

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Aplicação de quimiometria nos parâmetros que influenciam a susceptibilidade e na identificação de fungos de importância médica

ÂNDERSON RAMOS CARVALHO

PORTO ALEGRE, 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Aplicação de quimiometria nos parâmetros que influenciam a susceptibilidade e na identificação de fungos de importância médica

Tese apresentada por **ÂNDERSON RAMOS CARVALHO** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador: Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão

PORTO ALEGRE, 2023

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.03.2023, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Gilson Augusto Helfer

Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC)

Prof. Dr. Fabrício Souza Campos

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Walter Orlando Beys da Silva

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho, Anderson Ramos
Aplicação de quimiometria nos parâmetros que influenciam a susceptibilidade e na identificação de fungos de importância médica / Anderson Ramos Carvalho. -- 2023.
241 f.
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientador: Marco Flôres Ferrão.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Quimiometria. 2. Micologia. 3. Susceptibilidade Fúngica. 4. Imagens Digitais. 5. Espectroscopia na região do infravermelho. I. Fuentefria, Alexandre Meneghello, orient. II. Ferrão, Marco Flôres, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Aplicada (Faculdade de Farmácia/ Anexo II), sob orientação do prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria e no Laboratório de Quimiometria e Instrumentação Analítica (Instituto de Química), sob coorientação do prof. Dr. Marco Flôres Ferrão, ambos da UFRGS.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro destinado ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Dedico esse trabalho a minha companheira,
Luana Candice Genz Bazana;

Aos meus pais,

Flori Carvalho e Rejane Ramos Carvalho;

Aos meus avós Maria de Lourdes Petry
Ramos e Luiz Darci Ramos (*in memoriam*);

Fontes de inspiração, carinho e força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria, que acreditou na ideia proposta lá em 2016 e que virou mestrado em 2017 e doutorado em 2018. Obrigado por acreditar em uma alternativa inovadora, diferente e que parece se provar certa a cada nova etapa que se cumpre.

Ao meu coorientador prof. Dr. Marco Flôres Ferrão por esses muitos anos de convivência, ensinamentos e aprendizado que permitiram o meu desenvolvimento pessoal e intelectual. Mas também por compreender que orientar é mais que cobrar resultados e sim formar pesquisadores/cientistas que aprendam o olhar crítico para resolver problemas.

Ao meu amigo, ex-orientador Prof. Dr. George González Ortega que me ajudou no protótipo da ideia, lá no final da graduação e me instruiu com paixão acerca da estatística multivariada que nunca mais saiu da minha vida até então. Ao meu eterno orientador meu muito obrigado.

Aos meus caros amigos da faculdade de farmácia da UFRGS, os professores: Osmar Luiz Magalhães de Oliveira, Paulo Jaconi Saraiva e Otávio Jaconi Saraiva pelas muitas conversas e cafés que os momentos permitiram. Ao meu amigo Paulo Eduardo Borges Mayorga, que apesar de não ter sido meu professor na graduação me ensina todos os dias com a sua amizade e parceria.

Aos colegas do laboratório de pesquisa em micologia aplicada (LPMA) e do laboratório de quimiometria e instrumentação analítica (LAQIA) pela ajuda nessa caminhada e pela convivência que deixará recordações.

Ao laboratório de química medicinal de compostos de selênio (QMCS_e) na UFCSPA, que na pessoa do prof. Dr. Rômulo Faria Santos Canto que me abriu as portas e permitiu a realização das leituras no FTIR-HATR, em especial ao graduando Mário Alf da Rosa, que me auxiliou em todas as leituras, meu muito obrigado meu amigo.

A minha companheira de laboratório, de experimentos e de vida, Luana Candice Genz Bazana, pela paciência, compreensão em entender minhas ideias mais

malucas e viradas e por fornecer o incentivo para a superação das etapas que foram importantes para a minha formação.

Aos meus pais Flori Carvalho e Rejane Ramos Carvalho, por tudo que me ensinaram e permitiram que eu chegasse até aqui.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Leveduras de importância clínica como *Candida* spp. são microrganismos mais frequentemente isolados em infecções do trato urogenital, gastrointestinal e sanguíneo. A dificuldade em sua diferenciação e identificação devido à inespecificidade de testes bioquímicos ou ao não acesso às ferramentas mais precisas como as biomoleculares pode levar a recomendação de tratamentos menos efetivos. A similaridade com outras leveduras como as leveduras do gênero *Cryptococcus* pode ocasionar a erros de identificação e posteriormente tratamento. Além disso, a realização de testes de susceptibilidade através de inóculos com grande variabilidade causa prejuízos quanto à precisão do teste não concedendo ao analista poder decisório quanto à eficácia do antifúngico. Outros parâmetros como concentração de glicose, temperatura e pH podem influenciar o crescimento e inibição de leveduras de importância médica como as do gênero *Candida*. Assim, a presente tese teve como objetivo avaliar o preparo de inóculos do gênero *Candida* através da espectroscopia UV-Vis. Estimar o pH em meio de cultura em microvolumes através de imagens digitais. Estimar o impacto de pequenas alterações na temperatura, inóculo, pH e glicose no crescimento e inibição de cepas de *Candida* spp. Realizar a classificação de espécies de *Candida* através do emprego de imagens digitais oriundas de meio cromogênico. E, por fim, diferenciar e classificar leveduras do gênero *Cryptococcus* na presença de outras espécies de *Candida* spp. através do emprego da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) associada à quimiometria. Para atingir esses objetivos, foram utilizadas ferramentas quimiométricas que foram desde o delineamento experimental (DoE), regressão multivariada e classificação multivariada com diferentes matrizes de dados como imagens digitais, unidades de absorbância na espectroscopia ultravioleta e espectroscopia de infravermelho. Os resultados obtidos demonstraram que através da dispersão de quantidades conhecidas de blastoconídeos e obtenção de medidas espectrofotométricas permitiram maior precisão no preparo de inóculos. A determinação do pH através do emprego de imagens digitais em microvolumes em placas de 96 e 24 poços é uma opção vantajosa, pois permite a estimação do pH sem a quebra de esterilidade. Os resultados do DoE apontam

que mesmo pequenas modificações no inóculo, concentração de glicose e pH geram alterações significativas tanto para crescimento como para inibição. Imagens digitais do meio cromogênico associadas as ferramentas quimiométricas permitiram a classificação de cinco diferentes espécies de *Candida* com precisão e exatidão. E por fim, a diferenciação de duas espécies de *Cryptococcus* é possível mesmo com 13 outras espécies de *Candida* mostrando que o FTIR rivaliza em potencialidade com outras técnicas de identificação.

Palavras-chave: *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., Imagem digital, FTIR, levedura, DoE.

ABSTRACT

Application of chemometrics in the parameters that influence susceptibility and in the identification of fungi of medical importance

Clinically important yeasts such as *Candida* spp. are microorganisms most frequently isolated in infections of the urogenital, gastrointestinal, and blood tract. The difficulty in differentiating and identifying them due to the lack of specificity of biochemical tests or the lack of access to more precise tools as biomolecular ones can lead to the recommendation of less effective treatments. The similarity with other yeasts as yeasts of the genus *Cryptococcus* can lead to misidentification and subsequent treatment. In addition, carrying out susceptibility tests using inoculums with significant variability causes losses in terms of test accuracy, not granting the analyst decision-making power regarding the efficiency of the antifungal agent. Other parameters such as glucose concentration, temperature, and pH can influence the growth and inhibition of medically important yeasts as those of the genus *Candida*. Thus, the present thesis aimed to evaluate the preparation of the inoculum of the genus *Candida* through UV-Vis spectroscopy. Estimate the pH in culture medium in microvolumes through digital images. Estimate the impact of small changes in temperature, inoculum size, pH, and glucose concentration on the growth and inhibition of *Candida* spp. Perform the classification of *Candida* species through digital images from a chromogenic medium. And, finally, to differentiate and classify yeasts of the genus *Cryptococcus* in the presence of other species of *Candida* spp. through spectroscopy in the infrared region (FTIR) associated with chemometrics. Chemometric tools were applied to achieve these objectives, ranging from experimental design (DoE), multivariate regression, and multivariate classification with different data matrices as digital images and absorbance units in ultraviolet and infrared spectroscopy. The results showed that dispersing known quantities of blastoconidia and obtaining spectrophotometric measurements precision in the inoculum preparation. The pH determination through digital images in microvolumes in 96 and 24 well plates is an advantageous option, as it allows the estimation of the pH without sterility loss. The DoE results indicate that even tiny modifications in the inoculum size, glucose concentration and pH generate significant alterations both for growth and inhibition. Digital images of the chromogenic medium associated with

chemometric tools allowed the classification of five different *Candida* species with precision and accuracy. And finally, the differentiation of two species of *Cryptococcus* is possible even with 13 other species of *Candida* showing that FTIR rivals in potentiality with other identification techniques.

Keywords: *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., Digital images, FTIR, Yeast identification, DoE.

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), a presente tese segue a seguinte sequência:

- 1) Introdução e relevância ao tema;
- 2) Objetivos;
- 3) Revisão Bibliográfica;
- 4) Capítulos (I ao V) – Manuscritos;
- 5) Discussão geral;
- 6) Conclusões gerais;
- 7) Perspectivas
- 8) Referências bibliográficas;

Os capítulos referentes aos manuscritos (artigos publicados, submetidos e a serem submetidos) foram formatados especificamente conforme às regras das revistas selecionadas.

SUMÁRIO

Introdução e relevância ao tema.....	21
Objetivos.....	29
Revisão teórica	33
Capítulo I - (Manuscrito 1) Curve fitting and linearization of UV-Vis spectrophotometric measurements to estimate yeast in inoculum preparation.....	63
Capítulo II - (Manuscrito 2) Digital images coupled to PLS regression for pH prediction in sterile culture medium.....	87
Capítulo III - (Manuscrito 3) How small modifications on the parameters of the susceptibility test affect the inhibitory concentration.....	111
Capítulo IV - (Manuscrito 4) Application of digital images and machine learning to classify <i>Candida</i> species in CHROMagar.....	147
Capítulo V (Manuscrito 5) Identification and discrimination of yeasts through Biospectroscopy.....	187
Discussão Geral.....	215
Conclusão.....	223
Perspectivas.....	227
Referências.....	231

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

Infecções oportunistas oriundas de leveduras emergentes têm demonstrado grande potencial de infectividade nos últimos anos. Uma população crescente de pacientes imunossuprimidos (SIDA, transplantados e sob terapia com imunossupressores) resultou em diagnósticos cada vez mais frequentes de infecções fúngicas invasivas, incluindo também aquelas causadas por leveduras incomuns. Existe ainda uma predominância de infecções causadas pela *Candida albicans*, mas cada vez mais têm sido isoladas espécies de *Candida non-albicans* e outras leveduras de importância clínica como o gênero *Cryptococcus* tem emergido nas infecções invasivas (HORN et al., 2009; RUHNKE, 2006; LAMOTH et al., 2018).

Espécies de *Candida* são patógenos oportunistas. Embora as espécies de *Candida* façam parte da microbiota regular nos tratos gastrointestinal e geniturinário, elas têm a propensão de invadir e causar doenças quando um desequilíbrio é criado em seu microambiente (MBA, NWEZE, 2020). A ocorrência de neutropenia e a ruptura das barreiras como mucosas são os principais fatores de risco para infecções disseminadas. Em um hospedeiro imunocomprometido, a translocação do trato gastrointestinal e os cateteres intravasculares são as duas principais portas de entrada para infecção disseminada por *Candida* spp..

A criptococose é uma doença sistêmica causada pelo complexo *Cryptococcus*, que são leveduras encapsuladas que podem afetar os seres humanos. Essa micose pode acometer pulmões e sistema nervoso central possuindo altas taxas de mortalidade para pacientes soropositivos (ALSPAUGH, 2015; BAHN et al., 2020). Embora as duas espécies patogênicas do complexo *Cryptococcus* mais isoladas sejam *C. neoformans* e *C. gattii*, elas diferem na progressão da infecção, hospedeiro alvo e manifestações clínicas da doença. *C. neoformans* possui uma distribuição global e é um patógeno oportunista, causando infecções majoritariamente em pacientes imunocomprometidos, além de possuir maior capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e causar um quadro de meningite criptocócica (LI et al., 2014). Já o *C. gattii* é capaz de infectar hospedeiros saudáveis e está mais relacionado com o quadro pulmonar da doença (PAPPAS, 2013).

Assim a identificação de infecções fúngicas traz à tona as duas dificuldades: se é possível de se alcançar a correta identificação e qual a susceptibilidade do

microrganismo para a escolha do melhor tratamento. Alguns estudos multicêntricos mostram que a liderança das infecções ainda é da *Candida albicans* (63-70%), seguida pela *C. glabrata* (44%), *C. tropicalis* (6%) e *C. parapsilosis* (5%) (PFALLER et al., 2007). No entanto, outro trabalho mostrou que as *C. albicans* perfazem 43,37% das identificações, ou seja 54% das demais infecções são devidas a espécies non-*albicans* (EDDOUZI et al., 2013). Esse mesmo trabalho evidenciou que a resistência a azólicos foi menor nos isolados de *C. albicans* (0.54%), e mais proeminente nos isolados de non-*albicans*: *C. tropicalis* (2.08%) e *C. glabrata* (4.28%). Outro ponto é que diferenças geográficas modificam os perfis de identificação, por exemplo no Brasil a segunda e terceira leveduras mais isoladas são *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, já em outras regiões como Austrália as identificações se concentram nos isolados de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (COLOMBO et al., 2006; CHEN et al., 2006). O conhecimento epidemiológico só é possível através de grandes estudos multicêntricos. Já as avaliações epidemiológicas são dependentes de uma identificação inequívoca das espécies envolvidas nas infecções e testes de susceptibilidade dos isolados obtidos (ARASTEHFAR et al., 2019).

Nos últimos anos ocorreu uma mudança no perfil epidemiológico, em muito devido a popularização de novas estratégias de identificação como a espectrometria de massas (MALDI-ToF) e o maior acesso a identificação através da biologia molecular. Uma vez que ensaios fenotípicos, baseados nas análises bioquímicas para identificação não são capazes de diferenciar espécies proximamente relacionadas (NEJI et al., 2017). Por conseguinte, ocorre uma busca pela utilização de ferramentas mais precisas, esse fato modificou o perfil de identificação do gênero *Candida*, causando uma alteração nas proporções anteriormente relatadas. A utilização das novas ferramentas permitiu novas classificações, a partir de uma biblioteca cada vez maior dessas metodologias.

Por outro lado, a identificação de microrganismos novos criou a dificuldade de escolha de tratamento visto que não há sugestão de tratamento para algumas espécies. Portanto se faz necessário um maior emprego da susceptibilidade fúngica para permitir dados epidemiológicos mais precisos e exatos para essas novas identificações. Um isolado recém identificado de *Candida* ou *Cryptococcus* que possua poucos relatos na literatura quanto a sua

susceptibilidade frente as principais classes de antifúngicos (Azólicos, Equinocandinas e Poliênicos) insere na clínica a dificuldade da escolha do melhor tratamento. Por conseguinte, se faz necessária a testagem da sua susceptibilidade.

