

Universidade Brasil
Centro de Inovação em Engenharia Biomédica
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

ROGÉRIO PHILIPPOV DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS
(ATCC) DE INTERESSE CLÍNICO PARA DERMATITE ATÓPICA:
ESPECTROSCOPIA RAMAN**

São Paulo – SP
2020

ROGÉRIO PHILIPPOV DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS
(ATCC) DE INTERESSE CLÍNICO PARA DERMATITE ATÓPICA:
ESPECTROSCOPIA RAMAN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Airton Abrahão Martin
Co-Orientadores: Cláudio Alberto Téllez-Soto, Sonia Khouri

**São Paulo – SP
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

O51c OLIVEIRA, Rogério Philippov de
Caracterização e Padronização Bioquímica de Bactérias (Atcc) de Interesse Clínico para Dermatite Atópica: Espectroscopia Raman / Rogério Philippov de Oliveira. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2020.
92 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Airton Abrahão Martin.
Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Alberto Téllez-Soto.
Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

1. Dermatite Atópica. 2. Microbiologia Clínica. 3. Espectroscopia Vibracional Raman. I. Martin, Airton Abrahão. II. Téllez-Soto, Cláudio Alberto. III. Título.

CDD 620.82

TERMO DE APROVAÇÃO

ROGÉRIO PHILIPPOV DE OLIVEIRA

“CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS (ATCC) DE INTERESSE CLÍNICO PARA DERMATITE ATÓPICA: ESPECTROSCOPIA RAMAN”

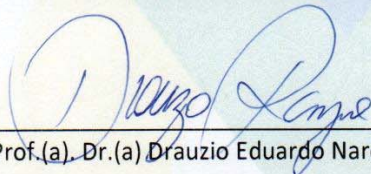
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:




Prof.(a). Dr.(a) Airton Abrahão Martin (presidente-orientador)



Prof.(a). Dr.(a) Claudio Alberto Téllez Soto (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof.(a). Dr.(a) Drauzio Eduardo Naretto Rangel (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof.(a). Dr(a) Sonia Khouri Sibelino (UNIVAP)

São Paulo, 12 de março de 2020

Presidente da Banca Prof(a). Dr(a) Airton Abrahão Martin

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: “**CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS (ATCC) DE INTERESSE CLÍNICO PARA DERMATITE ATÓPICA: ESPECTROSCOPIA RAMAN**”

Autor(es):

Discente: **Rogério Philippov de Oliveira**

Assinatura: _____

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Airton Abrahão Martin

Assinatura: _____

Coorientador(a): _____

Assinatura: _____

Data: 12/03/2020

AGRADECIMENTOS

Todo e qualquer agradecimento primeiramente o Rei dos Reis e Senhor dos Senhores Jesus Cristo, Dono e detentor da vida e da morte. Provérbios 2: 6. “Porque o SENHOR dá a sabedoria, e da sua boca vem o conhecimento e o entendimento”. Agradeço à minha esposa Veronika por toda a paciência, amor, apoio e auxílio em todos os momentos bons e difíceis.

Agradeço aos meus amigos e professores que estiveram sempre no apoio, corrigindo, ensinando, observando e auxiliando sempre na medida no possível.

Ao amigo e professor Cláudio Alberto Téllez Soto obrigado por toda atenção dedicada sempre quando possível e não somente no âmbito acadêmico, obrigado pela sua amizade e atenção. Uma gama preciosíssima de conhecimento não mediu esforços para orientar, apontar erros, discrepâncias e acertos com relação à espectroscopia vibracional.

A todos os professores, professora Sônia a qual não mediu esforços para que esse trabalho acontecesse, orientando e se dispondo a qualquer momento. À Prof^a Márcia Temperini e Prof^a Dalva, do Instituto de Química da USP e Fábio da Renishaw que gentilmente cederam a possibilidade de uso do ambiente laboratorial e utilização dos equipamentos Bruker e Renishaw. Professor Flávio Buratti Gonçalves, meu orientador no estágio em docência e abertura do espaço em sua sala de aula, E ao Me. Ícaro Matioli Barbosa, meu professor e amigo, pelo suporte e apoio em todos os sentidos desta pesquisa, tanto na parte biomédica e biológica, quanto de espectroscopia vibracional.

A empresa Theraskin Farmacêutica Ltda pelo apoio e incentivo no desenvolvimento deste projeto.

Ao Guilherme e ao laboratório no qual atua a Golden, pelas portas abertas. À Universidade Brasil e à CAPES pela oportunidade de realizar um sonho, que é a conclusão de uma etapa de um grande aprendizado e ao professor Dr. Airton Martin pela oportunidade de abrir o espaço na PROBES para o meu aprendizado e abraçar um novo e grande desafio na minha carreira. Grato. Muito grato.

Aos meus pais Tereza e Jozuel (in memoriam) aos quais também dedico este trabalho e que sempre procuraram me orientar no caminho do bem e da honra.

A todos os envolvidos direta ou indiretamente com este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O presente trabalho trata da análise e caracterização dos micro-organismos de maior importância relacionados com pele íntegra e em pacientes acometidos por dermatite atópica (DA). Foi proposto no decorrer desta pesquisa a observação do comportamento e mecanismos de ação dos micro-organismos colonizadores envolvidos em tecido cutâneo lesionado por DA e consequente perda de filagrina com alterações na barreira cutânea. A realização das análises deu-se por coleta com alça descartável diretamente das colônias nas culturas em placas de Petri. Espectroscopia Raman foi utilizado para analisar as cepas ATCC (American Type Culture Collection) de quatro micro-organismos, sendo eles, o *Staphylococcus aureus*-25923, *Staphylococcus epidermidis*-12228, *Streptococcus pyogenes*-19615 e *Pseudomonas aeruginosa* 10145. Através da segunda derivada, observou-se nos espectros Raman diferentes características em relação ao conteúdo proteico e lipídico entre as quatro bactérias analisadas. Através de métodos estatísticos (Média, Desvio Padrão espectrais, PCA - Análise de Componentes Principais e o Dendrograma de Ward), observou-se baixa dispersão e discrepância nos dados. A metodologia empregada pode mostrar a eficácia da espectroscopia Raman aplicada às amostras biológicas como ferramenta de verificação da integridade da barreira cutânea apresentando caminhos para o desenvolvimento futuro de novos fármacos, loções ou pomadas no auxílio ao tratamento de pacientes acometidos por dermatite atópica decorrente de biofilmes microbianos.

Palavras chave: Dermatite Atópica, Micro-organismos, Espectroscopia Raman, Integridade da Barreira Cutânea.

ABSTRACT

The present work deals with the analysis and characterization of the most important microorganisms related to intact skin and in patients affected by atopic dermatitis (AD). During the course of this research, it was proposed to observe the behavior and mechanisms of action of colonizing microorganisms involved in skin tissue damaged by AD and the consequent loss of filaggrin with changes in the skin barrier. The analyzes were performed by collection with a disposable loop directly from the colonies in the cultures in Petri dishes. Four microorganisms were analyzed by Raman spectroscopy, namely ATCC (American Type Culture Collection) strains of *Staphylococcus aureus*-25923, *Staphylococcus epidermidis*-12228, *Streptococcus pyogenes*-19615 and *Pseudomonas aeruginosa* 10145. Through 2nd derivatives, the Raman spectra showed different characteristics in relation to the protein and lipid content among the four bacteria analyzed. Statistical methods such as spectral mean and standard deviation, PCA (Principal Component Analysis) and Ward's Dendrogram were also applied, in which all showed low dispersion and discrepancy in their data. The methodology employed can show the efficacy of Raman spectroscopy applied to biological samples as a tool for determining the skin barriers integrity and presenting paths for the future development of new drugs, lotions or ointments in helping the treatment of patients affected by atopic dermatitis resulting from microbial biofilms.

Key words: Atopic Dermatitis, Microorganisms, Raman Spectroscopy, Skin Barriers Integrity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP - Péptidos Antimicrobianos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

DA – Dermatite Atópica

DSF - Diffusible Signal Factor

EPC Equipamento de Proteção Coletiva

EPI - Equipamento de Proteção Individual

FSD - Fator de Sinal Difusível

FTIR – Fourier Transform Infrared

GAS - Streptococcus do Grupo A

IFN- γ - Interferon Gamma

IgE – Imunoglobulina E

SPE - Substância Polimérica Extracelular

SPF - Specific Pathogen-Free

spp - Espécies

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	14
2.1	Geral	14
2.2	Específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	Anatomia da Pele Humana	15
3.1.1	Epiderme	15
3.1.2	Derme	16
3.1.3	Camada Basal	16
4.	DERMATITE ATÓPICA	17
4.1	Micro-Organismos da Pele	19
5.	BACTÉRIAS	20
5.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
5.1.2	Carboidratos	24
5.1.3	Lipídeos	25
5.1.4	Proteínas	26
5.1.5	Bases Nitrogenadas	27
5.1.6	Estrutura Celular Bacteriana	28
5.1.7	Estrutura da Bicamada Fosfolipídica das Bactérias	29
5.1.8	Fases do Crescimento Bacteriano	30
6.	MÉTODOS ESTATÍSTICOS	32
7.	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL	33
7.1	Caracterização Por Espectroscopia Raman	34
8.	METODOLOGIA	36
8.1	Preparação da Amostra	36
8.2	Análise Espectral	38
9.	RESULTADOS	41
9.1	Atribuição de Bandas	41
9.2	Análise dos Espectros	45

9.3 Tabelas e Cálculos de Conteúdo Lipídico	46
10. MÉTODOS ESTATÍSTICOS E SEUS RESULTADOS	68
11. DISCUSSÃO	73
12. CONCLUSÃO	79
13. TRABALHOS FUTUROS	80
14. ATUAÇÃO EM EVENTOS E CONGRESSOS DURANTE A PESQUISA	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (DA) - Tecido Epitelial, Epiderme, Derme, Hipoderme e anexos	16
Figura 2: (DA) - Eritema Papulas / Vesículas Espongióticas	18
Figura 3: (DA) - Escoriações, Erosões	18
Figura 4: (DA) - Despigmentação, Liquenificação	18
Figura 5: Microbiota residente em simbiose com a pele e disbiose cutânea	20
Figura 6: Diagrama esquemático da formação de biofilmes	21
Figura 7: Conformação estrutural de alguns Carboidratos	24
Figura 8: A conformação estrutural de alguns Lipídeos	25
Figura 9: A conformação regular da espinha dorsal do polipeptídeo	26
Figura 10: Esquema Estrutural das Bases Nitrogenadas - DNA e RNA	27
Figura 11: Diferenças entre as bicamadas Fosfolipídicas entre as bactérias Gram positivas e Gram negativas	29
Figura 12: Colônias microbianas em fase de crescimento exponencial	31
Figura 13: Curva de crescimento logarítmico e declínio microbiano	32
Figura 14: Esquema dos mecanismos de espalhamentos Raman	35
Figura 15: Exemplos de espectro Raman de diferentes gêneros de bactérias	36
Figura 16: Biomassa microbiana depositada em Suporte de Alumínio	38
Figura 17: Incidência do laser Raman em suporte de alumínio indicando 8 quadrantes com 3 giros em 8 pontos e 1 giro em 6 pontos	39
Figura 18: 30 pontos em regiões diferentes da amostra Obtenção de um total de 120 espectros de 4 amostras microbianas	40
Figura 19: Espectro Médio dos 4 micro-organismos com suas variações de intensidade e diferenças de picos entre si	41
Figura 20: Espectro Médio dos 4 micro-organismos com suas variações de intensidade e diferenças de picos entre si sendo apresentadas em 3D	42

Figura 21: Espectro Raman de <i>S.epidermidiss</i> . Pico primitivo deconvoluído com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de CH ₂ / CH ₃ nas regiões entre 3000 – 1200 cm ⁻¹	46
Figura 22: Diagrama Circular representando as diferenças entre o conteúdo Proteico e Lipídico do micro-organismo <i>Staphylococcus epidermidis</i>	48
Figura 23: Espectro Raman de <i>S.aureus</i> . Pico primitivo deconvoluido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de CH ₂ / CH ₃ nas regiões entre 3000 – 1200 cm ⁻¹	49
Figura 24: Diagrama Circular representando as diferenças entre o conteúdo Proteico e Lipídico do micro-organismo <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Figura 25: Espectro Raman de <i>S.pyogenes</i> . Pico primitivo deconvoluido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de CH ₂ / CH ₃ nas regiões entre 3000 – 1200 cm ⁻¹	51
Figura 26: Diagrama Circular representando as diferenças entre o conteúdo Proteico e Lipídico do micro-organismo <i>Streptococcus pyogenes</i>	52
Figura 27: Espectro Raman de <i>P.aeruginosa</i> . Pico primitivo deconvoluido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de CH ₂ / CH ₃ nas regiões entre 3000 – 1200 cm ⁻¹	53
Figura 28: Diagrama Circular representando as diferenças entre o conteúdo Proteico e Lipídico do micro-organismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
Figura 29: Espectro Raman de <i>Staphylococcus epidermidis</i> . Pico primitivo deconvoluido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de Amida I nas regiões entre 1750–1500 cm ⁻¹	55
Figura 30: Conformação Molecular da Tirosina	56
Figura 31: Conformação da Timina	56
Figura 32: Diagrama Circular representando as diferenças entre as estruturas proteicas do micro-organismo <i>Staphylococcus epidermidis</i>	57
Figura 33: Espectro Raman de <i>Streptococcus. pyogenes</i> . Pico primitivo deconvoluido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de Amida I nas regiões entre 1750–1500 cm ⁻¹	58
Figura 34: Estrutura Molecular da Guanina	58
Figura 35: Diagrama Circular representando as diferenças entre as estruturas proteicas do micro-organismo <i>Streptococcus pyogenes</i>	60
Figura 36: Espectro Raman de <i>S.aureus</i> . Pico primitivo deconvoluido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de Amida I nas regiões entre 1750–1500 cm ⁻¹	61

Figura 37: Biosíntese da Ceramida 1-Fosfato	62
Figura 38: Diagrama Circular representando as diferenças entre as estruturas proteicas do micro-organismo <i>Staphylococcus aureus</i>	64
Figura 39: Espectro Raman de <i>P. aeruginosa</i> . Pico primitivo deconvoluido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de Amida I nas regiões entre 1750–1500 cm ⁻¹	65
Figura 40: Estrutura molecular da Cortisona	66
Figura 41: Estrutura em 3D da Nicotinamida	66
Figura 42: Diagrama Circular representando as diferenças entre as estruturas proteicas do micro-organismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
Figura 43: Média e Desvio Padrão do espectro Raman de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas regiões entre 400 a 1800 cm ⁻¹	69
Figura 44: Média e Desvio Padrão do espectro Raman de <i>Staphylococcus aureus</i> nas regiões entre 400 a 1800 cm ⁻¹	69
Figura 45: Média e Desvio Padrão do espectro Raman de <i>Streptococcus pyogenes</i> nas regiões entre 400 a 1800 cm ⁻¹	70
Figura 46: Média e Desvio Padrão do espectro Raman de <i>Staphylococcus epidermidis</i> nas regiões entre 400 a 1800 cm ⁻¹	70
Figura 47: Classificação e separação das 4 bactérias por Análise de Componentes Principais (PCA)	71
Figura 48: Dendrograma de ligação de Ward apresentando as diferenças e similaridades entre os grupos das 3 bactérias Gram positivas e 1 Gram negativa	73

TABELAS

Tabela: 1 - Espectro Raman e Segunda Derivada - *Staphylococcus epidermidis*, cm^{-1} 42

Tabela: 2 - Espectro Raman e Segunda Derivada - *Staphylococcus aureus*, cm^{-1} ---- 43.

Tabela: 3 - Espectro Raman e segunda derivada - *Streptococcus pyogenes*, cm^{-1} ---- 43.

Tabela: 4 - Espectro Raman e Segunda Derivada – *Pseudomonas aeruginosa*, cm^{-1} - 44

Tabela: 5 - Análise e resultados de conteúdo proteico e lipídico nas regiões de CH_2/CH_3 – *Staphylococcus epidermidis* ----- 47

Tabela: 6 - Análise e resultados de conteúdo proteico e lipídico nas regiões de CH_2/CH_3 – *Staphylococcus aureus* ----- 49

Tabela: 7 – Análise e resultados de conteúdo proteico e lipídico nas regiões de CH_2/CH_3 – *Streptococcus pyogenes* ----- 51

Tabela: 8 – Análise e resultados de conteúdo proteico e lipídico nas regiões de CH_2/CH_3 – *Pseudomonas aeruginosa* ----- 53

Tabela: 9 – Análise e resultados de estrutura proteica nas regiões de Amida I – *Staphylococcus epidermidis* ----- 57

Tabela: 10 – Análise e resultados de estrutura proteica nas regiões de Amida I – *Streptococcus pyogenes* ----- 61

Tabela: 11 – Análise e resultados de estrutura proteica nas regiões de Amida I – *Staphylococcus aureus* ----- 65

Tabela: 12 – Análise e resultados de estrutura proteica nas regiões de Amida I – *Pseudomonas aeruginosa* ----- 68

1. INTRODUÇÃO

A pele, é compreendida como o maior órgão do corpo humano desempenhando importante papel na fisiologia humana. Organizada como um conjunto de células, em camadas altamente estruturadas incluindo a epiderme, derme e regiões subcutâneas. Essas estruturas comportam-se como hospedeira de centenas de micro-organismos a partir do momento do nascimento de qualquer pessoa em diferentes locais, com fisiologia única e nichos imunológicos como: vírus, bactérias e organismos eucariotos, como os fungos. Tanto as espécies de micro-organismos quanto os tecidos subjacentes, fornecem uma oportunidade para estudos sobre interações hospedeiro-microbioma na inflamação atópica / alérgica ou autoimune. Embora não nos pareça semelhante a outros órgãos, como o fígado ou o cérebro, a pele é o maior deles. É um órgão muito interessante, pois apresenta grandes variações de espessura, composição celular e estruturas anexas dependendo da região do corpo onde está localizada. As diferenças entre as regiões distintas são de fundamental importância para a cosmetologia e para uma melhor compreensão *in loco* de determinados gêneros e espécies de micro-organismos, pois a formulação de um produto deve atender aos requisitos necessários para que seja eficaz na função a que se propõe a temperatura corporal, o metabolismo de substâncias essenciais ao organismo e a comunicação com o meio externo através de suas funções sensoriais, como o tato (Fyhrquist *et al.*, 2019; Barnard, Li., 2016; Segger, 2007).

Dentre as lesões cutâneas ocorridas no decorrer de anos está a dermatite atópica (DA), que é descrita como uma doença crônica, pruriginosa inflamatória da pele que ocorre frequentemente em crianças, mas também pode afetar adultos, sendo uma doença recidiva. Estudos indicam a DA frequentemente associada a níveis elevados de imunoglobulina sérica (IgE) e história pessoal ou familiar de alergia tipo I, rinite alérgica e asma. A disbiose relacionada à DA é frequentemente caracterizada pela colonização por *Staphylococcus aureus* e perda simultânea de outras espécies potencialmente benéficas. (Lawrence *et al.*, 2014; Campana *et al.*, 2018).

O termo dermatite deriva do grego "derma", que significa pele, e "itis", que significa inflamação. Dermatite e eczema são muitas vezes utilizados como sinônimos, embora o termo eczema às vezes é reservado para a manifestação aguda da doença (do grego, ekzema, para ferver); aqui, nenhuma distinção é feita. Ao longo dos anos, muitos outros nomes têm sido propostos para a doença, por exemplo, o prurido Besnier (o comichão de Besnier), em homenagem ao

dermatologista francês Ernest Besnier (1831-1909). A sensibilização alérgica e a elevada imunoglobulina E (IgE) estão presentes apenas em cerca de metade de todos os doentes com a doença, pelo que a DA não é um termo definitivo (Thomsen.,2014).

As variadas complicações da pele decorrente de distúrbios na barreira cutânea, alterações no sistema imunológico assim como mutações genéticas, propiciam um ambiente perfeito para a proliferação de micro-organismos patogênicos de gêneros e espécies variadas. Embora estes organismos sejam considerados tipicamente comensais, quando encontram residência fora dos seus nichos ecológicos preferidos ou quando são apresentadas condições oportunistas aos mesmos, estes podem se tornar patogênicos. A composição taxonômica do microbioma da pele está bem caracterizada com relação ao seu gênero ou algumas vezes em nível de espécie, porém a sua composição em nível de estirpes e dinâmica, ainda são pouco conhecidas.

Segundo estudos realizados, duas das mais abundantes espécies bacterianas da pele: *Staphylococcus epidermidis* e *Propionibacterium acnes*, mostram níveis de estirpes diversificadas entre os indivíduos, estado da pele, e o local de amostras da pele (Fitz-Gibbon *et al.*. 2013).

Em laboratórios de rotina nos quais os protocolos analíticos visam uma maior rapidez e precisão nos resultados dos diagnósticos para controle de infecções e neste caso, infecções cutâneas o tratamento clínico das infecções causadas por *Staphylococcus sp* ou outro micro-organismo colonizador do tecido cutâneo por exemplo, podem diferir dependendo da causa real da infecção e portanto, torna-se viável desenvolver um método rápido e confiável para identificação desses micro-organismos. Técnicas analíticas de identificação e caracterização precisas e eficazes como a espectroscopia vibracional no infravermelho ou Raman, podem auxiliar na velocidade do diagnóstico e reduzir custos laboratoriais ou hospitalares em comparação às técnicas diagnósticas ligadas à biologia molecular. A espectroscopia vibracional Raman é, por exemplo, uma prática analítica na qual possibilita a análise de qualquer micro-organismo concernente à estruturas e discriminação bioquímica de células em tempo reduzido comparado aos métodos comumente utilizados e desta forma pode tornar-se uma ferramenta auxiliadora no campo analítico dermatológico (Dina *et al.*, 2017; Rebrošová *et al.*, 2017; Ho *et al.*, 2019;).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho é identificar e caracterizar os micro-organismos de importância clínica dermatológica responsáveis por infeccionar e lesionar o tecido cutâneo em pacientes com dermatite atópica aplicando a espectroscopia Raman.

2.2 Específicos

- Avaliar e caracterizar por intermédio da espectroscopia Raman o perfil de cada um dos quatro micro-organismos envolvidos nesta análise.
- Compreender as estruturas envolvendo conteúdo proteico e lipídicos de cada bactéria por espectroscopia Raman.
- Analisar as diferenças de cada bactéria co-relacionando as estruturas de proteínas e conteúdo proteico/lipídico na resistência microbiana em lesões de dermatite atópica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomia da pele Humana

A pele apresenta funções vitais a maioria dos outros órgãos do corpo humano e atua como barreira protetora contra agressões físicas, químicas e bacteriológicas no corpo, como também oferece controle hídrico concernente à evaporação evitando assim total desidratação. A pele igualmente permite a regulação de temperatura corporal por intermédio do sistema vascular, como por exemplo a rede de capilares que se estendem por toda pele da pele e das glândulas sudoríparas écrinas. A pele também age como mediador em relação ao tato e da mesma forma atua com relação à resposta imunológica e síntese de hormônios. Com o envelhecimento, a maioria das funções vitais da pele vão se degradando e como exemplo observa-se o fotoenvelhecimento, no qual é um processo cumulativo e esse processo é geralmente mais grave em pessoas idosas (Rittlé; Fischer., 2015).

