ATR-FTIR COMO TÉCNICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE CANDIDA: COMO A PREPARAÇÃO PRÉVIA DAS AMOSTRAS INFLUÊNCIA NA ANÁLISE

Vitor Martins de Andrade[1], Ana Beatriz Furtado Rodrigues[1], Antônio Osny de Toledo, Lenilson Afonso dos Santos[2], Katia Conceição[1], Elisa Esposito[1].

[1]Universidade Federal do Estado de São Paulo, Rua Talim, 330, Vila Nair - 12231-280 - São José dos Campos-SP, Brasil.
[2]Departamento de Química (IEF-Q) do Instituto Tecnológico de Aeronáutica – ITA - Praça Marechal Eduardo Gomes, 50 - Vila das Acácias – 12228-900, São José dos Campos - SP, Brasil

vitor.andrade@unifesp.br, beatrizrodrigues.abfr@gmail.com, aosnyt@gmail.com, lenilson.afonso@gmail.com, katia.conceicao@unifesp.br, eesposito@unifesp.br.

Resumo
A identificação das espécies de micro-organismos pode ser realizada a partir de diferentes técnicas. Entretanto, para o gênero Candida, pode haver elevada variação genética e fenotípica entre as espécies. Neste contexto, ATR-FTIR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada) vem sendo empregada na identificação de componentes químicos de diferentes origens, incluindo micro-organismos. As amostras dos biofilmes de Candida spp. foram previamente preparadas para análise empregando protocolos de desidratação com álcool etílico e de secagem à vácuo. Podem-se perceber picos intensos, representando a Região de Fingerprint, que indica a presença de polissacarídeos da parede celular e que é característica aos fungos, como também as regiões de proteínas e lipídeos. A espectroscopia ATR-FTIR demonstrou ser uma ferramenta poderosa para a identificação microbiana, porém, sua eficácia está diretamente condicionada à qualidade do preparo das amostras, sendo um fator determinante para o sucesso da análise e para a confiabilidade dos resultados obtidos.

Palavras-chave: *Candida* spp. ATR-FTIR. Identificação de espécies. Espectroscopia.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas; Microbiologia.

Introdução

Reconhecida como uma das espécies fúngicas mais relevantes no mundo, *Candida albicans* é um fungo dimórfico que faz parte da microbiota humana e também é responsável por causar infecções oportunistas (Cavalheiro, Teixeira, 2018; Robbins, Cowen, 2025). Esta espécie caracteriza-se pela capacidade de transitar entre as formas de leveduras, pseudohifas e hifas, bem como pela formação de biofilmes (Robbins, Cowen, 2025). Os biofilmes microbianos são complexas e altamente estruturadas comunidades de micro-organismos envoltas por uma matriz extracelular (MEC) e que se formam após células planctônicas aderirem a uma superfície. Estes biofilmes permitem que o agente causador de uma infecção possa se evadir do sistema imune e ficar livre da ação dos antimicrobianos devido à proteção gerada pela MEC (Cavalheiro, Teixeira, 2018). Todavia, outras espécies do gênero Candida também podem ser patogênicas e causar doenças aos humanos. Dentre estas espécies, pode-se citar a *Pichia kudriavzevii*, anteriormente nomeada *Candida krusei*. Esta espécie de levedura, por sua vez, também forma biofilmes e vem cada vez mais sendo isolada de diversos tipos de infecções (Alam et al., 2014; Cavalheiro, Teixeira, 2018; Gómez-Gaviria, Montes, 2020).

A identificação das espécies de micro-organismos pode ser realizada a partir de diferentes técnicas, como pelo uso de testes bioquímicos e de meios de cultura de identificação. Entretanto, especialmente para cepas clínicas e para o gênero Candida, pode haver elevada variação genética e fenotípica entre as espécies, dificultando estes ensaios. Atualmente, as técnicas de biologia molecular são mundialmente conhecidas e amplamente empregadas com este fim. Contudo, tais técnicas exigem equipamento laboratorial e o uso de reagentes de alto custo, o que pode inviabilizar a identificação para muitos laboratórios (Alam et al., 2014; Franconi *et al*., 2025).