Existem dificuldades na implementação de testes de suscetibilidade (antifungigrama) em muitos laboratórios de micologia ao redor do mundo (FALCI e PASQUALOTTO, 2019). Muitos são os obstáculos em adicionar à rotina micológica a prática do antifungigrama. Algumas dessas dificuldades advém da padronização das condições de crescimento do isolado purificado, outras do preparo do ensaio (meio de cultura, tampão, pH, fonte de carboidrato, temperatura de incubação, tempo de incubação etc). Há, no entanto, outros parâmetros que por apresentarem soluções corriqueiras não são tão avaliados como é o caso da preparação do inóculo, avaliação da condição ótima do crescimento do microrganismo de interesse e quais os parâmetros que propiciam a inibição no menor tempo possível. Pois só a partir de um desenvolvimento completo e robusto é possível que realizemos seu teste de inibição, uma vez que podemos ter resultados de falsas inibições quando o desenvolvimento não do microrganismo não é o satisfatório.

Em todos os laboratórios micológicos um mesmo problema os atinge que é a análise subjetiva tanto da identificação como da susceptibilidade (BORGHI et al., 2010). O subjetivismo de análise tanto de pré-aprovação como de falsos aceites e rejeições causam impactos imensuráveis à rotina micológica (MELETIADIS et al., 2000). Nas identificações a “espera de uma confirmação” pode levar a uma identificação equivocada de isolados que são altamente correlacionados bioquímica e fenotipicamente. Já nos ensaios de susceptibilidade, o subjetivismo pode ser tanto no preparo do inóculo através da comparação visual frente a um padrão de McFarland, como da inspeção visual da placa pós-ensaio (GALGANI; STEVENS, 1976). Em ambas as situações podemos aprovar inóculos e crescimentos/inibições que são falsamente verdadeiros, levando a perfis de sensibilidade ou resistência inexistentes (BORGHI et al., 2010). Além disso, a análise subjetiva do crescimento não nos permite prever que porcentagem o tratamento foi efetivo. Assim, o micologista não consegue de maneira visual atestar que a redução do crescimento foi de 40,

50 ou 60%, sendo necessário uma leitura espectrométrica para validar essa redução. As flutuações de parâmetros que são importantes para o crescimento como para suas inibições não podem ser deixadas de lado, ou não serem mensuradas em uma análise verdadeiramente quantitativa. Apenas através de medidas e sua recomendada comparação é que se torna possível a estimação dos seus efeitos.

Os erros, inseridos pelo subjetivismo, são vieses incorporados às análises da rotina micológica como a identificação e a susceptibilidade e impactam modificando os resultados (ARASTEHFAR et al., 2019b; PENCE et al., 2014). Assim, se as observações analisadas possuem viés anexado ao seu resultado ou são compostas de um pré-subjetivismo de aprovação, seja para sua identificação ou resistência a determinado fármaco esse resultado poderá estar comprometido.

Cientistas e pesquisadores coletam seus dados baseados em observações de seus experimentos e esses devem seguir práticas para que seja possível garantir os seus achados (EGLI et al., 2020). Nessa abordagem observacional, os cientistas são observadores do produto de determinado processo. Na etapa seguinte os observadores registram suas observações da mesma maneira como Charles Darwin fez a bordo do navio *Beagle*, que foi essencial para que ele tecesse sua teoria sobre a origem das espécies. No caso referido não houve controle do ambiente ou qualquer evento que influenciasse as medidas. No entanto, relações de causa-efeito podem ser obscurecidas devido à alta variabilidade intrínseca dos múltiplos processos que estão sendo deflagrados e não controlados. Além da natureza multifatorial dos processos que envolvem crescimento ou inibições de microrganismos. Portanto, podemos dizer que a abordagem observacional é passiva e não sofre intervenções do observador.

Por outro lado, abordagens observacionais clássicas como planos de controle, amostragem, gráficos controle e estudos de capacidade dos processos mensuram a efetividade e eficiência de determinado processo. Logo, possuir métricas para identificar fontes de variabilidade como fluxogramas de processo e diagramas de espinha de peixe, permitem ao observador esse vislumbre (EGLI et al., 2020). As ferramentas enunciadas têm natureza passiva, não permitindo ao observador qualquer tipo de controle do ambiente

experimental ou de parâmetros críticos do processo. Então, essas ferramentas não conseguem descrever ou apontar relações causa-efeito diretamente. A única maneira de encontrar essas relações entre parâmetros é conduzindo experimentos de natureza controlada. Diferentemente da abordagem observacional, a coleta de dados através de experimentos é de natureza ativa. Assim, os cientistas controlam o ambiente e os parâmetros críticos do processo. São esses controles que permitem ao cientista, através de mudanças controladas, trazer à tona os parâmetros chaves que alteram a causa-efeito e então correlacionar suas observações com as mudanças praticadas.

Existem três formas para que os cientistas conduzam um experimento controlado: método do acerto e erro, um fator por vez (OFAT, *one-factor-at-time*) e múltiplos fatores por vez (FISHER, 1925). A humanidade durante a sua história tem utilizado as duas primeiras opções até mesmo de forma intuitiva nas suas vidas. Os experimentos baseados no método de acerto e erro são experimentos absolutos, já os experimentos OFAT são de natureza comparativa, e ambos fazem parte do método científico ao longo dos séculos que ele se provou importante.

Desde a década de 20 do século passado, através dos ensinamentos de Ronald A. Fisher, sabemos como conduzir experimentos utilizando vários fatores por vez (FISHER, 1925). Fisher foi proeminente matemático e estatístico que desenvolveu suas metodologias na estação de agricultura de Rothamsted na Inglaterra a partir de 1919. Escreveu seu primeiro artigo em 1926 e seu primeiro livro em 1925 (*The Design of Experiments* esse que ainda é um dos livros mais vendidos e lidos do mundo) (FISHER, 1925; FISHER, 1935). Com esse conhecimento podemos conduzir comparações com mais de um fator e controlar variáveis que são importantes para se realizar um ensaio. São esses conhecimentos que permitem que se trabalhe com maior número de variáveis e é a natureza multifatorial dos processos e, principalmente, do campo da microbiologia que se faz um campo fértil para sua aplicação.

Por esses muitos motivos é que a microbiologia, especialmente na sub-área da micologia é que se faz imperativo o emprego de ferramentas estatísticas multivariadas para conhecer o impacto de diferentes parâmetros nos resultados obtidos. Diante dessas hipóteses, classificações e calibrações multivariadas são

ferramentas que podem auxiliar os analistas micológicos em sua rotina. Propomos, portanto, nesse estudo a investigação de novas alternativas para a classificação de fungos de importância médica e de ferramentas que auxiliem em importantes parâmetros para os ensaios de susceptibilidade.

OBJETIVOS

Diante da necessidade e importância da identificação de leveduras de importância clínica, bem como o controle de parâmetros importantes para a realização da susceptibilidade fúngica, este estudo propõe alternativas para a identificação e classificação de leveduras de importância clínica em associação com ferramentas quimiométricas. Também propõe a avaliação de parâmetros que influenciam diretamente a realização de ensaios de susceptibilidade (preparação de inóculo e pH) através de linearizações matemáticas de estimação de leveduras por mL e do emprego de calibração multivariada para avaliação do pH em microvolumes através de imagens digitais. Além disso, estuda a interação de fatores que modificam o crescimento e a susceptibilidade como temperatura, pH, inóculo, e glicose através de um delineamento experimental.

Os objetivos específicos incluem:

- 1) Encontrar uma técnica significativamente mais precisa e exata para estimações de inóculo que possibilitem preparos de inóculos mais precisos e assim menores variações em técnicas que dependam de inóculos líquidos (Capítulo I);
- 2) Propor uma metodologia através da calibração multivariada de imagens digitais para a realização de medidas de pH sem contato com amostra. Dessa forma permitindo a mensuração de pH sem a quebra de esterilidade e em microvolumes (Capítulo II);
- 3) Estimar o efeito de fatores importantes para o crescimento e inibição de leveduras do gênero *Candida* através do uso de delineamento experimental a fim de encontrar interações que modifiquem tanto o crescimento como a inibição (Capítulo III);
- 4) Propor uma técnica de identificação do gênero *Candida* através do emprego de meio cromogênico e a associação com ferramentas quimiométricas a fim de classificar diferentes espécies de *Candida* por meio de imagens digitais obtidas de um scanner de mesa (Capítulo IV);
- 5) Viabilizar uma técnica utilizado a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para a diferenciação e classificação de diferentes espécies de leveduras de importância clínica nos dois maiores gêneros de leveduras *Cryptococcus* e *Candida* (Capítulo V);

REVISÃO TEÓRICA

Estatística e Microbiologia

A palavra estatística é derivada da palavra latina “status” ou da palavra italiana “statista”, e o significado dessas palavras é “estado político” ou “governo”. Um dos usos mais famosos da palavra estatista foi feito no drama de Shakespeare, Hamlet publicado em 1602. A aplicação da estatística era limitada, governantes e reis a requisitavam pois precisavam de informações sobre terras, agricultura, comércio, populações de seus estados para avaliar seu potencial militar, sua riqueza, impostos e outros aspectos do governo. Há uma grande lacuna entre as estatísticas antigas e as estatísticas modernas, mas muito do conhecimento adquirido são utilizados modernamente.

As publicações de Francis Galton no final do século XIX despertaram o interesse de muitos matemáticos, o que levou a criação do laboratório e revista científica Biometrika. Fazendo de Karl Pearson o fundador da estatística matemática a partir de dados de biometria (biologia antropométrica). No início do século XX, William S. Gosset desenvolveu os métodos para tomada de decisão com base em pequenos conjuntos de dados. Gosset hipotetizou que havia duas maneiras de sobrescrever as incertezas de medição em pequenos conjuntos de dados. A partir disso, Gosset precisava mensurar os índices de açúcar (lote a lote) para manter os níveis alcoólicos em uniformidade da cerveja Guinness (STUDENT, 1904). Na sequência, criou uma distribuição estatística para a utilização em pequenos conjuntos amostrais, assim surgiu o “teste T de Student” (STUDENT, 1908) o que permitiu eliminar o viés das suas medidas através de medidas repetidas (replicatas). O trabalho de Karl Pearson foi essencial para o estudo da variação biológica como o ajuste de curvas (*Curve-fitting*) e testes de medidas desses ajustes (*Goodness-of-fit tests*) (HARDY et al., 2002).

A primeira aplicação microbiológica da distribuição de *Student* foi a contagem e estimação de leveduras através de hemocitômetros (STUDENT, 1907). Onde Gosset faz o cálculo do erro associado das contagens através da sua nova distribuição, prevendo e estimando quantas leveduras (partículas) estariam presentes em cada área (quadrantes) por expansão binomial. No entanto, um estudo anterior também encontrou valores corrigidos através do

número de células sob a expressão (\sqrt{n}) o que se mostrou bastante vantajoso para estimar o erro da média (LYON e THOMA, 1881). Assim Gosset confirmou os dados anteriormente evidenciados mostrando que se adequam a uma distribuição de Poisson e seguem uma distribuição padrão de erro igual a raiz quadrada do número de células. Logo, por melhor que seja a contagem de células, existe um erro inerente a sua variação caótica (erro aleatório) em torno de 7%.

Outro estatístico que levou seus conhecimentos para a área microbiológica foi Sir Ronald Fischer. Além dos seus famosos artigos onde analisou os dados registrados ao longo de muitos anos e, em 1921, publicou *Studies in Crop Variation*. Também originou a primeira aplicação da análise de variância (ANOVA) (FISHER, 1921). Na sequência o livro que o fez conhecido pela sua contribuição *Statistical Methods for Research Workers* (FISHER, 1925). Nesse livro ele faz um apanhado, sem matemática avançada, sobre tópicos intimamente associados com a biologia. Um dos seus artigos que traça um perfil sobre as dificuldades na microbiologia onde a precisão do método de plaqueamento para populações bacterianas (FISHER; THORNTON; MACKENZIE, 1922). Nesse trabalho, os autores sugerem que contagens bacterianas devem ser realizadas através de diluições, e compara o trabalho dele com o publicado por *Student* anteriormente (STUDENT, 1907). Contudo, o grande feito do trabalho foram as contagens paralelas de placas e o cálculo da variância e sua explicação que deriva da heterogeneidade de crescimento de determinados microrganismos.

De maneira geral, o uso de métodos estatísticos na microbiologia se faz pela razão de que existe uma tendência de que os problemas microbiológicos sejam descritos através de estatística. Outro ponto é que a estatística concede poder de informação que consta no conjunto de dados analisado. Por exemplo, a partir de um experimento de dois fatores como pH e temperatura e sua influência no desenvolvimento de um microrganismo, os métodos estatísticos concedem a possibilidade de estudar a influência de todos os fatores com interação a partir de um desenho delineado.

Ensaio de preparação de inóculo

A preparação de inóculos é etapa crucial para o desenvolvimento de testes de sensibilidade antifúngica. É uma etapa que possui singularidades de acordo com a diretriz seguida pelo laboratório de micologia: CLSI ou EUCAST (CLSI, 2008; EUCAST, 2017). Na diretriz orientada pela CLSI as contagens podem ser obtidas através do padrão de turbidez (0,5 de McFarland), onde se estima que hajam de 1 a 5 milhões de células por mL de suspensão. Contudo, o mesmo padrão afirma que uma transmitância de 85% da luz é representativa desse provável número de células. Por outro lado, a CLSI traz em seu documento que a transmitância recomendada é de 72 a 80%, e após a sua devida diluição uma contagem de 500 a 2500 células por mL estejam presentes. Enquanto que a EUCAST usa como parâmetros tanto o padrão de McFarland, como a leitura por absorbância (0,12 a 0,15 unidades), o que representaria algo também na mesma densidade celular de 1 a 5 milhões de células. Com menores diluições o protocolo da EUCAST prevê números de células de 1 a 5×10^5 células por mL. Assim maiores quantidades de células estão disponíveis para serem inibidas em cada poço da microplaca ensaiada.

Em ambas as diretrizes, CLSI e EUCAST, há uma importante variância no provável número de células (CLSI, 2008; EUCAST, 2017). Ou seja, há importante variância dentro do protocolo onde pode ocorrer uma diferença de até 5x o número de células a serem diluídas na próxima etapa dependendo do protocolo utilizado. Portanto, qualquer valor entre 1 milhão e 5 milhões de blastoconídeos é aceito para que o teste de susceptibilidade seja realizado. Quando comparamos inter-protocolos e suas recomendações, há sugestões diferentes para se chegar ao número provável de células por mililitro de dispersão. Seja por comparação com o padrão de turbidez, seja por transmitância ou absorbância, há relativa diferença entre estimativas nas densidades celulares. Além do mais, a grande variabilidade que ocorre nessa entrada de células no ensaio pode ser a razão pela qual os protocolos admitem duas diluições de variabilidade no resultado como aceitáveis.

