhos têm sido conduzidos na avaliação da aplicação desta técnica em pesquisas microbiológicas.

O trabalho de Giana et al. (2003) demonstrou a possibilidade do uso da espectroscopia de fluorescência na diferenciação dos grupos bacterianos *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*. As três espécies foram discriminadas através da PCA (Principal Component Analysis), com excelentes índices de sensibilidade e especificidade. Bhatta et al. (2006) também aplicaram a espectroscopia de fluorescência como forma de caracterizar microrganismos de reinos diferentes, utilizando *Lactobacillus* (bactéria) e *Saccharomyces* (fungo). Tourkya et al. (2009) investigaram a utilização da fluorescência na identificação de quatro gêneros de bactérias não fermentadoras de glicose (*Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*) que, por métodos convencionais, geralmente resultam em perfis de difícil interpretação. Os autores obtiveram boa correlação com a identificação genotípica, com sensibilidade e especificidade superior a 90%, além de caracterizar as diferentes espécies *Pseudomonas* utilizadas no estudo. Outra aplicação da espectroscopia da fluorescência na microbiologia foi apresentada por Guo et al. (2017), que utilizaram a técnica e um corante (laranja de acridina) na quantificação de *E. coli*, obtendo a contagem em menor tempo e com bons índices de identificação, quando comparados à metodologia clássica.

2.4.3.2 Espectroscopia no infravermelho (NIRS)

A espectroscopia no infravermelho (“Near-infrared spectroscopy” - NIRS) também vem se apresentando como uma potencial ferramenta na identificação microbiana. Esta se baseia na interpretação do espectro de absorção do material obtido a partir da irradiação com radiação infravermelha monocromática, mas com maior gasto de tempo para a obtenção dos espectros, visto que as medições são realizadas em comprimentos de onda discretos, intervalados por alguns nanômetros, e de alto custo na construção do monocromador.

2.4.3.2.1 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

Uma variante mais popular à NIRS é a espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), que possibilita diminuição do tempo de obtenção desses dados com aumento de qualidade (SCHMITT et al., 1998).

A fim de classificar as bactérias de acordo com o gênero pela técnica FT-IR, Helm et al. (1995) analisaram 139 espectros de várias espécies bacterianas. Ao avaliar espectros de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Clostridium*, as espécies de *Staphylococcus* foram agrupadas em um mesmo grupo, que foi subdividido em dois subgrupos contendo as cepas coagulase positivas e as coagulase negativas. No caso de *Streptococcus*, todas as espécies foram agrupadas em um único grupo; no entanto, a despeito da taxonomia para cocos e para bastonetes, os gêneros *Streptococcus* e *Clostridium* não puderam ser completamente separados dentro de dois grupos distintos. Os diferentes espectros das cepas dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Legionella*, e da família *Enterobacteriaceae* também foram investigados de acordo com a positividade para coloração de Gram, e houve a separação de dois grupos de cepas Gram-positivas e Gram-negativas.

Nieto et al. (2004) empregaram a espectroscopia FT-IR para diferenciar cepas da família *Enterobacteriaceae* (*Proteus*) e os gêneros *Staphylococcus* e *Pseudomonas*, definindo janelas espectrais para diferenciar as populações. Neste estudo, foi selecionada a janela espectral de lipídeos (2841 a 2986 cm^{-1}), refletindo a diferença lipídica na composição das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a janela de carboidratos (1180 a 1290 cm^{-1}) e a janela denominada de verdadeiro “fingerprint” (805 a 944 cm^{-1}), refletindo vibrações de grupos funcionais orgânicos característicos de cada molécula. A partir dos resultados, os autores diferenciaram as bactérias Gram-positivas das Gram-negativas e observaram quatro subgrupos maiores que se associaram com os gêneros estudados. Dessa forma, concluíram que a espectroscopia FT-IR foi capaz de classificar os microrganismos em diferentes níveis taxonômicos sem

a necessidade de outros critérios, de maneira rápida e simples, utilizando pequena quantidade de biomassa.

Kohler et al. (2015) avaliou a utilização da FT- IR na caracterização bioquímica (em particular, caracterização de lipídeos) de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* comparados à técnica tradicional, encontrando boa correlação entre os resultados, ressaltando os pontos positivos da utilização da técnica óptica.

2.5 Espectroscopia Raman

A interação da radiação eletromagnética com a matéria pode originar o espalhamento, que se trata da mudança na direção de propagação da radiação, podendo apresentar ou não uma mudança de frequência. Nestas situações, dois tipos de espalhamento podem ser observados: o espalhamento elástico ou Rayleigh, onde a radiação será espalhada na mesma frequência da radiação incidente, e o espalhamento inelástico ou Raman, onde a radiação será espalhada em uma frequência diferente da radiação incidente (SMITH; DENT, 2013). Este espalhamento inelástico de luz pode resultar tanto em um fóton de menor energia quanto em um fóton de maior energia. No primeiro caso, o fóton incidente encontra a molécula em um estado vibracional fundamental e o fóton espalhado é decorrente da passagem a um estado vibracionalmente excitado, e a diferença de energia entre o fóton incidente e o espalhado correspondem, portanto, a energia necessária para excitar este nível vibracional. Em outro caso pode acontecer do fóton espalhado ter maior energia que o fóton incidente, pois existe um número de moléculas que, nas condições ambientes, já estão excitadas, e decaem ao nível fundamental. No primeiro caso tem-se o espalhamento Stokes (fóton espalhado com energia menor que a do incidente), enquanto que no segundo, o espalhamento anti-Stokes (fóton espalhado com energia maior que a do incidente), vistos na Figura 4.

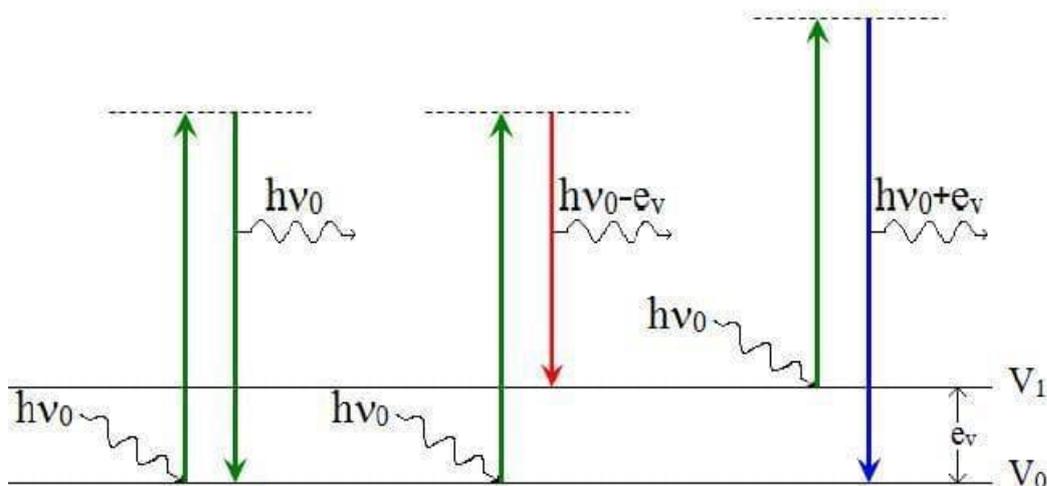


Figura 4 - Tipos de espalhamento de luz: Espalhamento Rayleigh, Stokes e anti- Stokes.
Fonte: SALA, 2003.

O efeito Raman teve sua primeira publicação em março de 1928, com a descrição de um experimento no qual era possível visualizar o efeito de espalhamento inelástico da radiação (RAMAN; KRISHNAN, 1928). O efeito Raman envolve uma distorção momentânea dos elétrons distribuídos em torno da nuvem eletrônica de uma molécula, seguida pela re-emissão da radiação enquanto esta nuvem retorna à sua configuração normal. Na forma distorcida, a molécula fica polarizada e no efeito Raman está ligado ao momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação. Esta facilidade da molécula se deformar sob ação de um campo elétrico denomina-se polarizabilidade e no caso particular do espalhamento Raman, esta polarizabilidade deve variar durante a vibração para que as moléculas sejam Raman ativas (SALA, 2003).

Os fótons que são espalhados têm uma energia maior ou menor em relação à luz incidente. O ganho ou a perda de energia durante o processo de espalhamento é causado pela interação do fóton com os estados vibracionais das ligações químicas da amostra. Portanto, um espectro Raman típico envolve um número de picos que são indicativos de determinadas ligações químicas e suas vibrações. As linhas espectrais são fornecidas em função de frequências

denominadas deslocamentos Raman (“Raman shift”) que são expressas em cm^{-1} (FARIA et al., 1996).

As técnicas ópticas têm sido propostas visando identificação de alterações patológicas em células, tecidos e fluidos biológicos, buscando discriminação de doenças e estados metabólicos alterados (MATTHÄUS et al., 2008). A espectroscopia Raman destaca-se por obter informações sobre a estrutura molecular e ligações químicas dos compostos sob análise, gerando a chamada impressão digital das moléculas (HANLON et al., 2000).

As constantes inovações e resultados envolvendo a espectroscopia Raman possibilitaram o uso desta técnica como uma ferramenta de grande valor nas análises de materiais biológicos, já que a emissão de fluorescência, que é um sinal mais intenso que o espalhamento Raman, pode ser reduzido com o uso de excitação laser em comprimento de onda mais próximo do infravermelho (CAREY, 1999; HANLON et al., 2000) ou ultravioleta (UVRR) (MANOHARAN, 1990). Com isto, técnicas como Raman ressonante, espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS), micro-Raman e espalhamento Raman anti-Stokes coerentes (CARS) têm sido utilizadas nas mais diversas análises e pesquisas envolvendo diferentes tipos de material biológico (HUANG et al., 2010).

2.6 Aplicabilidade da espectroscopia Raman na microbiologia

Em microbiologia, há uma crescente necessidade da rápida identificação de microrganismos em amostras do meio ambiente, envolvidos em Saúde Pública e estudos clínicos. Para a situação que requer uma identificação muito rápida de microrganismos específicos, uma opção é usar a abordagem da espectroscopia, particularmente a Raman (HUANG et al., 2007; PAHLOW et al., 2015).

A espectroscopia Raman é uma técnica não invasiva e simples, uma vez que não se faz necessário o emprego de reagentes, nem a adição de corantes ou outras substâncias ou mesmo de solventes para a mensuração espectral. Além disto, as análises espectrais são realizadas sem que ocorra

modificação ou preparação da amostra, permitindo que a composição química e estrutura morfológica dos microrganismos e tecidos não sejam comprometidas, mantendo a integridade dos espectros (HUANG et al., 2004).

Tendo isto em vista, alguns estudos têm sido conduzidos na tentativa de verificar a possibilidade do uso desta técnica como ferramenta diagnóstica. Naumanm et al. (1995) realizaram um estudo incluindo cepas da família *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Pseudomonas*. Dois grupos principais foram separados de acordo com a reação pela coloração de Gram, distinguindo entre Gram-positivo e Gram-negativo, com a identificação bandas características: proteínas celulares ($1500-1700\text{ cm}^{-1}$) e fosfatos, oligossacarídeos e polissacarídeos da parede celular ($800-1300\text{ cm}^{-1}$).

Em um estudo clínico prospectivo feito para identificar patógenos causadores de infecções na corrente sanguínea de pacientes hospitalizados, Maquelin et al. (2003) analisaram 135 amostras de sangue das quais 129 apresentaram contaminação por bactérias. Estas amostras, devidamente preparadas e cultivadas em agar Mueller Hinton, resultaram microcolônias cultivadas por um período de 6 a 8 h, que foram avaliadas por espectroscopia Raman (830 nm) diretamente na colônia no agar. A identificação destas cepas resultou em 92,2% de acertos comparados às técnicas tradicionais, mostrando a possibilidade do uso da espectroscopia Raman como ferramenta para uma identificação microbiana rápida.

Em outro estudo realizado por Choo-Smith et al. (2001) com cinco espécies microbianas (quatro bactérias e uma levedura, patógenos clinicamente relevantes) registraram o espectro das microcolônias diretamente do meio de cultura depois de 6 h, 12 h e 24 h de incubação e estabeleceram uma base de dados. Neste trabalho os autores, usando a microespectroscopia Raman (830 nm) e métodos estatísticos multivariados, conseguiram identificar e separar em “clusters” os microrganismos de espécies diferentes, sendo que esta separação foi melhor quando as medidas foram realizadas após 6 h de incubação. As amostras de 12 h e 24 h resultaram em maior heterogeneidade espectral, concluindo-se a partir destes dados a necessidade da padronização

dos tempos de cultivo para a formação de um banco de dados aplicável à identificação.

Ainda neste contexto, Maquelin et al. (2000) realizaram um estudo avaliando a influência que o meio de cultura poderia ter sobre o espectro Raman obtido, bem como diferenças espectrais em função da profundidade de penetração do laser (830 nm) na colônia. Foram utilizadas microcolônias de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecium* crescidos em meio de Mueller Hinton após 6 h de incubação, em condições adequadas para o crescimento microbiano. Embora tenha utilizado apenas um tipo de meio, observaram-se a influência deste nos espectros obtidos, como os picos referentes à água entre 1550-1700 cm^{-1} . Na avaliação quanto à região da microcolônia em que era realizada a incidência da luz e coleta dos espectros (superfície ou em profundidade), foram verificadas diferenças nos espectros, provavelmente devido aos diferentes níveis de moléculas de RNA em regiões de bordas comparativamente ao centro. Além disso, os espectros diferentes mostraram picos de timina (749 cm^{-1}) e fenilalanina (1004 cm^{-1}), indicando a presença de outras substâncias biológicas.

Em uma análise conduzida por Kirschner et al. (2001) foi realizado um estudo com 18 cepas de espécies diferentes de *Enterococcus* spp. (*E. faecium*, *E. hirae*, *E. faecalis*, *E. duran*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*), comparando a identificação fenotípica por métodos bioquímicos com a identificação por técnica Raman (830 nm). Nesta análise, a espectroscopia Raman identificou corretamente 17 das 18 cepas estudadas. Neste caso a espectroscopia vibracional também se mostrou como uma ferramenta útil na discriminação de espécies bacterianas.

Em 2004, Goodacre e Jarvis utilizaram 21 isolados de infecções de trato urinário, sendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Estas foram cultivadas em agar sangue e, posteriormente, uma parte da biomassa foi adicionada a uma solução coloidal de prata. Foram realizados 84 espectros com técnica Raman ressonante (UVRR, 244nm) dos isolados e foi possível a distinção entre as diferentes espécies. Porém houve similaridade entre dois

espectros de *Klebsiella* spp. e *E. coli*, que em análise mais apurada, detectou-se algumas diferenças nas regiões entre 480 e 800 cm^{-1} . *Citrobacter* spp. exibiu um pico característico em 677 cm^{-1} , atribuído a uma toxina produzida pela bactéria, e os espectros de *Enterococcus* spp. e *Proteus*, embora pertencentes a diferentes grupos, apresentaram um pico muito pronunciado em 730 cm^{-1} , atribuído a N-acetil-D-glucosamina, presente em ambas as bactérias. A análise estatística gerou dendogramas que permitiu a separação entre os gêneros.

Oliveira et al. (2012) avaliaram o potencial da espectroscopia Raman na identificação e discriminação de sete diferentes gêneros bacterianos isolados de infecções de trato urinário e desenvolveram metodologia de discriminação baseada nas diferenças espectrais entre as bactérias, utilizando métodos estatísticos multivariados (PCA) e análise discriminante (distância de Mahalanobis), separando as espécies Gram-positivas das Gram-negativas com 100% de precisão. A espectroscopia Raman também pode ser utilizada na detecção de patógenos em água, conforme descrito em estudo de Montanari et al. (2018), que utilizou a técnica na identificação de leveduras contaminando água que supria os equipamentos de hemodiálise de um hospital, que comparada às técnicas tradicionais de classificação, mostrou-se vantajosa quanto ao custo e tempo gasto nas caracterizações.

Na tentativa de melhorar a qualidade dos sinais gerados e aumentar a relação sinal/ruído, estudos têm utilizado o espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS), que é uma técnica que aumenta o espalhamento Raman por moléculas adsorvidas em superfícies de nanoesferas de metais (ouro, prata e cobre são os mais comuns) ou superfícies metálicas nanoestruturadas (NOLAN et al., 2011; CHISANGA et al., 2018). Jarvis e Goodacre (2008) realizaram uma revisão da literatura, demonstrando a utilidade da técnica SERS (785 nm) na identificação de possíveis agentes de guerra biológica, como os esporos de *Bacillus anthracis*, no entendimento do perfil metabólico dos microrganismos e no monitoramento de bioprocessos, como a produção da penicilina através da fermentação do fungo *Penicillium chrysogenu*.