A diferenciação química de materiais diversos com base em seus componentes já é realizada há algum tempo. Dentro deste contexto, a técnica de ATR-FTIR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada) vem sendo empregada na identificação de componentes químicos de diferentes origens e em diferentes cenários, em amostras sólidas ou líquidas (Franconi *et al*., 2025; Kaufmann *et al*, 2026; Medeiros *et al*, 2026). Um destes cenários é a identificação de diferentes gêneros e espécies de micro-organismos. ATR-FTIR é uma técnica considerada rápida e de alta precisão, que gera pouco dano à amostra analisada, além de não necessitar de reagentes químicos ou moleculares (Franconi *et al*., 2025; Kaufmann *et al*, 2026; Medeiros *et al*, 2026). Em sua maior parte, as análises microbiológicas concentram-se na região do infravermelho médio, que se encontra entre 4000 a 400 cm^{-1}. E é nessa faixa que ocorrem transições vibracionais fundamentais das principais macromoléculas orgânicas. Como cada espécie deve apresentar um espectro único, discriminá-las torna-se possível com esta técnica (Medeiros *et al*., 2026; Pebotuwa *et al*., 2020). Com esta técnica, a amostra, seja úmida ou seca, é colocada em contato direto com um cristal de elevada densidade óptica, comumente de diamante. Em seguida, um feixe de infravermelho atravessa este cristal, sofrendo múltiplas reflexões internas. É a partir dessas reflexões que se cria uma onda que penetra a amostra, gerando um sinal que resulta na formação de espectros (Medeiros *et al*., 2026).

Para a execução desta técnica é preciso realizar, muitas vezes, um preparo prévio das amostras a fim de possibilitar sua identificação química, que pode consistir em secagem da amostra, por exemplo. Nesse sentido, o presente trabalho buscou avaliar se diferentes preparações podem interferir nos resultados das análises e identificação de biofilmes do gênero Candida.

Metodologia

Para a realização do presente estudo, foram utilizadas as cepas SC5314 de *Candida albicans* e ATCC 6258 de *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*). Ambas as cepas foram, primeiramente, semeadas em ágar Sabouraud e mantidas em estufa bacteriológica por 48 h, a 37 °C. Feito isso, com o auxílio de uma alça descartável, colônias crescidas no ágar foram ressuspendidas em solução salina estéril (NaCl 0,9%). A determinação da densidade celular foi medida por absorbância (DO 530 nm) (Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader; Bio-Tek, Winooski, VT, USA) e a suspensão celular foi ajustada em meio BHI para 1×10^{6} cel.mL^{-1}.

Em seguida, em uma placa estéril de 96 poços, foram adicionados aos poços os corpos de prova (feitos de polipropileno) tratados para adesão celular. Então, nestes poços foram adicionados 200 µL das suspensões de cada espécie de Candida. O experimento foi realizado em triplicata e a placa foi mantida em bacteriológica por 24 h, a 37 °C para a formação dos biofilmes.

Passado este tempo, os biofilmes foram gentilmente lavados com solução salina estéril (NaCl 0,9%) para remover células não aderidas. Depois disso, para desagregar os biofilmes do fundo da placa foi utilizado um sonicador (Ultrasonic processor; Sonics & Materials, Inc; Newton, CT, USA) por 3 minutos. Por fim, procedeu-se à preparação das amostras para a análise de ATR-FTIR. Para isto, as amostras foram divididas em dois grupos: Grupo I - secagem a vácuo; Grupo II - desidratação com álcool etílico.

Para as amostras do Grupo I, o conteúdo dos poços foi transferido para microtubos após desagregação e colocados para secagem à vácuo (Concentrador centrífugo Genevac miVac, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) até a completa eliminação da água. Para as amostras do grupo II, após a lavagem dos biofilmes, foi feita desidratação das células para remoção de água utilizando concentrações crescentes de etanol na seguinte ordem: 25%, 50%, 75% e 100%. Ademais, as células foram expostas a cada concentração por 1 h.