Recobrando a superfície do corpo ela é dividida em porções, nas quais a porção ectodérmica é representada pela epiderme, porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme e a porção de tecido conjuntivo frouxo contendo células adiposas constituindo o panículo adiposo. A mesma pode por intermédio de várias terminações nervosas sensitivas receber constantemente informações concernente ao ambiente em que está exposta e dessa forma envia essas informações ao sistema nervoso central (Junqueira; Carneiro., 2011).

3.1.1 Epiderme

Junqueira e Carneiro, 2011 relatam a epiderme como sendo constituída por três tipos de células: Os Melanócitos, as Células de Langerhans e as células de Merkel sendo os queratinócitos as células em maior abundância. A epiderme é provida por cinco camadas basais que são: Camada basal no qual juntamente com a camada espinhosa são responsáveis pela constante renovação da epiderme por intermédio da grande atividade mitótica presente nesta região, a camada espinhosa no qual os filamentos de queratina e os desmossomos atuam em função de manter a manutenção na coesão entre as células da epiderme e na resistência aos atritos, a camada granulosa é repleta de querato-hialina envolvidas por membrana e contendo proteínas como histidina fosforilada e cistina. Os grânulos lamelares presentes também nesta camada, são responsáveis por formar barreira contra a penetração de substâncias e torna a pele impermeável à água, impedindo a desidratação do organismo. A camada lúcida é a camada mais evidente na pele espessa apresentando o citoplasma com numerosos filamentos de queratina e é constituída por células

achatadas, eosinófilas e translúcidas. E a camada córnea varia muito em sua espessura e está repleta de queratina e os tonofilamentos aglutinam-se à matriz formada pelos grânulos de querato-hialina nos quais se descamam continuamente (Junqueira; Carneiro.,2011).

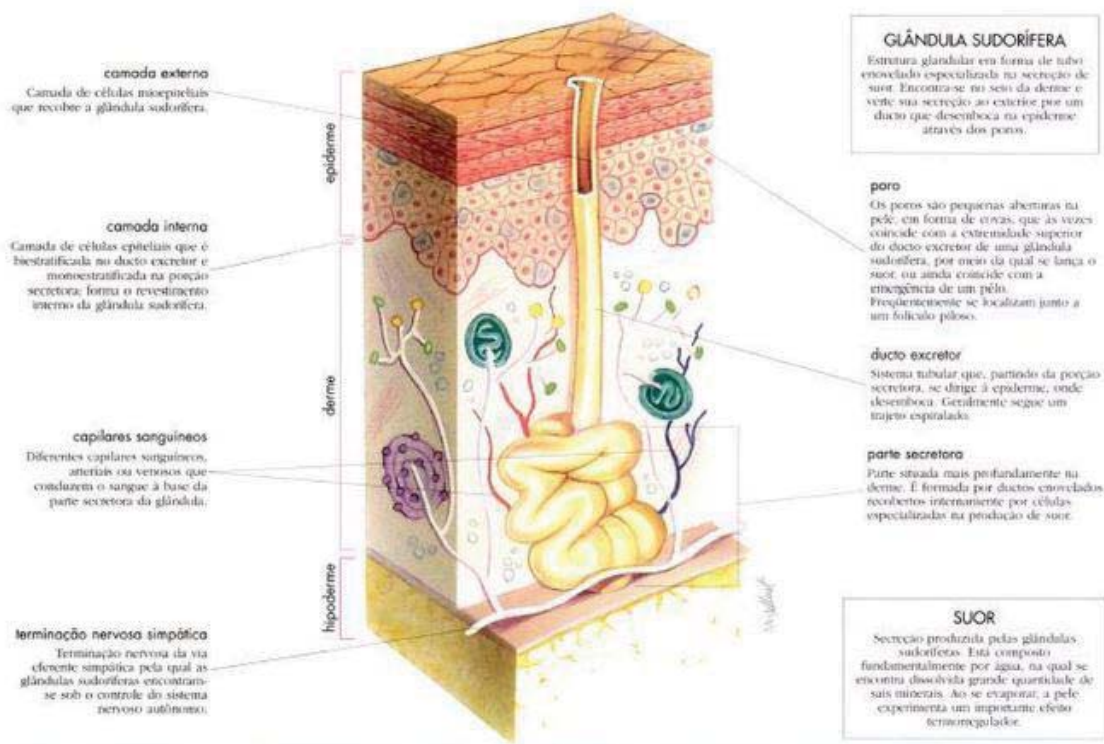


Figura 1: Tecido Epitelial, Epiderme, Derme, Hipoderme e anexos.

Fonte: Junqueira; Carneiro, 2011

3.1.2 Derme

A derme é a camada da pele composta por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, glândulas que promovem oleosidade na pele, suor, nervos, folículos pilosos e outras estruturas assim como na derme reticular. É composto de uma fina camada superior chamada derme papilar, e uma camada mais espessa denominada derme reticular. A derme papilar é responsável por nutrir à epiderme mediante os inúmeros vasos sanguíneos e contribui para também controlar a temperatura da pele (PubMed Health., 2017).

3.1.3 Camada Basal

Lancerotto *et al.*, caracteriza a camada basal (hipoderme) por septos fibrosos conectando à derme com o tecido adiposo. Esses septos são compostos por fibras elásticas e colágenas definindo lóbulos ovais-poligonais de células gordurosas,

formando o que se denomina rede colagênica periadipocitária, com compartimentos bem vascularizados por capilares. Essa estrutura desempenha importante papel na preservação da integridade celular e pode, conseqüentemente, influenciar os resultados de transplantes de gordura autóloga. Por meio da dissecação de cadáveres em suas análises Lancerotto *et al.*, identificou sobre a derme, uma primeira camada de tecido adiposo formando grandes lóbulos gordurosos encerrados entre os septos fibrosos em uma estrutura tipo favo de mel, e apresentou características quase constantes ao longo de todo. Estes septos eram bem definidos, orientados na maior parte perpendicular à superfície e mecanicamente fortes, ancorando a derme para os planos mais profundos. Os lobos gordurosos eram organizados em camadas simples a múltiplas, dependendo do teor de gordura e espessura do tecido superficial adiposo no indivíduo (Lancerotto., 2011).

4. DERMATITE ATÓPICA

A dermatite atópica (DA), conhecida em muitas literaturas como eczema cutâneo, apresenta-se como uma doença inflamatória crônica da pele caracterizada por lesões pruriginosas, escamosas e com presença de crostas tipicamente em superfícies flexoras. Fatores genéticos e características fisiopatológicas tem contribuído para que 50% dos pacientes acometidos por DA, estejam também relacionados com outras enfermidades como rinite alérgica e asma (Narala; Hata., 2017).

A DA é considerada uma doença complexa no qual está intrínseca a sua interação com a genética, por motivo de alterações da barreira cutânea de pacientes afetados por DA a estrutura da pele destes pacientes apresentam sinais característicos, os distúrbios imunológicos e não imunológicos, sendo vários fatores participantes da sua patogênese (Rodrigues *et al.*, 2010).

Neste interim, citamos em relação à pele a proteína filagrina, no está contida nos grânulos de querato-hialina sendo esta responsável por ativar as enzimas trigliceridase, as quais agregam a queratina e também outras proteínas nas camadas mais superficiais da epiderme. A filagrina é a principal proteína responsável pela formação de barreira do estrato córneo e ela fornece uma barreira de proteção cutânea e tendo a importante função de bloquear possíveis substâncias nocivas substâncias, impede a perda de fluídos vitais, sendo formada e continuamente regenerada pelos queratinócitos. É extremamente importante que sua integridade seja mantida intacta para a homeostase da hidratação do estrato córneo. A deficiência da proteína filagrina pode levar à falência da proteção da barreira cutânea e

consequentemente permitindo a penetração de alérgenos nos quais podem desencadear uma cascata de reações alérgicas na pele. (Addor; Aoki, 2009; Archer, 2019).



Figura 2: Eritema Papulas / Vesículas Espongióticas



Figura 3: Escoriações, Erosões



Figura 4: Depigmentação, Liquenificação

Fonte: Siegried, 2015

4.1 Micro-Organismos da pele

A pele humana é devidamente exposta à vários agentes causadores de alergias ou até mesmo deterioração cutânea em várias das ocasiões do dia a dia, sejam eles agentes químicos, físicos, de ordem ambiental ou microbiano. Nesta pesquisa será dado enfoque à sensibilidade, a irritação e as lesões cutâneas por intermédio da interligação entre processo inflamatório e os fatores microbiológicos relacionados à DA. Como resultado da constante exposição cutânea à bactérias, fungos, vírus e protozoários nos quais transitoriamente ou, permanentemente habitam regiões do corpo, muitas destas espécies microbianas formam um ecossistema complexo. A microbiota cutânea é responsável por preencher a epiderme e a unidade pilossebácea da pele humana. Aproximadamente 1000 espécies bacterianas pertencentes a 19 filos, bem como fungos (Dermatófitos) e espécies virais foram identificados como membros desta comunidade. Actinobactérias (espécies de *Propionibacterium* e *Corynebacterium*), Proteobacteria, Firmicutes (espécies de *Staphylococcus*) e Bacteroidetes são os representantes mais comuns dos quatro filos de bactérias dominantes. Muitos fatores (individuais, de estilo de vida, ambientais) influenciam a diversidade microbiana da pele humana e mudanças em qualquer uma dessas condições podem resultar em alterações rápidas da composição das espécies dentro da comunidade microbiana *in loco*, desta feita pode-se analisar a microbiota em pleno dinamismo e em constante possibilidade de mudança ou variabilidade concernente à colonização cutânea (Szabó *et al.*, 2016).

A relação entre pacientes acometidos por dermatite atópica e as infecções por micro-organismos pode ser melhor compreendida analisando o comportamento microbiano em um tecido cutâneo normal, íntegro e um tecido lesionado e comprometido por pruridos, inchaços, rubor, calor, processo inflamatório e perda da barreira cutânea. *Staphylococcus aureus* e bactérias do grupo β hemolíticos como os *Streptococcus pyogenes*, por exemplo, podem exacerbar a inflamação crônica da pele. Como resultado, antimicrobianos são prescritos para controlar a fase aguda da doença porém devido ao crescimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos os dermatologistas tem encontrado dificuldades na escolha da administração do fármaco adequado e na presença de dermatite disseminada com infecção secundária, antibióticos sistêmicos necessitam ser prescritos; no entanto, o tratamento deve ser individualizado, de forma a encontrar o antimicrobiano mais eficaz e com menores efeitos colaterais. Além disso, o fármaco deve ser utilizado pelo menor tempo possível, no objetivo de minimizar a resistência bacteriana. Em um tecido lesionado por exemplo com toxinas estafilocócicas e estreptocócicas pode haver ativação de células T,

indução à degranulação de mastócitos mediada por IgE e basófilos e ativar células inflamatórias. O uso de anti-sépticos tópicos, como a clorexidina, o triclosan e o hipoclorito, é uma opção para controlar a flora estafilocócica, mas pode causar irritação na pele (Petry *et al.*, 2012; Alexander *et al.*, 2019)

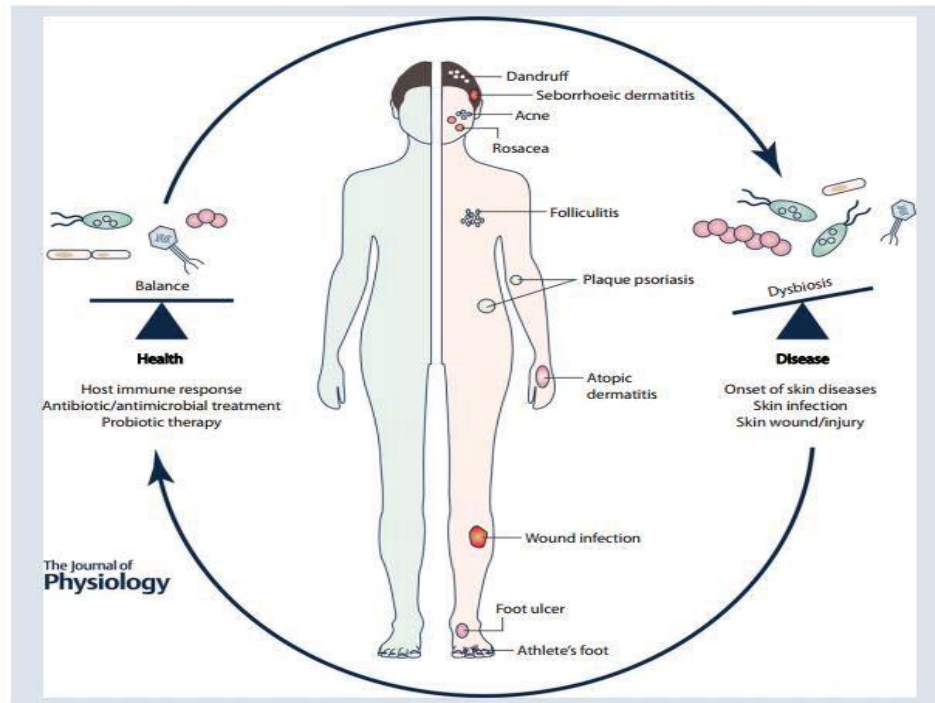


Figura 5: Microbiota residente em simbiose com a pele e disbiose cutânea decorrente de lesões e micro-organismos oportunistas patogênicos.

Fonte: Barnard, E; Li, H, 2016

5. BACTÉRIAS

A título de comparação entre as estruturas celulares entre os organismos vivos multivariados, desde os micro-organismos até o homem, das células mais simples a mais complexa compartilham certas propriedades fundamentais e características estruturais, todas elas são constituídas por compostos químicos. Vários compostos inorgânicos (sódio, potássio, ferro, magnésio, cálcio, cloro) podem ser observados em todos os organismos, porém os compostos orgânicos têm um maior significado biológico, atuando em muitas etapas cruciais do metabolismo e na definição de estruturas celulares e existindo milhares desses compostos orgânicos, a maioria dos quais podem ser agrupados em uma das quatro categorias principais: carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (DNA e RNA) como observado na descrição dos quatro micro-organismos em pauta neste trabalho e suas estruturas nos tópicos 5.1 a 5.1.8 (Trun, 2003; Mamy, 2015).

5.1 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*

Os micro-organismos *Staphylococcus epidermidis* são bactérias Gram-positivas nos quais apresentam morfologia em cachos ou tétrades tipicamente comensais da pele humana e encontra-se amplamente dominante na superfície e regiões internas da pele. Os papéis do *Staphylococcus epidermidis* comensal na saúde da pele são duplos. *Staphylococcus epidermidis* produz e secreta uma série de peptídeos antimicrobianos (AMPs), tais como modulinas solúveis em fenol (PSMs) e bacteriocinas, que podem prevenir diretamente a colonização de agentes patogénicos da pele incluindo *Streptococcus* do Grupo A (GAS), *Staphylococcus aureus* e mesmo outros.

Apesar de ser tipicamente considerado um organismo comensal, o *Staphylococcus epidermidis* pode comportar-se de forma diferente na pele quando houver desequilíbrio na homeostase cutânea, este é um ponto importante por se tratar da mesma bactéria, tendo papéis duplos, os de proteger a pele contra outros micro-organismos, e os de degradar a pele, com a formação de biofilmes como mecanismo patogénico. A natureza ubíqua de *Staphylococcus epidermidis* na pele humana e a sua capacidade para formar biofilmes resultaram numa elevada incidência de *Staphylococcus epidermidis* em infecções hospitalares, falência de dispositivos médicos e mesmo bacteriemia (Barnard; Li., 2016).

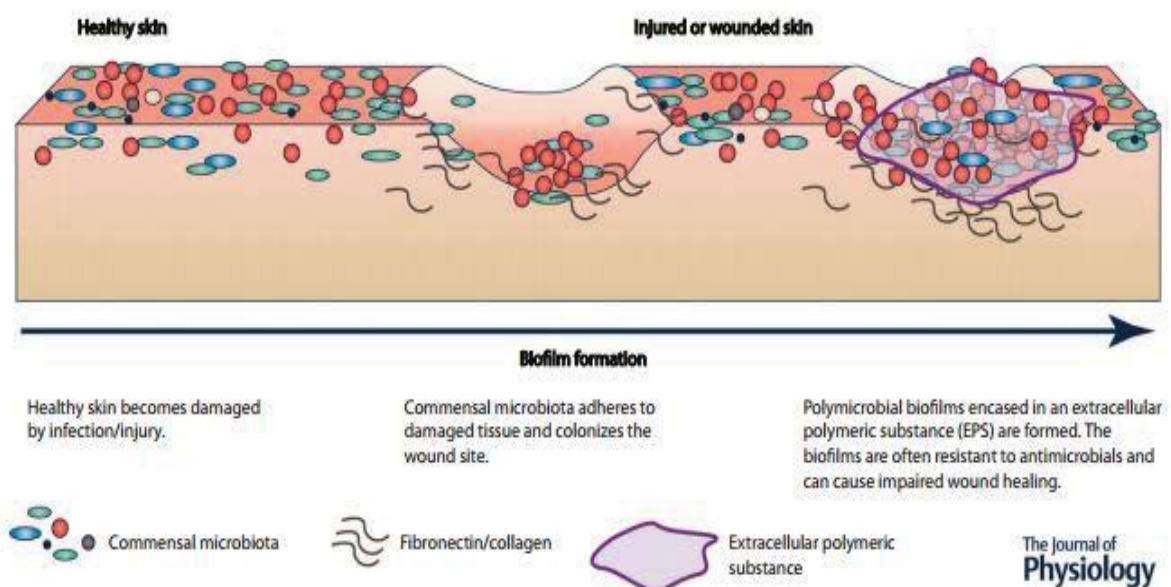


Figura 6: Diagrama esquemático da formação de biofilmes na cicatrização de feridas. Os microrganismos cutâneos comensais colonizam o local da ferida e aderem a tecidos do substrato expostos da superfície da ferida. As secreções de substâncias poliméricas extracelulares facilitam a maturação do biofilme, levando à formação de biofilmes polimicrobianos.

Fonte: Barnard, E; Li, H, 2016

A pele é composta de regiões compartimentalizadas com propriedades fisiológicas distintas, tais como pH, temperatura, umidade, nível de suor e conteúdo lipídico. Cada local representa um nicho ecológico que favorece o crescimento de sua própria coleção de micro-organismos. As comunidades microbianas em locais secos, úmidos e ricos em lipídios são em grande parte diferentes. As colônias microbianas mais diversas são encontradas nos locais secos e expostos da pele, como o antebraço e a palma. Um ponto relevante a se analisar é a relação entre os micro-organismos e a pele comprometida por algum tipo de lesão. Lesões, perfurações, queimaduras de 1º a 4º graus, arranhaduras são fatores nos quais podem estimular a formação de biofilme microbiano (Abdel-Sayed *et al.*, 2019).

Biofilmes são comunidades microbianas complexas encerradas em uma Substância Polimérica Extracelular (EPS). Este encaixe facilita as interações micróbio-micróbios e leva a uma maior virulência e resistência a muitos agentes antimicrobianos. Como resultado, a formação de biofilme complica o processo de cicatrização de feridas. Dentre as espécies do gênero *Staphylococcus* tem-se consolidado de fato pela literatura que a espécie aureus é responsável por grande parte das lesões ocorridas na pele e apresenta fatores extrínsecos relevantes no que diz respeito ao estímulo das respostas imunes em seu hospedeiro (Jamal *et al.*, 2018).

Estes micro-organismos são responsáveis por secretar ampla variedade de fatores de virulência nas regiões teciduais decorrentes da sua colonização como: polissacarídeos capsulares, peptídeoglicano e ácido teicóico, proteína A, hemolisinas, superantígenos, toxinas e enzimas importantes no que tange a degradação da região afetada. Os *Staphylococcus aureus* aderem à região cutânea formando biofilmes, colônias bacterianas nas quais secretam vesículas extracelulares contendo moléculas patogênicas como α -Lisina e cisteína protease, nas quais estão associadas à DA, foliculite simples e impetigo, queimaduras, eczemas, assim como furúnculos e carbúnculos, afetam não só o tecido cutâneo mas também, subcutâneo provocando sintomas sistêmicos e febre. Infecções sistêmicas podem ocorrer por infecções pós-cirúrgicas de feridas (Koneman *et al.*, 2012; Di Domenico *et al.*, 2018).

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose do gênero e espécie *Pseudomonas aeruginosa* são micro-organismos tipicamente do solo mas, podendo perfeitamente ser encontrados nos mais diversos tipos de ambientes, inclusive

ambientes considerados hostis à sua sobrevivência e é dos isolados clínicos mais comuns. Infecções por *P. aeruginosa* prevalecem geralmente entre os pacientes com lesões por queimadura, feridas cutâneas exsudativas, fibrose cística, leucemia aguda, transplante de órgãos e usuários de drogas intravenosas e podem ocorrer em qualquer local aonde haja propensão ao acúmulo de umidade (Wu *et al.*, 2015)

Dentre as infecções de tecido mole ou cutânea tem-se relatos de dermatite e otite interna por *Pseudomonas aeruginosa* em piscinas e banheiras quentes, sendo também relatadas algumas infecções esporádicas relacionadas com a aplicação de piercing de orelha. Possui uma taxa de propensão alta concernente à resistência aos antibióticos e pode inibir outras bactérias (comensais) na região infeccionada, causando considerável dificuldade no tratamento. São micro-organismos nos quais liberam fatores de virulência tais como a piocianina, pioverdina, piorrubina, piomelanina, fluoresceína, proteases, liberação de LPS, exotoxina A, leucocidase, fosfolipase e várias outras enzimas envolvidas em seu mecanismo de resistência (Koneman *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2018).

Os *Streptococcus spp* são bactérias Gram-positivas clinicamente importantes pois são capazes de causar uma grande variedade de doenças em seres humanos e animais. As análises filogenéticas baseadas nas sequências de rRNA 16S das espécies estreptocócicas revelam um padrão de agrupamento, refletindo, com algumas exceções, o seu potencial patogénico e preferências ecológicas. A adesão microbiana aos tecidos hospedeiros é o evento crítico inicial na patogênese da maioria das infecções (Lal *et al.*, 2011; Kosecka-Strojek *et al.*, 2019).

Os *Streptococcus* utilizam múltiplas adesinas para se ligar ao epitélio e a sua expressão é regulada em resposta às condições ambientais e de crescimento. As adesinas bacterianas reconhecem e ligam moléculas de superfície celular e componentes de matriz extracelular através de domínios específicos que para certas famílias de adesina foram bem definidos e encontrados conservados através das espécies de *Streptococcus*. Devido à sua complexa identificação estabeleceu-se um sistema dicotômico no qual as propriedades hemolíticas da amostra e com isso os estreptococos são classificados como α hemolíticos (quando causam a lise parcial das hemácias), β hemolíticos (quando causam a lise total das hemácias) e γ hemolíticos (não causam lise nas hemácias). Os *Streptococcus* são divididos em grupos sorológicos de Lancefield baseado nas características antigênicas de polissacarídeos variados chamados Carboidratos C e os grupos se estendem de A à V (Moschioni *et al.* 2010; Wang *et al.*, 2019).

As espécies dos grupos A, B e G terão grande respaldo nesta pesquisa visto que estes são de grande importância com relação à cutis humana. Os estreptococos do Grupo G contituem parte da microbiota natural h gastrintestinal, vaginal, orofaríngea e cutânea. As infecções causadas por estreptococos do Grupo G estão associadas à faringite, otite média, infecções pulmonares, celulite, tromboflebite séptica, bacteremia, endocardite, meningite e relatos de infecções graves relacionadas com próteses ósseas (Trabulsi., 2012).