Ainda neste contexto, outro estudo conduzido por Osorio-Román et al. (2010) avaliaram a caracterização do antígeno O (componente específico das paredes bacterianas) de bactérias *E. coli* O16 e *Salmonella typhimurium*, importantes agentes de infecções intestinais. Através da SERS, os espectros gerados foram diferentes o suficiente para permitir a caracterização destes microrganismos: as bandas vibracionais nas regiões entre 430 e 600 cm^{-1} são únicas para os antígenos das cepas de *Salmonella*, enquanto os picos em 724 e 1578 cm^{-1} são observados nos antígenos de *E. coli*. Sundaram et al. (2013) realizaram a identificação e classificação de quatro espécies diferentes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria innocua*) *in vitro*, envolvidos na contaminação de alimentos e desenvolveram um modelo de discriminação baseado em PCA, com excelente índice de classificação, com 97% de acertos. O estudo realizado por Chen, Premasiri e Ziegler (2018) avaliou a aplicação da técnica SERS para identificar os dois principais patógenos responsáveis por doenças sexualmente transmissíveis (DST): *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*, correlacionando seus espectros com os principais elementos presentes nas bactérias. Nos espectros de *N. gonorrhoeae*, a contribuição da guanina, adenina e NAD^+/NADH é mais evidente, enquanto para *C. trachomatis* o espectro reflete principalmente as proteínas presentes na superfície da bactéria. Com isso, os autores sugerem que a determinação dos constituintes da célula bacteriana e sua caracterização espectral possam dispensar a etapa do cultivo e permitir a identificação direta da célula em tempo menor.

Wu et al. (2014) usaram SERS para identificar *P. aeruginosa* diretamente do material biológico de pacientes com fibrose cística e pacientes controle, e o modelo discriminatório PLS (Partial Least Squares) foi capaz de discriminar as amostras de infecção daqueles sem infecção com 99,3% de sensibilidade e 99,6% de especificidade, além de discriminar amostras de pacientes com doença de pacientes saudáveis com 97,5% de sensibilidade e 100% de especificidade, demonstrando o potencial de usar a técnica em

amostras biológicas como uma ferramenta de diagnóstico rápido para detectar infecções bacterianas

Assim, a espectroscopia Raman vem se mostrando como uma ferramenta no estudo das características químicas e estruturais das células, apresentando-se como uma técnica altamente sensível e específica. O espectro Raman fornece um número de picos que descreve a composição molecular destas células, sendo estes picos sensíveis a mudanças estruturais, variações de interações intra e inter molecular, constituição de membrana e a interação lipídeo-proteína. Dado o interesse por métodos rápidos de análise microbiológica, os estudos envolvendo o emprego da espectroscopia Raman na identificação de microrganismos visa agilizar os processos de identificação microbiana por métodos mais rápidos e menos dispendiosos e com isto aperfeiçoar os procedimentos laboratoriais.

2.7 Quimiometria

A quimiometria pode ser definida como a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal para o tratamento de dados químicos, de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos. Ela enfoca o estudo de medidas analíticas baseando-se na idéia da observação indireta, relacionando essas medidas à composição química de uma substância e deduzindo o valor de uma propriedade de interesse através de alguma relação matemática.

A quimiometria pode ser dividida em áreas aplicadas atualmente como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, modelagem de processos multivariados, métodos de inteligência artificial, dentre outras (BRUNS; FAIGLE, 1995).

Grande parte do sucesso da espectroscopia Raman na área biomédica deve-se à utilização de ferramentas quimiométricas. Uma das principais aplicações da quimiometria foi na área de espectroscopia molecular. Com o uso das ferramentas quimiométricas foi possível analisar dados de maior

complexidade, dados com baixa resolução do sinal analítico e análise simultânea de vários compostos. A combinação da espectroscopia Raman com a quimiometria permite a criação de metodologias mais rápidas, redução do uso de reagentes, menor custo de análise e simplificação no preparo das amostras (MOROS; GARRIGUES; GUARDIA, 2010).

Os métodos de reconhecimento de padrões permitem identificar similaridades e diferenças nas propriedades das amostras e/ou variáveis e classificá-las de acordo com tais características. Esses métodos são divididos em dois segmentos: os de treinamento não-supervisionado e os de treinamento supervisionado. Os métodos de treinamento não-supervisionados não requerem nenhuma suposição inicial sobre a estrutura dos dados, o objetivo é encontrar agrupamentos naturais. A análise por componentes principais (PCA) é um dos métodos mais utilizados e difundidos para esse tipo de estudo (BRO; SMILDE, 2014).

Os métodos de treinamento supervisionados são aqueles que necessitam de alguma suposição inicial sobre o sistema em estudo e são empregados para prever se uma amostra pertence a uma determinada classe previamente estabelecida, como por exemplo, a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês, Partial Least Squares) (BARKER; RAYENS, 2003).

Nesta tese foi abordado somente o método empregado no tratamento de dados deste estudo.

2.7.1 Análise discriminante pelas distâncias

Na análise e interpretação dos dados, as observações podem ser agrupadas segundo algum tipo de métrica de distância, permitindo avaliar a extensão e a direção dos afastamentos entre os valores médios das variáveis usadas na discriminação, que são agrupadas conforme medidas de correlação ou associação. As medidas de distância são consideradas medidas de dissimilaridade, pois quanto maior os valores, menor é a semelhança entre as

amostras (FÁVERO et al., 2009). As principais medidas de distância nas análises discriminantes são:

- Distância Euclidiana: distância entre duas observações correspondente à raiz quadrada da soma dos quadrados das diferenças entre os pares de observações para todas as p variáveis.

$$d_{ij} = [\sum(x_i - x_j)^2]^{1/2} \quad (1)$$

- Distância Euclidiana quadrática: a distância entre duas observações (i e j) correspondente à soma dos quadrados das diferenças entre essas observações para todas as p variáveis.

$$d_{ij} = [(x_i - x_j)^T \cdot A \cdot (x_i - x_j)]^{1/2} \quad (2)$$

onde A é a matriz identidade.

- Distância de Mahalanobis: é a distância estatística entre dois indivíduos i e j , considerando a matriz de covariância S para o cálculo das distâncias. É um parâmetro útil para determinar a semelhança (ou diferença) dos dados de um grupo quando comparado a outro grupo e também para verificar a coesão do agrupamento da nuvem de pontos experimentais, visando análise discriminante.

$$d_{ij} = [(x_i - x_j)^T S^{-1} (x_i - x_j)]^{1/2} \quad (3)$$

2.7.2 Análise Discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

O PLS-DA é considerado um método supervisionado, no qual se deve ter um conhecimento inicial sobre as classes do conjunto de amostras. As classes são definidas baseadas no conhecimento prévio do sistema ou através de uma análise exploratória (PCA, por exemplo). O objetivo da regressão PLS é prever as concentrações Y a partir dos dados multivariados X .

O modelo de classificação PLS-DA pode ser construído a partir de algoritmos da regressão multivariada por mínimos quadrados parciais. O PLS é um tipo de calibração inversa, onde se busca uma relação direta entre a resposta instrumental e a propriedade de interesse (qualitativa ou quantitativa) e é construído em duas etapas: calibração e validação. Em uma primeira etapa, tanto a matriz de dados independentes X (variáveis espectrais) a ser projetada em novo sistema de coordenadas, como a matriz dependente Y (amostras) são decompostas simultaneamente. Tanto a matriz X como a matriz Y , decompostas no novo sistema de coordenadas, são representadas por T e U ("scores"), que representam a projeção dos valores das amostras no espaço, e P e Q ("loadings" ou "pesos"), que são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e os componentes principais, representando, portanto o quanto uma variável original contribui para um determinado componente principal, conhecidos como variáveis latentes. Uma grande vantagem do modelo de regressão PLS é a sua robustez, já que os parâmetros do modelo não se alteram de maneira significativa quando novas amostras são acrescentadas ou retiradas do conjunto de calibração (GELADI; KOWALSKI, 1986).

A etapa seguinte é a de validação, onde as variáveis de saída, obtidas através do conjunto de dados de calibração, são utilizadas para obter a classificação do novo conjunto de amostras. Um dos métodos mais utilizados para efetuar a validação é a chamada validação cruzada "leave-one-out". Neste tipo de validação, retira-se uma amostra do conjunto de calibração e constrói-se o modelo com as demais; depois, o modelo construído é usado para prever a classificação da amostra que foi retirada inicialmente e calcula-se o erro de previsão. Esse procedimento é repetido tantas vezes quantas for o número de amostras, até que todas as amostras tenham sido validadas.

Este modelo de validação cruzada é particularmente útil quando há pequeno número de amostras, inviabilizando a separação dos dados em dois grupos, um para a obtenção do modelo (cálculo dos scores e loadings para as matrizes X e Y originais) e outro para a validação (teste do modelo em amostra).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e cepas utilizadas no estudo

Foram utilizadas 115 cepas clínicas obtidas a partir de material biológico (urina, secreções e líquido) encaminhado ao Laboratório Municipal de Jacareí (SP) para análise. Este material foi transportado seguindo os procedimentos adotados para o transporte de material contaminante. Na Tabela 2 estão descritas as diferentes bactérias utilizadas neste estudo, selecionadas devido sua relevância nos quadros infecciosos e o número de cepas para representar a variação biológica entre as espécies.

Tabela 2 - Identificação bioquímica das espécies bacterianas utilizadas no estudo e quantidade de cepas por grupo.

Gram-negativas	Gram-positivas
<i>Enterobacter cloacae</i> (8 cepas)	<i>Enterococcus</i> spp.* (14 cepas)
<i>Escherichia coli</i> (14 cepas)	<i>Listeria monocytogenes</i> (14 cepas)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (14 cepas)	<i>Staphylococcus aureus</i> (15 cepas)
<i>Morganella morganii</i> (7 cepas)	
<i>Proteus mirabilis</i> (15 cepas)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (14 cepas)	

* gênero *Enterococcus*

Estas bactérias foram identificadas morfo-tintorialmente através da coloração de Gram e por testes bioquímicos através da utilização de meio de identificação para bacilos Gram-negativos: EPM MILI para as cepas de *Escherichia coli* (PROBAC DO BRASIL, MS: 10104030068) e API 20E (BioMérieux Brasil S.A., MS: 10158120563) para as demais cepas. A identificação dos cocos Gram-positivos foi realizada através de testes padronizados para estes gêneros: para *Staphylococcus aureus* utilizou-se a prova da coagulase em tubo e a sensibilidade à novobiocina e para *Enterococcus* spp. realizou-se as provas de crescimento em NaCl a 6,5% e a utilização da bile esculina. No caso de *Listeria monocytogenes*, realizou-se os

testes de catalase, oxidase, motilidade, redução de nitrato, VM-VP, β -hemólise e fermentação de carboidratos (xilose, manitol e ramnose). As espécies foram submetidas a testes de sensibilidade a antimicrobianos através do método semi-quantitativo baseado em difusão (Kirby-Bauer) para que cepas sensíveis fossem selecionadas para o experimento.

3.2 Preparo das amostras

As cepas das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram cultivadas em agar Mueller Hinton, já que em estudo preliminar é o que apresenta menor interferência no espectro Raman das bactérias crescidas em meio de cultura sólido, exceção feita para as cepas de *Enterococcus* spp., que apresentou dificuldade de crescimento sendo substituído pelo agar sangue (OLIVEIRA et al., 2012). Um dia antes da análise espectral, as cepas foram semeadas por esgotamento em placas contendo o meio de cultura e incubadas à $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ por 16-18h. As placas foram então acondicionadas e transportadas para o Laboratório de Espectroscopia Raman.

No momento da avaliação espectral, uma pequena quantidade de biomassa foi cuidadosamente removida das colônias na superfície do meio agar com o auxílio de uma alça descartável de volume de 10 μL e disposta em um pedaço de papel alumínio (Figura 5).

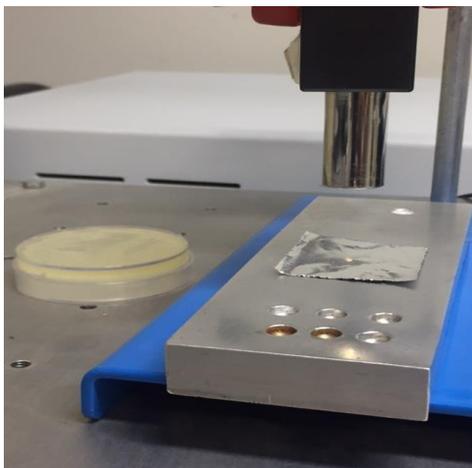


Figura 5 - Irradiação das amostras de bactérias, dispostas em papel alumínio, para coleta dos espectros Raman via “Raman probe” a uma distância focal de 10 mm da extremidade do “probe”.

3.3 Aquisição dos espectros

Os espectros Raman foram adquiridos em um espectrômetro Raman dispersivo (Lambda Solutions, Inc., MA, EUA, modelo P1) conforme diagrama esquemático apresentado na Figura 6a e foto na Figura 6b, que utiliza como fonte de excitação um laser de diodo em 830 nm (infravermelho próximo) acoplado a um cabo de fibras ópticas “Raman probe”, obtendo-se na saída do cabo óptico 300 mW de potência laser. A coleta do sinal luminoso espalhado pela amostra é efetuada pelo “Raman probe” e este é acoplado ao espectrômetro, que possui um espectrógrafo com grade de difração de 1.200 linhas/mm acoplado a uma câmera CCD “back thinned, deep-depletion” de 1340X100 pixels refrigerada termoeletricamente a -75°C (Peltier). A aquisição e o armazenamento dos espectros é realizada por um microcomputador PC utilizando o software RamanSoft (Lambda Solutions, Inc., MA, EUA, modelo P1 micro-Raman), que controla o tempo de exposição do detector e o número de aquisições por amostra e realiza o armazenamento dos espectros para posterior análise e interpretação. O tempo de exposição para a obtenção dos espectros foi de 5 s com 10 acumulações por espectro.

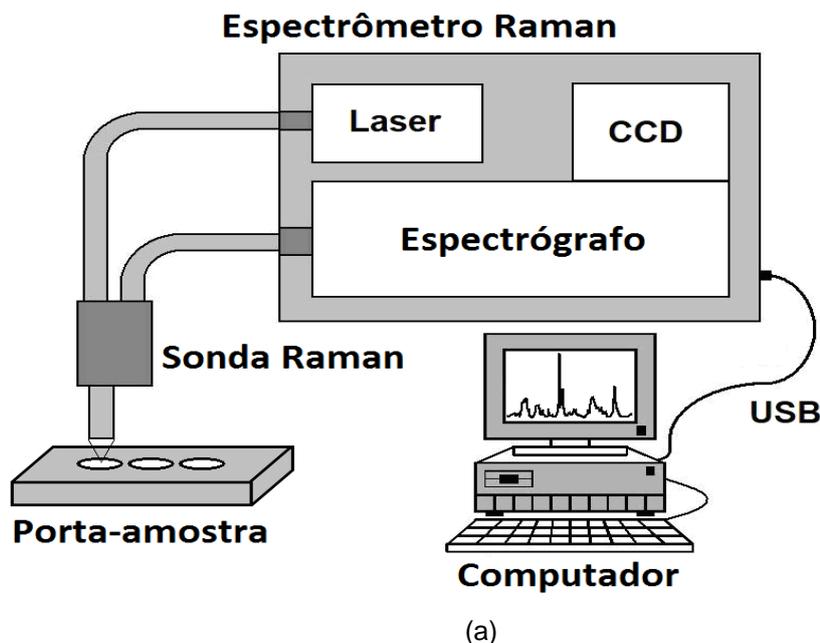
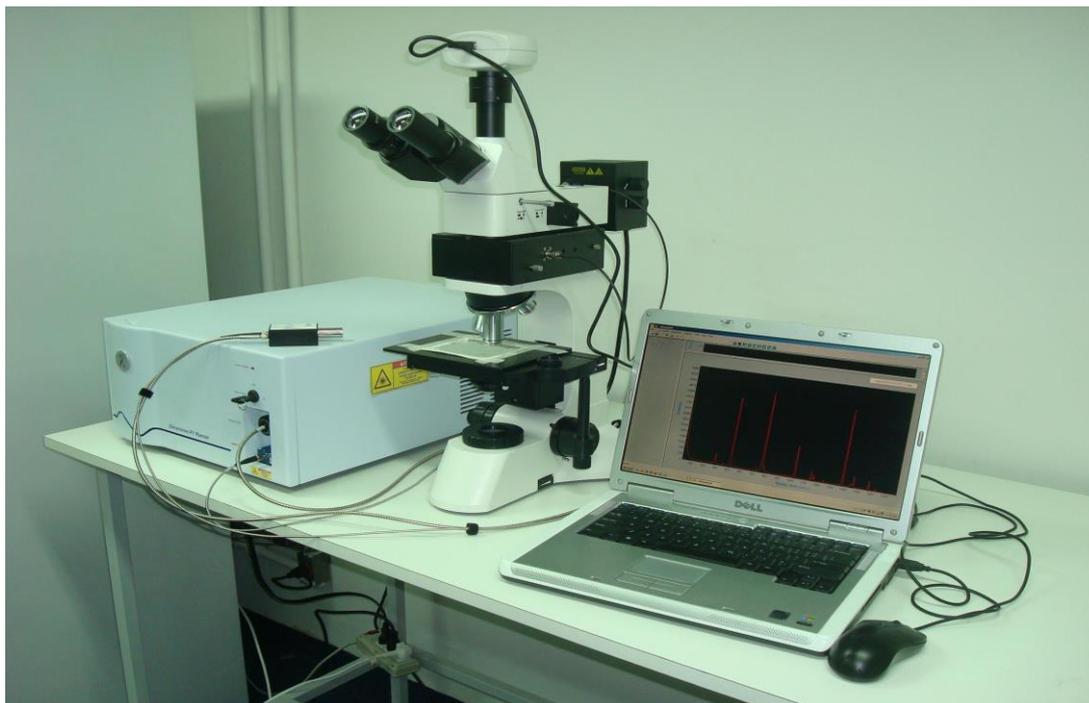


Figura 6 - (a) diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo (modelo P-1)



(b)

Figura 6 - (b) foto do aparelho Raman dispersivo.