Poucos trabalhos sugerem uma concordância entre resultados tendo como variabilidade uma diluição em torno do resultado (DANNAOUI e ESPINEL-INGROFF, 2019). A maioria dos trabalhos sugerem duas diluições como

variação aceitável, porém esse aceite de variação pode trocar a interpretação do resultado de sensível para resistente dependendo da concentração obtida (PFALLER et al., 2013; SIMOR et al., 1997). Na questão levantada, imaginemos que a média do nosso inóculo seja 3 milhões de células com desvio padrão de 1 milhão, assim há 95% de chance que nosso inóculo esteja entre 1 e 5 milhões. Duas diluições representam quatro vezes a concentração do antifúngico em questão, e a massa de células a ser inibida pode ser até cinco vezes maior ou menor do que a estimada (SMITH e KIRBY, 2018). Novas estratégias de concordância têm sido propostas a fim de que as duas diluições cada vez menos tenham impacto na clínica (PELLATON et al., 2022).

O inóculo possui papel essencial na modificação no teste de susceptibilidade, e devido a esse proeminente efeito foi denominado de *inoculum effect* para determinados antimicrobianos. Muitos trabalhos, ao longo dos anos, estudaram e avaliaram o impacto da modificação da densidade celular nos resultados de susceptibilidades fúngicas (azólicos) e bacterianas (beta-lactamas) (SMITH e KIRBY, 2018; SALAS et al., 2020; GEHRT et al., 1995; LOFFREDO et al., 2021; SORIANO et al., 1990; CARVAJAL et al., 2020; RINCON et al., 2021). No caso de bactérias, pequenas variações dentro do intervalo preconizado pela CLSI permitiram mudanças de até oito vezes na concentração de susceptibilidade, chamando a atenção para que pequenas variações no preparo do inóculo modifiquem grandemente o resultado da susceptibilidade (SMITH e KIRBY, 2018).

Trabalhos ao longo dos anos tem comparado diferentes técnicas de preparo de inóculos e seus impactos na reprodutibilidade do preparo de dispersões de células (PFALLER et al., 1988; ESPINEL-INGROFF e KERKERING, 1991; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2003). Os estudos concordam que a metodologia que permite maior confiança em estimar número de células é através do emprego do espectrofotômetro. Mesmo trabalhos mais recentes apontam baixo índice de concordância entre pontos de corte epidemiológico como valores em torno de 67% (PELLATON et al., 2022). E os prováveis parâmetros que influenciem essa baixa concordância seja a variabilidade do inóculo e as técnicas de medida da susceptibilidade.

O tamanho do inóculo (através do efeito do inóculo) pode modificar o resultado da susceptibilidade, podendo mostrar resultados mais sensíveis ou mais resistentes de acordo com o microrganismo estudado e sua distribuição (CUENCA-ESTRELLA et al., 2001). Se levamos em conta que diferentes leveduras possuem tamanhos diferentes, e formas igualmente díspares, podemos supor que a população microbiana em dada suspensão pode ser diferente (LAGUNAS e MORENO, 1985).

Diferentes efeitos de espalhamento de luz explicam os efeitos à nossa volta. O espalhamento Rayleigh é fenômeno que permite que vejamos o céu azul devido a interação das ondas eletromagnéticas (provenientes do sol) com os gases da nossa atmosfera (YOUNG, 1982; HORVATH, 2009). Esse espalhamento é possível, visto que as partículas em suspensão são muito menores que o comprimento de onda incidentes sobre as partículas (HORVATH, 2009). Além disso, esse é mesmo efeito que permite que vejamos o céu mais amarelado e alaranjado no nascer e no pôr-do-sol devido ao maior caminho óptico que a luz percorre em nossa atmosfera.

Através da teoria do espalhamento de luz, onde através da solução analítica para as equações de Maxwell para dispersão de ondas eletromagnéticas por partículas esféricas (*Mie scattering*), é possível se fazer a determinação de tamanho com confiabilidade e boa precisão (WEINER et al., 2001; GRAßMANN e PETERS, 2004). Já é sabido que a interação da luz (espectro de absorção UV-Vis) é bastante sensível com o tamanho das partículas envolvidas e que elas são deslocadas à região do visível (>400 nm) (BARBIR et al., 2019). Assim, alternativas têm sido mostradas para quantificar o espalhamento de luz para células sanguíneas, leite e leveduras (SMITH et al., 2012).

Assim, um mesmo padrão de turbidez pode alocar uma quantidade diferente de células, pois essas possuem tamanhos diferentes que refletem a luz de maneira desigual (GREGORY, 1985). Portanto, para uma mesma concentração de células, mas de tamanhos divergentes levarão a padrões de turbidez diversos, com sobreposições de sinais que levam a estimar concentrações maiores (BESTIC e ARNOLD, 1976). A utilização de colorímetros, turbidímetros e espectrofotômetros podem ser aplicados para a

padronização de inóculos. Contudo, uma maior precisão tem sido vista na utilização de espectrofotômetros e turbidímetros (BESTIC e ARNOLD, 1976).

Alguns trabalhos avaliaram diferentes tamanhos de inóculos e o grau de concordância entre as susceptibilidades obtidas. De maneira geral os menores inóculos possuem as melhores concordâncias, possivelmente devido à menor diferença absoluta no número de blastoconídeos ensaiados (COOK et al., 1990; ESPINEL-INGROFF et al., 1992; FROMTLING et al., 1993). Diferentes medidas já foram propostas. Algumas dessas propostas deram origem aos protocolos que hoje estão em uso pela comunidade científica e aplicados na rotina microbiológica (CUENCA-ESTRELLA et al., 2001). Contudo, devemos lembrar que o Brasil é o país que menos possui acesso para a susceptibilidade fúngica na América Latina (FALCI; PASQUALOTTO, 2019). Provavelmente, o baixo acesso ao ensaio de susceptibilidade fúngica (antifungigrama) seja a dificuldade na realização do ensaio e devido as técnicas de microdiluição se apresentarem de maneira bastante distinta do que a técnica de disco-difusão (Kirby-Bauer). A técnica de disco-difusão é bastante aplicada aos estudos qualitativos de sensibilidade antimicrobiana, devido a sua simplicidade e fácil execução. Assim, a microdiluição se apresenta como uma metodologia de mais difícil execução e com a necessidade de maior emprego de pessoal treinado e acostumado com essa técnica quantitativa.

Por fim, o preparo do inóculo com o auxílio de um espectrofotômetro, possibilita a aquisição de contagens mais precisas e, por conseguinte, com menor variabilidade. Ademais as outras técnicas comumente utilizadas como o método de Wickerman (padrão de turbidez) e contagem em câmara como Neubauer possuem maior variabilidade e imprecisão na estimativa de inóculos. Essas estratégias clássicas podem levar a ensaios com baixas taxas de concordância através do aumento das inconsistências devido ao aumento dos erros intra e interlaboratoriais.

pH e o impacto na micologia

A definição de pH de uma solução é o logaritmo negativo da atividade do íon hidrogênio na água. Ao assumirmos que no interior de uma levedura é uma

solução aquosa podemos estimar a quantidade de prótons livres no seu interior. Assim, em uma única célula, no pH 7, temos cerca de 3000 prótons livres (ORIJ et al., 2009). O pH influencia a ocorrência e a distribuição dos microrganismos. Sendo assim, o pH é um dos parâmetros que mais afeta o desenvolvimento de leveduras (ORIJ et al., 2011). O pH descreve a atividade química dos prótons, logo, é uma peça-chave nas reações redox, dissolução de minerais, complexações e outras reações. Pode modificar o metabolismo, sinalizar a síntese e transporte de aminoácidos, bem como sofrer com a modificação abrupta do potencial hidrogeniônico (PEÑA et al., 2015; JIN; KIRK, 2018). Além disso, um metabolismo diferenciado pode propiciar capacidades tamponantes diversas, visto que os resíduos de aminoácidos presentes no microrganismo podem atuar como tampões biológicos.

Ao longo dos anos, vários trabalhos têm mostrado o impacto do pH em diferentes etapas da micologia (FERREIRA et al., 2006; PEÑA et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2014; DANBY et al., 2012). Entre as etapas mais importantes na rotina micológica estão o crescimento e inibição do microrganismo. Além desses dois mais triviais, ensaios de filamentação e diferenciação celulares também fazem uso da modificação do pH para atingir suas finalidades. No caso das infecções por *Candida* spp. uma das maneiras de acessarmos a diferenciação celular através da formação de pseudo-hifas e biofilme é pela troca do pH (FERREIRA et al., 2006).

Delineamentos experimentais variando diversos fatores que impactam na susceptibilidade ao mesmo tempo são raros na micologia (RAMBALI et al., 2001). No trabalho de RAMBALI e colaboradores (2001) dez fatores foram avaliados em um planejamento fatorial fracionário frente a oito isolados de *Candida* spp. e seis isolados de fungo filamentosos. Como principais achados, os autores apontaram que a temperatura de incubação, o tempo de incubação, o tamanho do inóculo e a concentração de glicose afetaram significativamente a obtenção da concentração inibitória. Embora os autores não tenham testado diferenças no pH, ainda assim foi visto que as densidades ópticas dos controles de crescimento foram positivamente afetadas pela concentração de glicose e tempo de incubação.

Alguns trabalhos avaliam o impacto da modificação do pH no ensaio de susceptibilidade (DANBY et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2014; SOBEL e AKINS, 2022; LIU et al., 2011). De forma geral os achados encontram menor susceptibilidade quando os testes são realizados em pH mais ácidos. Parece que os azólicos tem maior propensão a apresentar esse comportamento de menor efetividade quando em pH mais baixo, algumas espécies também mostraram menor susceptibilidade à anfotericina B (LIU et al., 2011; DANBY et al., 2012). O mesmo perfil de menor susceptibilidade ao fluconazol também foi reportado por VASCONCELLOS e colaboradores (2014).

O comportamento de células sésseis (biofilmes) de *Candida albicans* foi diferente quando o pH do meio de cultura foi reduzido, em sua maioria maiores contagens de biofilme foram vistas (VASCONCELLOS et al., 2014). Comportamento diferente foi visto para *Candida tropicalis* quando o pH foi reduzido, além disso maiores potenciais de invasão de epitélio e colonização foram vistos em pHs neutros e alcalinos (FERREIRA et al., 2016). Assim, alguns autores indicam que a susceptibilidade seja realizada em pHs semelhantes ao tecido ou local onde foram isolados os microrganismos, pois dessa maneira a susceptibilidade seria concordante com o ambiente de infecção da levedura (LIU et al., 2011; SOBEL; AKINS, 2022).

O comportamento das leveduras de importância clínica, principalmente do gênero *Candida*, quando a sua transição entre forma unicelular para sua forma filamentosa (pseudo-hifa) é referida como morfogênese. A *C. albicans* possui a característica de responder ao ambiente modificando a sua morfologia de acordo com a modificação dos parâmetros da cultura. Seja pela modificação da temperatura, efeito da mudança no meio de cultura como a presença de albumina ou a troca do pH, as leveduras buscam se adaptar. Assim, estudos que avaliem os parâmetros de indução são relevantes para a compreensão da interação entre microrganismo e hospedeiro (DU; HUANG, 2016; BENSON et al., 2004; VYLKOVA et al., 2011). Transições fenotípicas também podem ocorrer devido as adaptações da levedura aos diferentes pHs do meio de cultura. Essas adaptações incluem modificações que permitem a reprodução sexual do gênero *Candida*, o que concede maior diversidade genética, no entanto tem alto preço energético (DU; HUANG, 2016).

A análise do pH intracelular (pH_i) pode ser uma estratégia de medida que pode ser aplicada em culturas micológicas líquidas. O pH pode influenciar a fisiologia celular, e o pH_i responde homeostaticamente às modificações no pH extracelular (pH_e) (ORIJ et al., 2011; MICHL et al., 2019). Esse acoplamento surge porque as proteínas que regulam o pH_i também são sensíveis ao pH_e, e um reequilíbrio dos fluxos ácido-base transmembrana altera o pH_i no estado estacionário. Contudo a maioria das medidas realizadas para a obtenção do sinal de pH_i são através de sondas fluorescentes. Portanto, a avaliação do pH de maneira rápida e fácil nos concede conhecimento sobre parte do metabolismo celular envolvido nas leveduras e a modificação que o meio de cultura sofre ao longo do crescimento. Outro ponto é que o ajuste fino e maior controle do pH de meios de cultura quanto ao quesito pH permite maior precisão, reprodutibilidade de ensaios (MICHL et al., 2019).

O gênero *Candida* faz parte da classe fúngica mais importante em humanos, com a possibilidade de causar infecções em quase todos os locais do corpo. Sua capacidade de adaptação morfológica se mostra crucial para a virulência do gênero porque concede ao microrganismo a habilidade de invadir tecidos no hospedeiro. A modificação do pH pelo microrganismo, através da liberação de amônia, tem a finalidade de induzir mudanças em sua estrutura e morfologia e condicionar sua estruturação. Assim o monitoramento do pH extracelular nos revela mecanismos de interação espécie-hospedeiro que são críticas para sua patogenicidade (VYLKOVA et al., 2011).

Fatores que modificam o crescimento e inibição

Vários são os fatores que modificam a multiplicação e a inibição dos microrganismos. Entre os mais estudados temos fontes de carbono (assimilação e fermentação), pH, tamanho do inóculo, temperatura, micronutrientes entre outros. Desde a criação da CLSI no início dos anos 90, e posterior criação das primeiras diretrizes dos ensaios de susceptibilidade, muitos foram os estudos que mostraram os impactos dos diferentes fatores no crescimento, e principalmente, na inibição das leveduras de importância médica.

De maneira geral esses fatores sempre foram estudados um de cada vez, na conhecida estratégia OFAT de pesquisa. No entanto, essa abordagem não permite que o cientista compreenda como as interações entre os fatores modificam a resposta analisada, no caso, crescimento e inibição. Avaliar o impacto dessas variações em conjunto pode ajudar o micologista a responder quais modificações são mais bem toleradas e quais parâmetros devemos ter mais cuidado no teste de sensibilidade antifúngica, pois crescimentos mais abundantes levam a inibições mais fáceis de interpretar. Portanto, um desenho experimental (DoE) é necessário para avaliar a probabilidade de interações no crescimento dos organismos e teste de susceptibilidade (de SOUSA et al., 2020). Assim, a busca pela robustez evita que a falta de crescimento ou o crescimento subótimo levem a dificuldades na obtenção do resultado da sensibilidade antifúngica.

No nosso conhecimento, poucos são os manuscritos que investigaram os efeitos das interações nas inibições dos antifúngicos. Rambali e colaboradores (2001) utilizaram um delineamento fatorial fracionário e obtiveram o perfil de interação para a inibição de itraconazol (RAMBALI et al., 2001). E Bartizal & Odds (2003) que avaliaram as influências para a resposta inibitória da caspofungina (BARTIZAL & ODDS, 2003). Assim, os dados são escassos e possuem influências para fármacos amplamente utilizados como fluconazol e anfotericina b são desconhecidas.

Identificação de leveduras de importância clínica

O diagnóstico de leveduras de importância clínica é requerido para determinar a etiologia da doença, detectar a infecção nosocomial ou para prever uma possível resistência ao tratamento. É sabido que as infecções oportunistas acometem grande número de imunossuprimidos. Mesmo o Brasil sendo o sexto país em população no mundo, é o segundo em transplantes de fígado e rim no mundo. Dessa forma, qualifica o país como um dos maiores em números de pacientes imunocomprometidos no mundo (ORGAN, 2016).