5.1.2 Carboidratos

A literatura descreve os carboidratos em ordem de classificação como pertencentes aos grupos dos monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos nos quais são designados como compostos orgânicos incluindo açúcares e amidos, apresentam estrutura atômica como carbono, hidrogênio e oxigênio. As paredes celulares células bacterianas possuem essa fonte nutritiva de açúcares e amidos em sua membrana plasmática no qual também atua precursores de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos e atuando de forma pontual na atividade metabólica do micro-organismo. (Coulon, 2010; Silva, 2010; Nelson, David.L, 2011; Ferreira, 2016).

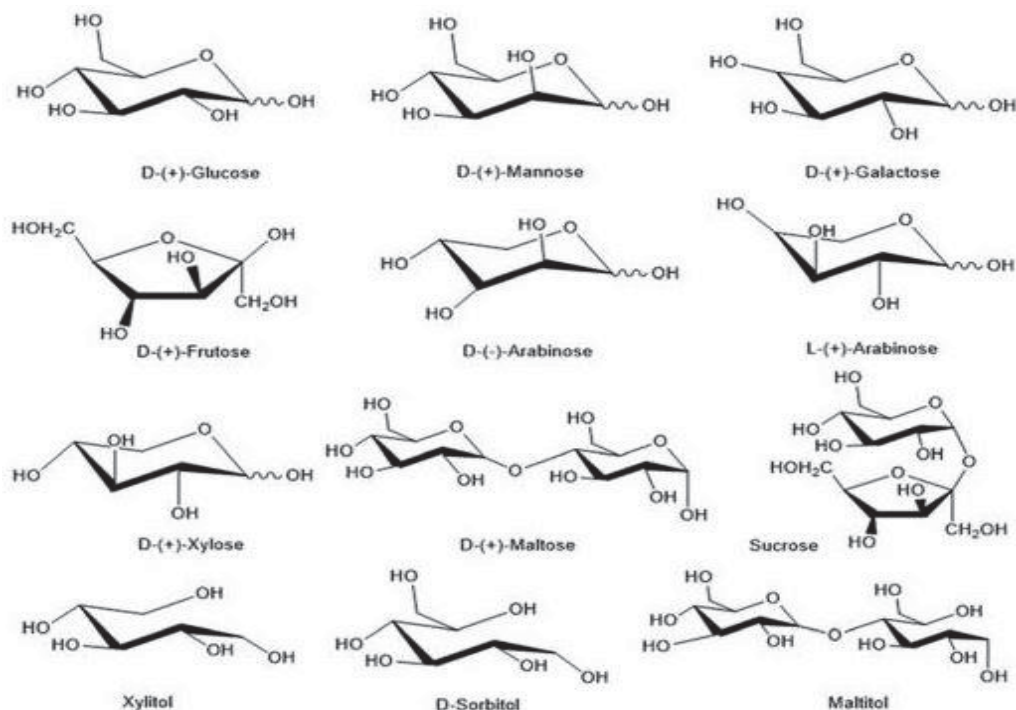


Figura 7: Conformação estrutural de alguns carboidratos

Fonte: Ferreira, A.M *et al*, 2016

5.1.3 Lipídios

Os Lipídeos como acila / alquila, glicano, glicerolípideos, glicerofosfolípideos e esfingolípideos. são moléculas extremamente importantes na função e patologia celular possuindo grande diversidade estrutural decorrente de fatores como comprimento variável de suas cadeias, uma infinidade de transformações bioquímicas oxidativas, redutoras, substituintes e formadoras de anéis, além de mudanças de conformação envolvendo resíduos de açúcar e outros grupos funcionais de diferentes origens biossintéticas. É essencial ter bancos de dados bem organizados de lipídios com informações estruturais relevantes e características relacionadas aos mesmos, tendo gêneros, espécies e subespécies de micro-organismos demonstrado claramente a capacidade de conferir resistência a variados fármacos em decorrência de sua membrana plasmática apresentar níveis diferenciados de lipídeos como por exemplo o complexo *Micobacterium tuberculosis*. (Fahy, 2011; David.L, 2011; Tsai, 2013; Nelson, Laufs, 2019)

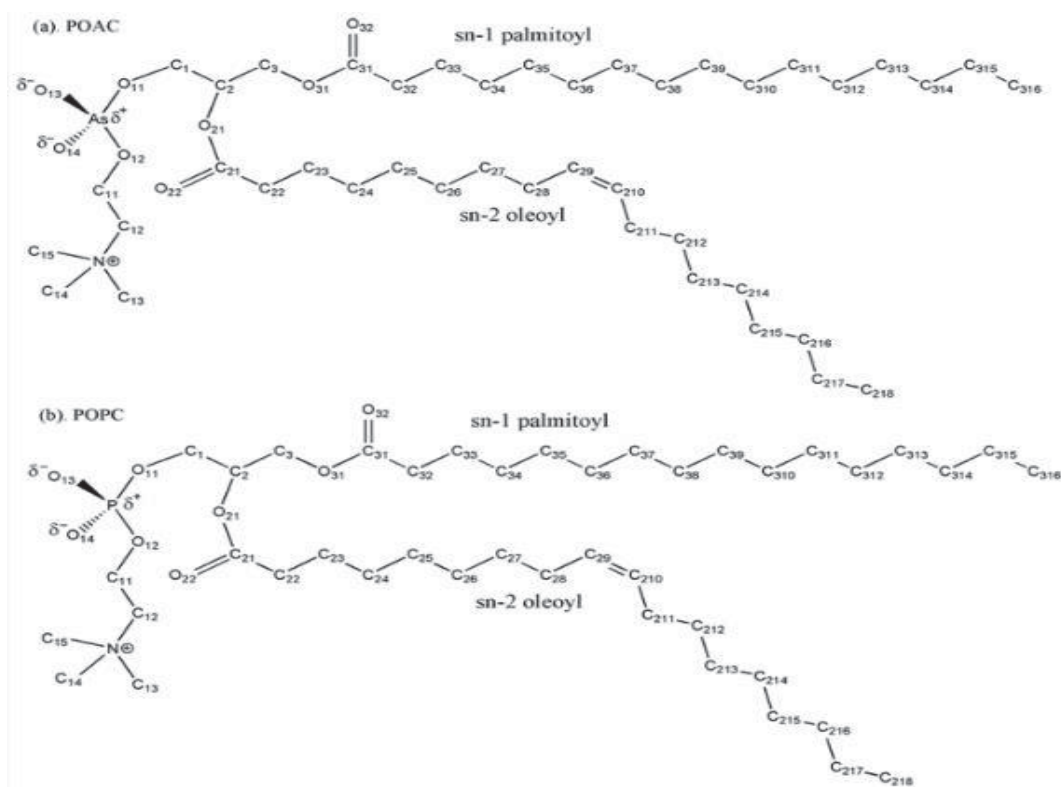


Figura 8: Conformação estrutural de alguns Lipídios

Fonte: Tsai, H.-H. *et al.*, 2013

5.1.4 Proteínas

As proteínas são as macromoléculas mais versáteis nos sistemas vivos e cumprem funções cruciais em essencialmente todos os processos biológicos e atuam como catalisadores, transportam e armazenam outras moléculas como o oxigênio, fornecem suporte mecânico e proteção imunológica, geram movimento, transmitem impulsos nervosos e controlam o crescimento e a diferenciação. As proteínas possuem um papel importantíssimo também com relação aos seres procariotos, pois as diferenças e mecanismos de virulência de muitas bactérias e outros organismos são advindas das variações e diferenças de estruturas, ou conformações proteicas como por exemplo os arranjos secundários: α -hélice e folha- β , ambas as estruturas unidas por pontes de hidrogênio entre os átomos de oxigênio ou nitrogênio fazem parte do esqueleto polipeptídico. Estruturas terciárias resultam do enrolamento da α -hélice ou da β -sheet, sendo estabilizadas por pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto. A junção de duas ou mais cadeias polipeptídicas, cada uma com sua própria estrutura secundária e terciária, combinam-se para gerar a estrutura quaternária (Berg, 2002; Silva, 2010; Nelson, David.L, 2011; Fisher, J. F.; Mobashery, S, 2019; Alberts, B, 2002).

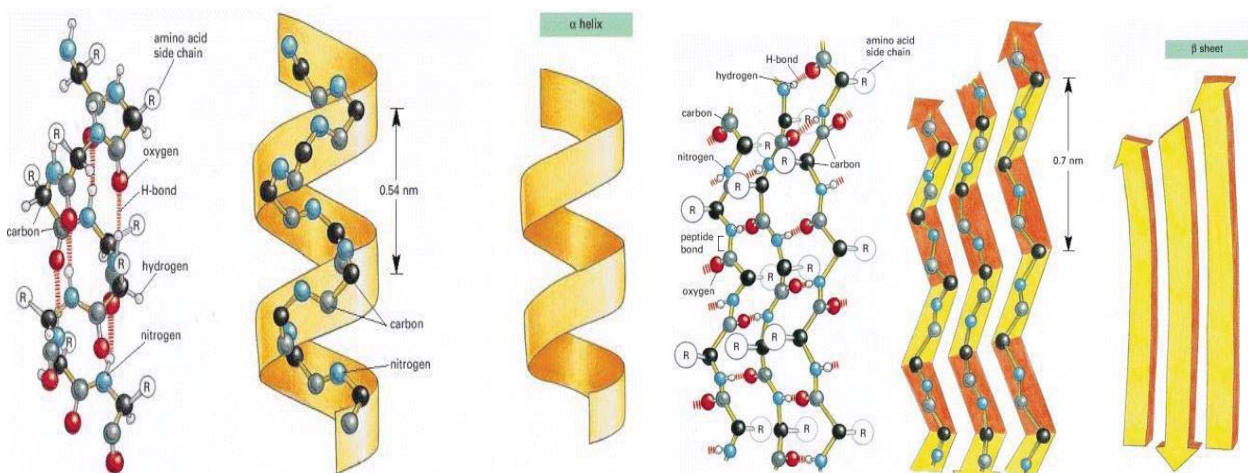


Figura 9: A conformação regular da espinha dorsal do polipeptídeo observada na α -Helix e na β -Sheet

Fonte: Alberts, B. *et al.*, 2002

5.1.5 Bases Nitrogenadas – DNA / RNA

Os ácidos nucleicos são grandes moléculas, formada por longas cadeias de nucleotídeos. Estes são compostos de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e átomos de fósforo. Os ácidos nucleicos principais e responsáveis por toda atividade metabólica são o ácido desoxirribonucleico (DNA) o qual armazena informações e o ácido ribonucleico (RNA) envolvido nas etapas de biossíntese proteica e expressão gênica. Cada nucleotídeo possui 3 elementos em sua estrutura: Um açúcar, um grupo fosfato e uma base nitrogenada. As bases nitrogenadas no DNA são: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T). No RNA a adenina, guanina e citosina estão presentes, porém uracil (U) encontra-se no lugar da timina (Lodish, H, 2000; Silva, 2010; Nelson, David.L, 2011).

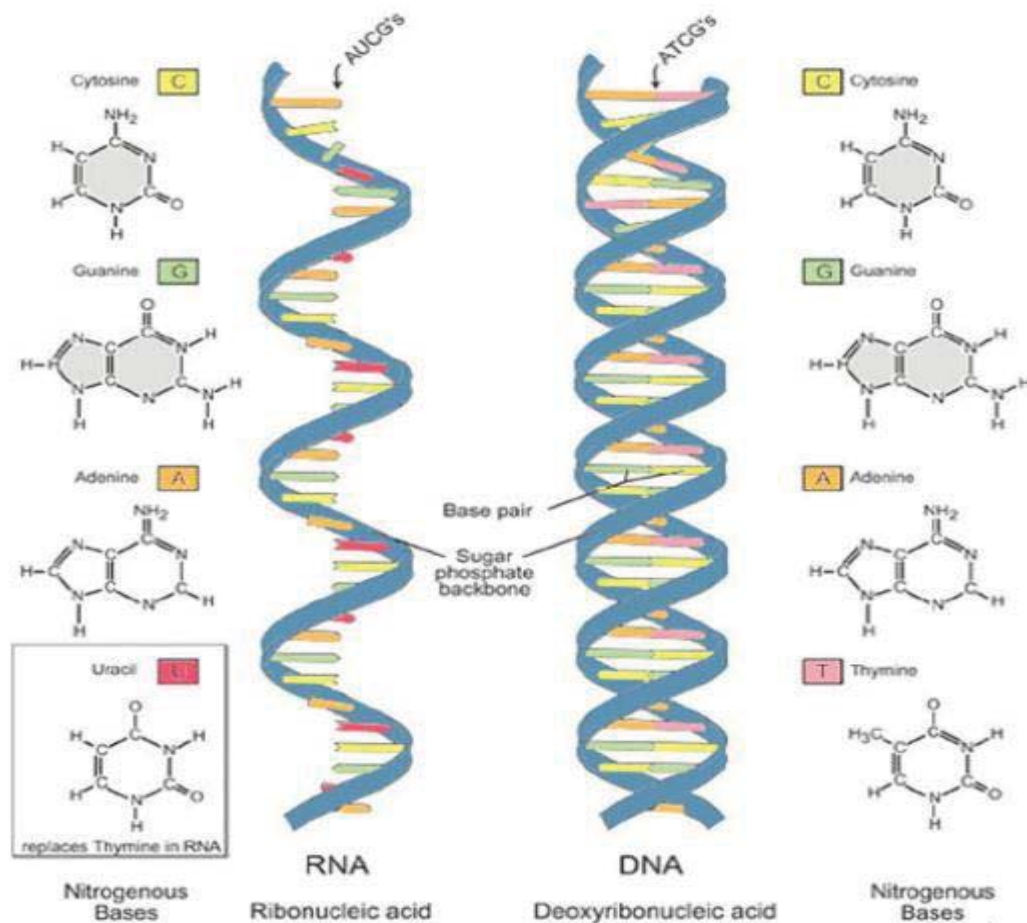


Figura 10: Esquema Estrutural das Bases Nitrogenadas - DNA e RNA

Fonte: Thies, J.E., 2015

5.1.6 Estrutura Celular Bacteriana

A estrutura celular bacteriana consiste na membrana plasmática, na parede celular e, no caso de bactérias Gram-negativas, na membrana externa. Ele determina a forma, as propriedades da superfície e a permeabilidade do soluto das bactérias e serve como uma interface pela qual as bactérias interagem e se comunicam entre si e com o meio ambiente. Portanto, o envelope bacteriano tem funções decisivas na fisiologia bacteriana, morfogênese, captação e liberação de substâncias, sensibilidade ou resistência a agentes antimicrobianos, desempenha um papel importante nas infecções, pois provoca reações imunes e está envolvido na evasão imunológica. e processos biotecnologicamente relevantes.

É composta por uma camada interna de peptidoglicano, envolta por uma membrana externa, que varia em espessura e em composição química dependendo do tipo de bactéria. O peptidoglicano é uma rede macromolecular, conhecido também como mureína, que está presente isoladamente ou em combinação com outras substâncias. O peptidoglicano é um componente essencial do envelope celular bacteriano e protege a célula contra a ruptura e mantém a forma da célula. Composto por cadeias de glicano conectadas por peptídeos curtos, o peptidoglicano forma uma macromolécula semelhante a uma rede em torno da membrana citoplasmática. Existe uma variação estrutural significativa nos peptidoglicanos de diferentes bactérias. Os patógenos modificam o peptidoglicano para se tornarem resistentes à lisozima. O peptidoglicano transporta componentes da superfície celular fixados covalentemente, como ácido teicóico, polissacarídeo capsular e proteínas da parede celular. Os precursores de peptidoglicano são sintetizados no citoplasma e vinculados a um lipídeo de poliprenil fosfato para transporte através da membrana citoplasmática. Os complexos de síntese de peptidoglicano são controlados por componentes do citoesqueleto bacteriano. As bactérias Gram-negativas também regulam a síntese de peptidoglicano pelas proteínas da membrana externa. (Silva, 2010; Braun, 2015; George,K; Douglas, 2017; Konemam, 2012).

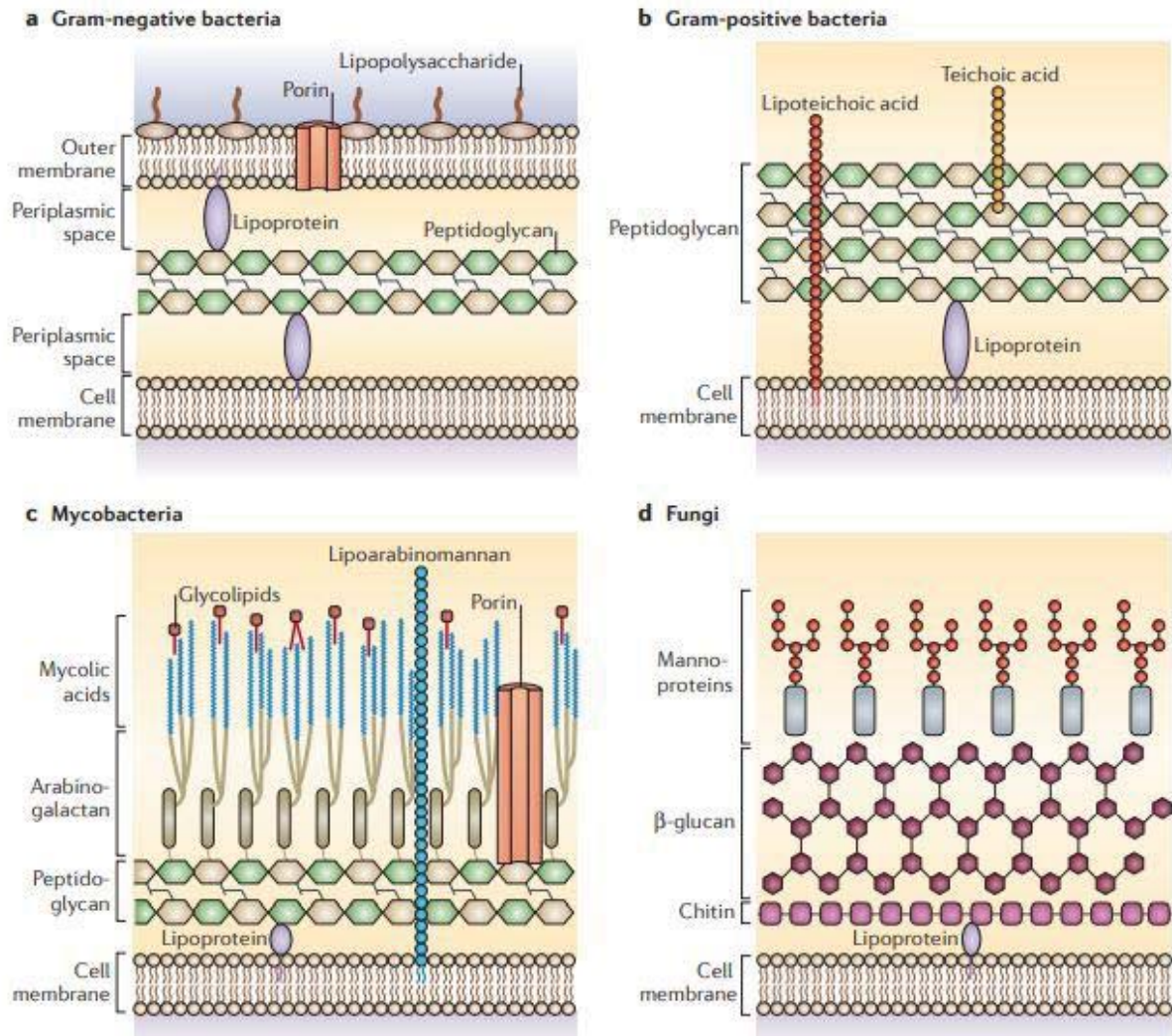


Figura 11: Diferenças entre as bicamadas Fosfolipídicas entre as bactérias Gram positivas e negativas

Fonte: Brown, L. *et al*, 2015

5.1.7 Estrutura da Bicamada Fosfolipídica das Bactérias

Nas bactérias Gram-positivas, aproximadamente 90% da parede são compostos de peptidoglicano, além de proteínas covalentemente ligadas interagindo com ácidos do tipo teicóico e lipoproteicos. Menos de 10% das proteínas exportadas covalentemente ligadas à parede celular bacteriana tem como precursores peptídeos de Sinais de Classificação de Parede Celular do terminal C (SCPC), os quais são elementos moleculares de grande importância referentes à estrutura de membrana plasmática das bactérias. Elementos, ou moléculas bioquímicas de clivagem e ancoragem como o peptídeo SCPC são necessários para dar estabilidade ou, fixação da parede celular, mediada por outras proteínas como por exemplo a enzima de classificação, reconhecimento e clivagem Transpeptidase Sortase (SrtA) descoberta pela primeira vez em *S. aureus*. Estas enzimas assim como uma gama de

aminoácidos variados como a Leucina, a Treonina, Arginina, Glicina, Prolina estão envolvidos em todo o processo de sinais receptores, clivagens e ancoragens de estrutura de membrana em quase todas as bactérias Gram-positivas e ocasionalmente em algumas Gram-negativas também como por exemplo a *Shewanella putrefaciens* e *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Schneewind, 1992; Mazmanian, 1999; Silva, 2010; Chartier, 2014; Siegel, 2016).

5.1.8 Fases do Crescimento Bacteriano

Fase de Latência (Latency at Game ou LAG

O período de latência pode ser entendido em relação à inoculação do micro-organismo em um meio de cultura propício ao seu crescimento como de adaptação ao ambiente de crescimento. A maquinaria genética dos micro-organismos nesse período pode sintetizar novas enzimas. O meio gradualmente se torna turvo devido ao crescimento celular, a mudança na turbidez pode ser quantificada medindo-se a densidade óptica da cultura de células usando um espectrômetro, no qual mede o crescimento da massa celular total na cultura. O tempo de crescimento nesse período pode variar conforme o estado fisiológico da cultura usada como inóculo e as condições de crescimento como por exemplo, um número elevado de micro-organismos já em estado de morte, lisados, inaptos e sem condições de crescimento. (Silva, 2010; Taheri-Araghi, 2015; Jun, 2018).

Fase Exponencial (Logarítmica ou "LOG")

A fase Log (logarítmica) da fase de crescimento bacteriano apresenta após um curto período de aceleração uma taxa de crescimento da população microbiana constante, ocorre a divisão celular e o seu número duplica após um determinado intervalo de tempo. As bactérias crescem e reproduzem-se assexuadamente por fissão binária e cada duplicação do número de organismos numa cultura representa uma nova geração de das condições ideais condições de crescimento como (temperatura, pH, disponibilidade de água, etc.).

A inoculação de uma única célula proporciona um crescimento no âmbito de razão 2 (1 bactéria origina 2 bactérias e assim sucessivamente como por exemplo: 1: 2: 4: 8: 16: 32: 64... e ou, 2^0 , 2^1 , 2^2 , 2^3 , 2^4 , 2^5 , 2^6 ...) (Trabulsi, 2005; Tortora, 2012; Silva, 2010).