A fim de determinar a reprodutibilidade dos resultados, todas as cepas foram analisadas em cinco repetições a partir de culturas independentes de cada cepa da bactéria estudada.

3.4 Pré-processamento e análise estatística dos espectros

Nesta etapa, os espectros precisaram se tornar adequados para serem comparados na etapa da análise, já que podem existir alguns sinais que não serão usados incluídos neles durante sua aquisição, que são minimizados sem prejuízo do sinal coletado. Para isso, após a coleta os espectros Raman foram submetidos a uma etapa de pré-processamento para remoção da fluorescência de fundo (sinal de “background”), com a correção da linha de base, através da subtração de um polinômio de 7^a ordem ajustado em toda a faixa espectral e remoção de “spikes” provenientes de raios cósmicos (Figura 7).

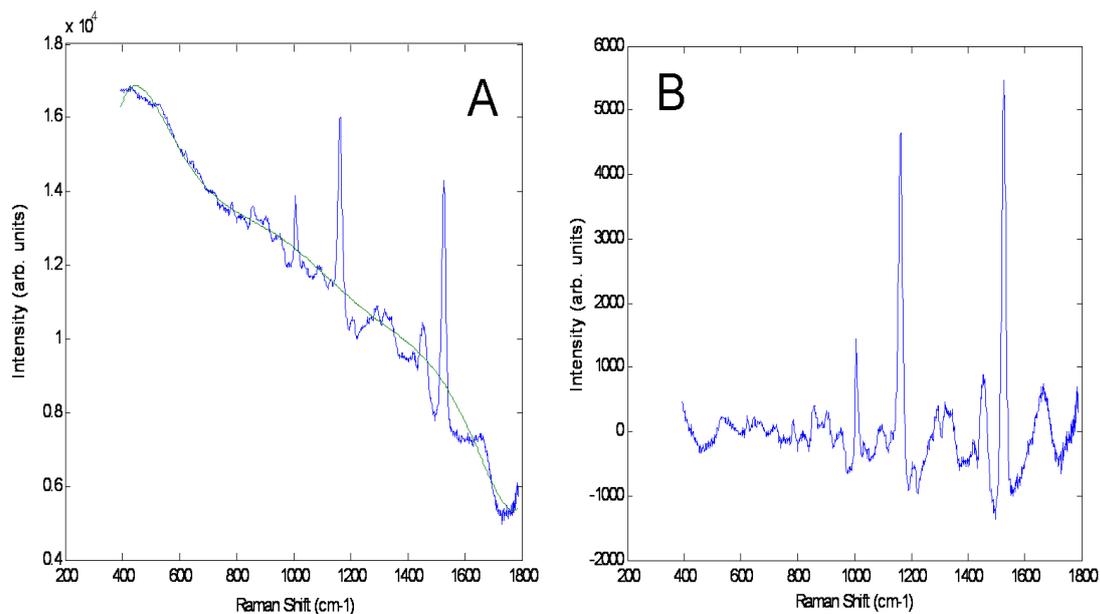


Figura 7 - Espectro de bactéria *S. aureus* demonstrando a remoção do “background” fluorescência por polinômio de ordem 7 (linha verde na Figura) ajustado em toda a faixa espectral. A: espectro com “background” de fluorescência e B: espectro com a fluorescência removida.

Os espectros foram normalizados pela área sob a curva (norma 1) e o espectro médio de cada tipo de bactéria foi calculado. Espectros com baixa relação sinal-ruído devido à alta auto-fluorescência foram retirados do estudo antes da análise discriminante (68 espectros retirados: 16 *E. coli*, 4 *E. cloacae*, 5 *Enterococcus* spp, 9 *K. pneumoniae*, 10 *L. monocytogenes*, 12 *P. mirabilis*, 11 *P. aeruginosa*, 1 *S. aureus*). O critério adotado foi retirar espectro com relação sinal-ruído menor que 5, sendo o ruído obtido pelo cálculo do desvio padrão na faixa espectral entre 430 e 460 cm^{-1} e o sinal como sendo a intensidade do pico mais intenso em 1450 cm^{-1} . Os espectros médios do conjunto de bactérias foram então plotados utilizando o software Microsoft Excel no intervalo de 400 a 1800 cm^{-1} com o intuito de verificar diferenças visuais comparativamente aos sinais Raman das espécies bacterianas estudadas. A posição em Raman *shift* dos picos foram marcados para a análise estatística visando verificar picos com diferenças nas intensidades que pudessem ser relacionados com as diferenças na composição bioquímica das bactérias.

3.5 Avaliação dos picos do espectro usando análise de variância (ANOVA)

A fim de verificar se existe diferença significativa entre os espectros das diferentes bactérias utilizadas neste estudo e buscando identificar quais destes picos são os mais importantes para a diferenciação bacteriana, as intensidades dos picos mais proeminentes foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA).

A análise de variância testa a hipótese de que as médias de três ou mais populações são iguais, avaliando a importância de um ou mais fatores comparando as médias das variáveis de resposta em diferentes níveis dos fatores. Com isso a análise da variância avalia se a diferença observada entre as médias são estatisticamente significantes, analisando as variações dentro da amostra e entre as amostras. A resposta da análise de variância é obtida com o teste de hipótese. Hipótese é uma resposta provisória a qual, de acordo com certos critérios, será rejeitada ou não, havendo em estatística dois tipos:

- Hipótese Nula (H_0): é a que vai ser testada. É a hipótese sobre a qual devem ser obtidas evidências para rejeitá-la, sendo a afirmação ou ponto de partida do teste de hipóteses. Afirma que as k populações tem a mesma média:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k \quad (4)$$

- Hipótese Alternativa (H_1): É a hipótese que fica no lugar de H_0 , afirmando que nem todas as médias das k populações são iguais.

O cálculo da ANOVA foi realizado com o programa estatístico GraphPad InStat (versão 3.00, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) para informações mais detalhadas sobre as diferenças entre as médias, foi usado o método de múltiplas comparações de Tukey, que avalia a magnitude dessas diferenças, com as comparações destes picos entre todos os 37 pares de grupos das cepas de bactérias, adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para rejeitar a hipótese de igualdade entre os picos. Cada análise gerou um relatório que foi utilizado para identificar os picos

que apresentaram o maior número de comparações de pares de grupos com diferença estatística.

3.6 Discriminação bacteriana utilizando picos mais significativos selecionados pelo ANOVA e utilizando todo o espectro

O teste ANOVA aplicado aos dados permitiu concluir que todos os picos possuíam diferenças estatisticamente significativas entre si. Em uma primeira análise, através do pós-teste de Tukey, foram identificados os picos que apresentaram as maiores significâncias estatísticas entre os pares de grupos e estes picos foram utilizados na análise discriminante. As intensidades destes picos foram submetidas a uma rotina de discriminação baseada na função `classify.m` no software Matlab (The Mathworks Inc., Natick, Massachusetts, USA, versão 2007), utilizando-se para a classificação a análise discriminante baseada nas distâncias. Outro modelo utilizado para discriminação foi o PLS, e neste modelo não houve seleção de picos, utilizando-se, portanto todo o espectro Raman obtido na irradiação das diferentes espécies bacterianas.

3.6.1 Discriminação pelas distâncias (dissimilaridade)

As medidas aplicadas nesta análise discriminante foram a distância linear (Euclidiana), a distância quadrática e a distância Mahalanobis. No presente estudo, a distância quadrática foi a que apresentou melhor modelagem discriminatória.

3.6.2 Discriminação pelo PLS-DA

Uma segunda análise discriminante foi realizada utilizando o PLS-DA (BARKER; RAYENS, 2003) com validação cruzada "leave-one-out" empregando todo o espectro, com o número de variáveis latentes escolhidas

automaticamente pelo modelo através de uma interface quimiométrica (NUNES et al., 2012).

O modelo de regressão PLS é um modelo de regressão multivariada baseado em variáveis latentes, usada nesta análise, pois consegue modelar a relação entre medidas espectrais (obtidas pelo Raman), que incluem muitas variáveis frequentemente correlacionadas entre si, e a bactéria analisada. Na regressão PLS, a ênfase está em desenvolver modelos preditivos, ou seja, prever as concentrações Y a partir dos dados multivariados X.

Os resultados tanto da discriminação através da distância quadrática quanto da discriminação pelo PLS foram organizados em uma tabela de matriz de classificação que relaciona o número de bactérias discriminadas por estes modelos e o número de bactérias em cada grupo (discriminação Raman *versus* teste bioquímico tradicional). As etapas descritas na metodologia estão ilustradas no diagrama de blocos na Figura 8.

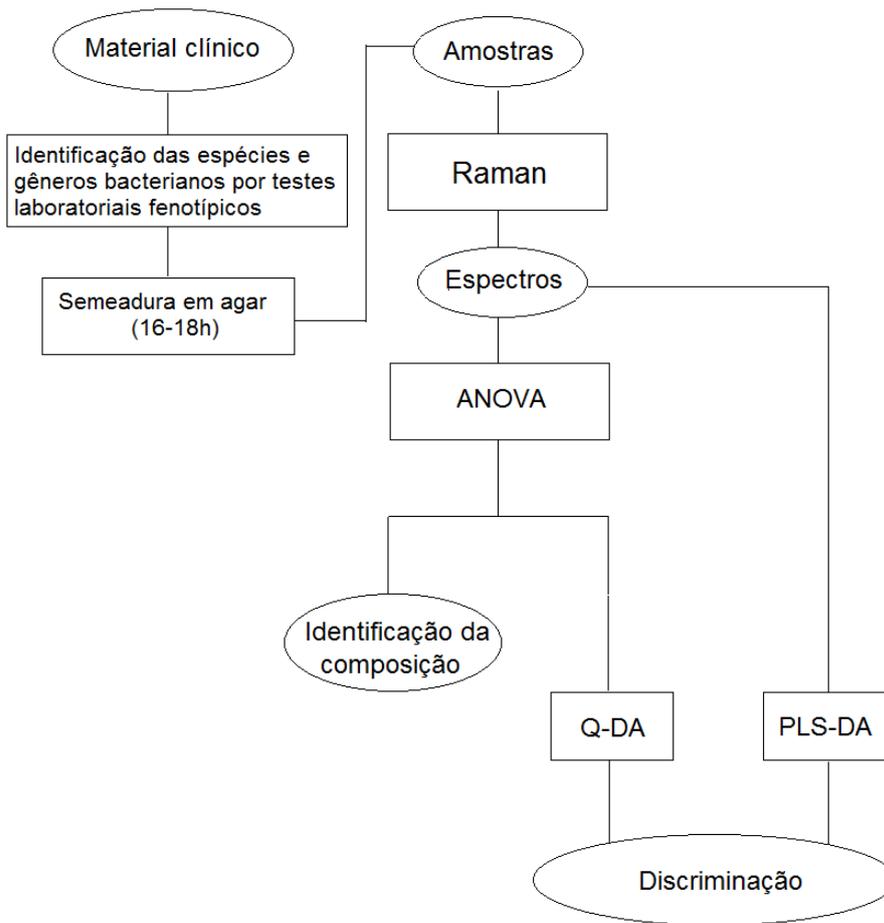


Figura 8 – Diagrama de blocos mostrando as etapas da metodologia da pesquisa.

4 RESULTADOS

4.1 Espectros Raman das diferentes espécies bacterianas

A fim de se desenvolver uma técnica óptica de identificação de bactérias foram obtidos espectros das bactérias conforme Tabela 3.

Foi calculada a média aritmética dos espectros de cada bactéria, totalizando nove médias espectrais, as quais foram normalizadas e plotadas. A Figura 9 ilustra os espectros médios e os desvios padrões de cada espécie bacteriana e na Figura 10 podem-se observar as médias dos espectros sobrepostos, no intervalo de 400 a 1800 cm^{-1} .

Tabela 3 - Número de cepas de cada espécie de bactéria e número de espectros obtidos e usados de cada espécie.

Espécie identificada por testes bioquímicos	Número de cepas	Número de espectros obtidos	Número de espectros usados
<i>Escherichia coli</i>	14	70	54
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	61	52
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	38	34
<i>Proteus mirabilis</i>	15	71	59
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	67	56
<i>Morganella morganii</i>	7	35	35
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	64	63
<i>Enterococcus</i> spp.*	14	67	62
<i>Listeria monocytogenes</i>	14	70	60

* gênero *Enterococcus*

Os espectros Raman das diferentes bactérias apresentam picos em posições específicas e característicos da constituição bioquímica das mesmas e a Tabela 4 apresenta a tentativa de atribuição destes picos conforme a literatura Raman já publicada.

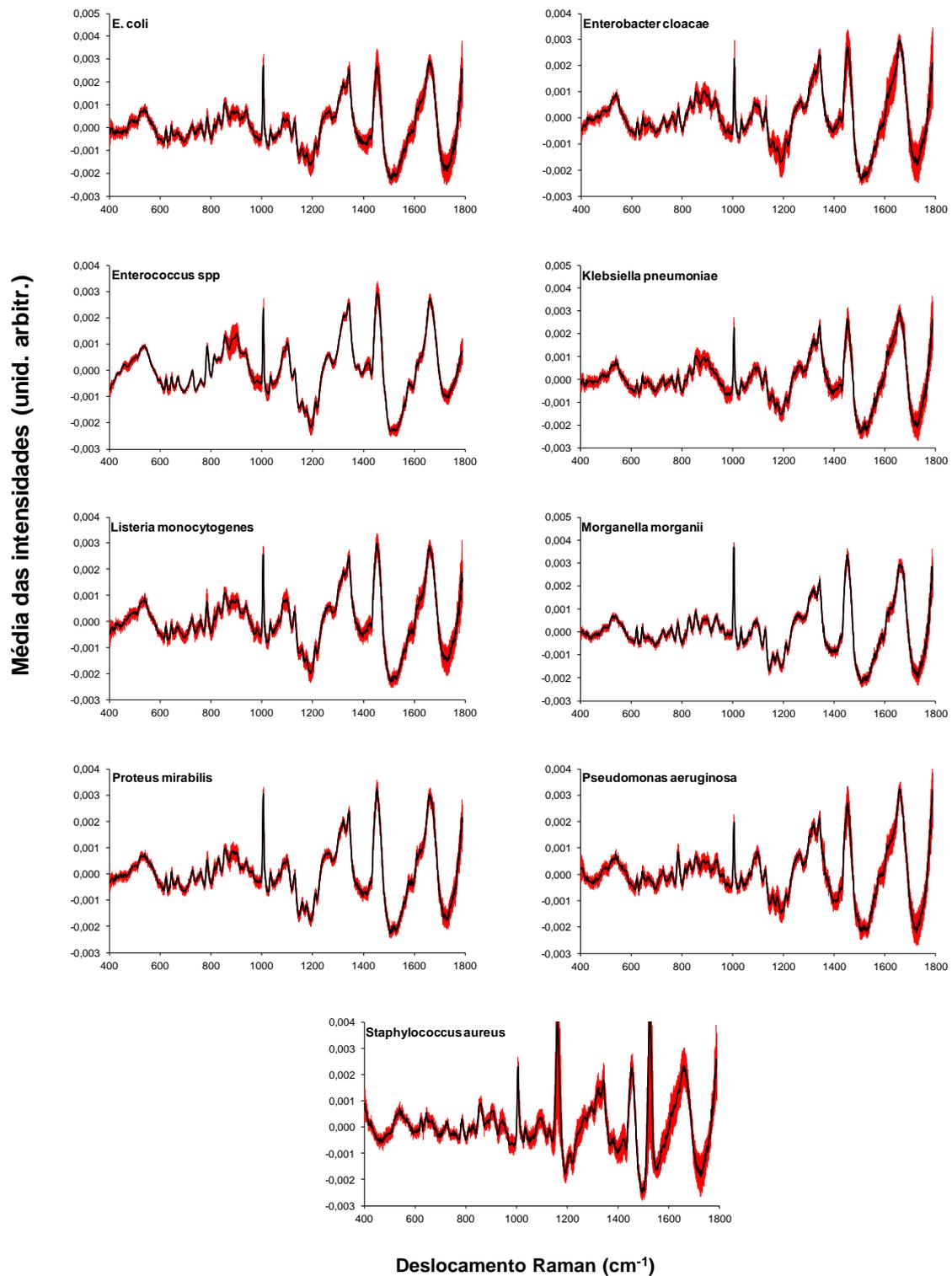


Figura 9 - Espectros Raman das médias das espécies bacterianas e desvios padrões (em vermelho) no intervalo espectral de 400 a 1800 cm^{-1} .