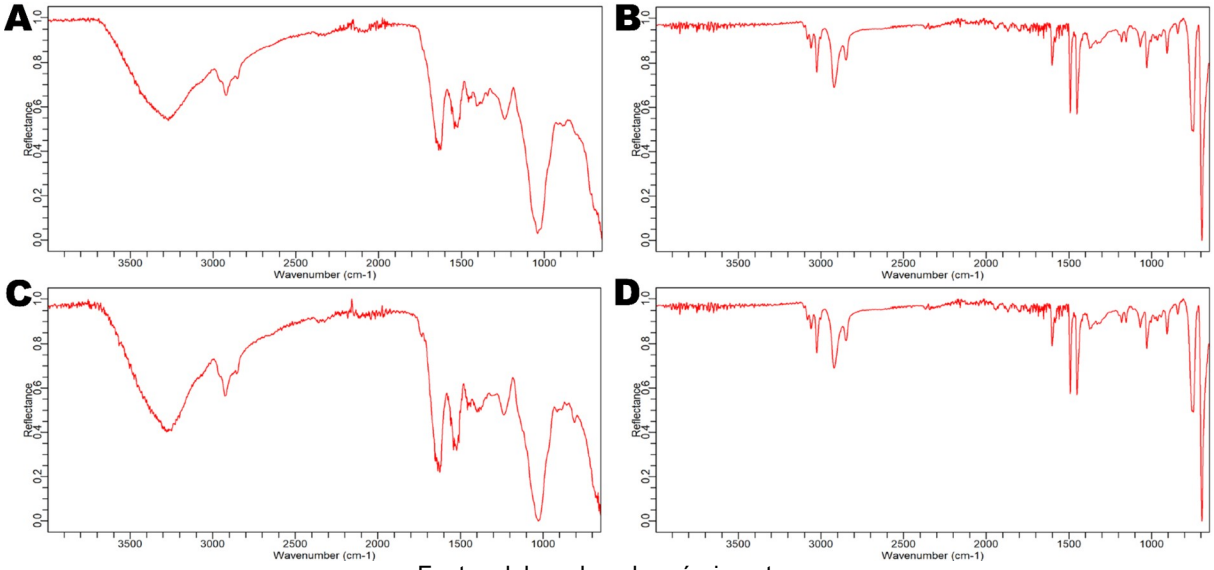
Por fim, as amostras foram colocadas no equipamento de ATR-FTIR para análise e gerar espectros (Agilent Cary 630 FTIR).

Resultados

Durante a preparação das amostras para análise por ATR-FTIR, o processo de desidratação dos biofilmes de *Candida spp* revelou-se fundamental para a obtenção de espectros com alta resolução e qualidade interpretativa quando comparada a secagem feita nos biofilmes desagregados e secos à vácuo, conforme mostrado na Figura 1. No processo de desidratação das amostras, foi essencial para remover a água presente nas células e na matriz do biofilme, uma vez que a água exerce forte absorção na região do infravermelho médio, especialmente nas faixas de 3400 a 3200 cm^{-1} (referente

ao estiramento O–H) e em 1640 cm^{-1} (deformação angular da molécula de água, que coincide com a região da amida I). Essas bandas de absorção intensa da água podem mascarar ou sobrepor sinais importantes de grupos funcionais de biomoléculas, comprometendo a identificação precisa de proteínas, lipídios e polissacarídeos. Ao promover a eliminação completa da água, foi possível realçar as bandas características dos componentes celulares, como os estiramentos C–H dos lipídios (3000 a 2800 cm^{-1}), as amidas I e II das proteínas (1700 a 1500 cm^{-1}) e, principalmente, o finger print de polissacarídeos na região de 1200 a 900 cm^{-1}, que se mostrou crítica para a discriminação entre as diferentes espécies de *Candida*. Dessa forma, a desidratação adequada da amostra não apenas melhorou a resolução espectral e a relação entre sinal e ruído, mas também viabilizou a correta atribuição das bandas e a diferenciação química entre os microrganismos.