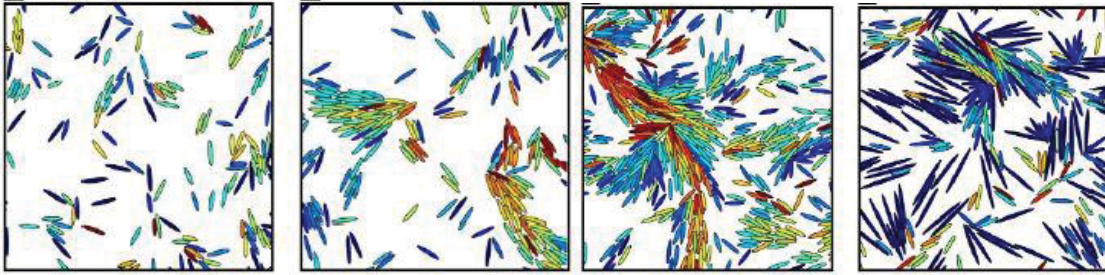


Figura 12: Colônias microbianas em fase de crescimento exponencial

Autor: Jeckel, H et al., 2019

Fase Estacionária

A fase estacionária apresenta um quadro crítico para o meio microbiano em relação ao ambiente de crescimento e nutrição por conta dos elevados níveis de produtos tóxicos, mudanças no pH como também o potencial de oxirredução, promovem alterações decorrentes das mudanças bruscas relacionadas ao crescimento exponencial constante. A falta de espaço físico, ou espaço biológico, números elevadíssimos de células microbianas em crescimento constante e por conta disso a queda nos elementos de nutrição, desta feita cessando o crescimento das células, contribuem para a chegada da próxima fase no meio microbiano (Trabulsi, 2005; Tortora, 2012; Silva, 2010).

Fase de Declínio e Morte

A perda irreversível da capacidade de divisão celular, conhecida como morte celular origina-se de um decréscimo da concentração de células viáveis na população microbiana a níveis nos quais tal perda ultrapassa o número de células novas formadas, conseqüentemente a população celular microbiana entra na fase de morte ou declínio logarítmico. Essa fase continua, até que a população tenha diminuído para uma pequena fração da população da fase anterior ou morre totalmente. Algumas espécies passam por toda a sequência de fases em somente poucos dias; outras mantêm algumas células sobreviventes indefinidamente (Trabulsi, 2005; Tortora, 2012; Silva, 2010).

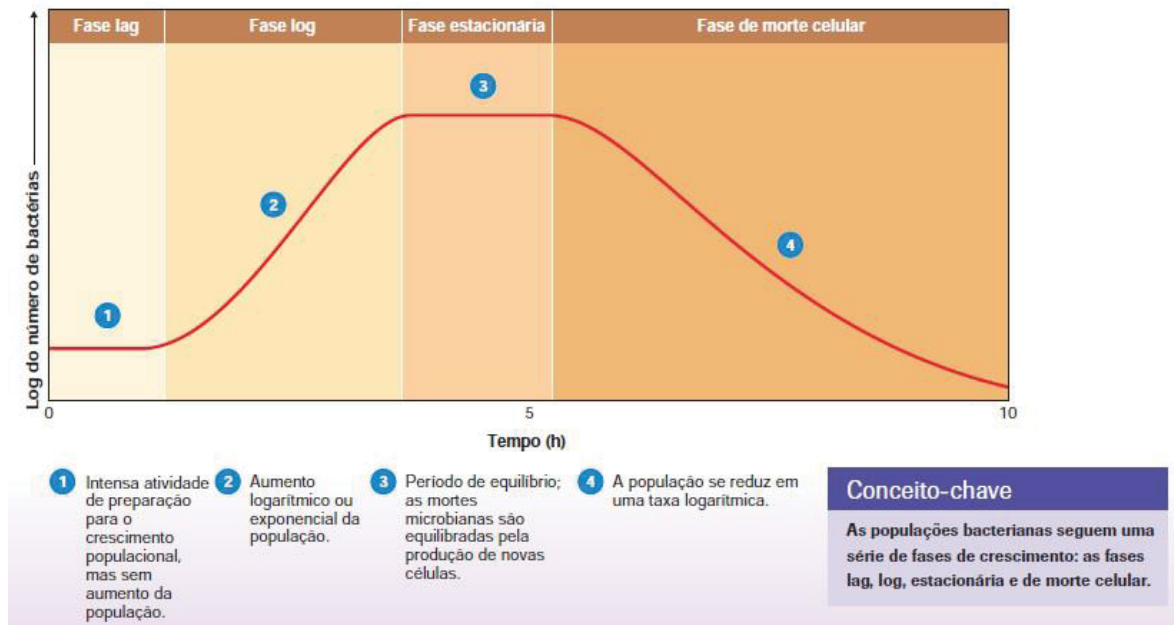


Figura 13: Curva de crescimento logarítmico e declínio microbiano

Autor: Tortora *et al.*, 2012

6. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Neste trabalho foram aplicados em relação aos espectros adquiridos dos quatro micro-organismos *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. pyogenes* os métodos estatísticos como Média e Desvio Padrão da amostra, no qual é a medida mais comum de dispersão, ou quão dispersos os dados estão da média. Quanto maior o desvio padrão, maior a dispersão nos dados, tendo o símbolo σ (sigma) como frequentemente usado para representar o desvio padrão de uma população, enquanto s é usado para representar o desvio padrão de uma amostra. A variação que é aleatória ou natural de um processo é frequentemente referida como ruído. O Desvio Padrão pode ser usado para estabelecer uma referência para estimativa da variação global de um processo. a PCA (Análise de Componentes Principais, também foi aplicada neste trabalho, no intuito de reduzir um conjunto de dados multivariados, convertendo-os em componentes ortogonais que são combinações lineares das variáveis originais, sendo estas variáveis, cada espectro obtido, para um componente particular, no qual cada componente em particular explica grande parte das variâncias. Foram obtidos o Dendrograma de ligação de Ward, ou seja, um diagrama de árvore que exhibe os grupos formados por agrupamento de variáveis em cada etapa e em seus níveis de similaridade. O nível de similaridade é medido ao longo do eixo vertical (alternativamente, pode-se exibir o nível de distância) e as variáveis diferentes são listadas ao longo do eixo horizontal e apresentando grupos formados para que a soma

dos quadrados agrupados dentro do grupo seja minimizada, ou seja, em cada etapa, os dois grupos são fundidos, resultando no menor aumento da soma dos quadrados agrupados dentro do grupo e contribuindo para esta análise está o software Minitab® v.16.2.1. (Haldiki, 2001; Barbosa, 2014; NCSS, 2019)

7. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

Chandrasekhara Venkata Raman, nascido em 7 de Novembro de 1888 recebeu o Prêmio Nobel de Física de 1930 por seu trabalho sobre a dispersão da luz, particularmente pela descoberta do efeito que recebeu seu nome. Em seu estudo, C.V Raman relatou pela primeira vez a dispersão inelástica da luz. Diferentes processos de espalhamento de luz surgem quando fótons de luz interagem com moléculas em material. A dispersão da luz é um processo de dois fótons, onde um fóton é absorvido e outro fóton é emitido simultaneamente. Os fótons são mais frequentemente emitidos com a mesma frequência que o fóton incidente (dispersão de Rayleigh), mas os fótons ocasionalmente perdem ou ganham energia devido a interações moleculares e, portanto, são deslocados em frequência (Singh., 2002).

A espectroscopia vibracional é denominada como um método analítico utilizado na análise de elementos simples, da estrutura química de compostos inorgânicos, ou de grupos funcionais de uma substância orgânica utilizando radiação eletromagnética.

Sempre que ocorre a excitação de uma substância com uma fonte de energia, esta pode tanto emitir como absorver radiação em determinado comprimento de onda, desta forma permitindo uma observação do comportamento da substância a ser analisada. Mediante da espectroscopia vibracional (Raman e no Infravermelho) podemos inferir por intermédio da análise rigorosa das bandas fundamentais, aspectos incidentes sobre a geometria estrutural, como por exemplo: a determinação de distâncias interatômicas para o caso de moléculas di e poliatômicas. Também podemos inferir aspectos sobre o isomerismo de complexos e como exemplo temos: a isomeria *cis* e *trans* de acordo com o grupo de ponto do composto (Sala *et al.*, 1984).

O fundamento da espectroscopia se dá pela natureza ondulatória das radiações eletromagnéticas, cuja variável é a frequência fundamental. Esta determina o número de oscilações realizadas pela onda por unidade de tempo e o comprimento de onda, distância percorrida pela onda durante um período de tempo (correspondente a uma unidade de frequência) sendo o produto deste, definido como a velocidade de propagação da onda (Sala, O, 1996).

7.1. Caracterização por Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica no qual se emprega o estudo da física da matéria condensada, e em todo âmbito de aplicações em química, bioquímica, farmacologia, ciências biológicas e da saúde. Apesar de que a espectroscopia Raman baseia-se num processo de dispersão (scattering), ele faz parte da espectroscopia vibracional juntamente com a espectroscopia de absorção no infravermelho (Sala *et al.*, 1984).

A utilização da espectroscopia Raman compreende também, além do estudo do espectro vibracional, o espectro rotacional e outros modos de baixas frequência em um sistema.

A espectroscopia Raman tem base na dispersão inelástica, ou dispersão Raman da luz monocromática, usualmente proveniente de um laser no visível, infravermelho próximo, ou situado na faixa espectral do ultravioleta próximo e sua atividade está ligada ao momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação, que atua como sistema perturbativo, e é diferente da espectroscopia no infravermelho onde consideramos o momento dipolo intrínseco (Porto; Wood, 1962; Nakamoto, 1986).

Existem 3 mecanismos básicos de dispersão dos fótons quando incidem em uma molécula: espalhamento Stokes, espalhamento anti-Stokes e espalhamento Rayleigh. Os dois primeiros processos de dispersão são espalhamentos inelásticos da radiação monocromática que incide em uma molécula, no entanto, o espalhamento Rayleigh é do tipo elástico. Nos dois casos a molécula pode passar de um estado vibracional para outro e diferenciam-se nas grandezas de frequência $\nu_0 - \nu_v$ e $\nu_0 + \nu_v$, que correspondem aos espalhamentos Raman Stokes e Raman anti-Stokes, respectivamente. Esses tipos de espalhamento podem ser visualizados na figura 14.

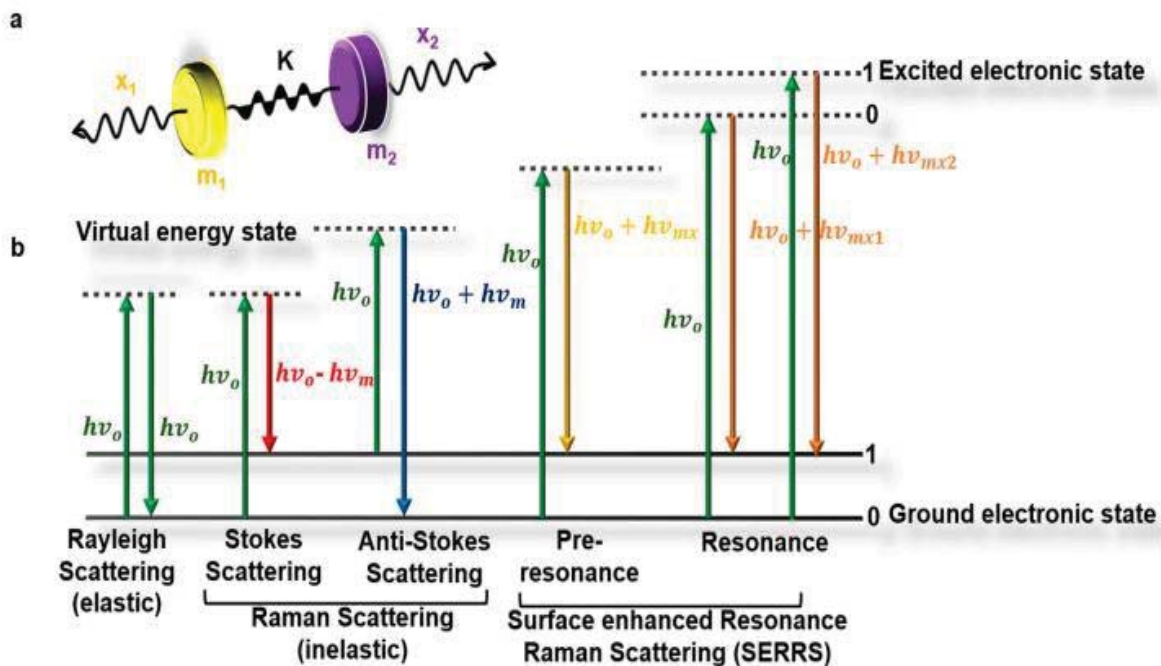


Figura 14: Esquema dos mecanismos de espalhamento Raman

Fonte: Chaichi, A *et al.* 2018

É interessante notar que, as moléculas diatômicas homonucleares, não apresentam absorção no infravermelho devido ao fato que não há variação nos seus momentos dipolares, no entanto elas apresentam atividade no espectro Raman pelo fato de que a incitação incidente de luz monocromática perturba o sistema, fazendo variar a polarizabilidade da molécula (isto é, interage com a densidade eletrônica), criando o momento dipolar induzido (Gans, 1971). Em linhas gerais podemos afirmar que ambas as espectroscopias se complementam e abrangem a espectroscopia vibracional como um todo.

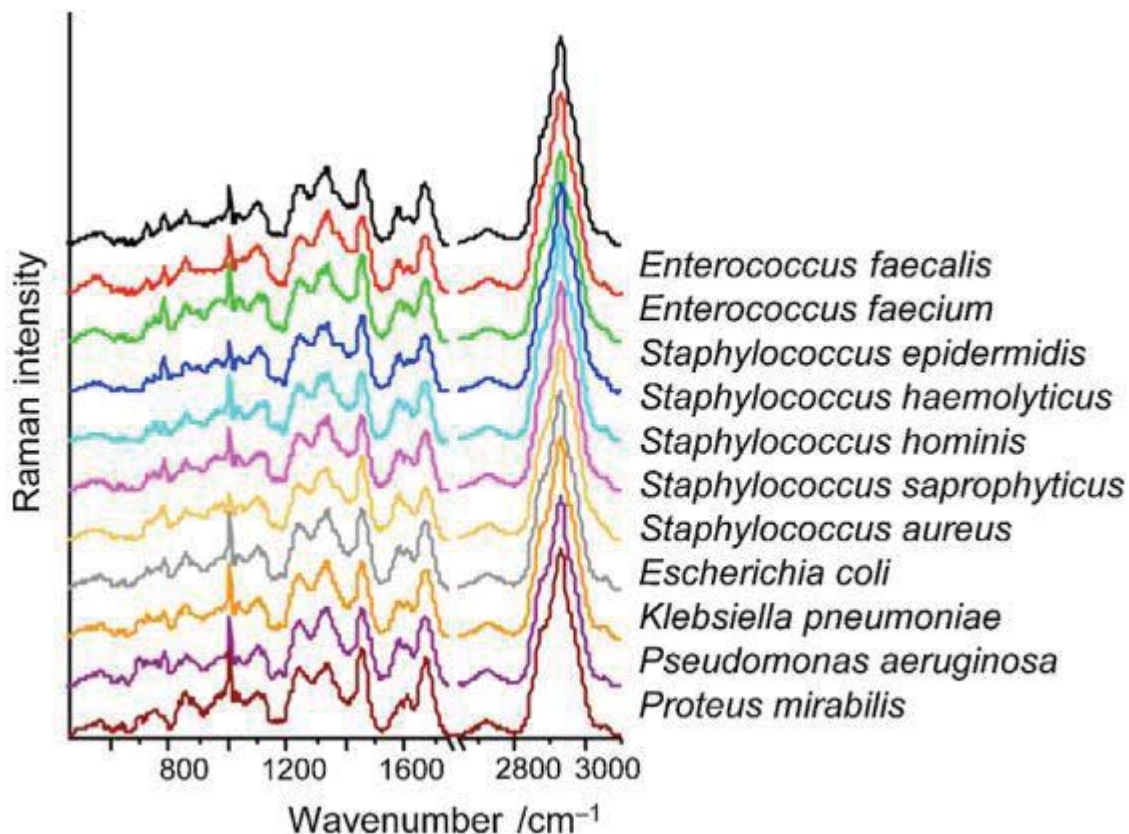


Figura 15: Exemplos de espectros Raman de diferentes gêneros de bactérias

Fonte: Neugebauer, U. *et al*, 2015

8. METODOLOGIA

8.1 Preparação da Amostra

Para a realização dos procedimentos analíticos laboratoriais foram observados e cumpridos os requisitos referentes à segurança para manipulação de micro-organismos em laboratório de nível 2, utilizando-se Equipamentos de Proteção Individual (EPI,s) e Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC,s) conforme as precauções universais e normas de Biossegurança do Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Foram coletadas para a preparação das amostras com o auxílio de alça de inoculação descartável, colônias da biomassa de quatro cepas microbianas diretamente de culturas em placas de Petri exatamente no mesmo período de tempo e no mesmo dia, as alçadas para a coleta das colônias foram realizadas em cada placa referentes a cada uma das diferentes espécies de micro-organismos. A semeadura para identificação e caracterização dos micro-organismos foi realizada em meio Ágar Sangue, Ágar Manitol, Ágar McConkey e Triptona de Soja BD Difco com alça descartável e com tempo de incubação entre 6 a 24 hs, sendo as cepas armazenadas em freezer a - 20°C em caldo BHI com glicerol a 20%, reativadas

em subculturas entre 6 e 24 horas em meio líquido de enriquecimento (caldo BHI – BD DIFCO®), com posterior repique em meios seletivos

Foram realizados testes de diferentes métodos de deposição dessas colônias na lâmina para microscopia com o objetivo de se colher o melhor sinal espectral possível no momento da incidência do laser e livre de interferentes como a fluorescência e baixo nível de concentração ou, volume de células. Primeiramente duas alçadas de cada uma das diferentes espécies de micro-organismos foram depositadas com uma gota de cloreto de sódio a 0,9% em lâmina para microscopia (devidamente higienizada anteriormente com álcool 70%) e posteriormente homogenizadas com auxílio da alça descartável, aguardou-se a secagem do biofilme na lâmina e posteriormente foram realizadas as leituras para aquisição dos espectros. Utilizou-se também a deposição da biomassa microbiana diretamente na lâmina para microscopia, sem o uso da diluição da mesma com uma gota de cloreto de sódio a 0,9%, somente a colônia, foi efetuado o espalhamento com auxílio da alça descartável, após a secagem foram também levados à leitura para aquisição espectral e em ambos os métodos de deposição da biomassa microbiana em lâmina para microscopia houve fluorescência e baixo sinal espectral, ou seja, os dois métodos de deposição foram inviáveis, não foram alcançados os resultados esperados .

O método mais viável de análise e que apresentou resultados satisfatórios para as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 14456, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 9300, *Streptococcus pyogenes* ATCC 15442 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. foi a deposição direta da biomassa microbiana sem o uso de cloreto de sódio a 0,9% em suporte de alumínio com centro ligeiramente côncavo e preparado exclusivamente para o deposição de amostras sólidas líquidas e semi-sólidas, de modo a ser preenchido todo o fundo côncavo do suporte de alumínio, a forma esférica e seu diâmetro côncavo auxiliaram no maior volume e conseqüentemente maior concentração do número de células microbianas para a análise e submissão à incidência do laser Raman.

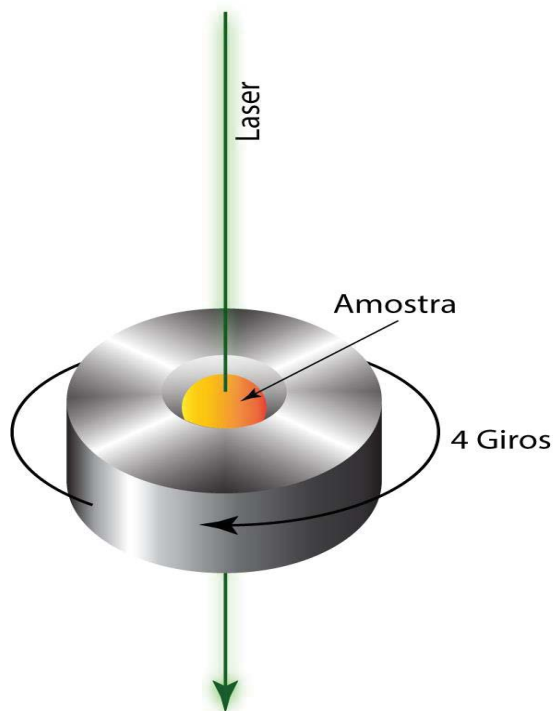


Figura 16: Biomassa microbiana depositada em Suporte de Alumínio
 Fonte: Autor, 2019

8.2 Análise Espectral

Foi realizada a caracterização das colônias de micro-organismos, sendo estes cepas ATCC, submetidas ao equipamento FT-Raman Bruker modelo MultiRam, possuindo detector Ge (resfriado com N₂ líquido) e laser Nd³⁺/YAG (1064 nm) sendo as condições para aquisição dos 120 espectros foram em laser FT-Raman de 1064 nm, 200mW, com 64 scans, tempo de exposição de 100 seg. e na região de 0 a 4000 cm⁻¹. Todo o processo analítico ocorreu na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).

A aquisição dos espectros deu-se com a amostra depositada no suporte de alumínio até cobrir a cavidade do mesmo e a incidência de laser Raman por pontos ocorreu em 8 quadrantes de 45°, delimitando-se 1 ponto para cada quadrante nas regiões da amostra, consecutivamente 8 diferentes interferogramas. Para cada um dos 8 quadrantes foram modificadas a posição da biomassa microbiana na cavidade do suporte e feito giro de 45°, ou seja, totalizando 8 pontos.

Este processo foi realizado repetidamente 4 vezes para cada amostra microbiana, sendo que na quarta e última análise foram tomados somente 6 quadrantes ou, 6 pontos totalizando 30 pontos, consecutivamente 30 espectros e com isso foram adquiridos no total de 4 amostras 120 espectros com diferentes variações de intensidade.

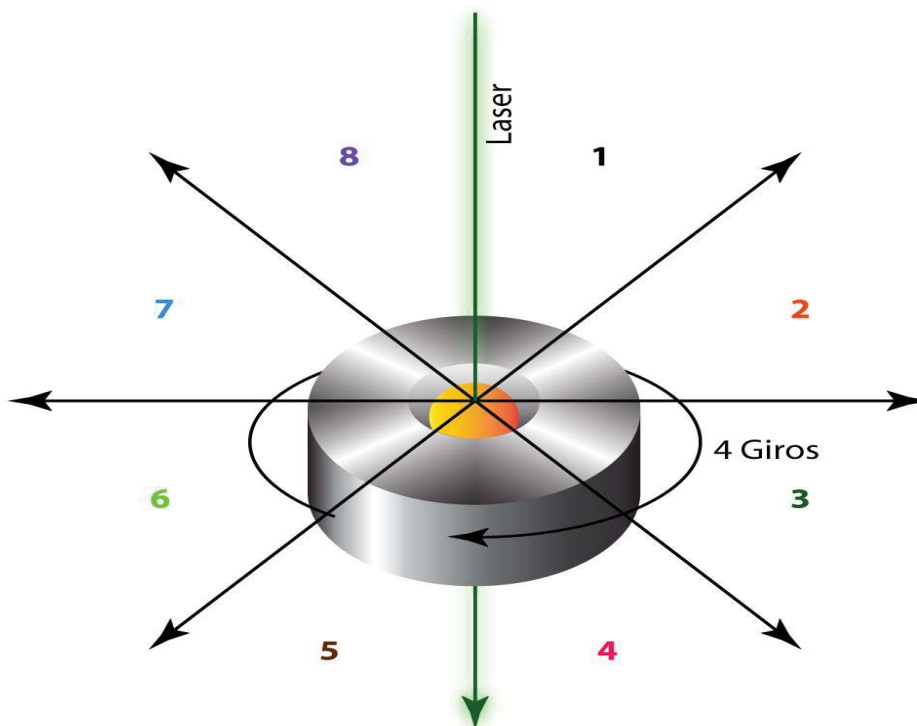


Figura 17: Incidência do laser Raman em suporte de alumínio indicando 8 quadrantes com 3 giros em 8 pontos e 1 giro em 6 pontos.