Na análise espectral da Figura 10 observou-se a semelhança entre os espectros das diferentes espécies, representada pelos picos nas mesmas posições e intensidade para todas as bactérias analisadas, reflexo da composição bioquímica bastante semelhante entre elas. Os picos de proteína aparecem principalmente na faixa entre 850 e 1500 cm^{-1} , ácidos graxos aparecem na faixa entre 980 e 1600 cm^{-1} , picos de carboidratos entre 850 e 1100 cm^{-1} e ácidos nucleicos aparecem entre 650 e 1500 cm^{-1} . Observou-se que o pico em 1380 cm^{-1} está presente mais intenso nas bactérias classificadas como Gram-positivas (*S. aureus* e *Enterococcus* spp.) e se correlaciona com o pico em 540 cm^{-1} ($r = 0,78$) uma vez que provém do mesmo constituinte da parede bacteriana (Figura 11), atribuído ao peptidoglicano. Os picos em 727, 857, 905 e 1421 cm^{-1} estão presentes em ambos os grupos, porém em intensidade maior nas Gram-positivas, o que poderia indicar maior concentração de peptidoglicanos e ácidos teicurônico e teicóico na parede destas (NAUMANN et al., 1982; GOODWIN, 2006). *S. aureus* possui picos característicos em 1162, 1291 e 1519 cm^{-1} , que podem ser atribuídos aos pigmentos da família dos carotenóides (MAQUELIN et al., 2009), típico deste microrganismo. *Enterococcus* spp., *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* apresentaram o pico em 785 cm^{-1} pouco mais intenso quando comparado às outras espécies e este pico se correlaciona com o pico em 813 cm^{-1} ($r = 0,85$), ambos atribuídos a conteúdo do material genético destas bactérias (Figura 12). As bactérias *M. morganii* e *P. mirabilis* apresentaram pico com maior intensidade em 1005 cm^{-1} quando comparado às outras espécies. O pico em 759 cm^{-1} possui intensidade reduzida em *S. aureus* e *Enterococcus* spp.. O pico em 1578 cm^{-1} aparece mais intenso nas bactérias *Enterococcus* spp., *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*. Para as bactérias *E. cloacae* e *K. pneumoniae*, um pico em 1557 cm^{-1} apresentou-se mais intenso. O pico em 1129 cm^{-1} aparece mais intenso para *E. coli* e *P. mirabilis* quando comparado às outras espécies. Estas diferenças nas intensidades dos picos estão relacionadas com a diferença na constituição química das bactérias, conforme atribuição detalhada na Tabela 4.

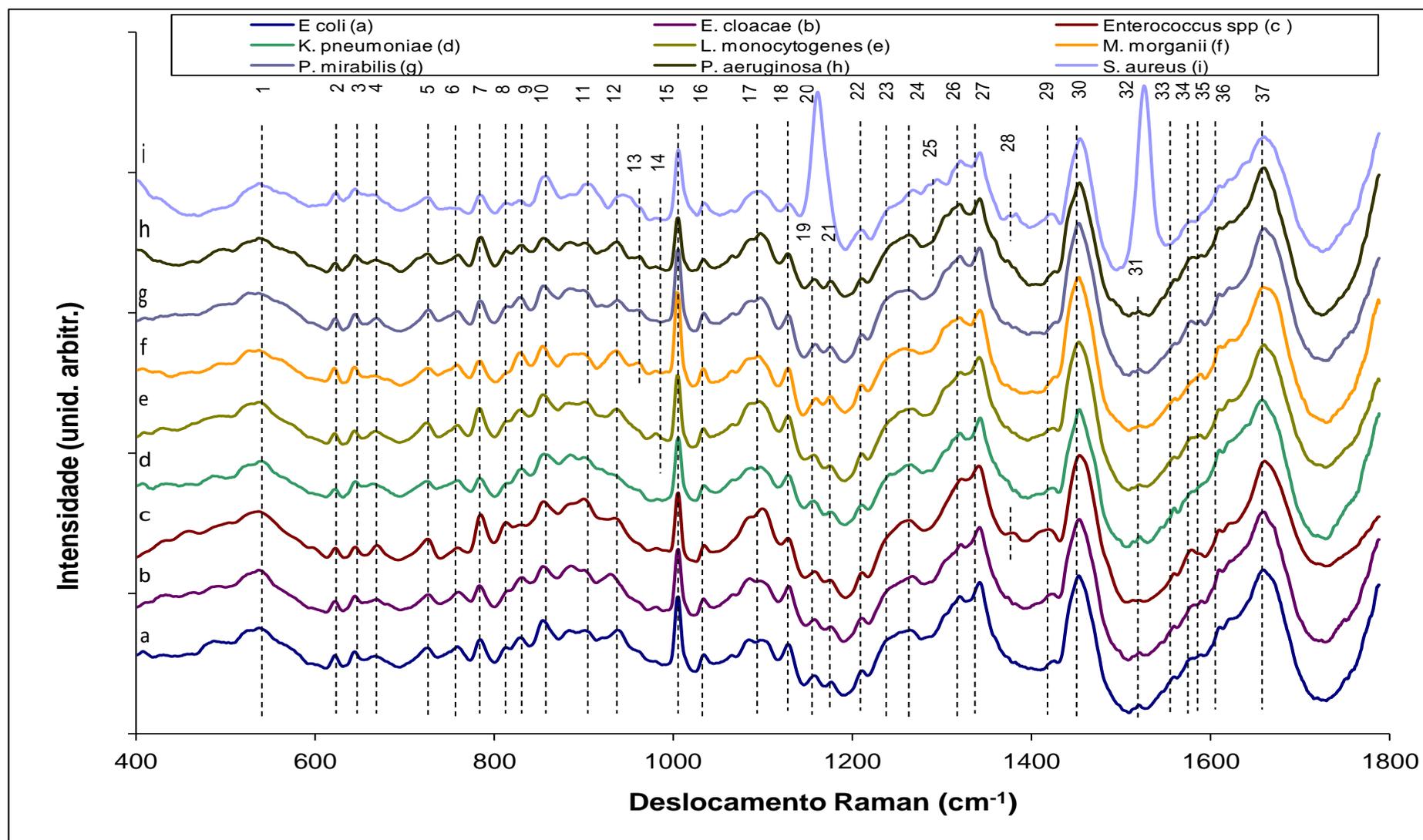


Figura 10 - Espectros Raman das médias das cepas bacterianas no intervalo espectral de 400 a 1800 cm^{-1} .

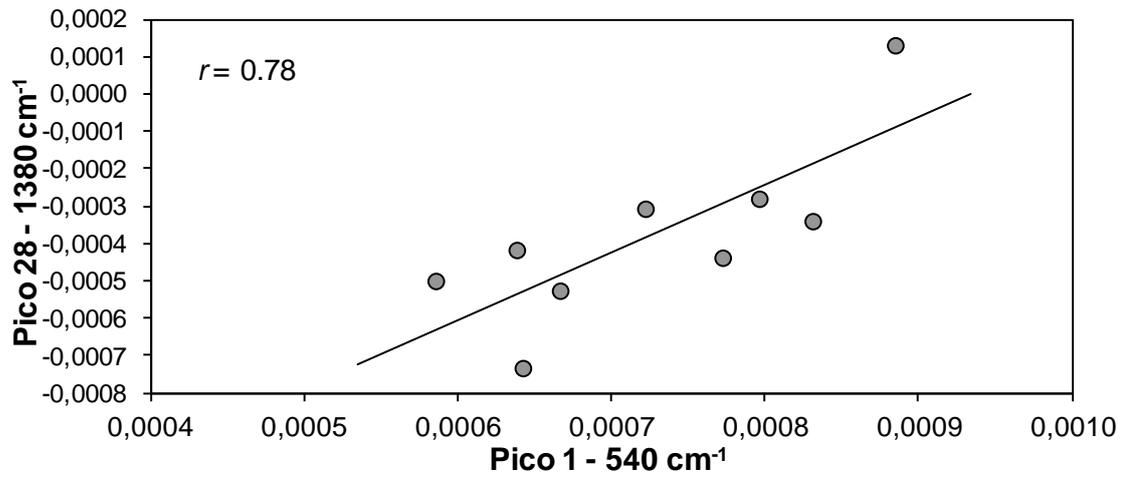


Figura 11- Correlação entre os picos 1 (glicosamina) e 28 (peptideoglicano).

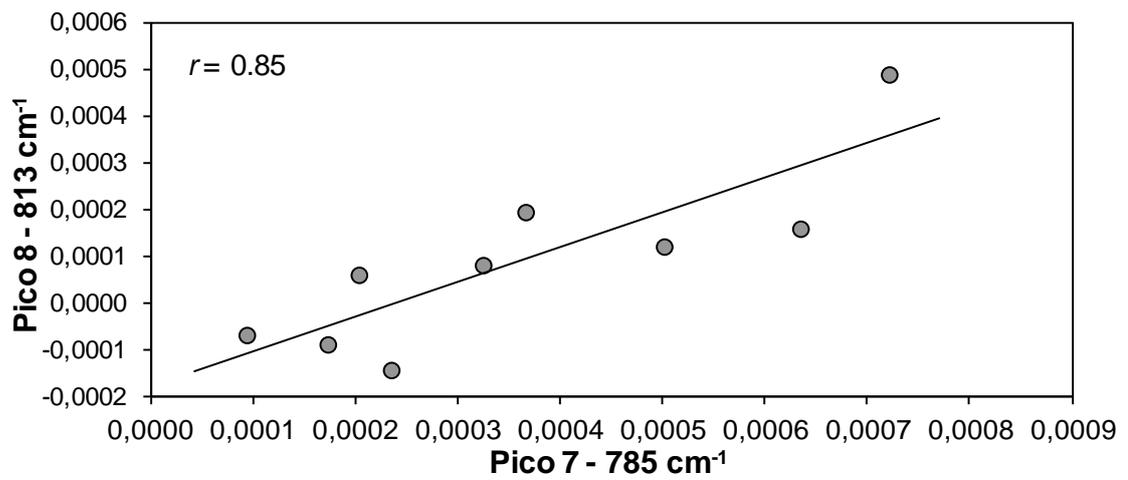


Figura 12 - Correlação entre os picos 7 (DNA/RNA) e 8 (RNA).

Tabela 4 - Picos Raman dos espectros das bactérias e tentativa de atribuições das bandas baseadas na literatura referente a bandas de energia vibracional.

Pico número	Deslocamento Raman (cm ⁻¹)	Atribuição	Referência
1	540	COC (deformação do anel glicosídico); vibração esquelética da glucosamina e acetil glucosamina; estiramento S-S	MAQUELIN et al., 2002; SHE et al., 1974.
2	623	Estiramento C-C fenilalanina (proteína)	MOVASAGHI et al., 2007.
3	645	Tirosina	PARET et al., 2010.
4	667	DNA; guanina	MAQUELIN et al., 2012.
5	727	Estiramento do anel da adenina; peptideoglicano; hipoxantina	HUANG et al., 2010.
6	759	Triptofano	PARET et al., 2010.
7	785	Citosina; uracila (estiramento do anel)	MAQUELIN et al., 2002.
8	813	Tirosina; ligação C–O–P–O–C do RNA	HUANG et al., 2010.
9	832	Tirosina	MAQUELIN et al., 2002.
10	857	Estiramento C-O-C da ligação glicosídica de sacarídeos; estiramento C-C da prolina e deformação CCH da respiração do anel da tirosina (proteínas); ácido teicurônico	MAQUELIN et al., 2002.
11	905	Estiramento C-O-C da ligação glicosídica de sacarídeos	MOVASAGHI et al., 2007.
12	937	Estiramento C-C (amida III)	MOVASAGHI et al., 2007.
13	962	Estiramento C-N (amida, lipopolissacarídeos)	PARET et al., 2010.
14	982	Peptideoglicano; estiramento C-C (proteínas); =CH lipídeos	MOVASAGHI et al., 2007; LEMMA et al., 2016.
15	1005	Estiramento C-C esquelético do anel aromático da fenilalanina / tirosina / triptofano; Estiramento C-CH dos carotenóides	HUANG et al., 2010; POPP et al., 2006; JEHLICKA et al., 2014.
16	1034	Deformação C-H no plano de fenilalanina, prolina; proteínas; estiramentos C-O e C-C de sacarídeos	PARET et al., 2010.
17	1093	Ácidos nucleicos (estiramento simétrico PO ₂ ⁻); estiramento esquelético C-C e C-O-C da ligação glicosídica de sacarídeos	MOVASAGHI et al., 2007.
18	1129	Estiramento C-N (amina) e C-C (lipídeos)	MAQUELIN et al., 2003; PARET et al., 2010.
19	1157	Estiramento –C–C– (carotenóides)	HUANG et al., 2010; JEHLICKA et al., 2014.
20	1162	Estiramento conjugado -C=C- no plano de carotenóides; estiramento C-N e C-C	MAQUELIN et al., 2003.
21	1175	Dobramento C-H no plano de tirosina; guanina e citosina; ácidos graxos (ácido esteárico)	MOVASAGHI et al., 2007; HUANG et al., 2010.
22	1210	Estiramento C-C da tirosina, fenilalanina, triptofano; proteínas; estiramento P=O	MAQUELIN et al., 2002; MOVASAGHI et al., 2007; POPP et al., 2005

23	1239	Estiramento C=O e ligação N-H (amida III); estiramento C-N (amida, proteína)	KUSIC et al., 2014.
24	1266	Estiramento C-N e N-H (amida III); timina e adenina (respiração do anel); deformação CH ₂ no plano de lipídios; sacarídeos	MAQUELIN et al., 2002; MOVASAGHI et al., 2007.
25	1291	Deformação CH ₂ e ácidos graxos; citosina	MAQUELIN et al., 2002; MOVASAGHI et al., 2007.
26	1318	Estiramento C-N e N-H (amida III); deformação CH ₂ e CH ₃ de proteínas; respiração do anel da guanina	MOVASAGHI et al., 2007; HUANG et al., 2010.
27	1341	Deformação CH ₂ e CH ₃ de lipídios e proteínas; estiramento N-H (amida III); estiramento C-C do triptofano; adenina, guanina (respiração do anel)	TANG et al., 2013.
28	1380	Estiramento simétrico e assimétrico -COO- do peptideoglicano; modos vibracionais CH da glucosamina	SHE et al., 1974; LEMMA et al., 2016; MAQUELIN et al., 2000.
29	1421	Adenina; guanina; modos vibracionais -C=O do peptideoglicano e modos vibracionais CH da glucosamina	SHE et al., 1974; MAQUELIN et al., 2000.
30	1454	Deformação CH ₂ e CH ₃ de lipídios e proteínas	MAQUELIN et al., 2002; MOVASAGHI et al., 2007.
31	1519	Estiramento conjugado -C=C- (proteínas)	HUANG et al., 2010; JEHLICKA et al., 2014.
32	1526	Estiramento conjugado -C=C- no plano de carotenóides	HUANG et al., 2010; JEHLICKA et al., 2014.
33	1557	Triptofano; exopolissacarídeos	MOVASAGHI et al., 2007.
34	1578	Adenina, guanina (estiramento do anel); modos vibracionais -C=O do peptideoglicano	MAQUELIN et al., 2002; MAQUELIN et al., 2000.
35	1588	Fenilalanina; hidroxiprolina	MOVASAGHI et al., 2007.
36	1608	Estiramento C=C do anel da fenilalanina, tirosina e triptofano	MAQUELIN et al., 2006; HUANG et al., 2010.
37	1659	Estiramento C=O (amida I); estiramento C=C de lipídios	MAQUELIN et al., 2002; MOVASAGHI et al., 2007; HUANG et al., 2010.