Figura 1 - Espectros das análises dos biofilmes de Candida spp. Legenda: A - biofilme de *C.albicans* com secagem à vácuo; B - biofilme de *C. albicans* desidratado com álcool etílico; C - biofilme de *P. kudriavzevii* com secagem à vacuo; D - biofilme de *P. kudriavzevii* desidratado com álcool etílico.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

De acordo com os espectros da Figura 1 e correlacionando com os valores de intensidade referente a cada espécie mostrados na Tabela 1, podemos observar alterações nos picos mais intensos entre 960 a 1180 cm^{-1} que confirmam a rica matriz polissacarídica típica do biofilme de *C. albicans*. Aqui encontra-se a Região de Fingerprint (900–1200 cm^{-1}), que indica a presença de polissacarídeos da parede celular.

Em seguida, nota-se as bandas em 1027 cm^{-1} (β-1,4 glucanas) e 980 cm^{-1} (β-1,6 glucanas) que são características da parede celular fúngica. A presença de mananas (963, 965, 969 cm^{-1}) é um marcador importante para discriminação de espécies de *Candida*, conforme observado por Pebotuwa e colaboradores (2020).

A região caracterizada como a região de proteínas apresenta os picos mais intensos entre 1300-1600 cm^{-1}. Aqui destacam-se o grupo Amida I (1600 cm^{-1}), importante indicador de estrutura secundária predominantemente em folhas β, comum em proteínas de adesão de biofilme, Amida II (em ~1544 cm^{-1}), que está ausente no espectro, possivelmente sobreposta ou com baixa intensidade, Amida III (~1312 cm^{-1}), em que se confirma a presença de proteínas estruturais.

A região de lipídios, localizada entre 2800 a 3000 cm^{-1}, apresenta picos em 2849 cm^{-1} e 2920 cm^{-1} que indicam cadeias lipídicas da membrana celular. Ademais, entre as regiões 3024 cm^{-1} e 3060 cm^{-1} sugerem presença de insaturações (ergosterol, fosfolipídios insaturados), típicas de membranas fúngicas. Destaca-se ainda algumas observações sobre intensidades mais altas (>89), que ocorrem na região de polissacarídeos (ex: 3082 cm^{-1}, 980 cm^{-1}), reforçando que a matriz do biofilme é rica em carboidratos. A região de proteínas (Amida I) tem intensidade moderada (~79–88), indicando proteínas estruturais, mas em menor quantidade relativa que os polissacarídeos.

Tabela 1 - Atribuição das bandas de absorção no espectro ATR-FTIR e comparação das intensidades relativas entre *C. albicans* e *C. krusei* (*P. kudriavzevii*).

Nº de Onda (cm^{-1})	Atribuição	Macromolécula	Intensidade em *C. albicans*	Intensidade em *C. krusei*	Diferença
695.1	Deformação de anel aromático (Tirosina/Fenilalanina)	Proteínas	~11.1	~6.3	*C. albicans* > *C. krusei*
747.3	CH_2 rocking / deformação alifática	Lipídios	~53.4	~49.2	*C. albicans* > *C. krusei*
905.7	Mananas + movimentos esqueléticos DNA/RNA/fosfato	DNA e Polissacarídeos	~85.6	~81.3	*C. albicans* > *C. krusei*
963.5	Mananas + estiramento C–O de fosfodiéster e ribose	DNA e Polissacarídeos	~88.8	~86.6	*C. albicans* > *C. krusei*
980.3	β-1,6 glucanas (parede celular)	Polissacarídeos	~89.7	~87.7	*C. albicans* > *C. krusei*
1026.9	β-1,4 glucanas / estiramento C–O de carboidratos	Polissacarídeos	~78.1	~75.2	*C. albicans* > *C. krusei*
1067.9	Estiramento C–O de carboidratos + fosfodiéster	DNA e Polissacarídeos	~86.2	~83.6	*C. albicans* > *C. krusei*
1153.6	Estiramento C–O de carboidratos	Polissacarídeos	~88.2	~85.9	*C. albicans* > *C. krusei*
1181.6	Estiramento C–O de carboidratos	Polissacarídeos	~88.2	~86.0	*C. albicans* > *C. krusei*
1312.0	Amida III (estrutura secundária de proteínas)	Proteínas	~87.8	~85.6	*C. albicans* > *C. krusei*
1328.8	Amida III / CH_2 wagging	Proteínas / Lipídios	~87.6	~85.4	*C. albicans* > *C. krusei*
1373.5	CH_2 wagging (lipídios) + β-1,3 glucanas	Lipídios e Polissacarídeos	~85.6	~83.5	*C. albicans* > *C. krusei*
1451.8	Deformação assimétrica de CH_3 (proteínas celulares)	Proteínas e Lipídios	~60.1	~56.4	*C. albicans* > *C. krusei*
1492.8	Vibração do anel aromático (Tirosina)	Proteínas	~60.6	~56.7	*C. albicans* > *C. krusei*
1600.9	Amida I (folhas β pregueadas)	Proteínas	~79.1	~76.5	*C. albicans* > *C. krusei*
2849.5	Estiramento simétrico de CH_2 (ν_s CH_2) – cadeias lipídicas	Lipídios	~81.3	~78.6	*C. albicans* > *C. krusei*
2920.4	Estiramento assimétrico de CH_2 (ν_{as} CH_2) – lipídios	Lipídios	~70.5	~67.3	*C. albicans* > *C. krusei*
3024.7	Estiramento =C–H de insaturações (ergosterol)	Lipídios	~76.5	~73.9	*C. albicans* > *C. krusei*
3060.1	Estiramento =C–H (proteínas / lipídios insaturados)	Proteínas / Lipídios	~85.7	~83.8	*C. albicans* > *C. krusei*
3082.5	Estiramento N–H (Amida A/B) – proteínas	Proteínas	~89.2	~87.3	*C. albicans* > *C. krusei*