Autor, 2019

Realizadas essas mensurações, foram devidamente higienizados com álcool 70% todo o poço do suporte no qual foi depositada a amostra para eliminação da possibilidade de contaminação entre a troca de uma biomassa microbiana e outra, repetiu-se o mesmo procedimento girando-se o suporte de alumínio no sentido anti-horário por mais 2 vezes, obtendo-se desta forma 30 pontos no total de diferentes regiões da amostra dos 4 micro-organismos submetidos à análise e somando-se um total de 120 espectros.

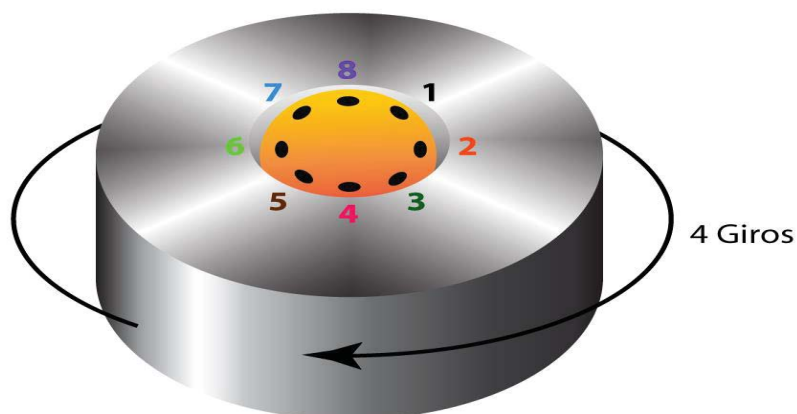


Figura 18: 30 pontos em regiões diferentes da amostra
 Obtenção de um total de 120 espectros de
 4 amostras microbianas
 Fonte: Autor, 2019

Foram realizadas as correções de linhas de base dos 120 espectros primitivos dos 4 micro-organismos *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.pyogenes*, *P.aeruginosa* e posteriormente realizada a média dos 30 espectros correspondentes a cada um dos 4 micro-organismos, obtendo-se desta forma um espectro médio, neste caso portanto obtendo-se 4 espectros médios, 1 de cada micro-organismo. Foram utilizados os softwares Omnic 6.2[®], para as correções de linha de base e o software Origin 8.5[®] para realização das médias e normalização vetorial. Após o tratamento espectral as bandas de cada um dos 4 micro-organismos foram atribuídas por intermédio de segunda derivada e posteriormente feitas comparações entre cada um dos espectros primitivos e de segunda derivada com a finalidade de obter-se as diferenças e informações vitais quando comparadas as amostras entre si e em decorrência dos seus diferentes modos vibracionais moleculares, foram realizadas deconvoluções nas regiões de importância como CH₂, CH₃ (3000 – 2800 cm⁻¹ - conteúdo lipídico e conteúdo proteico), regiões de Amida I (1720 – 1500 cm⁻¹ - estruturas proteicas) e regiões de Fosfato (1200 – 900 cm⁻¹) e Bases Nitrogenadas (800 – 200 cm⁻¹) e desta forma, obter as informações bioquímicas necessárias para o cumprimento do objetivo deste trabalho.

9. RESULTADOS

A quantificação dos teores de lipídios e proteínas foi realizada utilizando Análise de Deconvolução de Bandas (ADB) e ajuste Gaussiano na região espectral entre 3000 a 200 cm^{-1} ; como nas regiões de CH_2 , CH_3 (3000 – 2800 cm^{-1} - conteúdo lipídico e conteúdo proteico), regiões de Amida I (1720 – 1500 cm^{-1} - estruturas proteicas) e regiões de Fosfato (1200 – 900 cm^{-1}) e Bases Nitrogenadas – DNA/RNA (800 – 200 cm^{-1})

9.1 Atribuição de Bandas

Aqui encontram-se as atribuições aproximadas das bandas espectrais obtidas nas análises de picos primitivos e 2ª derivativas dos espectros Raman para os 4 micro-organismos como demonstrado nas tabelas 1,2,3 e 4.

Abaixo nas figuras 22 e 23 observa-se o plot dos espectros médios agrupados em sobreposição para melhor visualização das diferenças entre seus números de onda e intensidades.

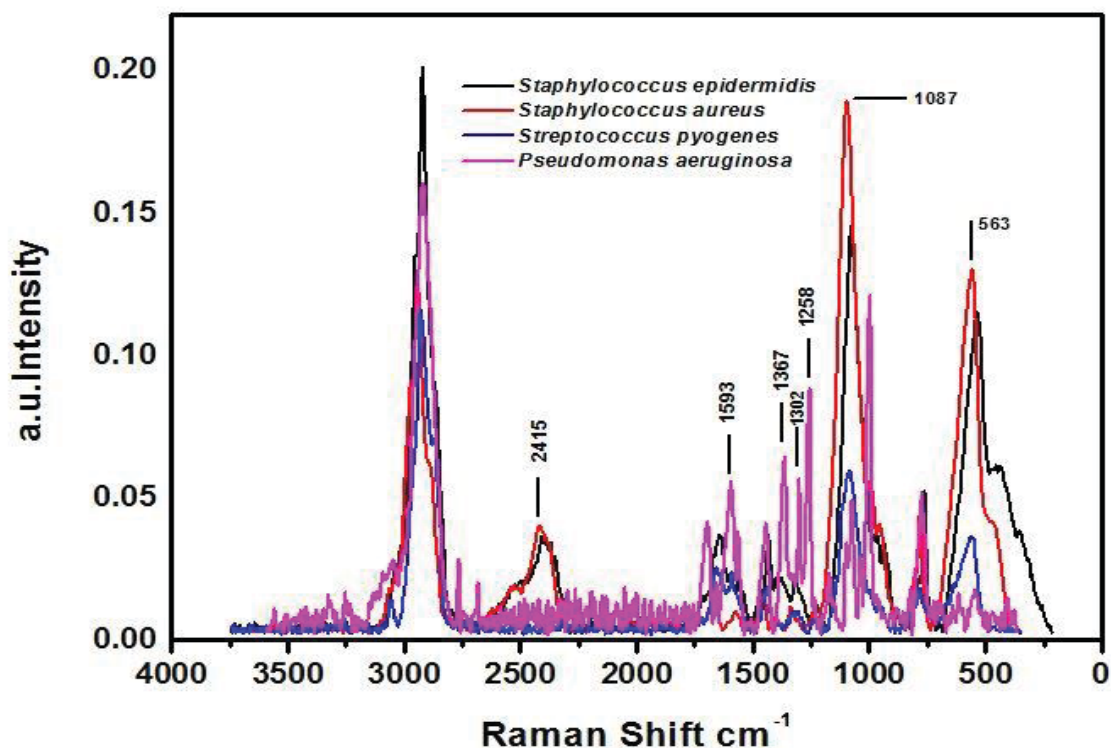


Figura 19: Espectro Médio dos 4 micro-organismos com suas variações de intensidade e diferenças de picos entre si

Fonte: Autor, 2019

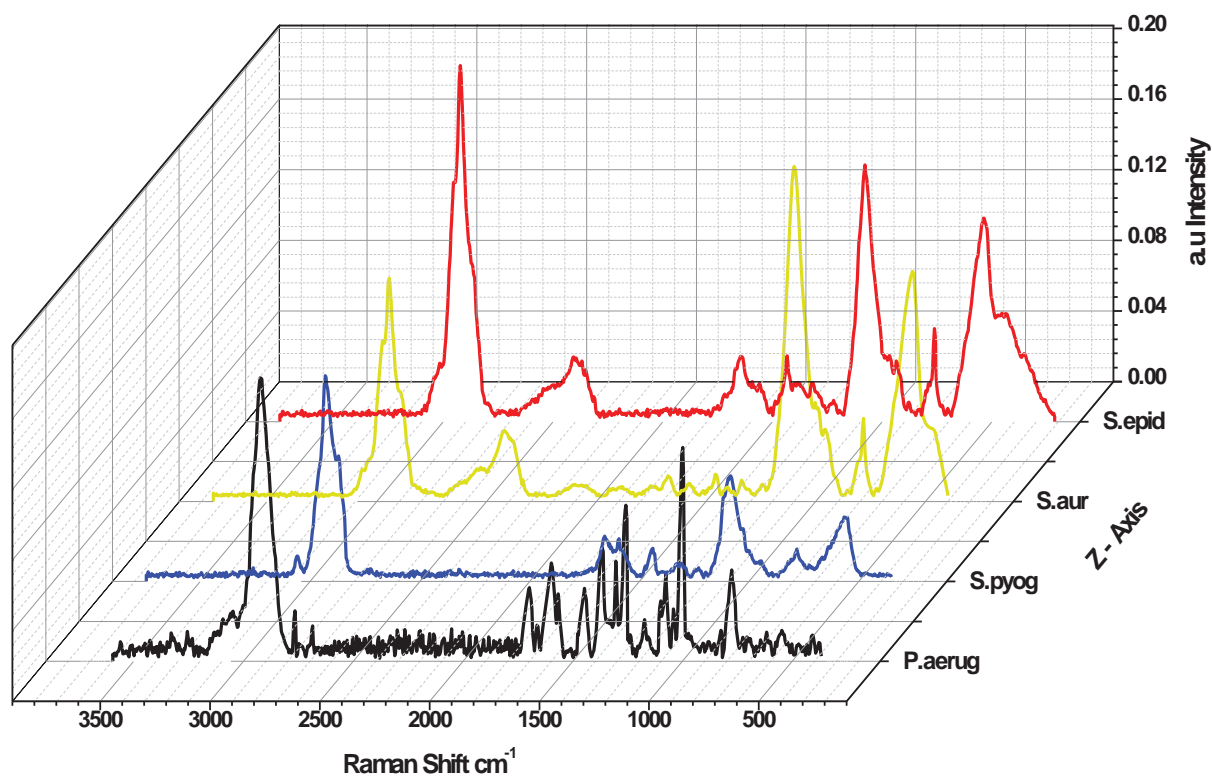


Figura 20: Espectro Médio dos 4 micro-organismos com suas variações de intensidade e diferenças de picos entre si sendo apresentadas em 3D

Fonte: Autor, 2019

Números de Onda espectrais e 2ª derivada das bactérias *S. epidermidis*, *S.aureus*, *S.pyogenes* e *P. aeruginosa*. Citação de literatura de Movasaghi e Gelder.

Tabela: 1 - Espectro Raman e Segunda Derivada - *Staphylococcus epidermidis*, cm^{-1} .

Espectro Raman cm^{-1}	2 derivada	Modos Vibracionais	Atribuições Principais
3627			Banda não atribuída
3227		$\nu_s(\text{OH}), (\text{NH})$	Proteínas
2975		$\nu(\text{N-H}), \nu(\text{C-H})$	
2945		$(\text{C-H}) \nu_{as}(\text{CH}_2)$	Vibrações de lipídios, Proteínas, Ácido Graxo
2426			Banda não atribuída
	2332		Banda não atribuída
1917			Banda não atribuída
1870			Banda não atribuída
1667		$\nu(\text{C=C}), \nu(\text{C=O})$	α -Helice,, Estiramento de Carbonila, Estrutura de Amida I
1581		$\nu(\text{C-C}), \delta(\text{C=C})$	Estiramento de Anel Fenílico, Fenilalanina
	1537	$(\text{C=N}), (\text{C=C})$	Amida não Cíclica Secundária, Ácido Glutâmico, Glutationa

1511		$\nu(\text{Pir.})$	Citosina, Pirimidina
1451		$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$	Lipídios, Proteínas
1099		$\nu(\text{PO}_2^-), \nu(\text{C-C}), \nu(\text{C-O-C})$	Fostato, Ligação Glicosídica
1002		$\nu_s\Delta(\text{C-C})$	Anel de Fenilalanina
992		(C-O), (C-C)	Ribose, Piridina, Anel de "Respiração"
959		$\nu_s(\text{PO}_4^{3-})$	Vibração de Hidroxiapatita de Cálcio
783		(O-P-O)	Ligação Fosfodiéster (DNA-RNA), Timina, Citosina, Uracil
560		($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$)	Histidina

Tabela: 2 - Espectro Raman e Segunda Derivada - *Staphylococcus aureus*, cm^{-1} .

Espectro Raman cm^{-1}	2 derivada	Modos Vibracionais	Atribuições Principais
3627			Banda não atribuída
3567		$\nu(\text{OH})$	Hidroxila Livre
3543			Banda não atribuída
3537			Banda não atribuída
3227			Banda não atribuída
2975			Banda não atribuída
	2878	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	Lipídios, Proteínas
2941		(C-H) $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	Vibrações de lipídios, Proteínas, Ácido Graxo
2426			Banda não atribuída
1917			Banda não atribuída
1870			Banda não atribuída
1667		$\nu(\text{C=C}), \nu(\text{C=O})$	α -Helice,, Estiramento de Carbonila, Estrutura de Amida I
1511		$\nu(\text{Pir.})$	Citosina, Pirimidina
1451		$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$	Lipídios, Proteínas
	1341	$\omega(\text{CH}_2)$	Guanina (DNA-RNA), Ácidos Nucleicos, Colágeno
1099		$\nu(\text{PO}_2^-), \nu(\text{C-C}), \nu(\text{C-O-C})$	Fostato, Ligação Glicosídica
1002		$\nu_s\Delta(\text{C-C})$	Anel de Fenilalanina
992		(C-O), (C-C)	Ribose, Piridina, Anel de "Respiração"
959		$\nu_s(\text{PO}_4^{3-})$	Vibração de Hidroxiapatita de Cálcio
783		(O-P-O)	Ligação Fosfodiéster (DNA-RNA), Timina, Citosina, Uracil
560		($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$)	Histidina

Tabela: 3 - Espectro Raman e segunda derivada - *Streptococcus pyogenes*, cm^{-1}

Espectro Raman cm^{-1}	2 derivada	Modos Vibracionais	Atribuições Principais
3317		$\nu(\text{OH}), \nu(\text{NH})$	Proteínas
3061		$\nu(\text{NH})$	Amina Secundária
2941		(C-H) $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	Vibrações de lipídios, Proteínas, Ácido Graxo
2885		$\nu_s(\text{CH}_3)$	Lipídios, Ácido Graxo
	2878	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	Lipídios, Proteínas

	2858	$\nu(\text{CH}_2)$	Triacilgliceróis
2422			Banda não atribuída
2333			Banda não atribuída
1671		$\nu(\text{C}=\text{C})$	Colesterol e ésteres, Amida I (Anti-Paralela, β -Sheet
1604		$\delta(\text{C}=\text{C}), \nu(\text{C}-\text{C})$	Fenilalanina, Tirosina (Proteínas), Estiramento de Fenil
1511		$\nu(\text{Pir.})$	Citosina, Pirimidina
1451		$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$	Lipídios, Proteínas
	1129	$\nu(\text{C}-\text{N}, \text{C}-\text{C})$	Amida III, Colágeno, Proteínas
1092		$\nu_s(\text{O}-\text{P}-\text{O}), \nu(\text{C}-\text{C})$	Fosfolipídios, Ácidos Nucleicos (DNA-RNA)
	1035	(C-H)	Fenilalanina
1006		$\nu_s\Delta(\text{C}-\text{C})$	Anel de Fenilalanina
962		$\nu_s(\text{PO}_4^{3-})$	Vibração de Hidroxiapatita de Cálcio
773		(PIP)	Fosfatidilinositol
743			Timina (modo de respiração do anel das bases de DNA / RNA)
556		$(\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2), (\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2)$	L-Triptofano, Uracila
542		$(\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2), (\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)$	L-Valina, β -D-Glicose [Gelder]

Tabela: 4 - Espectro Raman e Segunda Derivada – *Pseudomonas aeruginosa*, cm^{-1} .

Espectro Raman cm^{-1}	2 derivada	Modos Vibracionais	Atribuições Principais
3328		$\nu_{as}(\text{N}-\text{H})$	Banda de Amida I – Vibrações de Proteínas
3255			Banda não atribuída
3234		$\nu(\text{O}-\text{H}), (\text{N}-\text{H})$	A rede de ligações de (H) pode variar em tecidos nos tecidos malignos
3049		$\nu(\text{N}-\text{H})$	Banda de Amida II
2919		$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	Cadeias de Acil (Lipídios)
2763		$\nu(\text{N}-\text{H}), (\text{N}-\text{H}_3^+)$	Modos CH_3
2685			Banda não atribuída
1698			Banda não atribuída
1662		$\nu(\text{C}=\text{C}), (\text{C}=\text{O})$	Citocina, Uracil, Amida I, <i>cis</i> , Lipídios, Ácidos Graxos
1598		$\nu\delta(\text{C}=\text{O}), (\text{C}-\text{N}), \rho(\text{N}-\text{H})$	Amida I das proteínas (C=O), (C-N) e δ balanço na ligação (N-H)
1562		$(\text{C}-\text{O}-\text{O}^-)$	Triptofano
1448		$\delta(\text{CH}_2), (\text{CH}_3)$	Lipídios, Proteínas
1367		$\nu_s(\text{CH}_3), \delta(\text{C}-\text{H}), (\text{N}-\text{H}), \nu(\text{C}-\text{C})$	Polissacarídios, Fosfolipídios, Pectina, Citocina, Guanina
1305		$\tau(\text{CH}_2), (\text{CH}_3), \delta(\text{CH}_2)$	Atribuição para Colágeno, Lipídios, Adenina, Citosina
1257		$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	Amida III (proteína), Fosfato I, Adenina, Timina, Anel (respiração) de bases de DNA / RNA
1172		$\delta(\text{C}-\text{H}), \nu(\text{C}-\text{OH})$	Serina, Carboidratos, Treonina e Tirosina nas proteínas celulares
1075		$(\text{C}-\text{C}), \nu_s(\text{PO}_2^-), \nu_s(3\text{PO}_4^{3-})$	Fosfato de Hidroxiapatita, Lipídios (em tecido)

1099	$\nu_s(\text{PO}_2^-), \nu(\text{C-N})$	Grupos Fosfodioxi em Ácidos Nucleicos, Fosfato II normal), Grupos Fosfodiéster de Ácidos Nucleicos. Sugere-se um aumento de Ácidos Nucleicos em tecidos malignos
1041	$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	RNA, DNA, Picos de Formalina aparecendo em tecidos normais e tumorais
1000	$\nu_s\Delta(\text{C-C})$	Anel de Fenilalanina
824	$\nu(\text{C-C})$	Prolina, Hidroxiprolina
783	(O-P-O)	Ligação Fosfodiéster (DNA-RNA), Timina, Citosina, Uracil
776		Fosfatidilinositol, Vibrações no modo balanço em deformação angular fora do plano
617	$\tau(\text{C-C})$	Proteína
546	$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3$	Piruvato

9.2 Análise dos Espectros

Para a análise espectral e uma abordagem significativa no intuito de se encontrar diferenças relevantes nos seus conteúdos proteicos e lipídicos (regiões de CH_2 , CH_3 ($3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$), regiões de Amida I ($1720 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) e regiões de Fosfato e DNA/RNA ($800 - 200 \text{ cm}^{-1}$) foram realizadas as observações especificamente nas bandas entre os valores de números de onda já citados acima. Para estas análises utilizamos os picos primitivos de cada região específica e sobrepondo sobre os mesmos o espectro correspondente de 2ª derivada para melhor observação e maior compreensão das diferenças encontradas para cada região e seus respectivos picos como são apresentados nas figuras 23, 24, 25 e 26.

As análises de deconvoluções de bandas (ADB) e ajuste Gaussiano nas regiões espectrais entre $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ apresentam a quantificação dos teores de lipídios e proteínas em cada um dos micro-organismos. Considerando os sistemas biológicos bacterianos da região espectral entre $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ podemos atribuir a fórmula molecular $\text{CH}_2 / \text{CH}_3$ para esta região, aonde CH_2 indica o conteúdo lipídico e CH_3 as proteínas. A (ADB) e ajuste Gaussiano é o método mais apropriado para quantificação desses conteúdos microbianos, atribuindo-se os modos normais presentes e determinando as suas respectivas áreas para posterior comparações entre os 4 micro-organismos

As tabelas 5 a 12 possuem nas 4 primeiras colunas da esquerda, a informação dos respectivos números de onda e abaixo de cada número de onda, a área

correspondente à banda deconvoluída. À coluna central de cada tabela encontra-se as atribuições de conteúdo e estrutura molecular. Nas 4 últimas colunas da esquerda encontram-se os resultados estatísticos referentes aos números de onda e suas áreas, como: Médias, Desvio Padrão, Erro padrão da Média e Variância.

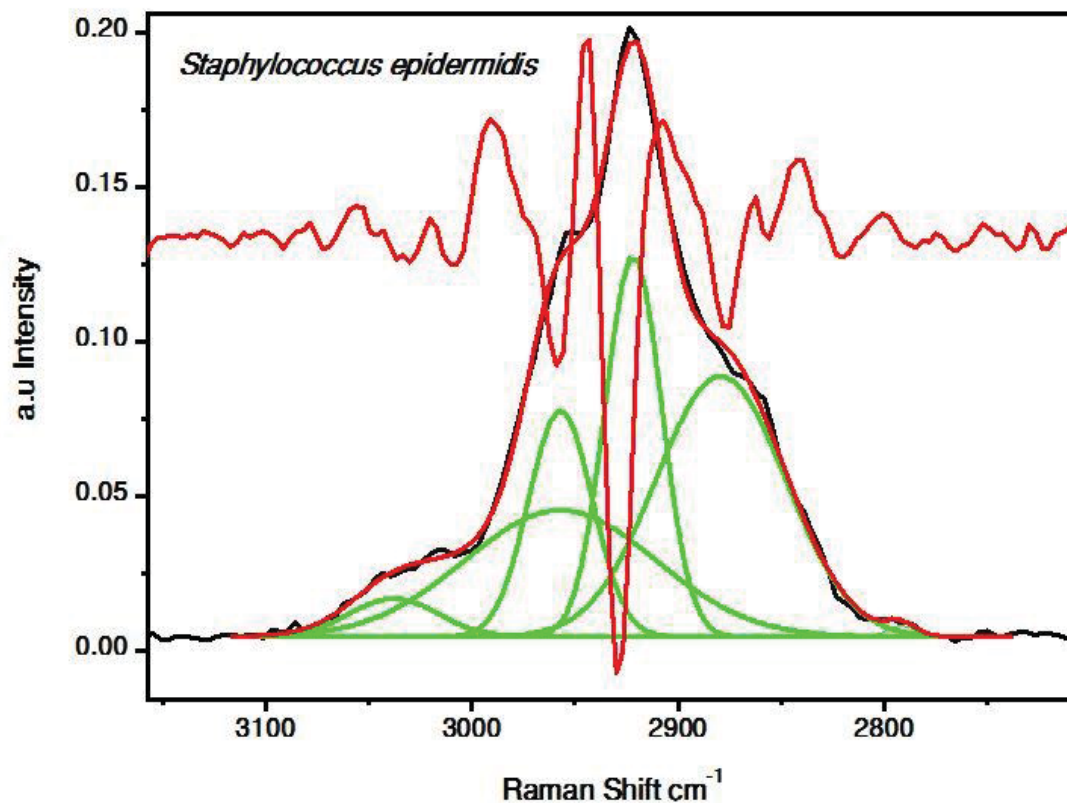


Figura 21: Espectro Raman de *S. epidermidis*. Pico primitivo deconvoluído com sua 2^a derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de CH₂ / CH₃ nas regiões entre 3000 – 1200 cm^{-1}

Fonte: Autor, 2019

9.3 Tabelas e Cálculos de conteúdo Lipídico e Proteico

O cálculo do conteúdo lipídico e proteico, assim como de estruturas de proteínas para as bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* é relevante porquanto assim como são encontrados elementos ou, compostos inorgânicos em todos os organismos conferindo grande importância na sua atividade metabólica e locomoção, também são encontrados os elementos orgânicos e são estes de fato os de maior importância biológica nos quais estão envolvidos nas definições de estruturas (α -hélice, β -sheet, β -turn) e conteúdos celulares (níveis quantitativos de proteínas e lipídeos). As bactérias possuem uma gama de diferentes compostos envolvidos na sua maquinaria metabólica como DNA, ribossomos, plasmídeo, grânulos contendo glicogênio e

metafosfatos, assim como nas estruturas de membrana plasmática como fímbrias, flagelo, dentre outras estruturas que conferem a elas maior ou menor capacidade de virulência e mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Exemplos como a membrana plasmática tanto de bactérias Gram positivas (que apresentam camada mais espessa de peptidoglicano) quanto Gram negativas (com camada menos espessa de peptidoglicano) apresentam inúmeras conformações ou arranjos moleculares proteicos formados por diferentes aminoácidos e lipídeos para formação de sua bicamada lipídica na qual é estruturada por grupo fosfato (PO_2), grupos (CH_2) nos quais indicam estruturas proteicas, açúcares ou carboidratos, (CH_3) que indicam gliceróis, ácidos graxos. Toda célula bacteriana é estruturada por longos polímeros de diferentes aminoácidos nos quais formam diferentes arranjos proteicos em cada região específica de toda célula bacteriana e isso se aplica também aos lipídeos e deste modo compreende-se que se torna viável avaliar tanto os níveis de conteúdo proteico e lipídico, quanto de arranjo ou, conformação proteica.