4.2 Análise das variações bioquímicas das bactérias avaliada pelos picos Raman

A avaliação através do teste ANOVA indicou que todos os picos marcados na Tabela 4 possuem diferenças estatisticamente significativas entre as médias das intensidades ($p < 0,05$). O pós-teste aplicado aos dados (teste de Tukey) gerou um relatório com as comparações entre as médias, que foi utilizado para identificar os picos que apresentaram o maior número de pares de bactérias com diferença estatística entre as médias das intensidades, e a Tabela 5 apresenta um exemplo de aplicação deste teste nas intensidades do pico em 540 cm^{-1} .

Foram selecionados os picos que apresentaram 19, 20 e 21 pares de grupos de bactérias com significância estatística para avaliação. Utilizaram-se os picos que apresentaram, no mínimo, 19 pares de grupo de bactérias com significância estatística, totalizando 13 picos, a saber: 540, 623, 645, 667, 785, 813, 962, 1005, 1129, 1210, 1239, 1291 e 1380 cm^{-1} , demonstrados na Figura 13.

Tabela 5 – Exemplo de teste ANOVA de um fator com a comparação entre as médias das intensidades dos picos das bactérias em 540 cm⁻¹ (teste de Tukey).

ANOVA de um fator – Pico em 540 cm ⁻¹				
$p < 0,0001$				
Diferença entre as médias				
Comparação	Diferença	q	Valor de p	Nível de significância
<i>E. coli</i> vs <i>E. cloacae</i>	-5.763E-05	3.211	$p > 0.05$	ns
<i>E. coli</i> vs <i>Enterococcus</i> spp.	-0.0001113	7.286	$p < 0.001$	***
<i>E. coli</i> vs <i>K. pneumoniae</i>	5.131E-05	3.219	$p > 0.05$	ns
<i>E. coli</i> vs <i>L. monocytogenes</i>	-2.282E-05	1.482	$p > 0.05$	ns
<i>E. coli</i> vs <i>M. morgani</i>	0.0001311	7.370	$p < 0.001$	***
<i>E. coli</i> vs <i>P. mirabilis</i>	0.0001068	6.911	$p < 0.001$	***
<i>E. coli</i> vs <i>P. aeruginosa</i>	0.0001351	8.629	$p < 0.001$	***
<i>E. coli</i> vs <i>S. aureus</i>	0.0001878	12.336	$p < 0.001$	***
<i>E. cloacae</i> vs <i>Enterococcus</i> spp.	-5.369E-05	3.081	$p > 0.05$	ns
<i>E. cloacae</i> vs <i>K. pneumoniae</i>	0.0001089	6.048	$p < 0.001$	***
<i>E. cloacae</i> vs <i>L. monocytogenes</i>	3.481E-05	1.985	$p > 0.05$	ns
<i>E. cloacae</i> vs <i>M. morgani</i>	0.0001887	9.596	$p < 0.001$	***
<i>E. cloacae</i> vs <i>P. mirabilis</i>	0.0001644	9.351	$p < 0.001$	***
<i>E. cloacae</i> vs <i>P. aeruginosa</i>	.0001927	010.851	$p < 0.001$	***
<i>E. cloacae</i> vs <i>S. aureus</i>	0.0002454	14.121	$p < 0.001$	***
<i>Enterococcus</i> spp. vs <i>K. pneumoniae</i>	0.0001626	10.590	$p < 0.001$	***
<i>Enterococcus</i> spp. vs <i>L. monocytogenes</i>	8.850E-05	5.984	$p < 0.001$	***
<i>Enterococcus</i> spp. vs <i>M. morgani</i>	0.0002424	14.039	$p < 0.001$	***
<i>Enterococcus</i> spp. vs <i>P. mirabilis</i>	0.0002181	14.685	$p < 0.001$	***
<i>Enterococcus</i> spp. vs <i>P. aeruginosa</i>	0.0002464	16.363	$p < 0.001$	***
<i>Enterococcus</i> spp. vs <i>S. aureus</i>	0.0002991	20.473	$p < 0.001$	***
<i>K. pneumoniae</i> vs <i>L. monocytogenes</i>	-7.413E-05	4.791	$p < 0.05$	*
<i>K. pneumoniae</i> vs <i>M. morgani</i>	7.979E-05	4.468	$p < 0.05$	*
<i>K. pneumoniae</i> vs <i>P. mirabilis</i>	5.550E-05	3.573	$p < 0.05$	ns
<i>K. pneumoniae</i> vs <i>P. aeruginosa</i>	8.374E-05	5.324	$p < 0.001$	**
<i>K. pneumoniae</i> vs <i>S. aureus</i>	0.0001365	8.919	$p < 0.001$	***
<i>L. monocytogenes</i> vs <i>M. morgani</i>	0.0001539	8.861	$p < 0.001$	***
<i>L. monocytogenes</i> vs <i>P. mirabilis</i>	0.0001296	8.657	$p < 0.001$	***
<i>L. monocytogenes</i> vs <i>P. aeruginosa</i>	.0001579	010.403	$p < 0.001$	***
<i>L. monocytogenes</i> vs <i>S. aureus</i>	0.0002106	14.296	$p < 0.001$	***
<i>M. morgani</i> vs <i>P. mirabilis</i>	-2.428E-05	1.394	$p > 0.05$	ns
<i>M. morgani</i> vs <i>P. aeruginosa</i>	3.955E-06	0.2248	$p > 0.05$	ns
<i>M. morgani</i> vs <i>S. aureus</i>	5.670E-05	3.293	$p > 0.05$	ns
<i>P. mirabilis</i> vs <i>P. aeruginosa</i>	2.824E-05	1.853	$p > 0.05$	ns
<i>P. mirabilis</i> vs <i>S. aureus</i>	8.098E-05	5.473	$p < 0.001$	**
<i>P. aeruginosa</i> vs <i>S. aureus</i>	5.274E-05	3.516	$p > 0.05$	ns

As atribuições destes picos mais significativos e a descrição dos elementos bioquímicos que podem estar relacionados com as diferenças das intensidades destes picos entre as espécies estão demonstradas na Tabela 6, em uma tentativa de elucidação das diferenças nas intensidades dos picos em função do gênero e espécie das bactérias.

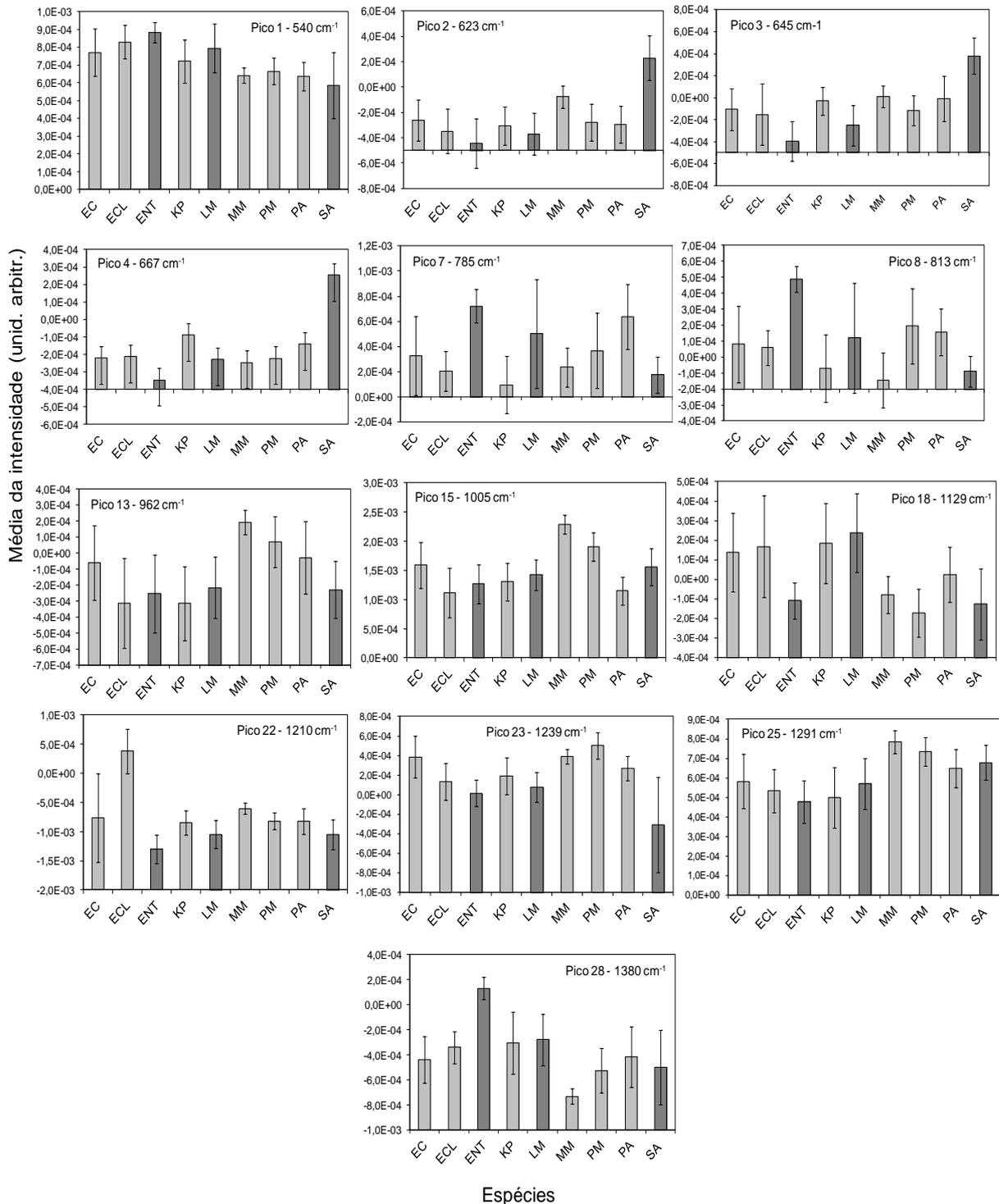


Figura 13 - Gráficos com as intensidades médias dos picos Raman das espécies de bactérias que tiveram as maiores significância entre si (ANOVA, $p < 0.05$).

EC: *E. coli*; ECL: *E. cloacae*; ENT: *Enterococcus* spp.; KP : *K. pneumoniae*; LM: *Listeria monocytogenes*; MM: *Morganella morganii*; PM: *P. mirabilis*; PA: *P. aeruginosa*; SA: *S.aureus*. (cinza claro: Gram-negativas; cinza escuro: Gram-positivas).

(Observação: as escalas negativas devem-se ao fato do polinômio de correção gerar picos negativos).

Tabela 6 - Picos Raman dos espectros das bactérias que apresentaram maior significância entre pares de grupos (ANOVA - Tukey, $p < 0.05$) e descrição dos elementos constituintes e alterações bioquímicas relacionadas às diferenças que ocorrem entre as espécies.

Pico número	Deslocamento Raman (cm ⁻¹)	Elemento responsável pelo pico	Elementos bioquímicos e alterações identificadas como responsáveis pelas diferenças das intensidades dos picos entre as espécies
1	540	Glicosídeos (glucosaminas) da parede celular	Microrganismos Gram-positivos possuem parede celular mais espessa, portanto possuem maior concentração de peptidoglicanos. <i>Enterococcus</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> (Gram-positivos) possuem maior intensidade dos picos 540 e 1380 cm ⁻¹ que as Gram-negativas.
2	623	Fenilalanina presente nas proteínas das bactérias	A fenilalanina é aminoácido encontrado em proteínas. Este pico tem correlação com o pico em 1005 cm ⁻¹ , exceção para a <i>S. aureus</i> . Na espécie <i>M. morgani</i> o pico correspondente apresentou maior intensidade, provavelmente devido à presença de fenilalanina desaminase, que origina o ácido fenil pirúvico e possui pico nessa posição (HANAI, KAWAI, 1991). Para o <i>S. aureus</i> , este pico mais intenso pode estar relacionado à fluorescência dos picos do beta-caroteno e sobreposição da banda de proteína A.
3	645	Tirosina presente nas proteínas das bactérias	<i>S. aureus</i> possui a proteína A na sua parede; é um polipeptídeo formado por ácido aspártico, ácido glutâmicos e resíduos de tirosina. A tirosina está reduzida na <i>Enterococcus</i> spp., o que pode sugerir a ação da enzima tirosina descarboxilase presente nesses microrganismos.
4	667	DNA: guanina	Para os Gram-negativos: <i>P. aeruginosa</i> e <i>K. pneumoniae</i> tem alta porcentagem de GC no DNA (66,2% e 57,1%, respectivamente), o que justificaria este pico mais intenso (ISLAS et al., 2004). Para o <i>S. aureus</i> , este pico mais intenso pode estar relacionado à fluorescência dos picos do beta-caroteno.
7	785	DNA/RNA: citosina e uracila (estiramento do anel)	Picos atribuídos a material genético. <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>P. aeruginosa</i> possuem maior genoma e alto conteúdo de RNA e estão com esse pico alto.
8	813	RNA; tirosina	Picos atribuídos a material genético. <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>P. aeruginosa</i> estão com esse pico alto. <i>Enterococcus</i> spp. com pico mais intenso, pode ser devido à presença da tirosina descarboxilase, que produz tiramina com pico nessa posição (SIDDIQUI et al., 2009). Este pico se correlaciona com o pico número 7 ($r = 0,85$) haja vista que provém do mesmo constituinte.
13	962	Estiramento C-N (amida)	Maior intensidade em Gram-negativas; devido à parede mais fina, maior conteúdo proteico intracelular fica mais evidente nas <i>M. morgani</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>P. aeruginosa</i>
15	1005	Anel aromático da fenilalanina/tirosina/triptofano (proteínas da membrana)	A fenilalanina é aminoácido encontrado em proteínas. Nas espécies <i>M. morgani</i> e <i>P. mirabilis</i> o pico correspondente apresentou maior intensidade, provavelmente devido à presença de fenilalanina desaminase, que origina o ácido fenil pirúvico e possui pico nessa posição (HANAI; KAWAI, 1991).
18	1129	C-N stretching (amina) e C-C stretching (lipídios)	Menos intenso em cocos Gram-positivos, pico pode estar relacionado com quantidade de lipopolissacarídeos nos Gram-negativos.

22	1210	Tirosina; fenilalanina; triptofano (proteínas); enzima beta-lactamase	Mais intenso em <i>E. cloacae</i> : esta bactéria produz enzima beta-lactamase, que apresenta pico em 1213 cm ⁻¹ (HEIDARI et al., 2014).
23	1239	DNA/RNA; estiramento C=O e ligação N-H (amida III) e estiramento C-N (amida) (proteínas)	Maior intensidade em Gram-negativos; devido à parede mais fina, maior conteúdo proteico intracelular fica mais evidente nas <i>M. morgani</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>P. aeruginosa</i>
25	1291	DNA/RNA: citosina; deformação CH ₂ (ácidos graxos) e amida (proteínas)	Maior intensidade em Gram-negativos; devido à parede mais fina, maior conteúdo proteico intracelular fica mais evidente nas <i>M. morgani</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>P. aeruginosa</i>
28	1380	Peptideoglicano (glucosaminas) da parede celular	Microrganismos Gram-positivos possuem parede celular mais espessa, portanto possuem maior concentração de peptideoglicanos. <i>Enterococcus</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i> (Gram-positivos) possuem maior intensidade dos picos 540 e 1380 cm ⁻¹ que as Gram-negativas. O <i>S. aureus</i> apesar de ser Gram-positivo possui pigmentação (carotenos) e pode ter picos com menor intensidade. Este pico se correlaciona com o pico número 1 ($r = 0,78$) haja vista que provém do mesmo constituinte

4.3 Discriminação das cepas usando função discriminante quadrática (Q-DA) e PLS-DA

O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade da espectroscopia Raman na discriminação de diferentes bactérias a partir de dois modelos discriminantes utilizando as intensidades dos 13 picos mais relevantes, conforme Tabela 6 e utilizando também todo o espectro.

O primeiro modelo utilizou a função discriminante `classify.m` do software Matlab e neste modelo foram utilizados os picos que apresentaram 19, 20 e 21 pares de grupos de bactérias com significância estatística, nos quais foi testado a função discriminante baseada em distâncias: linear (Euclidiana), quadrática e Mahalanobis. Os picos e as porcentagens de erro de cada análise estão demonstrados na Tabela 7, mostrando que a melhor discriminação ocorreu quando se utilizou os 13 picos que apresentaram, no mínimo, 19 pares de grupos de bactérias.