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

As variações de intensidade observadas nos espectros de ATR-FTIR, consistentemente maiores em *Candida albicans* em comparação a *Candida krusei* (*Pichia kudriavzevii*) em todas as faixas analisadas, pois refletem uma maior densidade e concentração biomolecular na matriz e parede celular de *C. albicans*, principalmente com relação aos polissacarídeos e proteínas da matriz do biofilme. De acordo com a literatura comparativa sobre espectroscopia no infravermelho de leveduras, essa discrepância quantitativa nos picos de absorção atua como uma assinatura biomolecular distinta que permite a diferenciação interespecífica. *Candida albicans* exibe uma estrutura de biofilme e matriz extracelular mais densa sob as mesmas condições de cultivo, enquanto *C. krusei* apresenta uma organização celular com menor absorção relativa nesses grupamentos funcionais, viabilizando o uso dessas impressões digitais espectrais como ferramenta rápida de identificação quimiométrica entre as espécies.

Discussão

Conforme achados na literatura, o preparo da amostra pode afetar e influenciar o resultado da análise por ATR-FTIR e, consequentemente, do espectro gerado, pela modificação do perfil químico global ou pela modificação de biomarcadores específicos (Pebotuwa *et al*., 2020; Medeiros *et al*., 2026). Como consequência, pode haver alteração nos picos espectrais específicos, como, por exemplo, variação na banda de amida I (1634 cm^{-1}), ligada às proteínas, e que atuou como um marcador importante para discriminar as espécies *C. glabrata* e *C. krusei* (Pebotuwa *et al*., 2020).

A região dos polissacarídeos na espectroscopia de infravermelho (ATR-FTIR) é compreendida principalmente na faixa de 1200 a 900 cm^{-1}, embora algumas análises possam mudar tal amplitude para 1400 a 900 cm^{-1} ou 1300 a 800 cm^{-1}. Há um consenso, porém, de que esta região específica proporciona a melhor discriminação interespécie em fungos do gênero *Candida*. Isso ocorre porque os perfis de polissacarídeos presentes na parede celular são singulares para cada espécie (Pebotuwa *et al*., 2020).

Embora a capacidade de discriminar as espécies fúngicas na região de 1200 a 900 cm^{-1} permaneça robusta independentemente do protocolo, a intensidade e a definição dos picos de polissacarídeos são sensíveis à forma como a amostra é preparada. Sendo assim, notou-se que, o uso de formalina destacou estes picos, enquanto que a lavagem com água possivelmente danificou a parede celular, levando a perda de frações polissacarídicas (Pebotuwa *et al*., 2020).