Outro ponto é que panoramas da micologia no Brasil apontam para uma heterogeneidade de laboratórios capazes de fazer antifungigrama (FALCI;

PASQUALOTTO, 2019). Comparativamente, somos o país da América Latina que mais possui laboratórios que realizam micologia em suas dependências, no entanto, também somos o país que mais possuem hospitais não realizam antifungograma e identificação micológica (FALCI; PASQUALOTTO, 2019). Esse referido estudo mostra que a identificação fúngica no Brasil é significativamente menor, apresentando reduzido potencial de identificar fungos em nível de espécie, utilizando majoritariamente métodos automatizados para tal.

O diagnóstico de infecções fúngicas, principalmente as causadas por leveduras, tem como principal teste no laboratório a cultura fúngica, pois ela permite um aumento considerável de sensibilidade a nível de gênero e espécie, o que concede prévio conhecimento para o antifungograma (QUATRIN et al., 2021). O meio de cultura mais utilizado é o ágar Sabouraud dextrose (ASD), outras alternativas podem ser sugeridas, mas de maneira geral o meio escolhido é o ASD. Meios especializados adicionais, como ágar cromogênico, permitem a separação de colônias de aparência semelhante em culturas com crescimento misto de mais de um gênero ou espécie de levedura e a identificação direta de algumas espécies de *Candida* (MERLINO et al., 1998). O diagnóstico errado de uma infecção mista é de particular importância, especialmente se o gênero e espécie de levedura encontrado for resistente ao antifúngico em uso. O meio cromogênico tem especial utilidade como meio de isolamento, pois permite uma diferenciação na cultura pela sua cor, o que auxilia em uma identificação presuntiva do isolado testado e tem importância pois ajuda no pré-conhecimento no teste de sensibilidade.

Outra ferramenta essencial em qualquer laboratório micológico é o microscópio, é através dele que o exame direto concede as primeiras informações acerca do provável agente etiológico. Contudo, maior poder é possível quando correlacionamos a cultura fúngica com o exame direto, por providenciar que mais um teste com sensibilidade e especificidade distintas sejam utilizados (QUATRIN et al., 2020). No entanto, a microscopia por si só não consegue determinar a causa específica da infecção, ela pode direcionar a pesquisa com o incremento de colorações e marcadores. Um dos exemplos de sua maior sensibilidade é a utilização de provas fluorescentes como o banco de calcofluor que se liga a quitina presente na parede celular fúngica. Dessa

maneira, cria-se um facilitador para escanear as amostras em busca de estruturas fúngicas, melhorando a avaliação da morfologia e busca de agentes etiológicos (CLANCY; NGUYEN, 2019).

O método fenotípico clássico teve sua descrição nos anos 40, onde a partir da assimilação e fermentação de diferentes fontes de carbono (carboidratos) e nitrogênio (como KNO_3), auxiliaram na identificação de leveduras (WICKERHAM; BURTON, 1948). Apesar de ser uma metodologia simples é bastante trabalhosa, pois envolve um grande número de etapas para sua preparação. Sendo inapropriada para uma rotina laboratorial intensa visto que se perderia muito tempo na preparação dos meios. Logo, seria um padrão ouro de identificação das infecções por *Candida* bastante inapropriado e pouco prático para quem utiliza.

Uma modificação da técnica de Wickerham, usando indicadores de pH e tubos de vidro permitiram o auxanograma, dessa forma tornou mais eficiente os testes, visto que era possível testar vários substratos em uma placa de ágar ao invés de múltiplos tubos (LAND et al., 1975). Consequentemente, se ganhava tempo com tal modificação, já que a adição de ágar facilitou a visualização, sendo mais fácil identificar a mudança de cor do que um grau de turbidez. Na sequência foi realizada a troca de indicadores que inibiam crescimentos e aumentavam as quantidades de bases nitrogenadas (MICKELSEN et al., 1977). Essa série de mudanças permitiu as miniaturizações desses melhoramentos e assim a comercialização de *kit's* primeiramente mais manuais em sua leitura e nos momentos seguintes automatizados, figura 1.

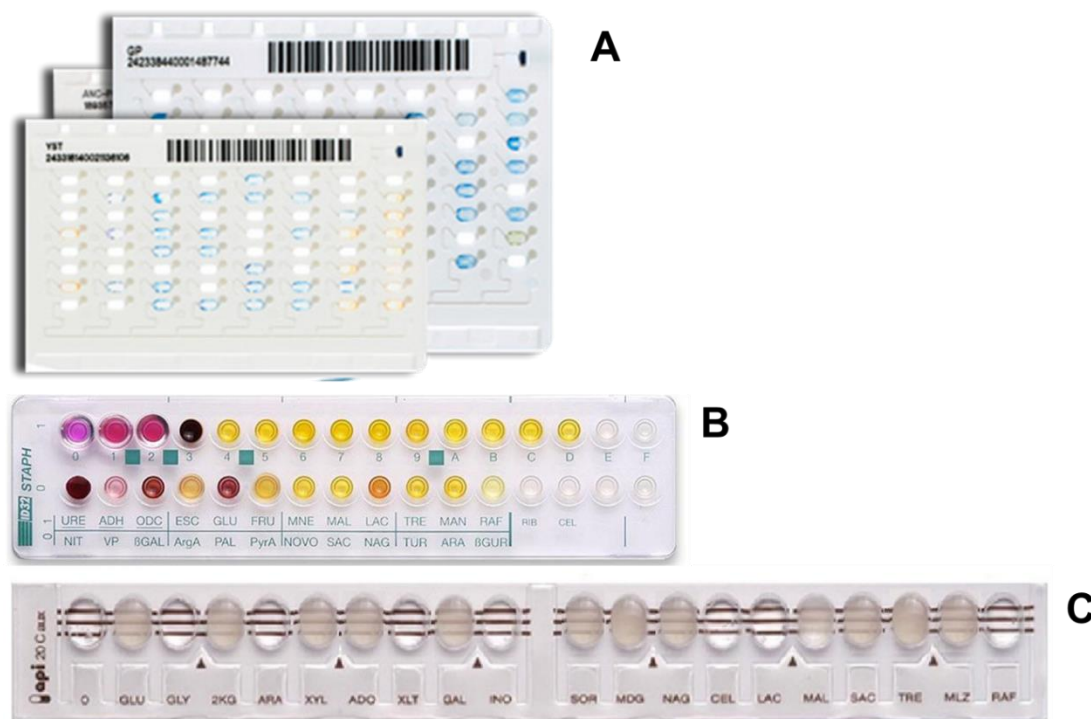


Figura 1. Kit's de miniaturização das técnicas clássicas, (A) Vitek®, (B) ATB ID32C®, (C) API 20C AUX®.

Exemplos desses sistemas são o API 20C®, o ATB ID32C® e o VITEK YBC®, que como características possuem a miniaturização da técnica clássica. O API 20C® é uma tira contendo 20 testes bioquímicos os quais podem ser comparados com os resultados liberados pelo fabricante. Já no ATB ID32C® é disponibilizado um cartão com 32 poços, onde 29 são reações de assimilação, uma susceptibilidade (com cicloheximida no meio), um teste colorimétrico (esculina), e um controle negativo. No entanto, o comparativo de ambos os sistemas contra cepas comuns e raras obtidas da clínica, mostra que o API 20C® classifica com mais eficiência, cerca de 90% (RAMANI et al., 1998). Resultado semelhante para a tipificação de *Candidas* foi encontrada por LIGUORI et al., (2010) com taxas de acerto de 87% para o sistema API 20C®. Já o VITEK®, consiste em 30 poços que contêm 26 poços bioquímicos e quatro controles negativos. É usado em conjunto com um sistema automatizado (sistema AutoMicrobic) que inclui um módulo de enchimento e vedação, uma incubadora e unidade de leitura, software de computador, hardware e uma impressora. Os resultados devem ser representados como um biocódigo de nove dígitos, onde depois é traduzido para uma porcentagem de identificação. O pacote de software

do sistema VITEK® combinava o biocódigo da amostra desconhecida com o que mais se assemelhava ao banco de dados. O VITEK 2 YST® contém 46 testes inclusos, sendo 25 carboidratos, sendo incubados por 18 h. Com esse cartão é possível obter resultados com uma performance de 94,8% (AUBERTINE et al., 2006).

Outras técnicas também são utilizadas como a análise da morfologia macro e microscópica. Além desses testes clássicos, existem outros métodos como a formação de tubo germinativo que foi descrito pela primeira vez na década de 60 como teste diferencial rápido. Trata-se de um teste de 2-4 h com a levedura inoculada em soro. Apesar de ser um teste simples e rápido é subjetivo, já que é necessária experiência do microbiologista a fim de que ele não confunda uma pseudo-hifa com um tubo germinativo verdadeiro. Outro ponto é que já foi descrito de espécies de *C. albicans* mutantes que não apresentavam formação de tubo germinativo (RUSTCHENKO-BULGAC; HOWARD, 1993). A presença de clamidiosporos é outro tipo de teste que pode ser realizado a fim de se procurar diferenças entre espécies, no entanto essa decorrência é mais lenta, sendo necessários alguns dias para que se obtenha o resultado. Ambos os testes descritos anteriormente fazem uso da microscopia óptica e, conseqüentemente, de um microbiologista treinado, o que dificulta sua aplicação na rotina usual. Em vista disso, buscou-se novas técnicas que não fizessem uso de aparelhos ou tamanha expertise.

Os testes colorimétricos, fluorimétricos e enzimáticos tiveram sua vez na detecção de *Candidas* com mais sensibilidade e especificidade que os anteriores, mais ainda assim, com algum número de falso-positivos. Em vista disso se apostou na prova da coagulase, no uso de meios diferenciais, crescimentos em temperatura ambiente (25° C) ou sob altas temperaturas (45° C) buscando alterações fenotípicas (NEJAD et al., 2015; MARINHO et al., 2010). No entanto, mesmo sendo um conjunto de técnicas simples e de baixo custo, tanto para seu preparo como para sua execução, são procedimentos que consomem muito tempo a fim de se obter um resultado. E muitos desses resultados são presuntivos e não conseguem discriminar de forma eficiente entre espécies correlacionadas dentro dos achados fenotípicos.

Outras técnicas que não utilizam culturas também têm crescido em uso, como é o caso dos testes sorológicos. Esses testes são material de escolha dada a sua praticidade de execução e velocidade em obter um resultado. As técnicas baseadas em anticorpos são fundamentais na detecção de antígenos circulantes em diferentes fluidos corporais. Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) detectam o antígeno manana (presente na exposição à *Candida*) e estão disponíveis comercialmente (Platelia, antígeno Candida, Bio-Rad, França) para candidíase invasiva, usando como matriz. Além disso, pode ser utilizado em combinação com anticorpos anti-Candida, onde mostrou uma sensibilidade (83%) e especificidade (86%) adequadas (MIKULSKA et al., 2010). Como ponto fraco dessa estratégia é que diferentes espécies de *Candida* variam a sensibilidade, reduzindo consideravelmente para *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

A presença de marcadores como 1,3- β -d-glucana no soro pode ser utilizado como diagnóstico de algumas infecções fúngicas como *Candida*, mas não *Cryptococcus*. Como contraponto, a baixa sensibilidade demonstrada por testes que utilizam essa plataforma e esse marcador. Geralmente alcançam uma métrica de 80%, tornando o teste com pouco indicativo de infecção (KARAGEORGOPOULOS et al., 2011). Por isso, os resultados de testes utilizando 1,3- β -d-glucana devem ser avaliados cuidadosamente e interpretados conjuntamente com outros dados clínicos. Então, o achado de 1,3- β -d-glucana no soro pode ser uma ferramenta útil para diagnosticar infecções invasivas, contudo as baixas sensibilidades podem ser observadas dada a profilaxia ou o tratamento. Ainda sobre testes de antígeno, testes imunocromatográficos (LFA, *Lateral Flow Analysis*) para a detecção de *Cryptococcus* ou por aglutinação por látex apresentam métricas adequadas de identificação. O teste LFA possui alta sensibilidade (98-100%) e especificidade (97-100%) com soro, plasma, líquido cefalorraquidiano e urina e é o biomarcador recomendado para o diagnóstico de criptococose (VIDA et al., 2015).

A utilização de ferramentas moleculares tem sido empregada como alternativa de diagnóstico e identificação de leveduras direto da amostra clínica, seja ela qual for, inclusive sangue. Uma variedade de painéis está disponível entre simplex e multiplex, assim como painéis pan-fúngicos. Um dos problemas desses meios *house-made* é a falta de padronização entre as diferentes

metodologias, não permitindo comparações diretas. Numa meta-análise 54 estudos com quase 5.000 pacientes testados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) baseado em sangue, a sensibilidade e a especificidade combinadas para candidíase invasiva comprovada ou provável versus controles de risco foram de 95% e 92%, respectivamente (AVNI et al., 2010). Alguns autores sugerem a combinação de testes para que se atinjam valores maiores de sensibilidade e especificidade utilizando testes sorológicos (NGUYEN et al., 2012).

Embora as hemoculturas não tenham sensibilidade, elas ainda representam o padrão ouro de diagnóstico para candidemia e os painéis de identificação de hemocultura molecular fornecem identificação precisa e rápida de patógenos cultivados. Os resultados são obtidos com o mínimo de tempo prático em comparação com métodos convencionais como meios cromogênicos e identificação bioquímica, identificação proteômica usando MALDI-TOF MS ou ensaios de hibridização in situ de fluorescência. A análise múltipla de ácidos nucleicos acoplada ao sequenciamento metagenômico de próxima geração (NGS, *next-generation sequencing*), que analisa os ácidos nucleicos de um amplo espectro de populações mistas de microrganismos simultaneamente, é uma estratégia que pode potencialmente identificar o patógeno causador quando outras estratégias falharem e tem sido usada para diagnosticar meningite criptocócica em vários estudos (RAMACHANDRAN et al., 2018).

A identificação de leveduras, como o caso da *Candida*, através do uso do NGS é uma tarefa recorrente devido a presença dominante do fungo no trato respiratório. Para alguns pesquisadores, o fato da presença dessa levedura no trato respiratório dificulta o diagnóstico, visto que a significância clínica pode ser modificada devido a abundância relativa dos achados. Além disso, existem limitações práticas ao uso do NGS, assim como as abordagens biomoleculares existe a necessidade de um protocolo de extração ótimo, incluindo um controle de procedimentos quanto à contaminação do processo. Outro ponto que pode modificar o NGS é quanto à armazenagem de amostras anterior do teste a fim de limitar o crescimento excessivo do fungo e sua extração do ácido nucleico. Combinar esses parâmetros com amplificação por PCR eficiente (primers cuidadosamente selecionados e uma polimerase de PCR de alta fidelidade) é

fundamental, e a utilização de controles positivos e negativos e a compreensão dos vieses introduzidos ao longo do processo são essenciais ao interpretar os dados NGS (NILSSON et al., 2019). Ainda assim, estudos mais rigorosos são necessários para que essa estratégia em infecções fúngicas antes que o uso dessa tecnologia se torne generalizado.

Métodos moleculares têm sido desenvolvidos nos últimos 20 anos para a padronização da extração de DNA de fungos de importância clínica a fim de melhorar os resultados. Com o lançamento do T2Candida, um ensaio que combina reação em cadeia da polimerase (PCR) com ressonância magnética para identificar as cinco mais prevalentes infecções de *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (ZERVOU et al., 2016). No entanto, o painel em questão não consegue separar algumas espécies, possuindo três resultados: *C. albicans/C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata/C. krusei*. O T2Candida é uma metodologia que se provou rápida, precisando de menos de 5 h para seu resultado, mas com sensibilidade de 91,1% e especificidade de 99,4% a serem consolidadas (ZERVOU et al., 2016).