Tabela 7 – Porcentagem de erros na discriminação bacteriana de acordo com a quantidade de significâncias entre os pares de grupos.

Número de Significâncias	Número dos picos	Porcentagem de erros na discriminação
Mínimo de 19	1,2,3,4,7,8,13,15,18,22,23, 25 e 28	2,2%
Mínimo de 20	7,13,15,18,22,23,25 e 28	5,3%
Mínimo de 21	13,15,18,22,23 e 28	14,8%

O segundo modelo utilizou a análise discriminante baseada no PLS-DA com 12 variáveis latentes. A discriminação dos espectros das cepas nos respectivos grupos foi feita considerando cada espectro como uma amostra individual, resultando em 475 espectros (ou amostras), onde cada espectro foi classificado em um dos grupos de bactérias. A Tabela 8 apresenta a matriz de classificação com os resultados da discriminação utilizando os espectros Raman das bactérias e a Figura 14 apresenta as plotagens do agrupamento das espécies de acordo com os modelos.

Tabela 8 - Matriz de classificação com os resultados de acertos dos modelos de discriminação utilizando os espectros Raman das bactérias (baseado no Chemoface, com validação "leave-one-out").

Identificação bioquímica	Classificação via Raman/ análise discriminante quadrática (Q-DA) usando picos selecionados								
	Gram-positivas				Gram-negativas				
	SA	ENT	LM	EC	KP	ECL	PM	MM	PA
<i>S. aureus</i> (63)	62	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp. (62)	-	60	2	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (60)	-	-	52	1	5	2	-	-	-
<i>E. coli</i> (54)	-	-	2	50	3	-	1	1	-
<i>K. pneumoniae</i> (52)	-	-	1	3	44	-	1	-	3
<i>E. cloacae</i> (34)	-	-	6	2	1	24	-	-	1
<i>P. mirabilis</i> (59)	-	-	2	4	2	-	51	-	-
<i>M. morganii</i> (35)	-	-	-	1	1	-	2	31	-
<i>P. aeruginosa</i> (56)	-	-	-	1	1	-	-	-	54
Precisão	89,5%								
Identificação bioquímica	Classificação via Raman/análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) usando todo espectro								
	Gram-positivas				Gram-negativas				
	SA	ENT	LM	EC	KP	ECL	PM	MM	PA
<i>S. aureus</i> (63)	63	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp. (62)	-	62	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (60)	-	-	52	4	-	-	-	4	-
<i>E. coli</i> (54)	-	-	-	49	2	-	-	3	-
<i>K. pneumoniae</i> (52)	-	-	-	3	41	-	7	-	1
<i>E. cloacae</i> (34)	-	3	15	-	-	14	2	-	-
<i>P. mirabilis</i> (59)	-	-	-	-	-	-	59	-	-
<i>M. morganii</i> (35)	-	-	-	-	-	-	3	32	-
<i>P. aeruginosa</i> (56)	-	-	-	-	-	-	-	-	56
Precisão	90,1%								

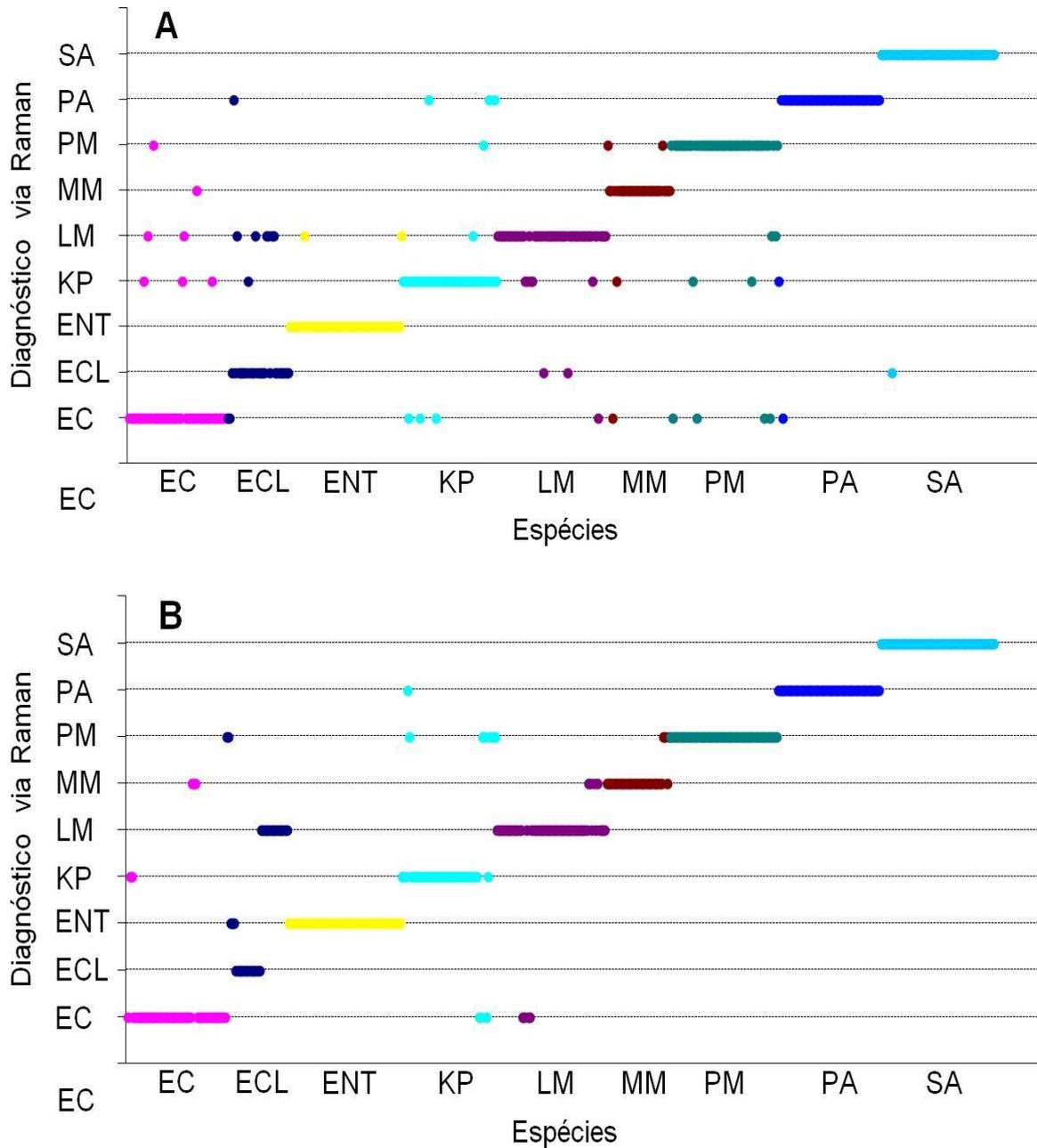


Figura 14 - Plotagem do agrupamento das espécies de acordo com os modelos de classificação Raman com análise discriminante baseada na distância quadrática (A) e mínimos quadrados parciais (B) mostrados na Tabela 8.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das bactérias através da espectroscopia Raman

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse na utilização da espectroscopia Raman na área biomédica, particularmente na identificação de microrganismos patogênicos, devido ao seu grande potencial na discriminação de diferentes gêneros e espécies microbianas, tanto de bactérias quanto de fungos (MAQUELIN et al., 2000; CHOO-SMITH et al., 2001; EFRIMA et al., 2004; BHATTA et al., 2006; POPP et al., 2010; BOARDMAN et al., 2016). Além disso, a técnica Raman tem a vantagem de ser rápida, é não-destrutiva, dado que a potência utilizada não causa dano à amostra, a coleta do espectro pode ser efetuada (sob certas condições) diretamente no substrato onde a amostra esteja, com utilização de pequena quantidade de biomassa e de custo reduzido, já que não necessita de reagentes especiais para o processamento das amostras após a cultura no agar (CHOO-SMITH et al., 2001, JARVIS et al., 2004, HUANG et al., 2007).

O interesse principal deste estudo foi avaliar a aplicabilidade da espectroscopia Raman na discriminação de bactérias clinicamente relevantes e identificar quais picos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as espécies pelo método ANOVA. A partir destes dados, objetivou-se correlacionar a informação espectral presente nestes picos com a composição química de cada bactéria a fim de desenvolver um modelo de classificação por análise discriminante dessas espécies utilizando os picos mais significativos e compará-lo com o modelo que utiliza todo o espectro na classificação.

A definição do meio Mueller Hinton baseou-se em experimento preliminar que avaliou qual melhor meio de cultivo que permitiu o crescimento de colônias puras e que não interferiu significativamente na obtenção dos espectros (OLIVEIRA et al., 2012). Trabalhos de Maquelin et al. (2000) e Popp et al. (2005) mostraram que os parâmetros de cultivo de microrganismos, como a composição do meio, influenciam o espectro e por este motivo uma composição deve ser padronizada com a menor influência possível.

O espectro Raman de uma determinada molécula consiste de uma série de bandas com seus respectivos picos, cada um representando uma frequência

vibracional característica daquela molécula. As várias estruturas celulares dos microrganismos, por sua vez, são compostas por moléculas que compõem grupos funcionais tais como proteínas, lipídeos e carboidratos, e todas estas moléculas possuem espectros vibracionais característicos. A qualidade e a quantidade desses componentes moleculares podem variar entre as espécies, e é com base nestas variações que a espectroscopia pode ser usada na identificação dos microrganismos (HUANG et al., 2010). De acordo com Naumamn (1998), a separação pode ser feita de forma confiável quando regiões espectrais que são selecionadas contêm informações sobre estruturas bioquímicas que são típicas para a membrana externa e parede celular, além da possível separação entre bactérias e leveduras.

Em geral, as bactérias possuem constituição bioquímica semelhante, composta basicamente por proteínas (flagelo, fímbria, parede, membrana citoplasmática e citoplasma), lipídeos (cápsula e membrana citoplasmática), polissacarídeos (cápsula e parede), peptideoglicanos (parede), ribossomos (citoplasma) e material genético (DNA/RNA) (GOODWIN, 2006). Nos espectros Raman das cepas bacterianas utilizadas neste estudo, a grande maioria dos picos se apresentou nas mesmas posições, indicando a similaridade da composição química entre os diferentes gêneros. Esta observação corrobora com o estudo de Jarvis e Goodacre (2004), que também demonstrou a semelhança entre os espectros dos gêneros bacterianos *Enterococcus* spp. e *Klebsiella* spp. e espécies *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*.

A principal diferença entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas está ligada à espessura da parede celular das mesmas. Nas Gram-positivas, a parede é espessa, com cerca de 20 camadas de peptideoglicanos e espessura típica de 20 a 80 nm, enquanto que as Gram-negativas possuem parede delgada, de cerca de uma ou duas camadas com espessura de cerca de 10 nm (KONEMAN et al., 2001; GOODWIN, 2006). Os espectros Raman das bactérias Gram-positivas apresentaram alguns picos com maior intensidade em 726, 857, 907, 1340, 1382 e 1421 cm^{-1} . Liu et al. (2009) demonstrou que os picos em 726 e 1340 cm^{-1} estão relacionados aos peptideoglicanos e que estes picos estão aumentados em bactérias Gram-positivas. Esta informação confirma o resultado da comparação entre os espectros médios das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mostrando que o aumento destes picos pode ser devido à maior quantidade de peptideoglicanos na parede celular. Jarvis et al. (2004) assinalou a diferença nos

picos em 1344 cm^{-1} de duas espécies de bactérias distintas, Gram-negativa (*E. coli*) e outra Gram-positiva (*B. subtilis*), sendo possível a classificação pela diferença neste pico.

Paret et al. (2010) buscaram a caracterização de espécies Gram-positivas (*M. testaceum*, *P. validus* e *C. michiganensis*) e Gram-negativas (*E. cloacae*, *A. rhizogenes* e *R. solanacearum*) através da micro-espectroscopia Raman e observaram que os picos em 1170 cm^{-1} , atribuído à tirosina e em 1156 cm^{-1} , atribuído a pigmentos carotenóides, estavam mais evidentes nas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, contribuindo com a separação das espécies. Kirschner et al. (2001) avaliaram a diferenciação entre diferentes espécies de *Enterococcus* spp. e obtiveram a separação destas com a identificação de *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, feito este difícil de ser alcançado quando utilizado as provas bioquímicas rotineiras.

5.2 Correlações entre as intensidades dos picos e constituição bioquímica das bactérias

A avaliação das intensidades dos picos é um passo importante para a discriminação dos gêneros bacterianos, visto que os picos Raman se correlacionam com a constituição bioquímica das amostras. Porém em muitos casos é difícil separar os elementos constituintes basais dos microrganismos devido à sua semelhança química. Na análise comparativa entre os espectros médios das cepas observou-se que todos os picos apresentaram diferenças estatisticamente significativas (ANOVA), demonstrando a possibilidade da separação das espécies através de seus espectros, especificamente das intensidades dos picos, baseadas em sua constituição bioquímica.

Os espectros Raman das bactérias Gram-positivas apresentaram alguns picos com maior intensidade, notadamente em 540 e 1380 cm^{-1} , que apresentaram diferenças significantes comparadas aos outros grupos. Esses picos foram atribuídos às ligações glicosídicas, presentes entre os resíduos de N-acetil glucosamina e ácido N-acetil murâmico para formar o peptidoglicano. Neste estudo, as cepas de *Enterococcus* spp. apresentaram picos mais intensos em 540 , 785 , 813 e 1380 cm^{-1} , assim como para as cepas de *L. monocytogenes*, provavelmente por se tratar de bactérias Gram-positivas, com camada mais espessa de peptidoglicano e,

consequentemente, maior quantidade de ligações glicosídicas. Embora *S. aureus* também seja classificado como bactéria Gram-positiva, não apresentou estes picos mais intensos. No entanto, por se tratar de cepa com grande quantidade de carotenóides, representado pelos picos em 951, 1162, 1293 e 1525 cm^{-1} , responsável pela pigmentação característica, supõe-se que por estes pigmentos interfiram na intensidade dos picos referidos aos glicosídios, tornando-os menos intensos devido à correção da linha de base (POPP et al., 2005; MAQUELIN et al., 2009).

Em 813 cm^{-1} , o pico de *Enterococcus* spp. é marcadamente mais acentuado que os demais, podendo ser explicado pela presença de tiramina nesta bactéria, uma vez que, por ser produtora de tirosina descarboxilase, ela conseguiria formar o produto desencadeado por esta reação enzimática, representado aqui pela tiramina. Ainda neste contexto, esta também poderia ser a explicação para a menor intensidade do pico em 645 cm^{-1} para *Enterococcus* spp. já que, por ser um pico atribuído à tirosina, esta sofreria a ação da citada enzima, diminuindo assim sua concentração e a intensidade deste pico. Já no caso de *S. aureus*, que apresenta este pico mais intenso, possui em sua estrutura a proteína A, que tem resíduos de tirosina em sua constituição, podendo explicar sua maior intensidade.

As bactérias Gram-negativas possuem, além de uma camada delgada de peptidoglicano, uma membrana externa composta de fosfolipídeos, proteínas (porinas) e, em especial, os lipopolissacarídeos (LPS). Internamente, as células bacterianas contêm ribossomo, DNA, água e eletrólitos dissolvidos neste material plasmático. Todos estes elementos podem contribuir para o espectro Raman observado. A semelhança espectral entre as bactérias Gram-negativas foi observada nos resultados deste estudo, evidenciando a pequena diferença na composição química. As bactérias Gram-negativas possuem maior intensidade do pico em 1129 cm^{-1} (pico de amina e lipídeos da composição dos lipopolissacarídeos) quando comparado aos cocos Gram-positivos deste estudo (*S. aureus* e *Enterococcus* spp.). A composição química da parede das bactérias Gram-negativas apresenta maior quantidade de LPS, que tem pico nesta posição. Trabalho de Kusic et al. (2013) utilizou a espectroscopia Raman na identificação de patógenos de água (*Legionella* spp e *P. aeruginosa*), e os picos entre 960 e 2850 cm^{-1} foram atribuídos à parede bacteriana (polissacarídeos e fosfolipídeos) destes bacilos Gram-negativos. Em Osorio-Román et al. (2010), o LPS (antígeno O) foi utilizado como

elemento bioquímico que pudesse fornecer a “impressão digital” da composição das bactérias *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, e assim permitir sua distinção, sendo portanto importante na classificação taxonômica das bactérias. Zhou et al. (2010), avaliaram as proteínas presentes no flagelos de *Pseudomonas putida* que foram utilizadas como possíveis marcadores para a caracterização desta bactéria, presentes também em algumas cepas móveis de *E. coli*.