Corroborando os achados do presente estudo, Pebotuwa e colaboradores (2020) observaram que houve uma diferença espectral clara entre os métodos de preparação de suas amostras. Foi atestado que a forma de preparo é capaz de afetar a composição macromolecular detectada, e que amostras não tratadas e lavadas apresentaram bandas protéicas, de DNA e de polissacarídeos intensas, enquanto amostras fixadas apresentaram maior intensidade nas bandas de polissacarídeos. Ao investigar a influência de diferentes métodos de preparação de amostras na capacidade da espectroscopia ATR-FTIR de discriminar espécies de *Candida*, bem como mapear se os marcadores espectrais de diferenciação variam conforme o preparo, foi visto que a preparação influencia os sinais químicos globais de *Candida*, mas sem comprometer a capacidade de discriminar as espécies pela técnica de ATR-FTIR. Vale destacar ainda que, a região dos polissacarídeos (1200–900 cm^{-1}) foi identificada como o marcador crítico comum para a discriminação das espécies em todos os métodos (Pebotuwa *et al*., 2020).

Franconi e colaboradores (2025) também destacaram as vantagens de utilizar ATR-FTIR na identificação de espécies fúngicas: processo livre de reagentes e tempo de aquisição rápido. Enquanto o presente estudo precisou realizar uma preparação prévia das amostras para análise, Franconi et al (2025) foi capaz de utilizar as amostras obtidas diretamente da placa de cultivo. Ademais, O ATR-FTIR classificou com 100% de precisão alguns dos isolados dentro do gênero *Candida*, como as amostras de *C. krusei* e de *C. glabrata*, e classificou com 95% de precisão as amostras de *C. albicans*.

Conclusão

A espectroscopia ATR-FTIR demonstrou ser uma ferramenta poderosa para a identificação microbiana, porém, sua eficácia está diretamente condicionada à qualidade do preparo das amostras. Conforme evidenciado neste estudo e na literatura, a desidratação adequada dos biofilmes de *Candida* spp. é fundamental para eliminar a água, cujas bandas de absorção intensas em 3400 e 3200 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} mascaram sinais importantes de biomoléculas, comprometendo a resolução espectral. Quando comparada à secagem à vácuo, a desidratação mostrou-se superior, proporcionando melhor relação entre sinal e ruído e maior definição das bandas características, especialmente na região dos polissacarídeos (1200 a 900 cm^{-1}), crítica para a discriminação entre espécies de *Candida*.

Dessa forma, a padronização de um protocolo robusto de preparação de amostras é imprescindível para que a espectroscopia ATR-FTIR atinja todo o seu potencial como ferramenta diagnóstica. A escolha adequada do método de desidratação, aliada à padronização das condições de cultivo e coleta espectral, garante espectros de alta resolução com bandas bem definidas e interpretáveis, viabilizando identificações microbianas rápidas, precisas e clinicamente confiáveis. A qualidade do preparo da amostra não é um detalhe técnico, mas sim um fator determinante para o sucesso da análise e para a confiabilidade dos resultados obtidos.

Referências

ALAM, M.Z., Alam, Q., Jiman-Fatani, A. *et al. Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. *World J Microbiol Biotechnol*. v. 30, p. 1437–1451, 2014.

Cavalheiro, M., Teixeira, M. C. Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. Front. Med.

Franconi, I., et al. Rapid Identification of Clinically Relevant *Candida* spp. by I-dOne Software Using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy. *Journal of Fungi*, v. 11. n. 1, 2025.

Gómez-Gaviria, M., Mora-Montes, H. M. Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. *Infection and Drug Resistance*, v. *13*, p. 1673–1689, 2020.

KAUFMANN, G., et al. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for human infectious disease diagnosis, microbial identification and strain discrimination: a systematic review (2015–2025). Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, p. 128219, 2026.

MEDEIROS, A. G. J., et al., *Infrared Spectroscopy as a Promising Tool for Diagnosing and Typing Human Pathogenic Fungi*, *Mycoses,* v. 69, n. 1, 2026.

PEBOTUWA S, Kochan K, Peleg A, Wood BR, Heraud P. Influence of the Sample Preparation Method in Discriminating *Candida* spp. Using ATR-FTIR Spectroscopy. *Molecules*. v. 25, n. 7, 2020.

Robbins N, Cowen L. *Candida.* Current Biology, v. 35, n. 11, 2025.