Tabela: 5 – Análise e resultados de conteúdo proteico e lipídico nas regiões de CH₂/CH₃ – *S. epidermidis*

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	N-Total 5	<i>S. epidermidis</i>				Atribuições cm ²	Médias	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	Variância
2										
3	2952	2952	2952	2952	2952	v(CH ₃) - Proteínas	2952	0	0	0
4	5.12	5.12	1.4	5.12	5.12		4.376	1.66363	0.744	2.76768
5	--	--	--	--	--		--	--	--	--
6	2924	2924	2924	2924	2924	v(CH ₂) - Lipídeos	2924	0	0	0
7	1.4	1.4	0.51	1.4	1.4		1.222	0.39802	0.178	0.15842
8	--	--	--	--	--		--	--	--	--
9	2911	2911	2912	2911	2911	v(CH ₃) - Proteínas	2911.2	0.44721	0.2	0.2
10	4.29	4.29	5.67	4.29	4.29		4.566	0.61715	0.276	0.38088
11	--	--	--	--	--		--	--	--	--
12	2868	2868	2868	2868	2868	v(CH ₂) - Lipídeos	2868	0	0	0
13	4.01	4.01	2.82	4.01	4.01		3.772	0.53218	0.238	0.28322
14	--	--	--	--	0.276		--	--	--	--
15	2834	2834	2833	2834	2834	v(CH ₃) - Proteínas	2833.8	0.44721	0.2	0.2
16	0.06	0.06	0.23	0.06	0.06		0.094	0.07603	0.034	0.00578

Os resultados apresentados na tabela de nº 5 mostram a variabilidade com relação aos valores médios entre os conteúdos lipídicos e entre os proteicos. Para o alcance de uma definição em porcentagem do volume entre um e outro e suas diferenças, foi realizada a soma dos valores das áreas das bandas, somente entre os valores de conteúdo proteico e somente de lipídeos para os 4 micro-organismos.

Posteriormente realizou-se uma regra de 3 para com relação ao resultado representado os 100%, afim de se encontrar o valor de X, posteriormente foi realizada uma ponderação desse resultado e encontrada a porcentagem final. Exemplo:

- Área de Proteínas: $4.38 + 4.57 + 0.09 = 9.04$
- Área de Lipídeos: $1.22 + 3.77 = 4.99$
- Regra de 3 para o maior resultado, ou seja, 9.04 que representa 100%:
- Proteínas: $9.04 \text{ ----- } 100\%$
- Lipídeos: $4.99 \text{ ----- } X$
 $X = 55\%$
- Ponderação: Somou-se as porcentagens: $100\% + 55\% = 155\%$
- Dividiu-se 100% (dividendo) por 155% (divisor) e o resultado multiplicou-se por 100.
- $100\% + 55\% = 155\%$
- $(100 / 155) \times 100 = 65\%$
- $(55 / 155) \times 100 = 35\%$

Conclusão: Para a bactéria *Staphylococcus epidermidis* é apresenta-se uma síntese de conteúdo proteico 65% maior em relação ao conteúdo lipídico de 35% .

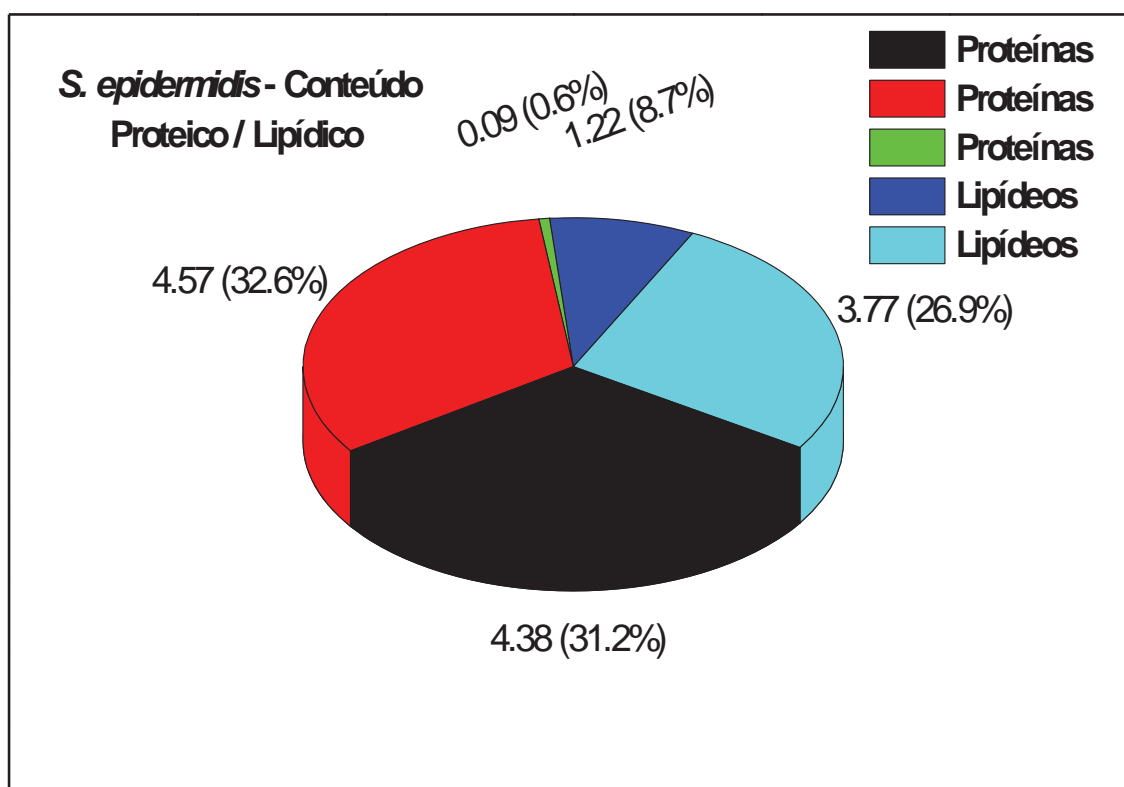


Figura 22: Diagrama Circular representando os valores médios das diferenças entre o conteúdo Proteico e Lipídico do micro-organismo *Staphylococcus epidermidis*

Fonte: Autor, 2020

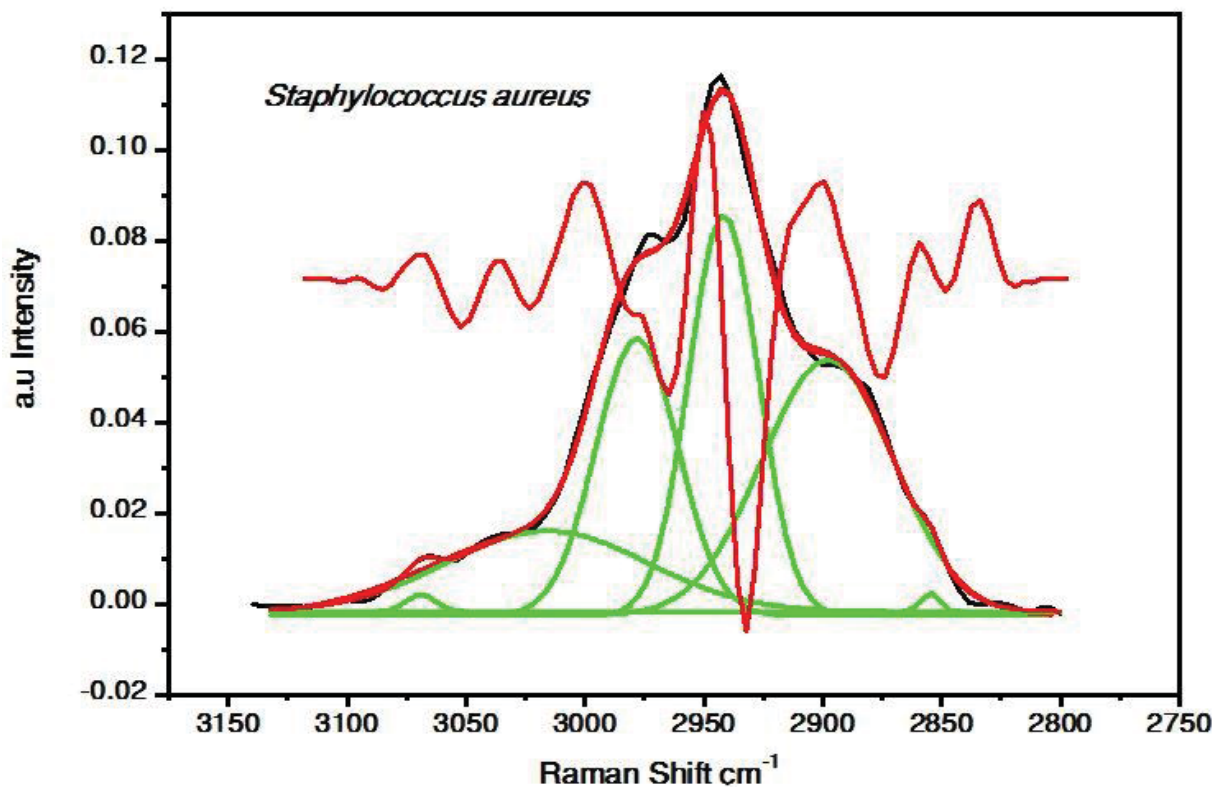


Figura 23: Espectro Raman de *S.aureus*. Pico primitivo deconvolvido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de CH₂ / CH₃ nas regiões entre 3000 – 1200 cm⁻¹

Fonte: Autor, 2019

Tabela: 6 – Análise e resultados de conteúdo proteico e lipídico nas regiões de CH₂/CH₃ – *S. aureus*

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
37	N-Total 5	<i>S. aureus</i>				Atribuições cm ⁻¹	Médias	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	Variância
38										
39	2980	2979	2980	2980	2971	$\nu(\text{CH}_3)$ - Proteínas	2978	3.937	1.76068	15.5
40	1.78	2.09	1.78	1.78	3.96		2.278	0.9498	0.42476	0.90212
41	--	--	--	--	--		--	--	--	--
42	2944	2939	2945	2945	2945	$\nu(\text{CH}_2)$ - Lipídeos	2943.6	2.60768	1.16619	6.8
43	0.42	3.76	0.42	0.42	0.94		1.192	1.45311	0.64985	2.11152
44	--	--	--	--	--		--	--	--	--
45	2938	2945	2938	2938	2930	$\nu(\text{CH}_3)$ - Proteínas	2937.8	5.31037	2.37487	28.2
46	4.43	0.36	4.43	4.43	1.48		3.026	1.96286	0.87782	3.85283
47	--	--	--	--	--		--	--	--	--
48	2885	2888	2885	2885	2893	$\nu(\text{CH}_2)$ - Lipídeos	2887.2	3.49285	1.56205	12.2
49	1.73	2.32	1.73	1.73	3.71		2.244	0.85842	0.3839	0.73688
50	--	--	--	--	--		--	--	--	--
51	2854	2850	2854	2854	2803	$\nu(\text{CH}_3)$ - Proteínas	2843	22.42766	10.02996	503
52	0.09	78.19	0.09	0.09	0.59		15.81	34.87215	15.5953	1216.067

- Área de Proteínas: $2.30 + 3.03 + 15.81 = 21.14$
- Área de Lipídeos: $1.19 + 2.24 = 3.43$
- Proteínas: $21.14 \text{ ----- } 100\%$
- Lipídeos: $3.43 \text{ ----- } X$
 $X = 16\%$

- Ponderação:
- $100\% + 16\% = 116\%$
- $(100 / 116) \times 100 = 86\%$
- $(16 / 116) \times 100 = 14\%$

Conclusão: Para a bactéria *Staphylococcus aureus* é apresenta-se uma síntese de conteúdo proteico 86% maior em relação ao conteúdo lipídico de 14%.

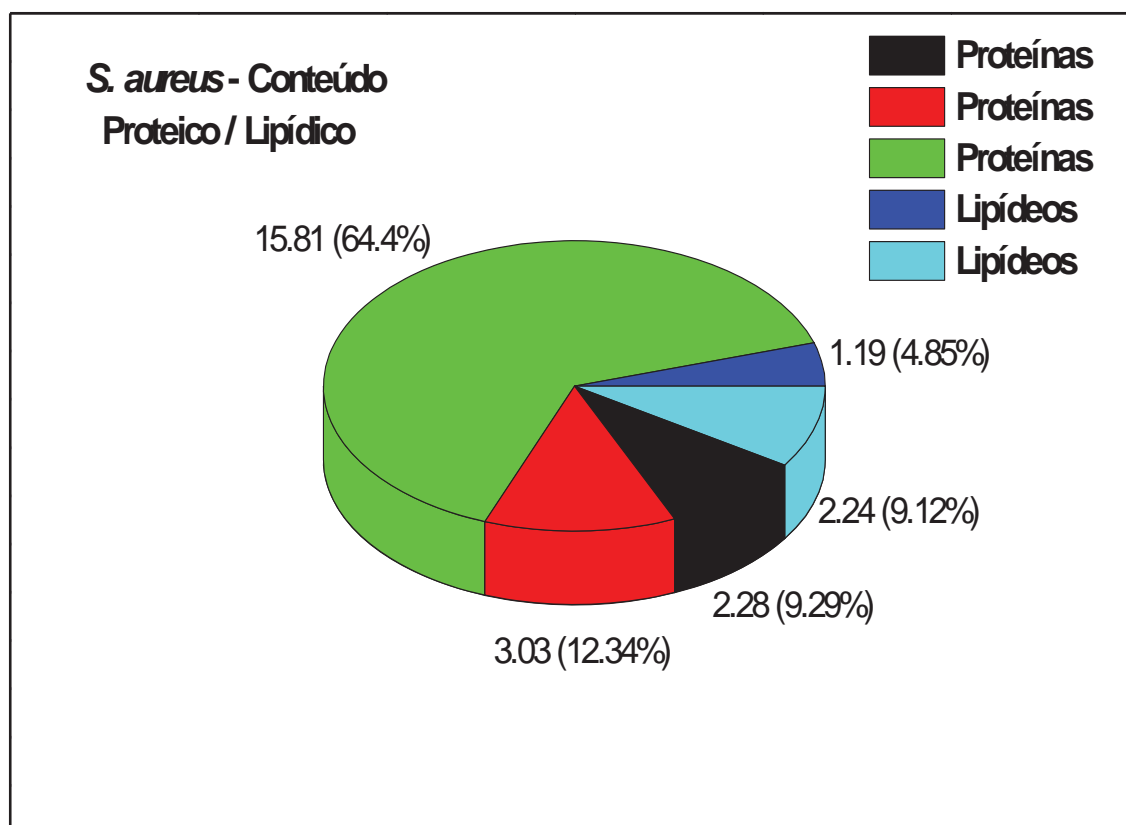


Figura 24: Diagrama Circular representando os valores médios das diferenças entre o conteúdo Proteico e Lipídico do micro-organismo *Staphylococcus aureus*

Fonte: Autor, 2020

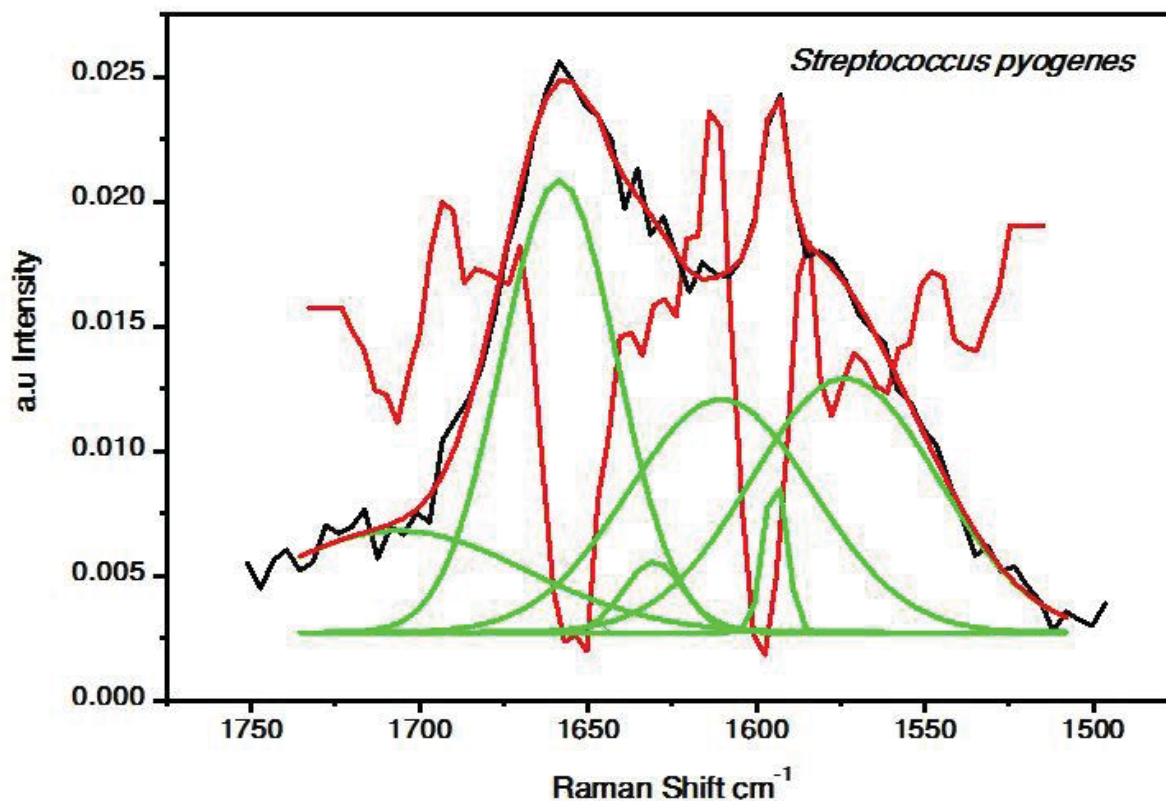


Figura 25: Espectro Raman de *S.pyogenes*. Pico primitivo deconvoluido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de CH₂ / CH₃ nas regiões entre 3000 – 1200 cm^{-1}

Fonte: Autor, 2019

Tabela: 7 – Análise e resultados de conteúdo proteico e lipídico nas regiões de CH₂/CH₃ – *S. pyogenes*

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
19	N-Total 5	<i>S. pyogenes</i>				Atribuições cm^{-1}	Médias	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	Variância
20										
21	2966	2965	2969	2969	2966	$\nu(\text{CH}_3)$ - Proteínas	2967	1.87083	0.83666	3.5
22	1.83	2.1	1.11	1.12	1.83		1.598	0.4545	0.20326	0.20657
23	--	--	--	--	--		--	--	--	--
24	2933	2932	2930	2930	2933	$\nu(\text{CH}_2)$ - Lipídeos	2931.6	1.51658	0.67823	2.3
25	0.35	0.36	1.01	1.01	0.35		0.616	0.35969	0.16086	0.12938
26	--	--	--	--	--		--	--	--	--
27	2920	2920	2912	2912	2920	$\nu(\text{CH}_3)$ - Proteínas	2916.8	4.38178	1.95959	19.2
28	5.18	4.83	6.97	6.97	5.18		5.826	1.05405	0.47139	1.11103
29	--	--	--	--	--		--	--	--	--
30	2869	2868	2866	2866	2869	$\nu(\text{CH}_2)$ - Lipídeos	2867.6	1.51658	0.67823	2.3
31	2.54	2.99	0.76	0.76	2.54		1.918	1.07295	0.47984	1.15122
32	--	--	--	--	--		--	--	--	--
33	2845	2839	2846	2846	2845	$\nu(\text{CH}_3)$ - Proteínas	2844.2	2.94958	1.31909	8.7
34	0.14	-16.08	0.31	0.31	0.14		-3.036	7.29231	3.26122	53.17783

- Área de Proteínas: $1.60 + 5.83 - 3.04 = 4.39$
 - Área de Lipídeos: $0.62 + 1.92 = 2.54$
 - Proteínas: 4.39 ----- 100%
 - Lipídeos: 2.54 ----- X
- $X = 58\%$

- Ponderação:
- $100\% + 58\% = 158\%$
- $(100 / 158) \times 100 = 63\%$
- $(58 / 158) \times 100 = 37\%$

Conclusão: Para a bactéria *Streptococcus pyogenes* apresenta-se uma síntese de conteúdo proteico 63% maior em relação ao conteúdo lipídico de 37%.