Outro ponto que se deve ter cuidado é o tipo de amostra a ser considerada. Leveduras obtidas de locais não estéreis do corpo (orofaringe, vias aéreas) podem trazer consigo parte da microbiota ou ser agente causador da infecção. Portanto, a macroavaliação do paciente, que inclui a consideração da história clínica e da anamnese, deve ser levada em consideração conjuntamente com os achados microbiológicos. Só dessa forma é capaz de determinar se a levedura recuperada no exame faz parte da colonização própria (microbiota) ou é o agente etiológico da infecção. Fora dessa consideração achados altamente característicos como nanquim no líquido cefalorraquidiano, que pode identificar gêneros de levedura encapsulados, como *Cryptococcus* spp. A detecção microscópica de células de levedura típicas, pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras em amostras obtidas de locais estéreis é indicativa de infecções fúngicas.

Assim, uma identificação inequívoca passa por uma série de avaliações e considerações que agregam sensibilidade e especificidade na análise. A maioria dos laboratórios criam seus protocolos de identificação para a maximização do resultado e das métricas de classificação e do tempo que se leva para obter esse relatório. Por assim dizer, temos um algoritmo decisional que leva em

consideração as técnicas utilizadas, local de isolamento, se ocorre ou não pré-concentração da amostra, possíveis contaminantes e tempo para a aquisição do sinal.

Quimiometria

O advento do computador no espaço laboratorial permitiu que os cientistas coletassem enormes quantidades de dados sobre uma ampla variedade de problemas de interesse. Com o avanço das técnicas analíticas instrumentais, o grande volume de dados pode ser gerado. Esses dados possuem um extenso número de variáveis, por exemplo, os espectros de infravermelho, espectros de ultravioleta (oriundos do espectro de varredura) e imagens digitais. Onde cada número de onda, comprimento de onda, e canais respectivamente, corresponde a uma variável. Devido a essa complexidade de dados se faz necessário a utilização de métodos estatísticos para sua análise. As técnicas multivariadas, assim, convergem como melhor escolha, visto que são capazes de encontrar padrões nos dados, classifica-los e até mesmo quantifica-los (SMITH, 2015).

Microrganismos, em especial os fungos, devido a sua natureza multicomponente, se enquadram nesta definição. Por conseguinte, a utilização da análise multivariada em associação aos métodos analíticos tem aumentado nos últimos anos devido as suas aplicabilidades (SANCHES et al., 2018; POTOCKI et al., 2019; BRADTBURD et al., 2018). Além das técnicas analíticas convencionais, técnicas aplicando imagens digitais tem recebido atenção devido à praticidade e velocidade de aquisição de dados através de *smartphones* (HELFER et al., 2018; GRASEL et al., 2016; MUTLU et al., 2017). Outro emprego da análise multivariada é na diferenciação e no reconhecimento de espécies altamente correlacionadas por diferentes técnicas espectroscópicas (POTOCKI et al., 2019; SAMPAIO et al., 2019; COSTA et al., 2016).

A análise multivariada de dados tem como finalidade básica racionalizar a informação de uma matriz complexa de dados facilitando assim a visualização de correlações entre as variáveis que dificilmente seriam verificadas mediante análise univariada. Assim, pela própria definição, a utilização deste tipo de abordagem tem como pressuposto básico um sistema complexo. A escolha

desse método e análise está diretamente relacionado ao questionamento em relação as amostras (situação problema) (SENA et al., 2002). Portanto, após a aquisição dos dados, é realizada a análise, de forma que os resultados sejam apresentados de acordo com as questões levantadas nas hipóteses. A apresentação dos resultados pode ser realizada de forma visual (reconhecimento de padrões), já na classificação de amostras ocorre a investigação se a amostra pertence ou não a uma classe pré-definida (supervisionada) (GRANATO et al., 2018, HAIR et al., 2009).

Podemos segmentar a análise multivariada entre conjunto de dados não-supervisionados e supervisionados. Dessa forma, contamos com dados que podemos explorar o reconhecimento de padrões sem que haja uma supervisão acerca dos agrupamentos ou diferenças das amostras (não-supervisionado). Ou podemos explorar a variância e formação de agrupamentos de amostras através da supervisão dessas amostras em classes ou concentrações (supervisionado) (GRANATO et al., 2018, HAIR et al., 2009).

Métodos de reconhecimentos de padrões (não-supervisionados)

Métodos não-supervisionados de reconhecimento de padrões não requerem nenhum conhecimento sobre a identificação das amostras *a priori*, uma vez que são utilizados para identificar grupos de amostras baseando-se em características comuns. Estes métodos podem, portanto, ser empregados para encontrar similaridades e diferenças entre amostras de um conjunto de dados. Enquadram-se nesta classe de métodos a análise de componentes principais (PCA), a análise de fatores (FA) e a análise de cluster (HCA), entre outros (BRERETON, 2003; HAIR et al., 2009).

A análise de componentes principais (PCA, do inglês: *Principal Component Analysis*) foi desenvolvida no início do século XX por Pearson (PEARSON, 1901), a projeção de que relacionou pontos não coplanares de uma dimensão maior ($n = 3, 4, 5...$) em um plano, utilizando-se das médias, dos desvios padrões e das correlações entre as variáveis do problema. Peason também representou geometricamente para a regressão planar e observou que a reta que mais se adequa ao conjunto de variáveis em questão está inserida no plano de

regressão. A partir de sua primeira formulação, o algoritmo da PCA foi sendo aprimorado até os dias atuais (HOTTELING, 1933; WOLD, ESBENSEN & GELADI, 1987).

A PCA possui a capacidade de separar e ampliar as informações mais relevantes do conjunto de dados, assim como evidenciar amostras atípicas (*outliers*) e também detectar relações entre amostras e variáveis. Através da PCA, a correlação significativa entre variáveis de um conjunto de dados permite que um número menor de novas variáveis seja encontrado de forma que descrevam a mesma informação presente nos dados originais. Para a redução do número de variáveis é realizada através uma compressão dos dados, combinando linearmente variáveis originais e agrupando aquelas que possuem informações semelhantes. As novas variáveis são chamadas de componentes principais (PCs – *Principal Components*), também conhecidas como autovetores. As PCs são não correlacionadas e ortogonais entre si, ou seja, cada PC possui informações distintas, sendo que a ordem de “importância” inicia com aquela que é mais representativa (PC1), oferecendo maior quantidade de informação, e assim por diante. Do ponto de vista matemático, a PCA pode ser descrita como a decomposição de uma matriz \mathbf{X} ($I \times J$), em duas matrizes, uma representando os escores (\mathbf{T}) e outra os pesos (\mathbf{L}). Os escores indicam o grau de correlação entre as amostras, já os pesos revelam as relações entre as variáveis. A matriz \mathbf{E} indica os resíduos, desvios entre as projeções e coordenadas originais.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{L}^T + \mathbf{E}$$

Um pressuposto básico para a PCA é que a escolha das matrizes \mathbf{T} e \mathbf{L} seja feita de tal forma a maximizar a variância de \mathbf{X} nas primeiras componentes, ou seja, que as componentes principais de maiores autovalores contenham a maior parte da informação relevante e que as restantes sejam apenas ruído.

A análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA, do inglês: *Hierarchical Clusters Analysis*) é, assim como a PCA, um método não-supervisionado utilizado no tratamento de dados. A HCA tem sua origem na biologia, através da taxonomia numérica, sendo um método empregado para descobrir padrões naturais de comportamento das amostras. A principal função da HCA é agrupar amostras de modo que as pertencentes ao mesmo

agrupamento (*cluster*) sejam mais semelhantes do que amostras de outros grupos. Através de uma árvore hierárquica, denominada dendrograma, é possível visualizar o grau de similaridade entre objetos.

A HCA é uma técnica aglomerativa, ou seja, considera cada amostra um único elemento, agrupando-as de forma sistemática por semelhança em um processo iterativo (procedimento que gera uma sequência de soluções aproximadas que vão melhorando conforme iterações são executadas), até que ocorra a formação de um único grupo. Na farmácia, este método é rotineiramente empregado em dados espectroscópicos, visto a redução de dimensionalidade proporcionada pelo mesmo.

A primeira etapa para a aplicação da técnica de HCA é a definição de um índice numérico para medir distância entre amostras, uma vez que a HCA utiliza a proximidade entre objetos como característica de semelhança. A distância Euclidiana é a mais comum e utilizada em situações rotineiras. Onde a distância Euclidiana entre pontos com coordenadas $A = (a_1, a_2)$ e $B = (b_1, b_2)$ no espaço multidimensional é apresentada usando o teorema de Pitágoras, onde x_{aj} e x_{bj} são valores numéricos da j -ésima coordenada de A e B, respectivamente.

$$d_{AB} = \sqrt{(x_{a1} - x_{b1})^2 + (x_{a2} - x_{b2})^2 + \dots + (x_{aj} - x_{bj})^2}$$

Quando não restar nenhum agrupamento para realizar ligação, as distâncias são padronizadas e o resultado é apresentado na forma de um dendrograma. A análise hierárquica por agrupamentos é bastante utilizada para identificação de procedência e autenticação de medicamentos, insumos, material vegetal e na microbiologia (COSTA et al., 2020; ARUMUGAM et al., 2012; UARROTA et al., 2014).

Métodos supervisionados

A análise supervisionada possibilita que amostras sejam categorizadas em diferentes classes previamente a aplicação do método (SALZER et al. 2000). Por exemplo, é possível a classificação de determinado microrganismo, diferenciação de cepas, sensibilidade do microrganismo, produção de um fator

de virulência etc. Ou seja, ao contrário dos métodos de análise exploratória, são necessários conhecimentos *a priori* sobre cada amostra. Esse grupo de amostras, cuja propriedade de interesse é conhecida, é chamada de conjunto de treinamento. A partir desse conjunto de dados é construído o modelo de classificação. Devido a isso, esse conjunto de técnicas é denominado métodos supervisionados.

Assim, é possível construir um modelo de classificação com base exclusivamente nas variáveis altamente correlacionadas com a característica qualitativa em questão. O modelo proposto depois de calibrado pode ser então avaliado usando um conjunto de amostras independentes de característica qualitativa conhecida para validar as propriedades de previsão do modelo proposto, antes de utilizá-lo em um conjunto de amostras desconhecidas. Enquadram-se nesta classe de métodos a análise do vizinho mais próximo (k-NN), soft independent modeling of class analogy (SIMCA) e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), entre outros (BRERETON, 2003; HAIR et al., 2009).

Dentro das análises supervisionadas temos algoritmos específicos para quantificar uma determinada característica (y) a partir de um conjunto de dados com essa característica conhecida (concentração de analito). A partir da calibração da matriz de dados (X) é possível, através da análise de regressão multivariada, estimar coeficientes que desenhem um modelo ajustado que permite prever as concentrações desconhecidas em um novo conjunto de dados. O modelo em questão pode ser calibrado utilizando-se a característica quantitativa conhecida (y) e sua correlação e covariância com as variáveis da matriz X (que atuarão como preditores). Na calibração multivariada o modelo proposto depois de calibrado, pode ser então avaliado mediante uso de um conjunto de amostras independentes de característica quantitativa conhecida (y) para validar as propriedades de previsão do modelo proposto, antes de utilizá-lo em um conjunto de amostras desconhecidas.

Muitos são os algoritmos que se enquadram nesta classe calibração multivariada. Onde os mais utilizados são: regressão de componentes principais (PCR), regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), regressão de mínimos

quadrados ordinários (OLS), regressão de vetores suporte (SVR) entre outros (BRERETON, 2003; HAIR et al., 2009; DUMANCAS et al., 2015).

FTIR-ATR

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared spectroscopy*) compreende a faixa de 4000 até 650 cm^{-1} , é a mais utilizada na espectroscopia de infravermelho. Assim o FTIR é uma ferramenta importante para a determinação de estruturas orgânicas e bioquímicas, principalmente após 1950, onde os equipamentos de feixe duplo adicionaram ganhos analíticos importantes.

A região de impressão digital (*fingerprint*) que está entre 650 e 1700 cm^{-1} é relevante para identificação de compostos, visto que pequenas diferenças resultam em grandes modificações nessa região do espectro de infravermelho. Portanto, devido a sua difícil interpretação raramente é possível indicar a que estrutura o referido espectro pertence. Dessa maneira, a região é importante para os métodos quimiométricos pois permite diferenciar e classificar devido a presença de bandas características de cada entidade química (SKOOG, HOLLER & CROUCH, 2017).

Outro importante ganho analítico é a possibilidade de acoplamento do acessório de refletância atenuada (ATR) o que permite maior ganho de sensibilidade dado o número de reflexões entre o laser a o cristal de deposição da amostra. O método de reflexão total atenuada (*Attenuated Total Reflectance* - ATR) é baseado na reflexão interna da radiação infravermelha. Ao entrar em contato com materiais com altos índices de refração, como o ZnSe, a radiação infravermelha é totalmente refletida internamente. Em contato com a amostra, cujo o índice de refração é menor, parte desta radiação penetra na mesma, atenuando o feixe do comprimento de onda correspondente as bandas de absorção, surgindo então o espectro (Figura 2). Esta radiação penetrante que interage com a amostra é conhecida como onda evanescente.

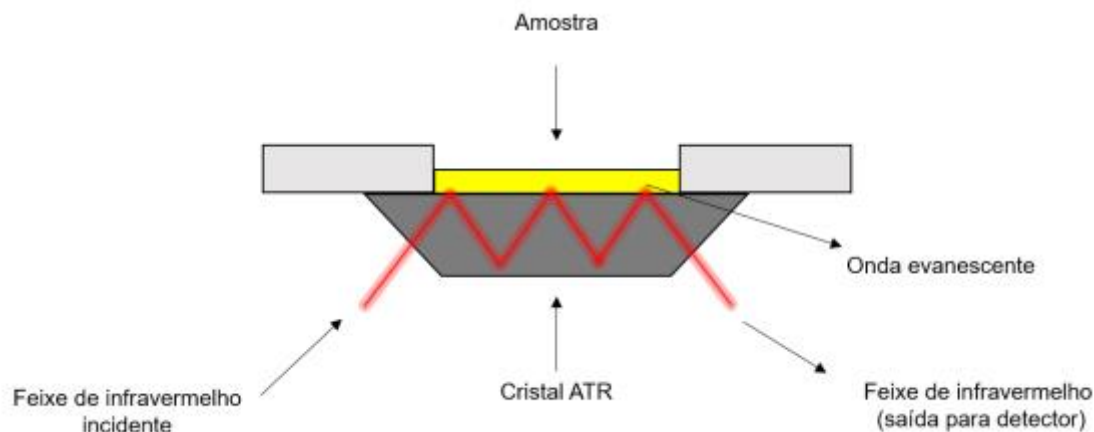


Figura 2. Representação esquemática do funcionamento do cristal de ATR ao medir uma amostra no FTIR.