A espectroscopia Raman também tem o potencial para a identificação dos elementos intracelulares, como demonstrado em trabalhos que tem o propósito de identificar estes elementos (PREMASIRI et al., 2016; WANG et al., 2016). O pico descrito em 1210 cm^{-1} é atribuído a constituintes fundamentais da célula, tais como tirosina, fenilalanina e triptofano, aminoácidos que podem constituir diferentes proteínas. As espécies do gênero *Enterobacter*, em especial *E. cloacae* e *E. agglomerans*, apresentam enzima (proteína) Amp C constitucional, e a produção desta enzima (pertencente à classe das beta-lactamases) já é determinada pelo seu código genético, apresentando conseqüentemente alto perfil de resistência para os antibióticos beta-lactâmicos. Neste estudo, para *E. cloacae*, observa-se maior intensidade do pico em 1210 cm^{-1} quando comparado às outras bactérias, sugerindo que este aumento é devido à presença da enzima. Em trabalho realizado por Heidari et al. (2014), na avaliação de enzimas beta-lactamases produzidas por bactérias, este pico mostrou-se mais evidente para estas proteínas, provavelmente por sua constituição bioquímica envolver tais aminoácidos. Paret et al. (2010) demonstraram que a presença de um pico em 1551 cm^{-1} , atribuído a um exopolissacarídeo (carboidrato) constituinte das cápsulas bacterianas, é fator importante na separação de *E. cloacae* das outras bactérias. Este pico foi observado no presente estudo, porém também para *K. pneumoniae*. Tal observação pode ser explicada pela similaridade entre estas espécies, já que anteriormente eram classificadas em um único gênero, *Aerobacter* spp. (KONEMAN et al., 2001). Outro pico observado por PARET, que se apresentou um pouco mais evidente para *E. cloacae* foi em 810 cm^{-1} , que neste estudo foi demonstrando em 814 cm^{-1} .

O pico em 623 cm^{-1} apresentou maior intensidade para a bactéria *M. morgani*. Uma possível explicação é que nestes microrganismos há a presença da enzima fenilalanina desaminase, que origina o ácido fenil pirúvico e que possui pico nesta posição (HANAI; KAWAI, 1991). Para Gram-positivas, somente *S. aureus* apresentou pico mais intenso nesta posição, podendo estar relacionado à

sobreposição da banda de proteína A, que apresenta fenilalanina em sua constituição (SJOHOLM, 1975) e intensidade alterada devido à intensidade dos picos do beta-caroteno, que pode influenciar a formação do polinômio de correção da linha de base. No caso do pico em 1005 cm^{-1} , também atribuído a fenilalanina, o padrão de intensidade se repete para *M. morgani*, aparecendo também mais intenso para *P. mirabilis*, detentora da enzima que catalisa a formação do ácido fenil pirúvico.

O pico em 667 cm^{-1} , que corresponde à guanina (base nitrogenada - DNA/RNA), foi observado maior intensidade para as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, que tem alta porcentagem da associação guanina-citosina (GC) em seu DNA (66,2% e 57,1%, respectivamente), indicando maior intensidade dos picos destas bases nitrogenadas em seus espectros. Já para *S. aureus*, este pico mais intenso pode estar relacionado à influência dos picos do beta-caroteno na correção da linha de base. O pico em 785 cm^{-1} também corresponde ao conteúdo genético das bactérias (DNA/RNA). Pode-se observar que o pico nesta posição encontra-se mais intenso para *L. monocytogenes*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*, e uma vez que tais bactérias apresentam maior genoma e alto conteúdo de RNA, sugere-se maior contribuição deste constituinte ao espectro.

Os picos em 962 , 1239 e 1291 cm^{-1} são atribuídos a constituintes básicos como amida (proteínas), DNA/RNA e ácidos graxos, importantes elementos presentes em todas as espécies bacterianas. No entanto, é possível identificar diferenças nas intensidades dos picos das bactérias avaliadas neste estudo: as intensidades destes picos apresentam-se maior para as bactérias Gram-negativas, e a possível explicação para esta observação estaria relacionada com a espessura das paredes celulares: como estas bactérias apresentam parede mais delgada, os picos referentes a constituintes intracelulares, como material genético e proteínas, podem ficar mais evidentes, contribuindo assim com a intensidade dos picos descritos nestas posições.

5.3 Discriminação das bactérias através da espectroscopia Raman

A discriminação bacteriana pode ser realizada através da técnica Raman avaliando-se tanto as diferenças entre os principais picos presentes no espectro, quanto todo o espectro.

Neste estudo, o modelo que utilizou a função discriminante `classify.m` do software Matlab nos picos selecionados pelo ANOVA e que melhor classificou os espectros foi a distância quadrática, com 89,5 % de acertos considerados em todos os grupos. Quando avaliado todo o espectro, através do PLS, a taxa de acertos foi de 90,1%. De acordo com esses resultados, é possível afirmar que a seleção de picos mais significativos pode ser vantajosa, uma vez que menos cálculos matemáticos são necessários quando se utiliza apenas alguns pontos do espectro e o algoritmo de discriminação pode ser mais rápido, contribuindo com a redução do tempo para se alcançar o diagnóstico.

Sundaram et al. (2013) fizeram a detecção e a classificação de quatro espécies diferentes de bactérias Gram-positivas e negativas *in vitro* e desenvolveu um modelo de discriminação baseado na PCA, com 97% de classificação correta. Strola et al. (2014) utilizou sete espécies bacterianas (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *M. luteus* e *S. marcescens*) em um algoritmo de classificação usando o “support vector machine” (SVM) aplicado aos espectros Raman (532 nm) em duas faixas espectrais (650 a 1800 cm^{-1} e 2600 a 3200 cm^{-1}). Obtiveram resultados positivos na identificação de espécies bacterianas com taxas de sucesso próximas de 90% através da classificação SVM utilizando essas duas faixas. Hamasha et al. (2013) compararam duas técnicas de análise multivariada para avaliar a sensibilidade e a especificidade na identificação de cepas patogênicas e não patogênicas de *E. coli* através da espectroscopia Raman no visível (514 nm), empregando a PCA e a PLS. Foi observadas sensibilidade e especificidade acima de 95% para ambas as técnicas, e taxas de acerto de 100% para uma das espécies.

Wu et al. (2014) utilizaram SERS para identificar *P. aeruginosa* diretamente do material biológico, usando como biomarcador a pioverdina e a piocianina, pigmentos próprios desta espécie. Foram avaliadas 22 amostras de pacientes com fibrose cística e pacientes saudáveis e os espectros foram obtidos e avaliados pelo PCA e PLS, onde a PLS foi capaz de discriminar as amostras com infecção daquelas sem infecção com 99,3% de sensibilidade e 99,6% de especificidade. Além

disso, esta técnica também pode discriminar amostras de pacientes com a doença fibrose cística de pacientes saudáveis com 97,5% de sensibilidade e 100% de especificidade. Harz et al. (2009) demonstraram o uso da espectroscopia Raman na identificação das principais espécies envolvidas em meningites bacterianas diretamente do líquido céfalo-raquidiano, com 94% de identificação correta, evidenciando pouca influência do material biológico na definição espectral. Estes resultados demonstram o potencial de utilização da técnica em amostras biológicas como uma ferramenta de diagnóstico rápido para detectar infecções bacterianas.

Kloß et al. (2013) investigaram a utilização da micro-espectroscopia Raman na definição de infecções urinárias sem a utilização da cultura, através de modelo matemático desenvolvido pelo SVM, permitindo a identificação de espécies envolvidas nestas infecções (*E. faecalis*, *E. faecium*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*), com precisão global de 92%. Premasiri et al. (2017) também utilizaram espectroscopia Raman (SERS) na identificação de 12 cepas de espécies bacterianas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus* e *E. faecalis*) envolvidas em infecções urinárias diretamente no material biológico (urina), com taxas de 95,8% de sensibilidade e 99,3% de especificidade utilizando o PLS na discriminação bacteriana. Os autores discutem as vantagens, como a dispensa da fase de cultivo, que permite a identificação bacteriana em menos de 1 h. No entanto, a possibilidade de culturas mistas dificulta esta dispensa, já que a confirmação da contaminação depende do isolamento de colônias bacterianas diferentes crescidas no agar.

Uma nova abordagem da utilização da espectroscopia Raman aplicada à microbiologia é a identificação de possíveis alterações na célula bacteriana provocadas pelo uso de antimicrobianos. Münchberg et al. (2014) avaliaram duas cepas de *E. coli* e duas espécies de *Pseudomonas* submetidas a diferentes classes de antimicrobianos (ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina e sulfametoxazol), obtendo altos índices (acima de 85%) na identificação de cada espécie, além de classificar duas cepas resistentes à ampicilina com sucesso.

Xuan Nguyen et al. (2017) utilizaram a espectroscopia Raman e a espectroscopia FT-IR na região de impressão digital para detectar alterações moleculares em cepas de *E. coli* submetidas a diferentes classes de antimicrobianos (ampicilina, cefotaxima, tetraciclina e ciprofloxacina). Na avaliação dos espectros das cepas não tratadas e tratadas com os antimicrobianos, foram

observadas alterações nas bandas correspondentes aos carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos e que, associadas à análise por PCA, permitiram a discriminação entre as cepas. Dekter et al. (2017) avaliaram o perfil de resistência de 133 cepas de bactérias isoladas de amostras sanguíneas (*E. faecalis*, *E. faecium*, *S. aureus*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *S. marcescens*) através da espectroscopia Raman, e seus perfis foram comparados àqueles obtidos com a metodologia clássica. Ocorreu concordância de 68% entre as cepas sensíveis e 98% entre as cepas resistentes, sugerindo o potencial da técnica na descrição dos perfis de sensibilidade aos antimicrobianos. Kirchhoff et al. (2018) utilizaram cepas de *E. coli* com diferentes perfis de resistência à ciprofloxacina e compararam com os perfis obtidos através de técnicas fenotípicas de referência, com boa correlação entre os valores, além de detectar as mudanças provocadas pelo antimicrobiano na célula bacteriana.

Neste trabalho foi demonstrada a possibilidade do uso da espectroscopia Raman na identificação bacteriana diretamente das colônias crescidas em agar Mueller Hinton e a discriminação em grupos separados de acordo com a intensidade dos picos mais relevantes selecionados com técnica estatística ANOVA aplicada aos espectros e com todo o espectro. As vantagens do uso da técnica Raman incluem a rapidez, o baixo custo e a utilização de pequena porção de biomassa para análise, o que permite a identificação da etiologia de uma doença infecciosa em menor tempo, permitindo uma decisão mais acertada quanto ao esquema terapêutico a ser aplicado. Como grande vantagem, isso reduziria a aplicação da antibioticoterapia empírica, reduzindo os custos com o tratamento inadequado e diminuindo as taxas de resistência aos antimicrobianos, o que representa uma grande preocupação da comunidade médica na atualidade (WHO, 2017).

5.4 Trabalhos futuros

Uma possibilidade para trabalhos futuros é a caracterização do perfil de resistência bacteriana aos antimicrobianos e a identificação dos possíveis mecanismos desta resistência por meio de espectroscopia Raman, com objetivo de oferecer maior suporte à decisão médica na escolha do tratamento mais adequado a infecções em tempo reduzido. Importante também mencionar a possibilidade de trabalhos futuros utilizando outras espécies bacterianas, em especial aquelas que

requerem condições especiais de cultivos e identificações, além de microrganismos pertencentes a outras classes, como no caso de fungos que também estão relacionados a diversos processos patogênicos ao homem.

CONCLUSÃO

A espectroscopia Raman foi capaz de identificar as diferenças espectrais baseadas na composição bioquímica de oito espécies bacterianas e um gênero bacteriano envolvidos em infecções humanas (*Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*), fornecendo informações espectrais reprodutíveis referentes à diferença na composição das mesmas. Foram identificadas diferenças nos picos que são referentes a variados constituintes bioquímicos como peptidoglicanos, ácidos nucleicos e proteínas, elementos importantes que permitiram a separação entre as espécies Gram-positivas e Gram-negativas. O modelo de discriminação que utiliza a distância quadrática (Q-DA) aplicada à intensidade dos picos mais relevantes permitiu classificação das bactérias em seus respectivos grupos clínicos, com taxa de acertos de 89,5% e o modelo baseado no PLS (PLS-DA) aplicado a todo espectro com 90,1% de acertos comparados aos processos tradicionais de identificação bacteriana, mostrando ser uma técnica promissora para um diagnóstico mais rápido de doenças infecciosas.

Referências Bibliográficas

ALLINGER, N. L. **Química orgânica**. São Paulo: Reverté, 1979.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.260-271, mar. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2319>.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 166-173, 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/cem.785>.

BHATTA, H.; GOLDYS, E.M.; LEARMONTH, R.P. Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, [s.l.] v.71, n. 1, p.121-126, jun 2006. <http://dx.doi.10.1007/s00253-005-0309-y>

BOARDMAN, A. K. et al. Rapid Detection of Bacteria from Blood with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 88, n. 16, p. 8026-8035, ago. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01273>.

BRIGANTE, G. et al. Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by Using the BD Phoenix System in the Low- Inoculum Mode. **J. Clin. Microbiol.**,[s.l.] v. 46, n. 11, p. 3826 - 3828, sep. 2008. <http://dx.doi./10.1128/JCM.00877-08>.

BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Anal. Methods**,[s.l.] v.6,n. 9, p. 2812-2831, mar 2014. <http://dx.doi/10.1039/C3AY41907J>

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Quim. Nova**,[s.l.] v. 8, n. 2, p. 84-99, abr. 1995.

CAREY, P. R. Raman Spectroscopy, the Sleeping Giant in Structural Biology, Awakes. **J. Biol. Chem.**,[s.l.] v. 274,n. 38. p. 26625 - 26628, set.1999.

CASPERS, P. J.; LUCASSEN, G. W.; PUPPELS, G. J. Combined In Vivo Confocal Raman Spectroscopy and Confocal Microscopy of Human Skin. **Biophys. J.**,[s.l.] v.85, n. 1, p. 572-580, jul. 2003. [http://dx.doi/ 10.1016/S0006-3495\(03\)74501-9](http://dx.doi/ 10.1016/S0006-3495(03)74501-9)

Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.** 51:1-28, 2002.

CHAMPE, P.C. et al. **Bioquímica ilustrada**. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CHAUDHURY, A.; ANBUMANI, S.; GURURAJKUMAR, A. Isolation of Legionella pneumophila from clinical and environmental sources in a tertiary care hospital. **Indian J. Med. Res.**,[s.l.], v. 131, p. 761-764, jun. 2010.

CHEN, Y.; PREMASIRI, W. R.; ZIEGLER, L. D.. Surface enhanced Raman spectroscopy of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae for diagnostics,

and extra-cellular metabolomics and biochemical monitoring. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1-12, 26 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23562-5>.

CHISANGA, M. et al. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) in Microbiology: Illumination and Enhancement of the Microbial World. **Applied Spectroscopy**, [s.l.], p. 467-481, 23 mar. 2018. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0003702818764672>.

CHOO-SMITH, L.-P et al. Investigating Microbial (Micro) colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy. **Appl. Environ. Microbiol.**, [s.l.] v. 67, n. 4, p. 1461-1469, abr. 2001. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.4.1461-1469.2001>

CIACCIO, E.J.; DUNN, S.M.; AKAY, M.. Biosignal pattern recognition and interpretation systems. 3. Methods of classification. **Ieee Engineering In Medicine And Biology Magazine**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 129-135, fev. 1994. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE). <http://dx.doi.org/10.1109/51.265792>.

CIOBOTă, V. et al. The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 397, n. 7, p. 2929-2937, 27 jun. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3895-1>.

DIECKMANN, R. et al. Rapid characterisation of *Klebsiella oxytoca* isolates from contaminated liquid hand soap using mass spectrometry, FTIR and Raman spectroscopy. **Faraday Discussions**, [s.l.], v. 187, p.353-375, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5fd00165j>.

DOERN, G. V. et al. "Clinical Impact of Rapid in Vitro Susceptibility Testing and Bacterial Identification." **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1757–1762, jul. 1994.

D'SOUZA, H.A.; CAMPBELL, M.; BARON, E.J. Practical bench comparison of BBL CHROMagar Orientation and standard two-plate media for urine cultures. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 1, p. 60-64, jan. 2004. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.1.60-64.2004>.

EFRIMA, S. et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Tool for Probing Specific Biochemical Components in Bacteria. **Appl. Spectrosc.**, v. 58, n. 1, p. 33-40, jan. 2004. <http://dx.doi.org/10.1366/000370204322729441>.