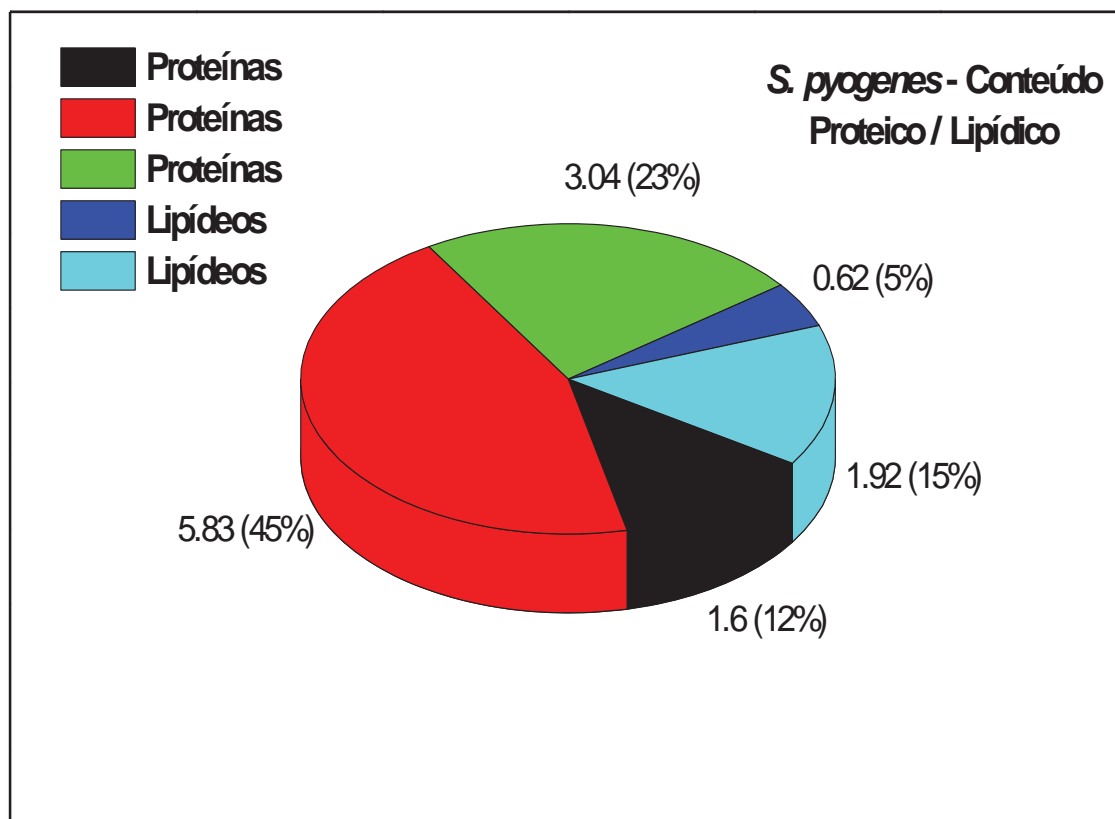


Figura 26: Diagrama Circular representando os valores médios das diferenças entre o conteúdo Proteico e Lipídico do micro-organismo *Streptococcus pyogenes*

Fonte: Autor, 2020

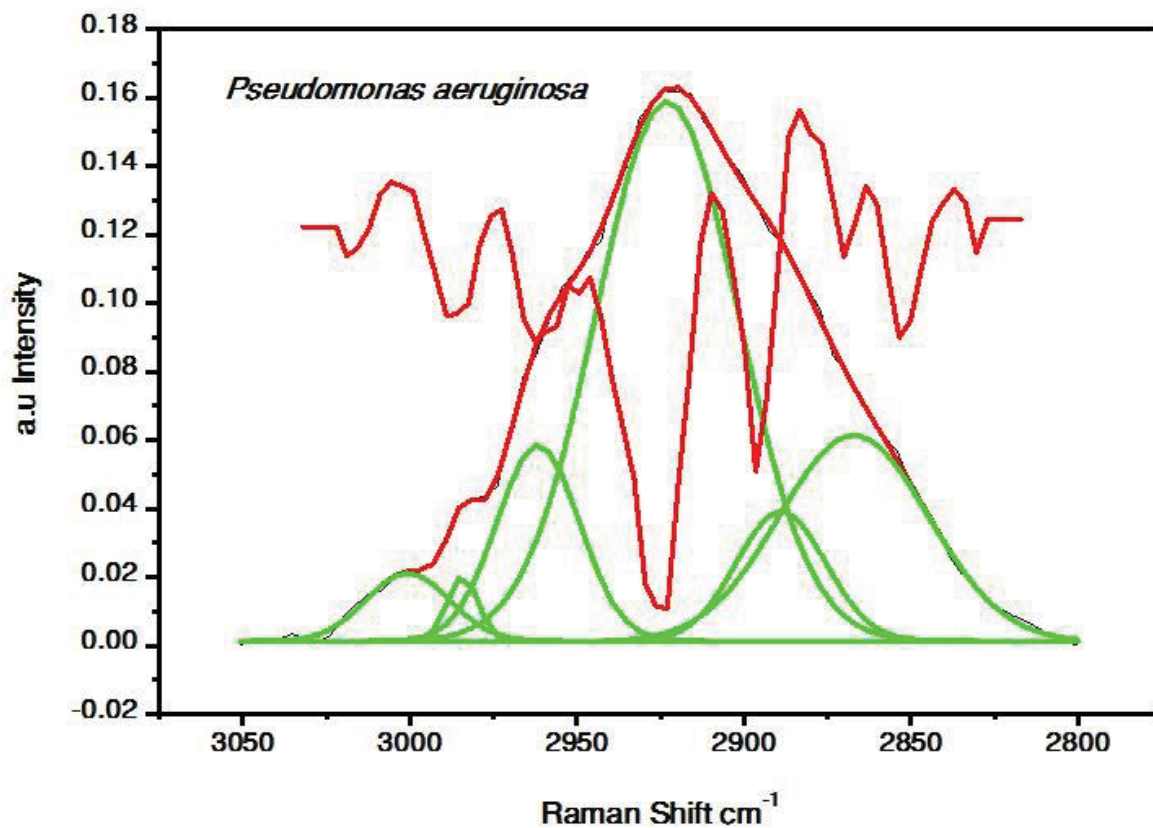


Figura 27: Espectro Raman de *P.aeruginosa*. Pico primitivo deconvolvido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de CH₂ / CH₃ nas regiões entre 3000 – 1200 cm⁻¹

Fonte: Autor, 2019

Tabela: 8 – Análise e resultados de conteúdo proteico e lipídico nas regiões de CH₂/CH₃ – *P. aeruginosa*

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
55	N-Total 5	<i>P.aeruginosa</i>				Atribuições cm ⁻¹	Médias	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	Variância
56										
57	2946	2945	2944	2944	2944	$\nu(\text{CH}_3)$ - Proteínas	2944.6	0.89443	0.4	0.8
58	4.55	5.01	5.02	5.02	5.02		4.924	0.20912	0.09352	0.04373
59	--	--	--	--	--		--	--	--	--
60	2923	2926	2926	2926	2926	$\nu(\text{CH}_2)$ - Lipídeos	2925.4	1.34164	0.6	1.8
61	1.46	1.01	1.01	1.01	1.01		1.1	0.20125	0.09	0.0405
62	--	--	--	--	--		--	--	--	--
63	2900	2906	2906	2906	2906	$\nu(\text{CH}_3)$ - Proteínas	2904.8	2.68328	1.2	7.2
64	4.37	3.04	3.03	3.03	3.03		3.3	0.59816	0.26751	0.3578
65	--	--	--	--	--		--	--	--	--
66	2864	2883	2883	2883	2883	$\nu(\text{CH}_2)$ - Lipídeos	2879.2	8.49706	3.8	72.2
67	2.16	0.45	0.45	0.45	0.45		0.792	0.76474	0.342	0.58482
68	--	--	--	--	--		--	--	--	--
69	2744	2870	2870	2870	2870	$\nu(\text{CH}_3)$ - Proteínas	2844.8	56.34891	25.2	3175.2
70	191.4	3.01	3.02	3.02	3.02		40.694	84.24722	37.6765	7097.593

- Área de Proteínas: $4.92 + 3.30 + 40.69 = 48.91$

- Área de Lipídeos: $1.10 + 0.79 = 1.89$

- Proteínas: $48.91 \text{ ----- } 100\%$

- Lipídeos: $1.89 \text{ ----- } X$

$$X = 4\%$$

- Ponderação:

- $100\% + 4\% = 104\%$

- $(100 / 104) \times 100 = 96\%$

- $(4 / 104) \times 100 = 4\%$

Conclusão: Para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* apresenta-se uma síntese de conteúdo proteico 96% maior em relação ao conteúdo lipídico de 4%.

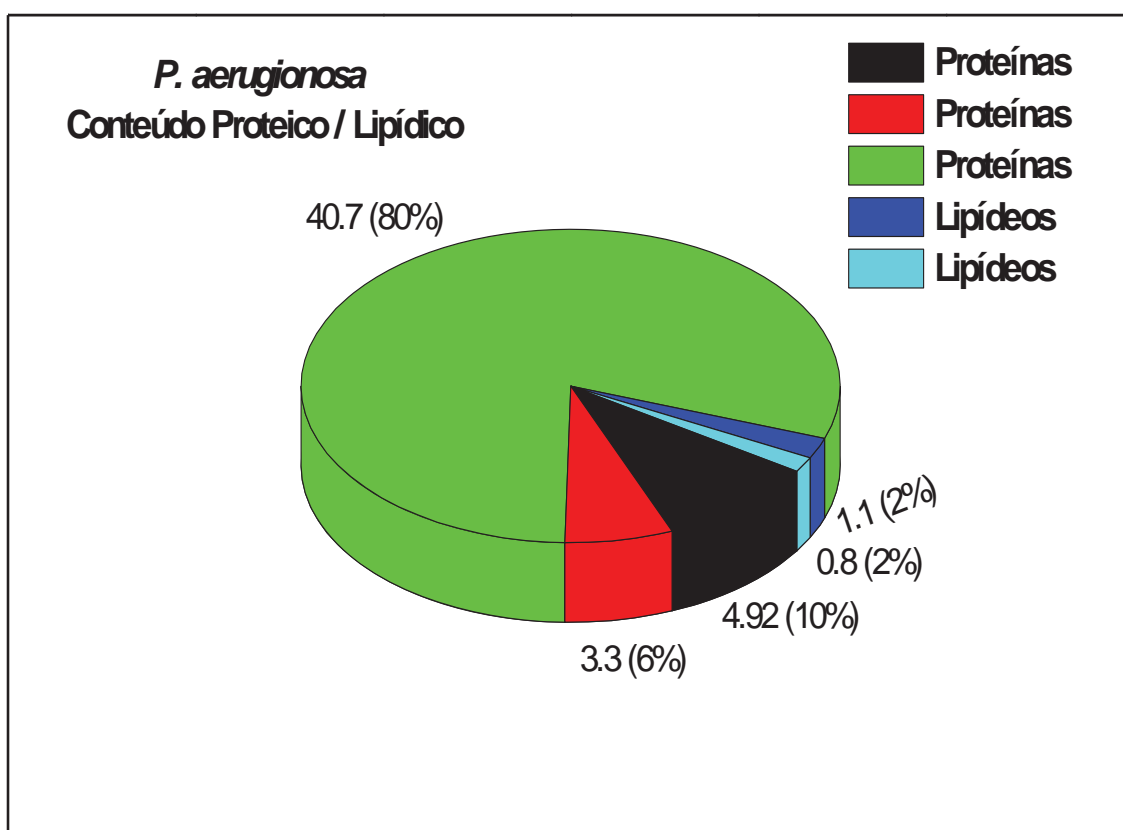


Figura 28: Diagrama Circular representando os valores médios das diferenças entre o conteúdo Proteico e Lipídico do micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte: Autor, 2020

A análise das regiões de Amida I segue o mesmo processo de (ADB) Análise de Deconvolução de Bandas e ajuste Gaussiano nas regiões entre 1750 – 1400 cm^{-1} para as bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, Nesta análise foram apresentadas as estruturas moleculares de proteínas destes micro-organismos como α -hélice, β -Sheet e β -Turn. como podem ser observadas nas figuras 27, 28, 29 e 30.

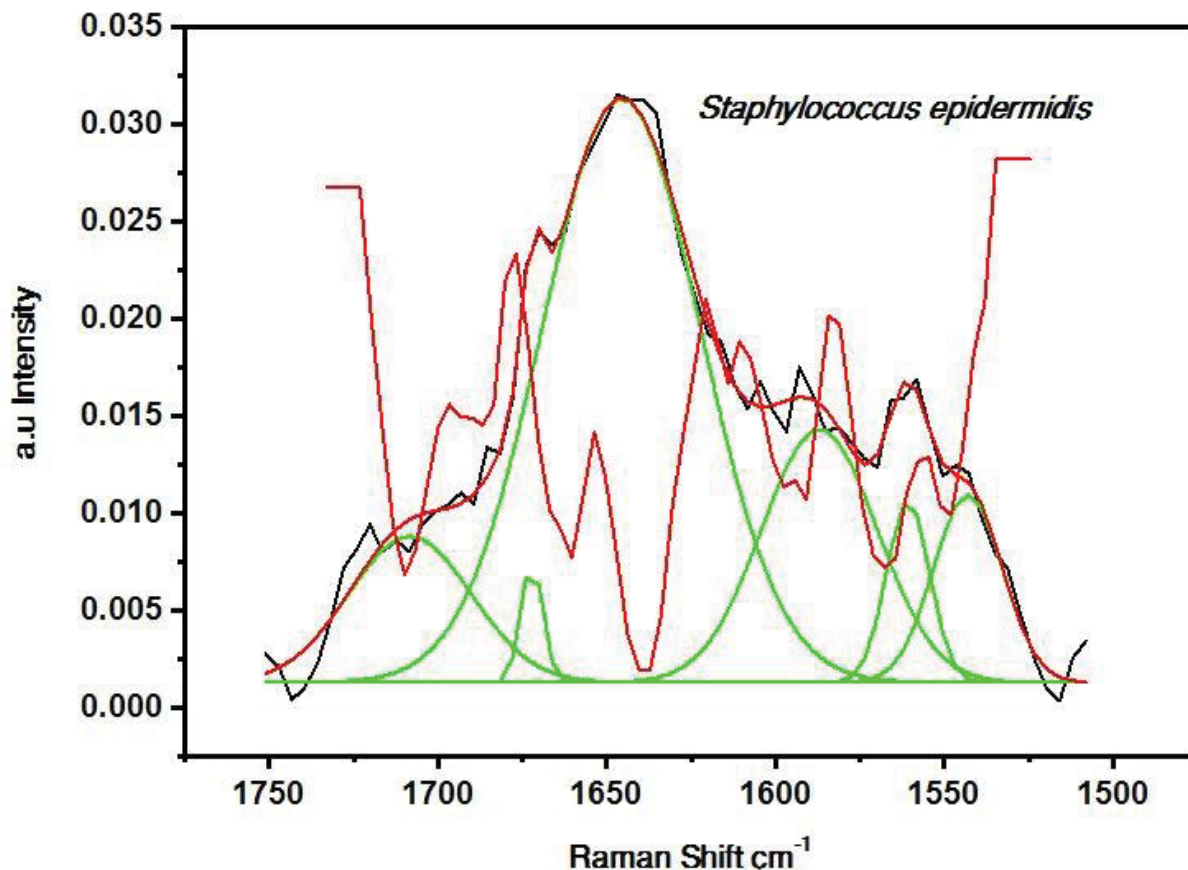


Figura 29: Espectro Raman de *S. epidermidis*. Pico primitivo deconvolvido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de Amida I nas regiões entre 1750–1500 cm^{-1}

Fonte: Autor, 2019

Nas regiões de Amida I entre 1750 – 1500 cm^{-1} é possível observar por intermédio da deconvolução da banda, a área e a 2ª derivada na bactéria *Staphylococcus epidermidis* os perfis de estrutura ou conformação proteicas conforme a tabela 10 apresentando β -sheet anti-paralela em 1713 ($\text{C}=\text{O}$ Timina), 1671 (Colesterol e Ácidos Graxos) e 1561 cm^{-1} ($\text{C}-\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$, δNH , Tirosina, Triptofano, cm^{-1} folha, assim como α -hélice nas bandas em 1643 ($\text{C}=\text{O}$) e 1586 cm^{-1} (Fenilalanina, Hidroxiprolina).

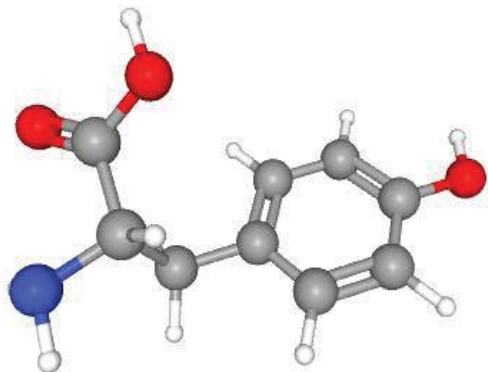


Figura 30: Conformação
Molecular da Tirosina
Fonte: PubChem, 2019

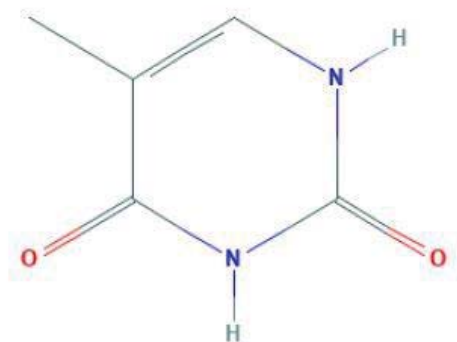


Figura 31: Conformação
Molecular da Timina
Fonte: PubChem, 2019

Cálculo das estruturas proteicas para *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

- Área de α -hélice: $1.14 + 0.53 = 1.67$
 - Área de β -sheet: $0.276 + 0.77 + 0.146 + = 1.08$
 - α -hélice: 1.67 ----- 100%
 - β -sheet: 1.08 ----- X
- $X = 65\%$
- Ponderação:
 - $100\% + 65\% = 165\%$
 - $(100 / 165) \times 100 = 61\%$
 - $(65 / 165) \times 100 = 39\%$

Conclusão: Para a bactéria *Staphylococcus epidermidis* apresenta-se uma síntese de estrutura proteica do tipo α -hélice em 61% maior com relação à estrutura proteica do tipo β -sheet com 39%.

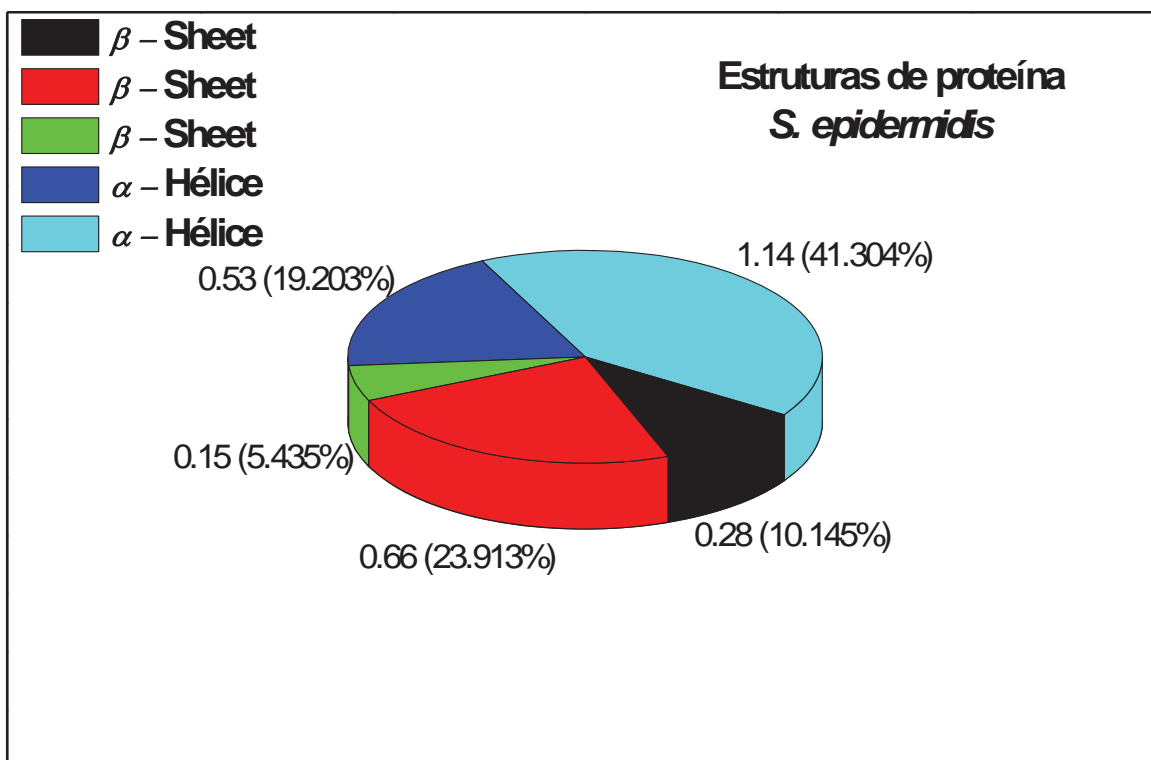


Figura 32: Diagrama Circular representando os valores médios das diferenças entre as estruturas proteicas do micro-organismo *Staphylococcus epidermidis*

Fonte: Autor, 2020

Tabela: 9 – Análise e resultados de estrutura proteica nas regiões de Amida I – *S. epidermidis*

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	N Total 5	<i>S. epidermidis</i>				Atribuições	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	Variância
2	1720	1708	1716	1716	1708	Amida I- β -sheet	1713	5.36656	2.4	28.8
3	0.32	0.34	0.19	0.19	0.34		0.276	0.07893	0.0353	0.00623
4	--	--	--	--	--		--	--	--	--
5	1714	1672	1649	1649	1672	Amida I- β -sheet	1671	26.54619	11.87182	704.7
6	0.21	0.05	1.09	1.9	0.05		0.66	0.81688	0.36532	0.6673
7	--	--	--	--	--		--	--	--	--
8	1647	1646	1639	1639	1646	Amida I-Alfa Hélice	1643	4.03733	1.80555	16.3
9	2	1.77	0.07	0.07	1.77		1.136	0.97764	0.43721	0.95578
10	--	--	--	--	--		--	--	--	--
11	1586	1587	1585	1585	1587	Amida I-Alfa Hélice	1586	1	0.44721	1
12	0.43	0.56	0.56	0.55	0.56		0.532	0.05718	0.02557	0.00327
13	--	--	--	--	--		--	--	--	--
14	1561	1561	1561	1561	1561	Amida I- β -Sheet	1561	0	0	0.00E+00
15	0.19	0.15	0.12	0.12	0.15		0.146	0.02881	0.01288	8.30E-04

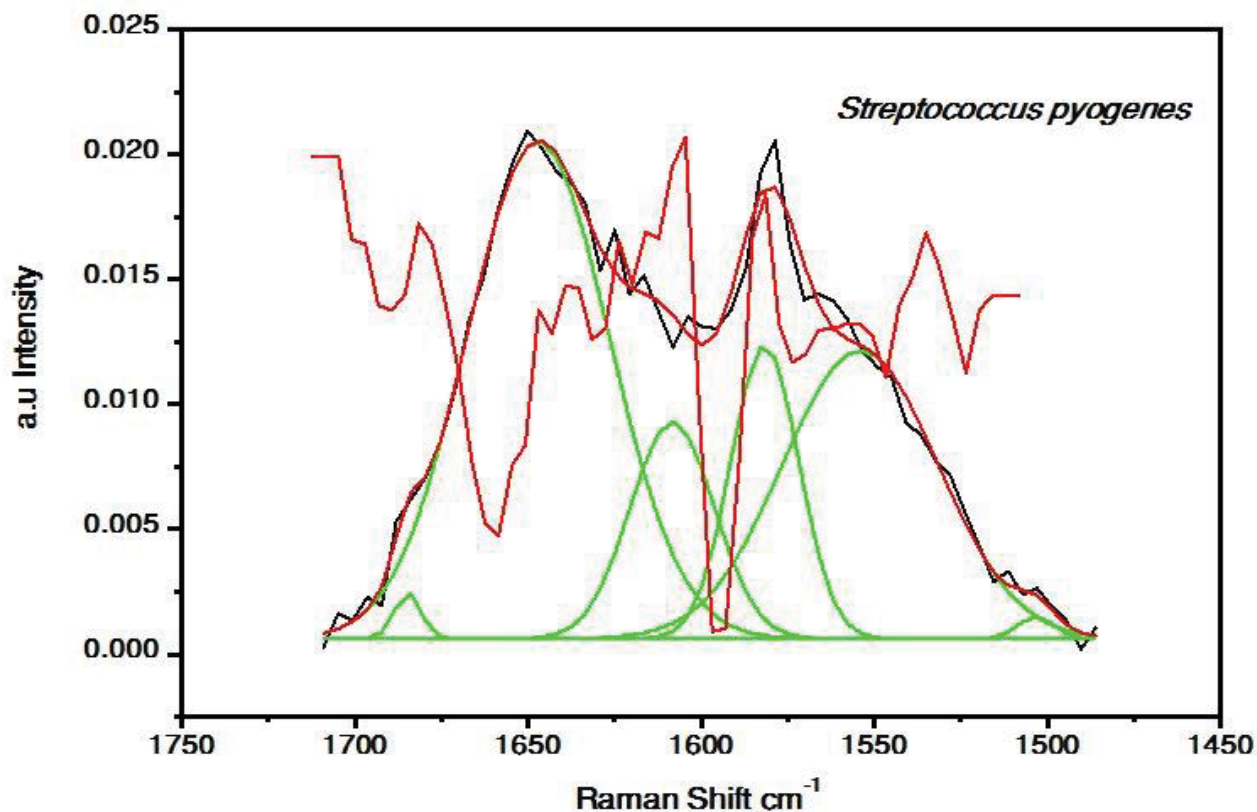


Figura 33: Espectro Raman de *S. pyogenes*. Pico primitivo deconvoluido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de Amida I nas regiões entre 1750–1500 cm^{-1}

Fonte: Autor, 2019

Em 1695 ($\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$) 1673 $\nu(\text{C}=\text{C})$ e 1629 $\nu(\text{C}=\text{O}$, $\text{C}_\alpha=\text{C}_\alpha)$ cm^{-1} é possível observar por intermédio da deconvolução da banda, a área e a 2ª derivada na bactéria *Streptococcus pyogenes* conforme tabela 11, folha β -sheet anti-paralela, em 1683 (Guanina) β -turn e em 1691 cm^{-1} α -hélice.