A complexidade dos espectros de FTIR representa a imensa diversidade de moléculas em biomateriais como uma impressão digital altamente específica de sua composição química. Como tal, os métodos de reconhecimento de padrões são necessários para classificar os espectros de FTIR de acordo com seu espectro e similaridade ou heterogeneidade química correspondente. Dessa forma, a diversidade dentro ou entre amostras (indivíduos com parentesco taxonômico próximo ou distante) pode ser estudada, bem como as influências de fatores abióticos ou bióticos.

Imagens digitais

Imagens digitais consistem numa representação discreta de dados que processam informações espaciais e de intensidade o que costumeiramente chamamos de cor. Para uma imagem bidimensional, ou seja, em duas dimensões (2D), uma função $f(x, y)$, em que x e y são coordenadas espaciais e o valor de f , para cada par (x, y) , é denominado de intensidade de cor naquele par (GONZALES; WOODS, 2010). Assim, analogamente, uma imagem digital também pode ser descrita como uma matriz finita $A(m, n)$, em que m é seu número de linhas e n é o número de colunas. Nesta matriz, cada par (m, n) define uma célula chamada pixel (termo derivado do inglês *picture element*) e cada pixel terá um valor de intensidade ou nível de cor (GONZALES; WOODS, 2010, SOLOMON; BRECKON, 2013).

No processo de construção de uma imagem digital, como na aquisição de uma fotografia ou no escaneamento de uma imagem impressa, implica em atribuir as coordenadas espaciais (m, n) para cada pixel, num processo chamado de amostragem, e suas respectivas intensidades (quantização) (Figura 3). Isso é o que ocorre, por exemplo, quando digitalizamos uma imagem oriunda de um papel fazendo uso de um scanner (GONZALES; WOODS, 2010 SOLOMON; BRECKON, 2013).

$$A_{(m \times n)} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & . & . & . & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & . & . & . & a_{2n} \\ . & . & . & . & . & . \\ . & . & . & . & . & . \\ . & . & . & . & . & . \\ a_{m1} & a_{m2} & . & . & . & a_{mn} \end{bmatrix}$$

Figura 3. Representação de uma matriz A, com m linhas e n colunas.

Por outro lado, a quantização é dependente dos sensores usados na detecção da cor, portanto, a sensibilidade do sensor aos comprimentos de onda que incidem sobre ele é que define os vários níveis de intensidade possíveis. Por exemplo, um sensor monocromático (escala de cinza) com resolução de 8 bits para cada pixel irá quantizar 2^8 ou 256 níveis de intensidades, dos quais o primeiro e o último níveis, respectivamente, se referem ao preto e ao branco, enquanto os 254 níveis intermediários são níveis de cinza e, portanto, a escala de cinza desse sensor é quantizada em valores discretos que variam de 0 a 255 (SOLOMON; BRECKON, 2013). Da mesma maneira como foi apresentado o número de valores discretos que podem variar para o cinza, ocorre com os três principais canais no RGB (vermelho-verde- azul), sendo assim, uma matriz com os três canais conterá 768 variáveis onde as cores podem se apresentar (Figura 4).

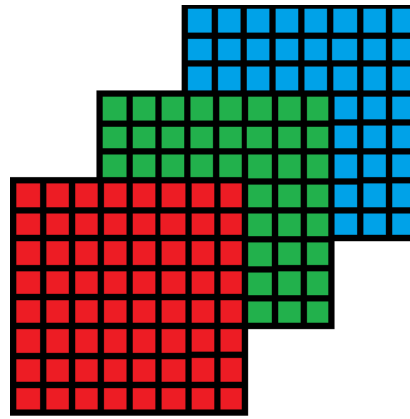


Figura 4. As três matrizes sobrepostas dos canais vermelho, verde e azul.

Apesar do uso do termo cor para se referir à amplitude da função $f(x, y)$, o uso de imagens digitais não é restrito às interações com a faixa visível do espectro eletromagnético, cobrindo praticamente todo o espectro, além de fontes acústicas, ultrassônicas e eletrônicas, embora seja comum converter sinais diversos para níveis de cinza a fim de expressá-las numa forma perceptível ao olho humano (GONZALES; WOODS, 2010).

Imagens digitais têm aplicações nas diversas áreas de atividade humana, sendo fortemente usada em medicina, onde se usam imagens de raio-X, tomografias de raios gama e de emissão de pósitrons, imagens de ultrassonografia e de ressonância magnética, mas também tem uso nas áreas da astronomia, de climatologia, aviação (com uso de radares, por exemplo), mais recentemente nas análises químicas e farmacêuticas com a ampla aplicação das espectrometrias (GONZALES; WOODS, 2010).

VISIBLE SPECTRUM

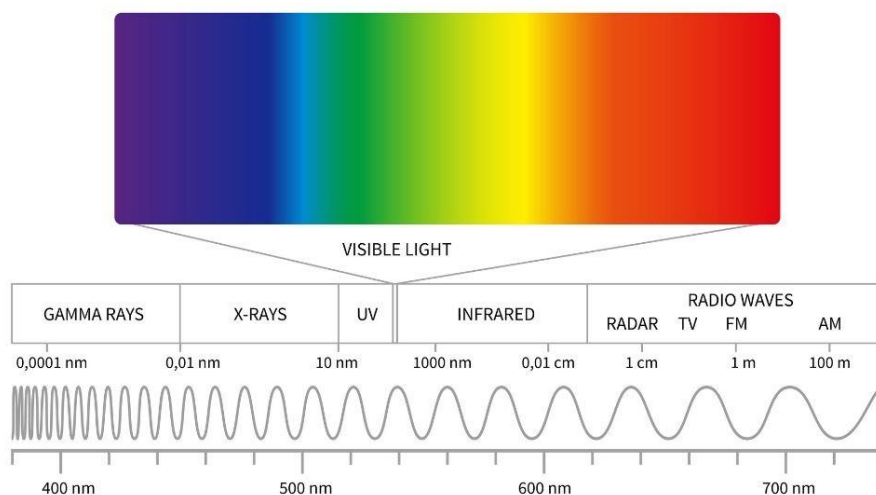


Figura 5. Espectro eletromagnético apresentando as diferentes ondas eletromagnéticas, seu comprimento de onda e no detalhe a região visível por nós humanos desse espectro eletromagnético.

É grande o número de sistemas de cores usados atualmente, sendo mais largamente usados os sistemas RGB (do inglês red, green, blue), CMY (do inglês cyan, magenta, yellow), CMYK (do inglês cyan, magenta, yellow, black) e HSI (do inglês hue, saturation, intensity), (Figura 6).

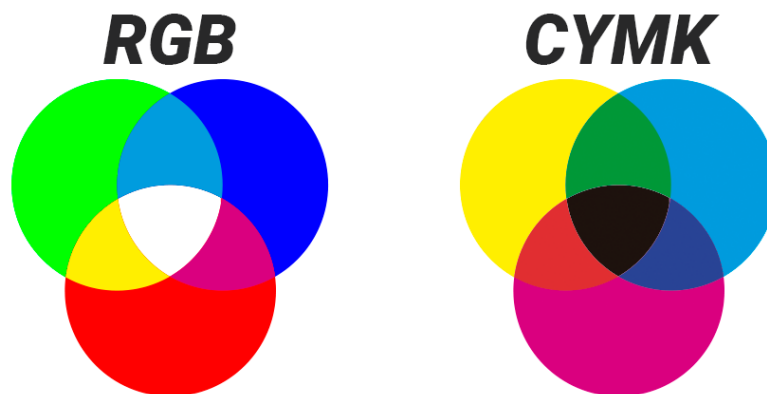


Figura 6. Os dois principais sistemas de cores utilizados na tecnologia, o RGB em nossas telas de computadores, celulares e televisões e o CMYK que é utilizado em impressoras.

Embora os cones sejam os receptores do olho humano, eles só conseguem detectar diretamente as cores vermelho, verde e azul, que devido a essa particularidade, recebem o nome de cores primárias, as demais cores são percebidas pela combinação das sensações das cores detectadas, conforme foi proposto pelo inglês Thomas Young (1773-1829) e aperfeiçoado pelo alemão Herman von Helmholtz (1821-1894), no século XIX, e que hoje é conhecida como mistura aditiva de cores e constitui o cerne do sistema de cores RGB que foi descrito anteriormente (FRASER; BANKS, 2013).

CAPÍTULO I – Curve fitting and linearization of UV-Vis spectrophotometric measurements to estimate yeast in inoculum preparation

Manuscrito publicado no periódico *Analytical Biochemistry* (3,365).

DOI: 10.1016/j.ab.2021.114216

O Capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 65 -85.

Carvalho ÂR, Genz Bazana LC, Ferrão MF, Fuentefria AM. Curve fitting and linearization of UV-Vis spectrophotometric measurements to estimate yeast in inoculum preparation. *Anal Biochem.* 2021 Jul 15;625:114216. doi: 10.1016/j.ab.2021.114216.

CAPÍTULO II – Digital images coupled to PLS regression for pH prediction in sterile culture medium

Manuscrito publicado no periódico *Biomedical Signal Processing and Control* (5,076).

DOI: 10.1016/j.bspc.2021.103435

O Capítulo 2 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 87-107.

Carvalho, Â.R., Bazana, L.C.G., Fuentefria, A.M., Ferrão, M.F. Digital images coupled to PLS regression for pH prediction in sterile culture medium. *Biomedical Signal Processing and Control*, 73, 2022, 103435. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2021.103435>

**CAPÍTULO III – Slight modifications on the parameters of the antifungal test
may impact the minimal inhibitory concentration result**

Manuscrito a ser submetido no periódico Brazilian Journal of Microbiology (2,21).

O texto completo do capítulo 3, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 113 – 146, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da avaliação dos fatores que impactam na susceptibilidade fúngica avaliados por delineamento experimental (fatorial completo).

CAPÍTULO IV – Application of digital images and chemometrics to differentiate and classify *Candida* species in CHROMagar

Manuscrito submetido no periódico Analytical and Bioanalytical Chemistry (4,48).

O texto completo do capítulo 4, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 149 – 185, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta do estudo da aplicação de classificação multivariada de imagens digitais para a classificação de leveduras do gênero *Candida* crescidas em meio cromogênico e avaliadas por scanner e transformação de imagens digitais em RGB.

**CAPÍTULO V – Identification and discrimination of yeasts through
Biospectroscopy**

Manuscrito *under review* no periódico *Yeast* (3,325).

O texto completo do capítulo 5, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 189 – 214, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta do estudo da aplicação da espectroscopia na região do infravermelho para a diferenciação e classificação de leveduras de interesse clínico como os do gênero *Candida* e *Cryptococcus*.

DISCUSSÃO GERAL

A presente tese foi desenvolvida com o intuito de oferecer ferramentas que facilitem e tornem a rotina micológica mais precisa tanto do ponto de vista de identificação como de ensaios de susceptibilidade. Reconhecidamente, as duas etapas mais importantes da micologia são: a identificação do agente causador da micose e o teste de susceptibilidade antifúngica. Contudo, apesar das diretrizes sugerirem o preparo do inóculo a partir de técnicas clássicas como o padrão de turbidez, transmitância e absorvância do espectrofotômetro a grande variabilidade de tamanho e formas das leveduras podem levar a densidades celulares díspares. Essa elevada variabilidade de células introduz no teste de susceptibilidade relativa incerteza quanto à sua precisão e exatidão na obtenção da sensibilidade fúngica.

De maneira geral os protocolos utilizados para a execução da microdiluição em caldo (CLSI, 2008; EUCAST 2017) tem como padrões de preparo de inóculo a turbidez de McFarland. A escala nefelométrica de McFarland possui padrões de 0,5 até 10 onde são os valores mais frequentes de turvação utilizados em laboratórios de microbiologia. Esses padrões apresentam prováveis dispersões aproximadas de bactérias que vão de $1,5 \times 10^8$ até 3×10^9 , contudo o tamanho médio (cerca de 1 micra) de bactérias é significativamente menor que leveduras (~5 micras), o que diferente em padrão de turbidez e número de células dispersas (WEINER et al., 2001; SMITH & CHU, 2012; PFALLER et al., 1988). Apesar da simplicidade da visualização frente a um padrão de turbidez, o método de Wickerman apresenta uma análise subjetiva no preparo de inóculos, pois pequenas alterações de turbidez apresentam grandes variações de densidades celulares (WICKERHAM & BURTON 1948; PFALLER et al., 1988). Logo, a fim de evitar uma análise subjetiva e de baixa precisão, os protocolos sugerem o emprego de turbidímetro ou espectrofotômetro como forma de automatizar e trazer para o campo analítico o preparo de inóculo (EUCAST, 2017; LAGUNAS & MORENO, 2011). No entanto, com a diferença de tamanho entre os microrganismos testados um mesmo padrão de turbidez ou transmitância pode ser responsável por uma contagem bastante distinta (WEINER et al., 2001; STUDENT, 1907). Devido a essas dificuldades, propomos em nosso trabalho a realização de uma calibração utilizando de câmara de Neubauer e leituras espectrofotométricas a fim de conhecer a real distribuição de células nas

suspensões analisadas. Porém, devido a pequena faixa de linearidade propomos o incremento da faixa através de modelos de linearização para ganhos de maiores dispersões celulares. Comparativamente, o comprimento de onda em 530 nm se saiu com melhor ajuste e sensibilidade, enquanto a linearização realizada pelo algoritmo Morgan-Mercer-Flodin (MMF) permitiu melhor ajuste da linearização. Dessa maneira nossa proposta se mostrou mais precisa obtendo $5 \pm 0.5 \times 10^6$, enquanto o padrão de turbidez, absorvância e transmitância ($1-5 \times 10^6$). Assim nossa alternativa permite reduzir a incerteza associada da concentração de células na etapa de preparação de inóculos (Capítulo I).

Um dos fatores mais impactantes para o desenvolvimento microbiano é o pH. O potencial hidrogeniônico é capaz de causar mudanças de transições fenotípicas, morfológicas, modificar o metabolismo e prover adaptações importantes nas leveduras (PEÑA et al., 2015; ORIJ et al., 2009). Além disso, o pH é um parâmetro de qualidade importante para a fabricação, manutenção e estudos de crescimento e inibição na micologia (LIGUORI et al., 2010). No entanto, determinar o pH em ambientes que requerem a manutenção da esterilidade e possuem volumes diminutos é um desafio. Assim, o presente trabalho resolveu utilizar imagens digitais para prever o pH no meio de cultura líquido utilizado no laboratório (RPMI 1640) para a microdiluição através de uma calibração multivariada. Constatou-se que as imagens digitais obtidas por meio de um *smartphone* foi uma estratégia válida para medir o pH em placas de 24 e 96 poços. Ambos os modelos PLS mostraram se interessantes, contudo o modelo feito a partir da placa de 24 poços se mostrou mais preciso, possivelmente devido ao maior conteúdo líquido e assim maior caminho óptico. Ambos os modelos propostos foram capazes de prever pHs na faixa de 5,5 a 9,5 apesar das suas particularidades de calibração. Assim, pudemos constatar que foi possível estimar o pH no RPMI 1640 através de imagens digitais. Consequentemente, uma ferramenta fácil, rápida, sem alíquotagem e sem a quebra de esterilidade permite a obtenção do pH em poços de placas de 24 e 96 poços. Dessa maneira, acreditamos que esse trabalho venha a contribuir com o conhecimento do pH e o estudo do comportamento das diferentes espécies no meio de cultura RPMI 1640 (Capítulo II).