FALLON, D. et al. A comparison of the performance of commercially available chromogenic agars for the isolation and presumptive identification of organisms from urine. **J. Clin. Pathol.**, v. 56, n. 8, p. 608-612, ago. 2003.

FARIA, D. L. A. de ; SANTOS, L. G. C.; GONCALVES, N. S.. Uma Demonstração Sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo o Experimento de Raman. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 319-323, june 1997. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421997000300014>.

FÁVERO, L. P. et al. **Análise de dados: modelagem multivariada para tomada de decisões**. 1 ed. São Paulo: Elsevier, 2009. 544 p.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R.. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 185, p. 1-17, 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(86\)80028-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(86)80028-9).

GIANA, H. E. et al. Rapid Identification of Bacterial Species by Fluorescence Spectroscopy and Classification Through Principal Components Analysis. **Journal Of Fluorescence**, [s.l.], v. 13, n. 6, p. 489-493, nov. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/b:jofl.0000008059.74052.3c>.

GILLIGAN, P. H. et al. Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococcus in Prenatal Screening Cultures. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 2, p. 855-857, feb. 2004. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.2.855-857.2004>

GOODWIN, J.R. Vibrational Microspectroscopy of bacterial colonies. 2006. 214p. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas) – School of Chemical and Physical Sciences, Queensland University of Technology, Brisbane, Austrália.

GRUMAZ, S. et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. **Genome Medicine**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1-13, 1 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-016-0326-8>.

GUO, R. et al. A rapid and low-cost estimation of bacteria counts in solution using fluorescence spectroscopy. **Anal Bioanal Chem**, v. 409, n. 16, p. 3959-3967, abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-017-0347-1>.

HAIJING, L. et al. Identification and Differentiation of Clinically Relevant Mycobacterium Species Directly from Acid-Fast Bacillus-Positive Culture Broth. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 47, n. 12, p. 3814-3820, 30 set. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01534-09>.

HANLON, E. B et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Phys. Med. Biol.**, [s.l.], v. 45, n. 2, p. 51-59, feb.2000.

HARZ, M. et al. Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus Staphylococcus and dependence on their cultivation conditions. **The Analyst**, [s.l.], v. 130, n. 11, p. 1543-1550, 2005. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b507715j>.

HARZ, M. et al. Direct analysis of clinical relevant single bacterial cells from cerebrospinal fluid during bacterial meningitis by means of micro-Raman spectroscopy. **Journal Of Biophotonics**, [s.l.], v. 2, n. 1-2, p. 70-80, fev. 2009. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.200810068>.

HELM, D. et al. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. **J Genet. Microbiol.**, v. 137, n. 1, p. 69-79, jan. 1995. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-137-1-69>.

HUANG, W. E. et al. Shining Light on the Microbial World. **Advances In Applied Microbiology**, [s.l.], p. 153-186, 2010. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2164\(10\)70005-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2164(10)70005-8).

HUANG, W. E. et al. Single-Cell Raman Spectral Profiles of *Pseudomonas fluorescens*. **Microb. Ecol.**, v. 53, n. 3, p. 414-425, mar. 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-006-9138-5>.

HUANG, W. E. et al. Raman Microscopic Analysis of Single Microbial Cells. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 76, n. 15, p. 4452-4458, ago. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac049753k>.

IBRAHIM, E. H. et al. The Influence of Inadequate Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infections on Patient Outcomes in the ICU Setting. **Chest**, [s.l.], v. 118, n. 1, p.146-155, jul. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.118.1.146>.

ISLAM, M.I.U.; LANGRISH, T.A.G.. An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying. **Food Research International**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.46-56, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.08.010>.

JARVIS, R. M.; GOODACRE, R.. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 76, n. 1, p. 40-47, jan. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac034689c>.

JARVIS, R. M.; GOODACRE, R.. Ultra-violet resonance Raman spectroscopy for the rapid discrimination of urinary tract infection bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 232, n. 2, p. 127-132, mar. 2004. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00040-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00040-0).

JARVIS, R. M.; BROOKER, A.; GOODACRE, R.. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bacterial Discrimination Utilizing a Scanning Electron Microscope with a Raman Spectroscopy Interface. **Anal. Chem.**, v. 76, n. 17, p. 5198 - 5202, jul. 2004. <http://dx.doi.org/10.1021/ac049663f>.

JARVIS, R. M.; GOODACRE, R.. Characterization and Identification of Bacteria Using SERS. **Chem. Soc. Rev.**, v. 37, n. 5, p. 931-936, may. 2008. <http://dx.doi.org/10.1039/b705973f>.

JAWETZ, E. et al. **Microbiologia medica**. 26 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 611 p.

KAYSER, F. H. et al. **Medical Microbiol.** 2 ed. New York: Thieme, 2005. 698 p

KERREMANS, J. J. et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. **J. Antimicrob. Chemoth.**, v. 61, n. 2, p. 428-435, dec. 2008. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm497>.

KIRCHHOFF, J. et al. Simple Ciprofloxacin Resistance Test and Determination of Minimal Inhibitory Concentration within 2 h Using Raman Spectroscopy. **Analytical**

Chemistry, [s.l.], v. 90, n. 3, p. 1811-1818, 11 jan. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03800>.

KIRSCHNER, C. et al. Classification and Identification of Enterococci: a Comparative Phenotypic, Genotypic, and Vibrational Spectroscopic Study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 5, p. 1763-1770, mar. 2001. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.5.1763-1770.2001>.

KLOß, S. et al. Culture Independent Raman Spectroscopic Identification of Urinary Tract Infection Pathogens: A Proof of Principle Study. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 85, n. 20, p. 9610-9616, 24 set. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac401806f>.

KOHLER, A. et al. High-Throughput Biochemical Fingerprinting of *Saccharomyces cerevisiae* by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. e0118052, 23 fev. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0118052>.

KONEMAN, E. et al. **Diagnostico microbiológico: Texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1495 p

KUMAR, A. et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. **Crit Care Med.**, v. 34, n. 6, p. 1589-1596, jun. 2006. <http://dx.doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>.

KUSIC, D. et al. Identification of water pathogens by Raman Microspectroscopy. **Water Research.**, v. 48, n. 1, p. 179-189, set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.030>.

LAMMIE, S. L.; HUGHES, J. M.. Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. **Annual Review Of Food Science And Technology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 287-312, 28 fev. 2016. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033251>.

LAW, J. W. et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 5, p.1-19, 12 jan. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>.

LEHTO, V. et al. The comparison of seven different methods to quantify the amorphous content of spray dried lactose. **Powder Technology**, [s.l.], v. 167, n. 2, p. 85-93, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2006.05.019>.

LIU, T. et al. A High Speed Detection Platform Based on Surface-Enhanced Raman Scattering for Monitoring Antibiotic-Induced Chemical Changes in Bacteria Cell Wall. **Plos One**, [s.l.], v. 4, n. 5, p. e5470, 7 maio 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005470>.

LÓPEZ, T. et al. Thermal Characterization of Agar Encapsulated in TiO₂ Sol?Gel. **International Journal Of Thermophysics**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 1483-1493, set. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10765-004-5753-x>.

LORENZ, B. et al. Cultivation-Free Raman Spectroscopic Investigations of Bacteria. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 413-424, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.002>.

LOUIE, L. et al. Evaluation of a New Chromogenic Medium (StrepB Select) for Detection of Group B Streptococcus from Vaginal-Rectal Specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 12, p. 4602-4603, dec. 2010. <http://dx.doi.org/doi:10.1128/JCM.01168-10>.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre : Artmed, 2016. 1032 p.

MAESSCHALCK, R. de; JOUAN-RIMBAUD, D.; MASSART, D.I.. The Mahalanobis distance. **Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.1-18, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-7439\(99\)00047-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-7439(99)00047-7)

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 83, n. 1, p. 39-48, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00322-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00322-7).

MAQUELIN, K. et al. Raman Spectroscopic Method for Identification of Clinically Relevant Microorganisms Growing on Solid Culture Medium. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1, p. 12-19, jan. 2000. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac991011h>.

MAQUELIN, K. et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 51, n. 3, p. 255-271, nov. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012\(02\)00127-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012(02)00127-6).

MAQUELIN, K. et al. Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 324-329, 1 jan. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.1.324-329.2003>.

MAQUELIN, K. et al. Raman spectroscopic typing reveals the presence of carotenoids in Mycoplasma pneumoniae. **Microbiology**, [s.l.], v. 155, n. 6, p. 2068-2077, 21 abr. 2009. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.026724-0>.

MARZOCCO, A.; TORRES, B. B.. **Bioquímica básica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386 p

MATTHÄUS, C. et al. Chapter 10 Infrared and Raman Microscopy in Cell Biology. **Methods In Cell Biology**, [s.l.], p. 275-308, 2008. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)00610-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x(08)00610-9).

MANOHARAN, R. et al. UV resonance Raman spectra of bacteria, bacterial spores, protoplasts and calcium dipicolinate. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-15, fev. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012\(90\)90042-5](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012(90)90042-5).

MANTSCH, H. H.; JACKSON, M.. Pathology by Infrared and Raman Spectroscopy. **Handbook Of Vibrational Spectroscopy**, [s.l.], p. 311-340, 15 ago. 2006. John Wiley & Sons, Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/0470027320.s8101>.

McCLELLAND, R. Gram's stain: the key to microbiology. **MLO Med Lab Obs.**, v. 33, n. 4, p. 20-22, abr. 2001.

MONTANARI, L. B. et al. Yeast isolation and identification in water used in a Brazilian hemodialysis unit by classic microbiological techniques and Raman spectroscopy. **Journal Of Water And Health**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 311-320, 8 dez. 2017. IWA Publishing. <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2017.334>.

MOROS, J.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. D. La. Vibrational spectroscopy provides a green tool for multi-component analysis. **TrAC Trends Anal. Chem.**, [s.l.], v. 29, n. 7, p. 578-591, jan.2010. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.trac.2009.12.012>

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U.. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 5, p.493-541, set. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/05704920701551530>.

MUHAMADALI, H. et al. Rapid, accurate, and comparative differentiation of clinically and industrially relevant microorganisms via multiple vibrational spectroscopic fingerprinting. **Analyst.**, v.141, n. 17, p. 5127-5136, aug. 2016. [http://dx.doi.org/ doi:10.1039/c6an00883f](http://dx.doi.org/doi:10.1039/c6an00883f).

MÜNCHBERG, U. et al. Raman spectroscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, [s.l.], v. 406, n. 13, p. 3041-3050, 21 mar. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-7747-2>.

MURRAY, C. J. L.. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, [s.l.], v. 385, n. 9963, p.117-171, jan. 2015. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)61682-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(14)61682-2).

MURRAY, P.R.; ROSENTHAHL, K. S.; PFALLER, M. A.. **Microbiologia Médica**. 7 ed. Madrid: Elsevier, 2006. 976 p

NAUMANN, D. et al. Infrared Spectroscopy, a Tool for Probing Bacterial Peptidoglycan. Potentialities of Infrared Spectroscopy for Cell Wall Analytical Studies and Rejection of Models Based on Crystalline Chitin. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 125, n. 3, p. 505-515, jul. 1982. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06711.x>.

NAUMANN, D. et al. FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells. **Journal Of Molecular Structure**, [s.l.], v. 347, p.399-405, mar. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2860\(95\)08562-a](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2860(95)08562-a).

NAUMANN, D.. Infrared and NIR Raman spectroscopy in medical microbiology. **Infrared Spectroscopy: New Tool in Medicine**, [s.l.], p. 245-257, 24 abr. 1998. SPIE. <http://dx.doi.org/10.1117/12.306089>.

NELSON, W. H.; MANOHARAN, R.; SPERRY, J. F.. UV Resonance Raman Studies of Bacteria. **Applied Spectroscopy Reviews**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 67-124, mar. 1992. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/05704929208018270>.

NIETO, L. I. et al. Empleo de espectroscopia infrarroja-transformada de Fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica. **Acta bioquím. clín. latinoam.**, La Plata, v. 38, n. 3, p. 289-295, set. 2004.

NOLAN, J. P.; SEBBA, D. S.. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Cytometry. **Methods In Cell Biology**, [s.l.], p. 515-532, 2011. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-374912-3.00020-1>.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, nov. 2012.

OSORIO-ROMÁN, I. O. et al. Characterization of bacteria using its O-antigen with surface-enhanced Raman scattering. **The Analyst**, [s.l.], v. 135, n. 8, p. 1997-2001, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c0an00061b>.

PARET, M.L. et al. Biochemical Characterization of Gram-Positive and Gram-Negative Plant-Associated Bacteria with Micro-Raman Spectroscopy. **Appl. Spectrosc.**, v. 64, n. 4, p. 433-441, abr. 2010. <http://dx.doi.org/10.1366/000370210791114293>.

PAHLOW, S. et al. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 89, p.105-120, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.006>.

PEREIRA, L. et al. Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, [s.l.], v. 20, n. 4-6, p. 223-228, jul. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1389-0344\(03\)00058-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1389-0344(03)00058-3).

PETTI, C. A.; RELLER, L. B.; WEINSTEIN, M. P.. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 44, n. 8, p.1108-1114, 15 abr. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/512818>.

RAO, S. et al. Raman Study of Mechanically Induced Oxygenation State Transition of Red Blood Cells Using Optical Tweezers. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 96, n. 1, p.209-216, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.108.139097>.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S.. A New Type of Secondary Radiation. **Nature**, [s.l.], v. 121, n. 3048, p.501-502, mar. 1928. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/121501c0>.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. UNESP 2003, 115p.

STONE, N. et al. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. **Faraday Discussions**, [s.l.], v. 126, p. 141-157, 2004. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b304992b>.

SUNDARAM, J. et al. Surface enhanced Raman scattering (SERS) with biopolymer encapsulated silver nanosubstrates for rapid detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 167, n. 1, p.67-73, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.013>.

RICHARDS-KORTUM, R.; SEVICK-MURACA, E.. QUANTITATIVE OPTICAL SPECTROSCOPY FOR TISSUE DIAGNOSIS. **Annual Review Of Physical Chemistry**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.555-606, out. 1996. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physchem.47.1.555>.

SCHMITT, J.; FLEMMING, H.. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 1-11, jan. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0964-8305\(98\)80002-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0964-8305(98)80002-4).

SMITH, E.; DENT, G. **Modern Raman spectroscopy: a practical approach**. Chichester: John Wiley & Sons, 2013. 217 p.

SNYDER, J. W.; MUNIER, G. K.; JOHNSON, C. L.. Direct Comparison of the BD Phoenix System with the MicroScan WalkAway System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterobacteriaceae and Nonfermentative Gram-Negative Organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 46, n. 7, p. 2327-2333, 21 maio 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00075-08>.

TANG, Y.; PROCOP, G.W.; PERSING, D.H. Molecular diagnostics of infectious diseases. **Clin. Chem.** v.43, n. 11, p. :2021-2038, nov. 1997.

TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WOOLHOUSE, M. E. J.. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 356, n. 1411, p. 983-989, 29 jul. 2001. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>.

TORTORA, G.J. et al. **Microbiologia**. 8 ed. Rio de Janeiro, Artmed, 2002. 642p.

TOURKYA, B. et al. Fluorescence Spectroscopy as a Promising Tool for a Polyphasic Approach to Pseudomonad Taxonomy. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 58, n. 1, p.39-46, 25 set. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-008-9263-0>.

WALKER, H.K.; HALL, W.D.; HURST, J.W. **Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations**. 3 ed. Boston: Buttersworths, 1990. 2808p.

WANG, J. et al. Rapid label-free identification of mixed bacterial infections by surface plasmon resonance. **Journal of Translational Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.85-92, 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-9-85>.

WHO - World Health Organization (2004). Anexo Tabela 2: Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002. The world health report 2004. Disponível em: http://www.who.int/entity/whr/2004/annex/topic/en/annex_2_en.pdf Acesso em 07 de julho de 2017.

WHO 2015. World Health Organization. Antibiotic resistance. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>. Acesso 9 de julho de 2017.

WU, X. et al. Rapid detection of Pseudomonas aeruginosa biomarkers in biological fluids using surface-enhanced Raman scattering. **Smart Biomedical And Physiological Sensor Technology Xi**, [s.l.], p. 91070, 22 maio 2014. SPIE. <http://dx.doi.org/10.1117/12.2053156>.

WU, X. et al. Comparison of Three Methods for Rapid Identification of Mycobacterial Clinical Isolates to the Species Level. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.1898-1903, 14 mar. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02253-06>.

ZHOU, A. H. et al. Combined AFM/Raman microspectroscopy for characterization of living cells in near physiological conditions. **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**. v. 4, n.1, p. 515- 522, 2010.