A grande maioria dos trabalhos que avaliam as influências dos fatores no crescimento e na susceptibilidade geralmente o fazem pela metodologia OFAT (ESPINEL-INGROFF et al., 1992; DE VASCONCELLOS et al., 2014; CUENCA-ESTRELLA et al., 2001; COOK et al., 1990). Raros trabalhos utilizam uma abordagem multivariada para avaliar como os fatores em seus diferentes níveis impactam no crescimento ou na susceptibilidade de leveduras importantes clinicamente (RAMBALI et al., 2001). Além disso, com as discordâncias das duas principais diretrizes utilizadas no mundo (CLSI, 2008; EUCAST, 2017), muitas dúvidas pairam acerca de alguns parâmetros sugeridos em cada diretriz como a concentração de glicose e inóculo inicial. Sendo assim, aventamos a hipótese de trazer esses parâmetros avaliados de maneira multivariada a fim de descobrir o seu impacto no crescimento e nas concentrações inibitórias. Para isso, utilizamos um planejamento experimental fatorial completo 2^4 onde manipulamos as variáveis temperatura, glicose, inóculo e pH. Os resultados mostram que pequenas modificações nos parâmetros estudados (pH, temperatura, inóculo e glicose) podem modular o desenvolvimento e as concentrações inibitórias. A microdiluição em caldo usando uma técnica robusta para determinar as concentrações inibitórias, como foi o caso do IC_{50} , provou ser uma ferramenta essencial. Portanto, não existe uma diretriz definitiva para os testes de susceptibilidade antifúngica, nem condições para todas as leveduras, mas regiões com crescimento otimizado que permitem a obtenção de inibições adequadas. Esses achados suportam a hipótese de que os fatores devem sofrer maior controle para garantir o pH, a temperatura, a concentração de glicose e o preparo do inóculo, pois os mesmos têm impacto diferente nas concentrações inibitórias. Dessa forma, cada isolado de levedura efetivamente tem seus requisitos ideais para testes de suscetibilidade, no sentido de que alguns isolados de fungos são mais sensíveis do que outros a mudanças nas variáveis do protocolo de crescimento e susceptibilidade (Capítulo III).

A identificação micológica é fundamental para o manejo clínico. Só a partir do conhecimento da provável espécie nos casos do gênero *Candida* há segurança para uma indicação clínica de terapia antimicrobiana (NEJI et al., 2017). Isso se deve principalmente ao fato de que algumas espécies possuem reduzida susceptibilidade a classes antifúngicas, como é o caso da *C. krusei* e

C. glabrata no caso dos azólicos (DANBY et al., 2012; AVNI et al., 2010). Outro ponto, é que dados epidemiológicos apontam para um aumento substancial de isolamentos de *Candida non-albicans* ao longo dos últimos anos. Esses achados corroboram as menores susceptibilidades encontradas na clínica e a necessidade cada vez atual de identificar para a sugestão da terapia mais eficaz (AUBERTINE et al., 2006; ARASTEHFAR et al., 2019). Dada a dificuldade da identificação pelas vias clássicas (bioquímica e fenotípica) tanto pela obtenção de resultados equiparáveis, quanto pelo tempo investido para a aquisição do resultado. Assim, buscar alternativas para a identificação de leveduras de interesse clínico e que possuem perfis de resistência heterogêneo faz-se necessário. Logo, em nosso trabalho buscou utilizar imagens digitais adquiridas através de um scanner de mesa para classificar diferentes espécies de *Candida* oriundas de um meio cromogênico. Confirmamos que é possível obter métricas mais adequadas e precisas de classificação através de imagens digitais transformadas em um histograma de cores RGBHSIGray (vermelho, verde, azul, matiz, saturação, intensidade e cinza) e classificação multivariada. Diferentes arranjos de matrizes de cor foram avaliados, bem como oito algoritmos forneceram uma gama de modelos de classificação quanto a suas precisões, especificidades e sensibilidades em encontrar a classe correspondente. Nos quais, a abordagem com um alvo para os algoritmos testados se mostrou superior, assim o PLS-DA obteve as melhores métricas de classificação, enquanto a matriz com desempenho superior foi HSI. Portanto, a classificação através do emprego de meio cromogênico e imagens obtidas de um scanner pode ser uma alternativa para identificar espécies mais prevalentes de *Candida* spp. de maneira rápida, fácil e aplicável na rotina micológica (Capítulo IV).

A identificação de leveduras invasivas, principalmente em doenças pulmonares como as do *Cryptococcus* é um desafio clínico. O *Cryptococcus* é uma levedura haploide encapsulada responsável pela criptococose e que ocorre em pacientes imunodeprimidos majoritariamente (RAMACHANDRAN et al., 2018). Devido a sua alta mortalidade associada, sua identificação inequívoca e escolha do tratamento são essenciais para um desfecho clínico positivo (VIDAL & BOULWARE, 2015). O conceito de uma infecção um agente etiológico é assumido como válido na maioria das infecções fúngicas. Contudo, alguns

estudos mostram que um mesmo paciente pode exibir-se colonizado por mais uma espécie de interesse clínico, o que aumenta a dificuldade na identificação. Logo, coinfeções com leveduras correlacionadas podem acontecer, assim como o isolamento de leveduras presente na microbiota do paciente como é o caso do gênero *Candida*. Assim, o presente trabalho resolveu utilizar espectros de infravermelho para diferenciar e classificar espécies de *Cryptococcus* na presença de diferentes espécies de *Candida*. Embora existam ferramentas que permitem essa diferenciação de maneira inequívoca como é o caso da biologia molecular (RAMACHANDRAN et al., 2018), são metodologias que tem um valor agregado alto e demandam conhecimento técnico aplicado para suas análises. Além disso, a aquisição de insumos para a biologia molecular inviabiliza a identificação na grande maioria dos laboratórios micológicos. Assim, alternativas como a identificação através do MALDI-ToF-MS viabilizam o emprego na microbiologia, contudo ainda são tecnologias caras para que os laboratórios possam acessar mais recorrentemente. Sendo assim, técnicas com menor valor agregado e que permitam a identificação de leveduras de importância clínica são uma oportunidade para a rotina. Uma técnica que possui o poder de interagir com a amostra e obter dados representativos delas é a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de FTIR são distribuições das biomoléculas que estão contidas na parede e membrana celular das leveduras e seu citosol, devido a penetrabilidade do feixe eletromagnético. Dessa maneira, os espectros mostram as bandas de absorção que representam essa mistura complexa que são os microrganismos. Acessórios como o ATR concedem ao analista que o preparo de amostra não seja realizado, visto a não necessidade de montagem de uma pastilha de KBr para a aquisição do sinal. Devido à complexidade de cada espectro, e as pequenas diferenças que podem ocorrer em cada espécie envolvida a análise multivariada se faz necessária para reconhecer padrões e extrair conhecimento dos espectros de infravermelho. Os resultados das análises exploratórias concederam informação sobre as diferentes organizações e biomoléculas presentes nos microrganismos. Essas diferenças foram capazes de serem exploradas para a criação de modelos multivariados de classificação dos microrganismos envolvidos. No artigo em questão, utilizamos duas abordagens com duas classes (*Cryptococcus* spp. e *Candida* spp.) e com três classes (*Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*

e *Candida* spp.). Ambas as abordagens realizadas mostraram ótimas métricas de classificação possibilitando a identificação inequívoca das espécies envolvidas. Portanto a aplicação do FTIR-ATR para a diferenciação e classificação de leveduras de importância clínica é uma ferramenta prática, rápida, eficiente e não-destrutiva. Acreditamos que a análise por FTIR-ATR concede informações importantíssimas acerca do microrganismo e auxilia o analista no processo de identificação fúngica. (Capítulo V)

Portanto, o presente trabalho abordou temas extremamente importantes para a micologia e evidenciou a grande variabilidade da padronização do inóculo pode influenciar na realização do teste de microdiluição em caldo, principalmente, pela diferença na concentração de blastoconídeos na suspensão de células em experimentos de informação clínica (Capítulo I); o pH é um parâmetro essencial para o crescimento, desenvolvimento e morfogênese fúngica, sendo que a sua medida possibilita o controle da qualidade em meios de cultura líquido, contudo, obter o pH de microvolumes e sem a quebra da esterilidade (Capítulo II); o estudo de fatores que impactam tanto no crescimento e inibição são importantes para que correções nas diretrizes utilizadas para os testes de antifungigrama sejam realizados com confiança e fidedignidade, assim demonstramos que através da aplicação de delineamento experimental é possível obter essas informações e que pequenas modificações alteram a susceptibilidade de cepas controle (Capítulo III); a identificação de espécies mais prevalentes do gênero *Candida* permite ao analista a melhor escolha de antifúngicos para testes de sensibilidade que levem a tratamentos mais eficazes, no entanto, obter a identificação de maneira rápida, fácil é um desafio nos laboratórios micológicos (Capítulo IV); e para finalizar, a identificação de leveduras correlacionadas ou de coinfeções pode ser uma etapa crítica, assim, através de espectros de infravermelho foi possível classificar diferentes espécies de *Cryptococcus* spp. (Capítulo V).

CONCLUSÕES

- A linearização efetuada se mostrou vantajosa por permitir um incremento de intervalo de predição para inóculos entre 10^4 e 10^9 células por mL concedendo ao modelo proposto maior precisão ao estimarmos a absorvância de determinada amostra no espectrofotômetro;
- A avaliação do pH em volumes de 100 μ L se mostrou reprodutível e uma alternativa para o conhecimento desse atributo físico-químico tão importante na micologia;
- A realização da medida de pH através de imagens digitais pode ser empregada também para o controle da qualidade de meios de cultura já preparados, assim possibilitando valorar o seu pH sem a quebra de esterilidade;
- A avaliação das interações importantes para o crescimento altera significativamente a inibição de *Candida* spp., assim, pequenas alterações no meio de cultura podem levar a erros importantes na susceptibilidade de leveduras de importância clínica;
- A identificação de leveduras de *Candida* através de um scanner de mesa se mostrou uma alternativa rápida, fácil e que é facilmente aplicável na rotina micológica trazendo métricas interessantes de classificação;
- Diferenciar a espécie de *Candida* envolvida é algo importante para estudos epidemiológicos como para a realização do teste de susceptibilidade, portanto o simples conhecimento entre *C. albicans* e *C. non-albicans* concede ao analista a melhor escolha para o teste de sensibilidade;
- Diferenciar e classificar leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* se mostrou possível e com ótimas métricas de classificação através da espectroscopia de infravermelho associado às ferramentas quimiométricas;
- Classificar as duas espécies de *Cryptococcus* mais prevalentes na clínica foi possível mesmo com 12 espécies de *Candida* no mesmo conjunto de dados.

PERSPECTIVAS

- Analisar os dados obtidos dos espectros de FTIR para demais microrganismos da micoteca de leveduriformes (*Candida* spp.) diferenciando e classificando em espécies através da relevância clínica apresentada;
- Analisar, via modelo multivariado os dados obtidos em diferentes tempos de crescimento com a finalidade de estudar a complexidade estrutural das leveduras cultivadas em ágar Sabouraud;
- Correlacionar via calibração multivariada a concentração de antifúngicos obtidos através do teste de susceptibilidade com os espectros obtidos das leveduras como ferramenta de estudo de mecanismo de ação;
- Analisar os espectros obtidos em meios de cultura para protease, com a finalidade de estudar as diferenças bioquímicas e de organização das leveduras e sua potencialidade como diferenciadora nos crescimentos.
- Avaliar a potencialidade do FTIR como ferramenta para prever a resistência à antifúngicos permitindo classificar e estimar a concentração de contato do microrganismo cultivado baseado em biomarcadores.

REFERÊNCIAS

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, 78, 55–58, 2015.

ARASTEHFAR, A., et al. Molecular Identification, Genotypic Diversity, Antifungal Susceptibility, and Clinical Outcomes of Infections Caused by Clinically Underrated Yeasts, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis*: An Iranian Multicenter Study (2014–2019). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 9, 2019.

ARASTEHFAR, A., FANG, W., PAN, W., LACKNER, M., LIAO, W., BADIEE, P., ZOMORODIAN, K., BADALI, H., HAGEN, F., LASS-FLÖRL, C., BOEKHOUT, T. YEAST PANEL multiplex PCR for identification of clinically important yeast species: stepwise diagnostic strategy, useful for developing countries. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2019 Feb;93(2):112-119. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.09.007.

ARUMUGAM R, RAGUPATHI RAJA KANNAN R, JAYALAKSHMI J, MANIVANNAN K, KARTHIKAI DEVI G, ANANTHARAMAN P. Determination of element contents in herbal drugs: chemometric approach. **Food Chem.** 2012 Dec 15;135(4):2372-7. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.040.

Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos. **Organ Transplantation in Brazil**. In. São Paulo, 2016.

AUBERTINE, C. L. et al. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. **Journal of Clinical Microbiology**, 44: 227-228, 2006.

AVNI, T.; LEIBOVICI, L.; PAUL, M. PCR Diagnosis of Invasive Candidiasis: Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, 49, 665–670, 2010.

BAHN, Y.S., SUN, S., HEITMAN, J., LIN, X. Microbe Profile: *Cryptococcus neoformans* species complex. **Microbiology** 2020 Sep;166(9):797-799. doi: 10.1099/mic.0.000973.

BARBIR, D.; DABIC, P.; MEHES, M. The use of PWHM and Mie methods in estimation of colloidal silver particle size obtained by chemical precipitation with sodium borohydride. **Hemijaska Industrija** 73(00):31-31, 2019.

BARTIZAL C, ODDS FC. Influences of methodological variables on susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species and *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2003 Jul;47(7):2100-7. doi: 10.1128/AAC.47.7.2100-2107.2003.

BENSEN, E. S. et al. Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. **Molecular Microbiology**, Dec;54(5):1335-51, 2004.

BESTIC, P. B.; ARNOLD, W. N. Linear transformation of standard curves for yeast turbidity. **Applied and Environmental Microbiology** 32.4: 640-641, 1976.

BIGGS, R.; MACMILLAN, R. L. The Error of the Red Cell Count. **Journal of Clinical Pathology**, Nov;1(5):288-91, 1948.

BORGHI, E. et al. Comparative evaluation of the Vitek 2 yeast susceptibility test and CLSI broth microdilution reference method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in Italy: the GISIA3 study. **Journal of clinical microbiology**, 48(9), 3153–3157, 2010.

BOTNARU, V. et al. Criptococoză--infecție fungică frecventă a imunocompromisului [Cryptococcosis--a common fungal infection in immunosuppressed patient]. **Pneumologia**, 63(3):156-163, 2014.

BRATBURD, J. R. et al. Gut Microbial and Metabolic Responses to *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* and *Candida albicans*. **mBio**, 9(6), 2018.

BRERETON RG. Chemometrics: data analysis for the laboratory systems and chemical plants. 1 ed. John Wiley & Sons Ltda: Chichester, 2003.

CARVAJAL, L. P. et al. Novel Insights into the Classification of *Staphylococcal* β -Lactamases in Relation to the Cefazolin Inoculum Effect. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 64(5), e02511-19, 2020.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Rapid diagnosis of invasive candidiasis. **Current Opinion in Infectious Disease**, 32, 546–552, 2019.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. M27–A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2008.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, 44: 2816–23, 2006.

COOK, R. A.; MCINTYRE, K. A.; GALGANI, J. N. Effects of incubation temperature, inoculum size, and medium on agreement of macro- and microdilution broth susceptibility test results for yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 34(8), 1542–1545, 1990.

COSTA EB, SILVA RC, ESPEJO-ROMÁN JM, NETO MFA, CRUZ JN, LEITE FHA, SILVA CHTP, PINHEIRO JC, MACÊDO WJC, SANTOS CBR. Chemometric methods in antimalarial drug design from 1,2,4,5-tetraoxanes analogues. **SAR QSAR Environ Res**. 2020 Sep;31(9):677-695. doi: 10.1080/1062936X.2020.1803961.

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

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, 39(2):525-532, 2001.

DANBY C. S, et al. Effect of pH on in vitro susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 antifungal agents and implications for clinical use. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Mar;56(3):1403-6, 2012.

DE SOUSA, E.S.O., CORTEZ, A.C.A., DE SOUZA CARVALHO MELHEM, M. et al. Factors influencing susceptibility testing of antifungal drugs: a critical review of document M27-A4 from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Braz J Microbiol** 51, 1791–1800 (2020). <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00354-6>

DE VASCONCELLOS, A. A. et al. Environmental pH influences *Candida albicans* biofilms regarding its structure, virulence and susceptibility to fluconazole. **Microbial Pathogenesis**, Apr-May;69-70:39-44, 2014.

DU, H.; HUANG, G. Environmental pH adaption and morphological transitions in *Candida albicans*. **Current Genetics**, May;62(2):283-6, 2016.

DUMANCAS, G. G., RAMASAHAYAM, S., BELLO, G., HUGHES, J., & KRAMER, R. (2015). Chemometric regression techniques as emerging, powerful tools in genetic association studies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 74, 79–88. doi:10.1016/j.trac.2015.05.007

EDDOUZI, J. et al. Identification and antifungal susceptibility of a large collection of yeast strains isolated in Tunisian hospitals, **Medical Mycology**, 51, 7, 737–746, 2013.

EGLI, A., SCHRENZEL, J., & GREUB, G. Digital microbiology. **Clinical Microbiology and Infection**. v26(10), 2020, p1324-1331. doi:10.1016/j.cmi.2020.06.023

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **Journal of Clinical Microbiology**, Dec;30(12):3138-45, 1992.

Espinel-Ingroff, A.; Kerkering TM. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, Feb;29(2):393-4, 1991.

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Method for determination of broth dilution minimum inhibitory concentration of antifungal agents for yeasts. V. 7.3.1. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, Basel, Switzerland, 2017.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Clinical Mycology in Latin America and the Caribbean: a snapshot of diagnostic and therapeutic capabilities. **Mycoses**, 62(4), 368–373, 2019.

FERREIRA, C. et al. *Candida tropicalis* biofilm and human epithelium invasion is highly influenced by environmental pH. **Pathogens and Disease**, Nov;74(8):ftw101, 2016.

FISHER, R. A. Statistical methods for research workers. Oliver and Boyd, Londres, 1925.

- FISHER, R. A. The design of experiments. Oliver & Boyd. 1935.
- FISHER, R. A. Studies in crop variation. I. An examination of the yield of dressed grain from Broadbalk. **The Journal of Agricultural Science**, 11(02), 107, 1921.
- FISHER, R. A.; THORNTON, H. G.; MACKENZIE, W. A. The accuracy of the plating method of estimating the density of bacterial populations. **Annals of Applied Biology**, 9(3-4), 325–359, 1922.
- FRASER, T.; BANKS, A. **O guia completo da cor**. Tradução Renata Bottini. 2. ed. São Paulo: Senac, 2013.
- FROMTLING, R. A. et al. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 37(1):39-45, 1993.
- GALGIANI, J. N.; STEVENS, D. A. Antimicrobial susceptibility testing of yeasts: a turbidimetric technique independent of inoculum size. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 10(4), 721–728, 1976.
- GEHRT, A. et al. Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. **Journal of Clinical Microbiology**, May;33(5):1302-7, 1995.
- GONZALES, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento digital de imagens**. 3. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010.
- GOSSET, W.S. "Student" on the Error of Counting with a Haemocytometer. **Biometrika**, 5, 351-360, 1907.
- GRASEL, F. S.; MARCELO, M. C. A.; FERRÃO, M. F. A non-destructive, rapid and inexpensive methodology based on digital images for the classification of natural tannin extracts. **RSC Advances**, 6(38), 32358–32364, 2016.
- GRABMANN, A.; PETERS, F. Size Measurement of Very Small Spherical Particles by Mie Scattering Imaging (MSI). **Particle & Particle Systems Characterization**, 21(5), 379–389, 2004.
- GRANATO, D., SANTOS, J. S., ESCHER, G. B., FERREIRA, B. L., & MAGGIO, R. M. (2018). Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science & Technology**, 72, 83–90. doi:10.1016/j.tifs.2017.12.006
- GREGORY, J. Turbidity fluctuations in flowing suspensions. **Journal of Colloid and Interface Science**, 105(2), 357–371, 1985.
- HAIR, J.F.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L. ANÁLISE MULTIVARIADA DE DADOS. 6 ed. Bookman: Porto Alegre, 2009.
- HELPER, G. A. et al. A New Tool for Interpretation of Thermal Stability of Raw Milk by Means of the Alizarol Test Using a PLS Model on a Mobile Device. **Food Analytical Methods**, 11, 2022–2028, 2018.

- HORN, D. L. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Disease**, 48: 1695–703, 2009.
- HORVATH, H. Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, 110(11), 787–799, 2009.
- HOTELLING, H., J. **Edu. Psych.** 1933, 24 (6), 417-441.
- JIN, Q.; KIRK, M. F. pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. **Frontiers in Environmental Science**, 6, 2018.
- KARAGEORGOPOULOS, D. E. et al. beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: A meta-analysis. **Clinical Infectious Disease**, 52, 750–770, 2011.
- LAGUNAS, R.; MORENO, E. The calculation of cellular parameters from the turbidity of yeast cultures may give rise to important errors. **FEMS Microbiology Letters**, 29(3), 335–337, 1985.
- LAMOTH, F., et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 73(suppl_1):i4-i13, 2018.
- LAND, G. A, et al. Improved auxanographic method for yeast assimilations: a comparison with other approaches. **Journal Clinical Microbiology**, 2: 206-217, 1975.
- LIGUORI, G. et al. *Candida albicans* identification: comparison among nine phenotypic systems and a multiplex PCR. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, Sep;51(3):121-4, 2010.
- LIU, W. et al. Impact of pH on the antifungal susceptibility of vaginal *Candida albicans*. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, 114:278–280, 2011.
- LOFFREDO, M. R, et al. Inoculum effect of antimicrobial peptides. **PNAS**, vol 118, No. 21 e2014364118, 2021.
- LYON, J. F.; THOMA, R. Ueber die Methode der Blutkörperzählung. **Virchows Archive**, 84, 131, 1881.
- MARINHO, S. A. et al. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41(2), 286-294, 2010.
- MBA, I.E., NWEZE, E.I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 39, 1797–1819, 2020.
- MELETIADIS, J. et al. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-Thiazyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. **Journal of clinical microbiology**, 38(8), 2949–2954, 2000.

MERLINO, J., TAMBOSIS, E., VEAL, D. Chromogenic tube test for presumptive identification or confirmation of isolates as *Candida albicans*. **J Clin Microbiol**. 1998 Apr;36(4):1157-9. doi: 10.1128/JCM.36.4.1157-1159.1998.

MICHL, J.; PARK, K. C.; SWIETACH, P. Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. **Communications Biology**, Apr 26;2:144, 2019.

MICKELSEN, P. A, MCCARTHY, L. R, PROPST, M. A. Further modifications of the auxanographic method for identification of yeasts. **Journal Clinical Microbiology**, 5: 297-301, 1977.

MIKULSKA, M. et al. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: Recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. **Critical Care**, 14, R222, 2010.

MUTLU, A. Y. et al. Smartphone-based colorimetric detection via machine learning. **The Analyst**, 142(13), 2434–2441, 2017.

NEJAD, B. S.; SAMARBAF-ZADEH, A.; SALEHI, Z. Comparison Between Phenotypic Characterization and Semi-Nested PCR for the Identification of *Candida* Species in Clinical Isolates. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, August; 10(3): e17391, 2015.

NEJI, S. et al. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. **Journal of Biomedical Science**, 24:67, 2017.

NGUYEN, M.H. et al. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, 54, 1240–1248, 2012.

NILSSON, R. H. et al. Mycobiome diversity: High-throughput sequencing and identification of fungi. **Nature Reviews Genetics**, 17, 95–109, 2019.

ORIJ, R. et al. In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. **Microbiology**, 155, 268–278, 2009.

ORIJ, R.; BRUL, S.; SMITS, G. J. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, 1810(10), 933–944, 2011.

PAPPAS, P. G. Cryptococcal Infections in Non-Hiv-Infected Patients. Transactions of the American Clinical and Climatological Association, [s. l.], v. 124, p. 61–79, 2013.

PEARSON, K., **Philoso. Magazi**. 1901, 2 (6), 559-572.

PELLATON, N. et al. How Yeast Antifungal Resistance Gene Analysis Is Essential to Validate Antifungal Susceptibility Testing Systems. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, May 4;12:859439, 2022.

PENCE, M.A., MCELVANIA TEKIPPE, E., WALLACE, M.A., BURNHAM, C.A. Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2014 Oct;33(10):1703-12. doi: 10.1007/s10096-014-2115-x.

PEÑA, A. et al. Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Mar;15(2):fou005, 2015.

PFALLER, M.A. et al. Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 77(1), 37–40, 2013.

PFALLER, M.A. et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **Journal of Clinical Microbiology**, Aug;26(8):1437-41, 1988.

PFALLER, M.A. et al. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, 45: 1735–45, 2007.

POTOCKI, L. et al. FTIR and Raman spectroscopy-based biochemical profiling reflects genomic diversity of clinical *Candida* isolates that may be useful for diagnosis and targeted therapy of candidiasis. **International Journal of Molecular Sciences**, 20(4), 988, 2019.

QUATRIN, P.M. et al. Método convencional para o diagnóstico de micoses: um estudo comparativo. **Biomedical Research**, 40, 4, 2021.

RAMACHANDRAN, P.S. et al. Detection of *Cryptococcus* DNA by Metagenomic Next-generation Sequencing in Symptomatic Cryptococcal Antigenemia. **Clinical Infectious Diseases**, 68, 1978–1979, 2018.

RAMANI, R, et al. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 36(11):3396-8, 1998.

RAMBALI B, FERNANDEZ JA, VAN NUFFEL L, WOESTENBORGH F, BAERT L, MASSART DL, ODDS FC. Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: a process analysis of test variables. **J Antimicrob Chemother.** 2001 Aug;48(2):163-77. doi: 10.1093/jac/48.2.163.

RINCON, S. et al. A Test for the Rapid Detection of the Cefazolin Inoculum Effect in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, 19;59(4):e01938-20, 2021.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Interlaboratory evaluation of hematocytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(11):5236-5237, 2003.

RUHNKE, M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. **Current Drug Targets**, 7: 495–50, 2006.

RUSTCHENKO-BULGAC, E.P.; HOWARD, D.H. Multiple chromosomal and phenotypic changes in spontaneous mutants of *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, 139 Pt 6:1195-207, 1993.

SALAS, J. R., et al. Mathematical modeling of the “inoculum effect”: six applicable models and the MIC advancement point concept. **FEMS Microbiology Letters**, 367, 5, fnaa012, 2020.

SALZER, R, et al. Infrared and Raman imaging of biological and biomimetic samples. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 366:712–726, 2000.

SAMPAIO, P. N.; CALADO, C. R. C. Classification of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells using PLS-DA modelling based on MIR spectroscopy. **2019 IEEE 6th Portuguese Meeting on Bioengineering (ENBENG)**, 2019.

SANCHES, J. M., et al. Vaginal lipidomics of women with vulvovaginal candidiasis and cytolytic vaginosis: A non-targeted LC-MS pilot study. **PLoS One**, 13(8), e0202401, 2018.

SENA, M., FRIGHETTO, R. T., VALARINI, P., TOKESHI, H., & POPPI, R. (2002). Discrimination of management effects on soil parameters by using principal component analysis: a multivariate analysis case study. **Soil and Tillage Research**, 67(2), 171–181. doi:10.1016/s0167-1987(02)00063-6

SIMOR, A. E., et al. Antifungal susceptibility testing of yeast isolates from blood cultures by microbroth dilution and the E test. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 16(9), 693–697, 1997.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**; Cengage Learning, 2017.

SMITH, K. P.; KIRBY, J. E. The Inoculum Effect in the Era of Multidrug Resistance: Minor Differences in Inoculum Have Dramatic Effect on MIC Determination. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 62(8), 2018.

SMITH, R. Chemometrics. In **Forensic Chemistry**; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, UK, 2015; pp 469–503. <https://doi.org/10.1002/9781118897768.ch12>.

SMITH, Z.J.; CHU, K. Wachsman-Hogiu S. Nanometer-scale sizing accuracy of particle suspensions on an unmodified cell phone using elastic light scattering. **PLoS One**, 7(10):e46030, 2012.

SOBEL, J. D.; AKINS, R. Determining Susceptibility in *Candida* Vaginal Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 23:e0236621, 2022.

SORIANO, F. et al. Relevance of the inoculum effect of antibiotics in the outcome of experimental infections caused by *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 25(4), 621–627, 1990.

STUDENT. On the error of counting with a Haemocytometer. **Biometrika**, 5, 3, 351-360, 1907.

STUDENT. The application of the 'law of error' to the work of the Brewery, **Guinness internal report**, 1904.

STUDENT. The Probable Error of a Mean. **Biometrika**, 6(1), 1–25, 1908.

UARROTA VG, MORESCO R, COELHO B, NUNES EDA C, PERUCH LA, NEUBERT EDE O, ROCHA M, MARASCHIN M. Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for screening cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during postharvest physiological deterioration. **Food Chem.** 2014 Oct 15;161:67-78. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.110.

VIDAL, J.E.; BOULWARE, D.R. Lateral flow assay for cryptococcal antigen: An important advance to improve the continuum of hiv care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 57, 38–45, 2015.

VYLKOVA, S. et al. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. **mBio**, 17;2(3):e00055-11, 2011.

WEINER, I.; RUST, M.; DONNELLY, T. D. Particle size determination: An undergraduate lab in Mie scattering. **American Journal of Physics**, 69(2), 129–136, 2001.

WICKERHAM, L. J.; BURTON, K. A. Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. **Journal of Bacteriology**, 56: 363-371, 1948.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P., **Chemometrics Intell. Lab. Syst.** 1987, 2 (1-3), 37-52.

YOUNG, A. T. Rayleigh scattering. **Physics Today**, 35.1: 42-48, 1982.

ZERVOU, F. N. et al. T2 Magnetic Resonance for Fungal Diagnosis. **Human Fungal Pathogen Identification**, 305–319, 2016.