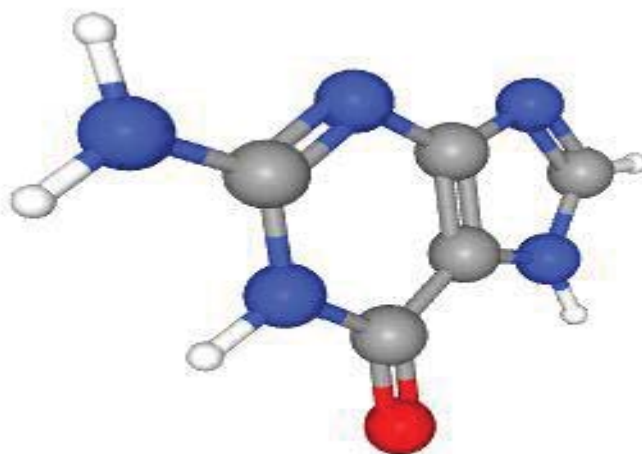


Figura 34: Estrutura Molecular da Guanina

Fonte: PubChem, 2019

- Área de α -hélice: $0.19 = 0.19$
 - Área de β -sheet: $0.02 + 0.24 + 0.02 + = 0.28$
 - α -hélice: 0.19 ----- 100%
 - β -sheet: 0.28 ----- X
 $X = 68\%$
 - Ponderação:
 - $100\% + 68\% = 168\%$
 - $(100 / 168) \times 100 = 60\%$
 - $(68 / 168) \times 100 = 40\%$
-

- Área de β -sheet: $0.02 + 0.24 + 0.02 + = 0.28$
 - Área de β -turn: $0.12 = 0.12$
 - β -sheet: 0.28 ----- 100%
 - β -turn: 0.12 ----- X
 $X = 43\%$
 - Ponderação:
 - $100\% + 43 = 143 \%$
 - $(100\% / 143\%) \times 100 = 70\%$
 - $(43 / 143) \times 100 = 30\%$
-

- Área de α -hélice: $0.19 = 0.19$
- Área de β -turn: $0.12 = 0.12$
- α -hélice: 0.19 ----- 100%
- β -turn: 0.12 ----- X
 $X = 63\%$
- Ponderação:
- $100 + 63 = 163\%$
- $(100 / 163) \times 100 = 61\%$
- $(63 / 163) \times 100 = 39\%$

Conclusão: Para a bactéria *Streptococcus pyogenes* apresenta-se uma síntese de estrutura proteica do tipo β -sheet em 60% maior com relação à estrutura proteica do tipo α -hélice com 40% . Para a comparação da folha β -sheet com β -turn temos as seguintes diferenças: 70% de conformação proteica para β -sheet e 30%

para β -turn. E com relação à comparação entre a estrutura de α -hélice e β -turn segue α -hélice com 61% para 39% de estrutura β -turn no micro-organismo *Streptococcus pyogenes*.

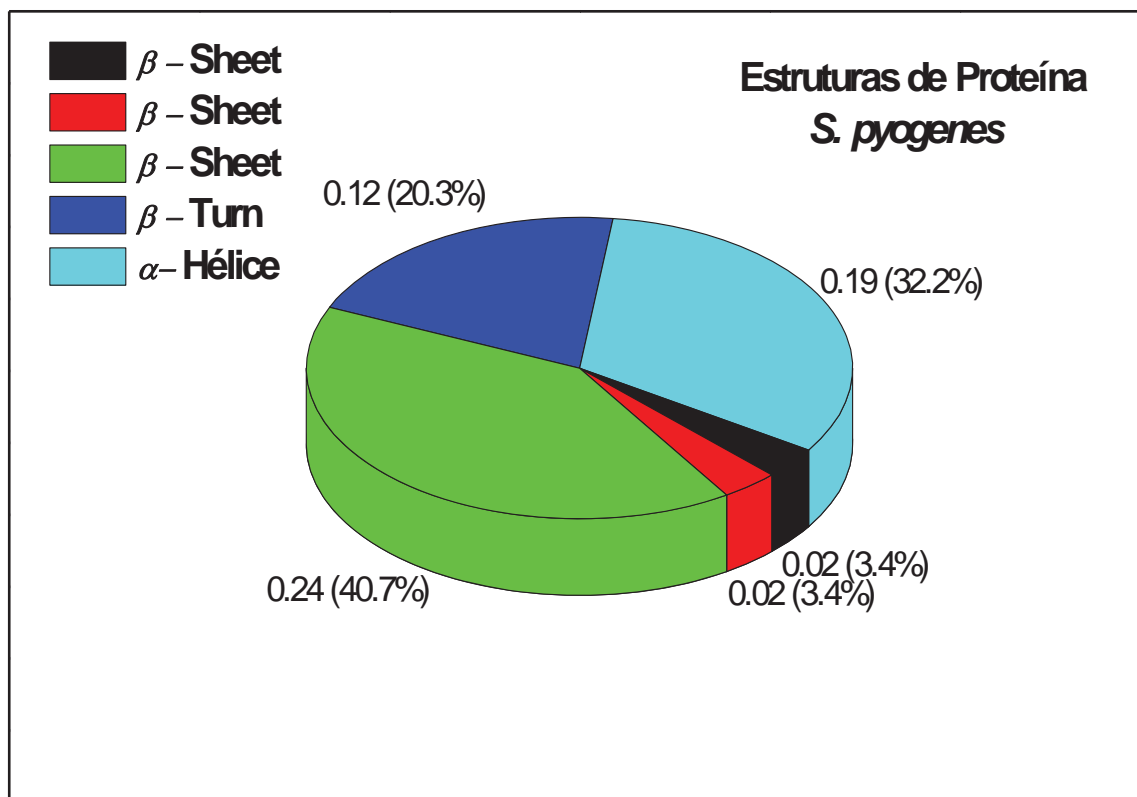


Figura 35: Diagrama Circular representando os valores médios das diferenças entre as estruturas proteicas do micro-organismo *Streptococcus pyogenes*

Fonte: Autor, 2020

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
34										
35	N Total 5	<i>S. pyogenes</i>				Atribuições	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	Variância
36	1696	1689	1697	1697	1697	Amida I- β -sheet	1695	3.49285	1.56205	12.2
37	0.01	0.04	0.01	0.01	0.01		0.016	0.01342	0.006	1.80E-04
38	--	--	--	--	--		--	--	--	--
39	1687	1665	1688	1688	1688	Amida I- β -turn	1683	10.18332	4.55412	103.7
40	0.06	0.37	0.05	0.05	0.05		0.116	0.14206	0.06353	0.02018
41	--	--	--	--	--		--	--	--	--
42	1668	1699	1666	1666	1666	Amida I- β -sheet	1673	14.56022	6.51153	212
43	0.23	0.01	0.32	0.33	0.33		0.244	0.1374	0.06145	0.01888
44	--	--	--	--	--		--	--	--	--
45	1653	1651	1651	1851	1651	Amida I-Alfa Hélice	1691	89.22332	39.90188	7960.8
46	0.27	0.16	0.18	0.18	0.18		0.194	0.04336	0.01939	0.00188
47	--	--	--	--	--		--	--	--	--
48	1629	1630	1629	1629	1629	Amida I- β -sheet	1629	0.44721	0.2	0.2
49	0.02	0.04	0.02	0.02	0.02		0.024	0.00894	0.004	8.00E-05

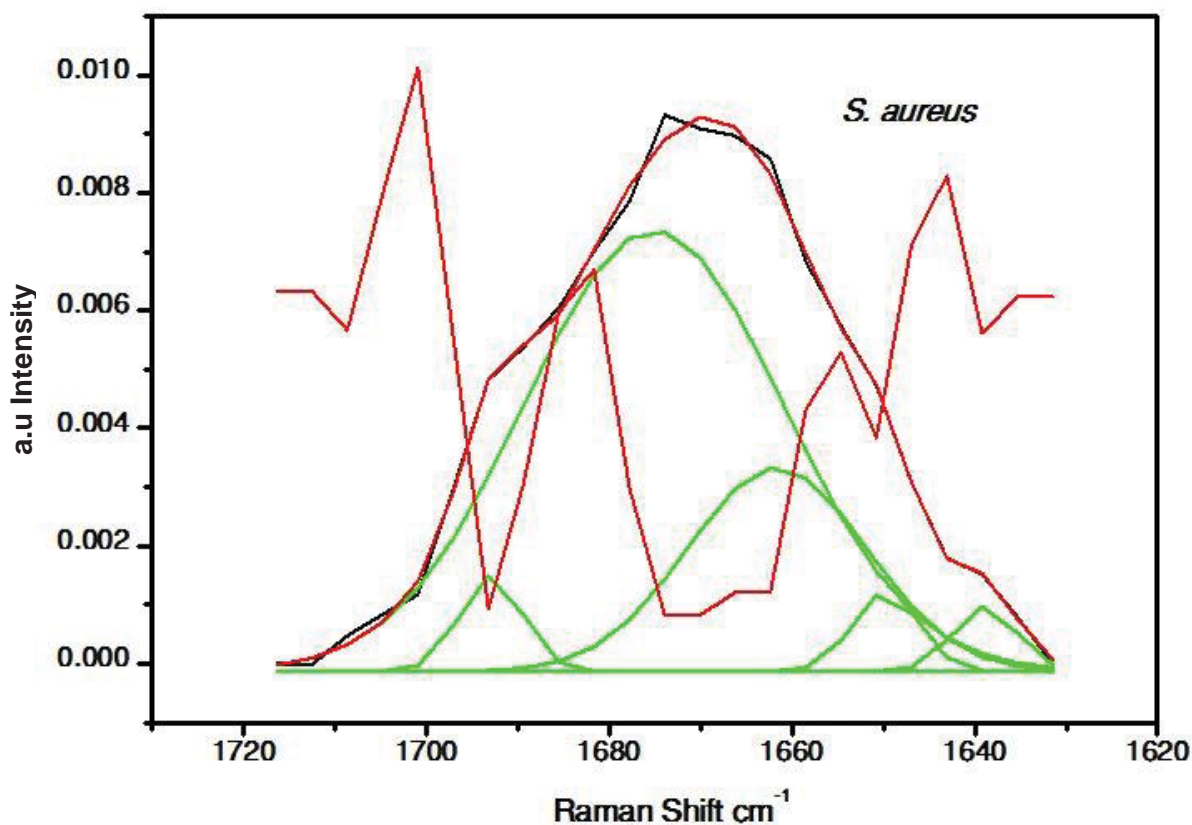


Figura 36: Espectro Raman de *S.aureus*. Pico primitivo deconvolvido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de Amida I nas regiões entre 1750–1500 cm^{-1}

Na tabela 11 nos apresenta a bactéria *Staphylococcus aureus* possuindo como estrutura proteica nas banda em 1692 (C=O, C-N, N-H) folha β -sheet, em 1683 (C=O Guanina), δ (N-H) e 1671 (C=C) cm⁻¹ temos a conformação β -turn, em 1661 (C=C Ceramida) 3_{10} -hélice e 1652 (C=C) α -hélice.

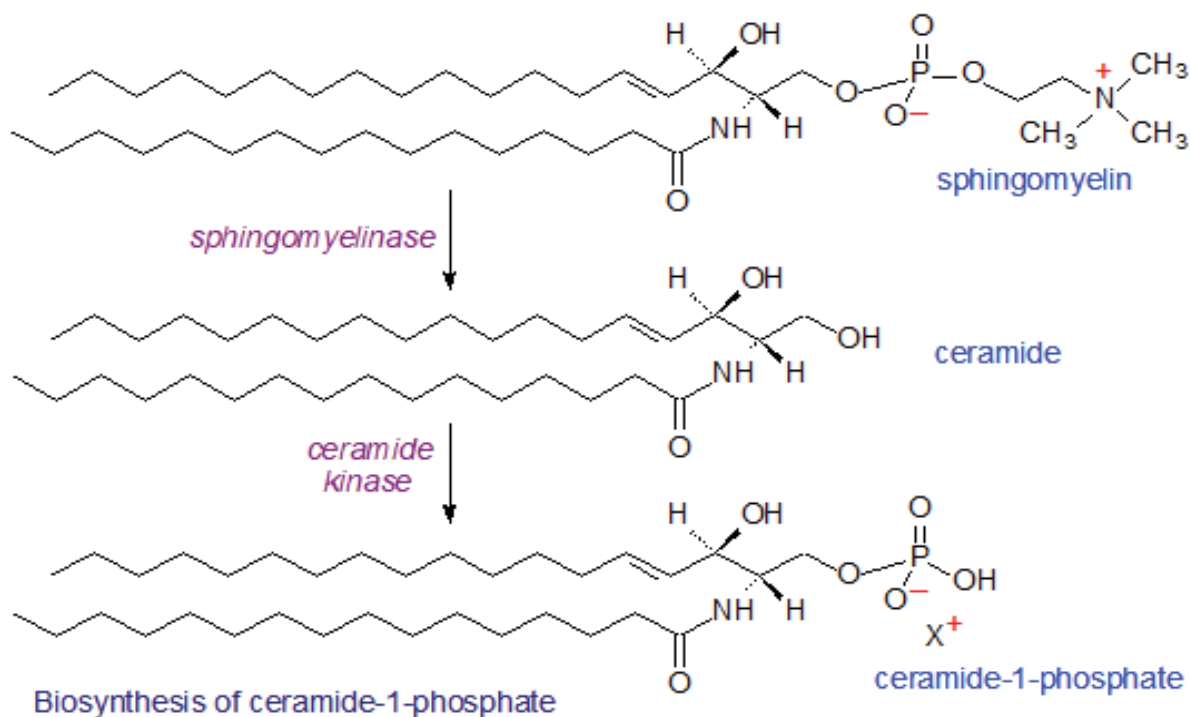


Figura 37: Biosíntese da Ceramida 1-Fosfato

Fonte: Nitai C.H; Aparna, M, 2017

- Área de α -hélice: 0.10 = 0.10
 - Área de β -turn: 0.12 + 0.12 = 0.24
 - α -hélice: 0.10 ----- X
 - β -turn: 0.24 ----- 100%
- X = 42%

- Ponderação:
- 100 + 42 = 142%
- (100 / 142) x 100 = 70%
- (42 / 142) x 100 = 30%

- Área de α -hélice: 0.10 = 0.10
 - Área de β -sheet: 0.19 = 0.19
 - α -hélice: 0.10 ----- X
 - β -sheet: 0.19 ----- 100%
- X = 53%

- Ponderação:
 - $100 + 53 = 153\%$
 - $(100 / 153) \times 100 = 65\%$
 - $(53 / 153) \times 100 = 35\%$
-

- Área de α -hélice: $0.10 = 0.10$
 - Área de 3_{10} -hélice: $0.03 = 0.03$
 - α -hélice: 0.10 ----- 100%
 - 3_{10} -hélice: 0.03 ----- X
- $X = 30\%$

- Ponderação:
 - $100 + 30 = 130\%$
 - $(100 / 130) \times 100 = 77\%$
 - $(30 / 130) \times 100 = 23\%$
-

- Área de β -turn: $0.12 + 0.12 = 0.24$
 - Área de 3_{10} -hélice: $0.03 = 0.03$
 - β -turn: 0.24 ----- 100%
 - 3_{10} -hélice: 0.03 ----- X
- $X = 13\%$

- Ponderação:
 - $100 + 13 = 113\%$
 - $(100 / 113) \times 100 = 88\%$
 - $(13 / 113) \times 100 = 12\%$
-

- Área de β -turn: $0.12 + 0.12 = 0.24$
 - Área de β -sheet: $0.19 = 0.19$
 - β -turn: 0.24 ----- 100%
 - β -sheet: 0.19 ----- X
- $X = 79\%$

- Ponderação:
- $100 + 79 = 179\%$
- $(100 / 179) \times 100 = 56\%$
- $(79 / 179) \times 100 = 44\%$

Conclusão: Para a bactéria *Staphylococcus aureus* apresenta-se a síntese de estrutura proteica do tipo α -hélice em 77% maior com relação à estrutura proteica do tipo 3_{10} -hélice com 23%. Para a comparação da folha α -hélice com β -turn temos as seguintes diferenças: 70% de conformação proteica para α -hélice e 30% para β -turn. E com relação à comparação entre a estrutura de α -hélice e β -sheet segue α -hélice com 65% para 35% de estrutura β -sheet. A estrutura β -turn é 75% mais expressiva em relação a 3_{10} -hélice que possui 25% no seu total. E finalizando, para a área de estrutura de β -turn observa-se uma porcentagem de 56% com relação à 44% de β -sheet no micro-organismo *Staphylococcus*.

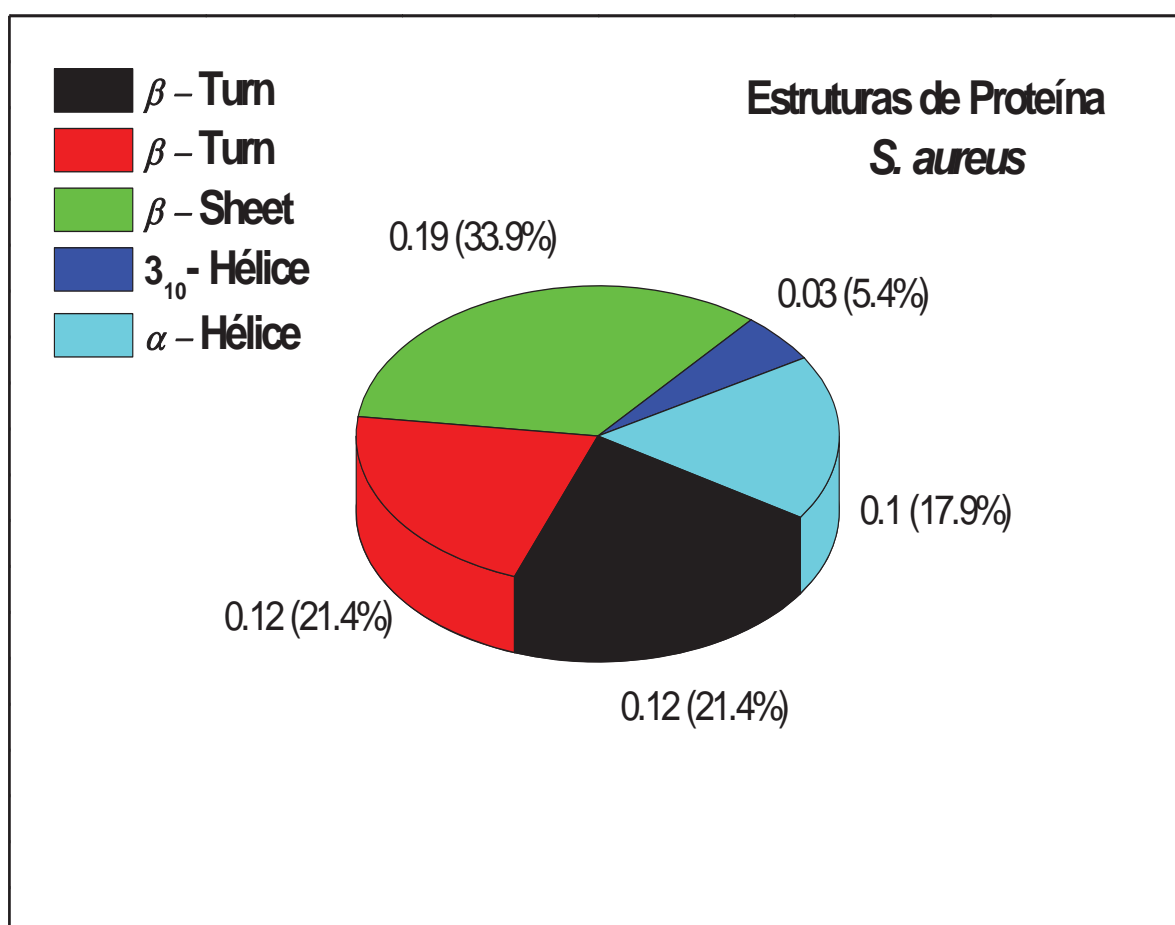


Figura 38: Diagrama Circular representando os valores médios das diferenças entre as estruturas proteicas do micro-organismo *Staphylococcus aureus*

Fonte: Autor, 2020

Tabela: 11 – Análise e resultados de estrutura proteica nas regiões de Amida I – *S. aureus*

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
52	N Total 5	<i>S. aureus</i>				Atribuições	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	Variância
53	1690	1690	1693	1693	1693	Amida I- β -sheet	1692	1.64317	0.73485	2.7
54	0.85	0.08	0.02	0.01	0.01		0.194	0.36787	0.16452	0.13533
55	--	--	--	--	--		--	--	--	--
56	1683	1683	1693	1679	1675	Amida I- β -turn	1683	6.69328	2.99333	44.8
57	0.01	0.01	0.09	0.2	0.27		0.116	0.1161	0.05192	0.01348
58	--	--	--	--	--		--	--	--	--
59	1674	1675	1671	1672	1662	Amida I- β -turn	1671	5.1672	2.31084	26.7
60	0.12	0.08	0.29	0.01	0.08		0.116	0.10502	0.04697	0.01103
61	--	--	--	--	--		--	--	--	--
62	1664	1664	1664	1664	1650	Amida I- 3_{10} -Hélice	1661	6.26099	2.8	39.2
63	0.06	0.01	0.05	0.01	0.01		0.028	0.0249	0.01114	6.20E-04
64	--	--	--	--	--		--	--	--	--
65	1654	1661	1647	1659	1639	Amida I-Alfa-Hélice	1652	9.05539	4.04969	82
66	0.09	0.19	0.04	0.16	0.01		0.098	0.07662	0.03426	0.00587

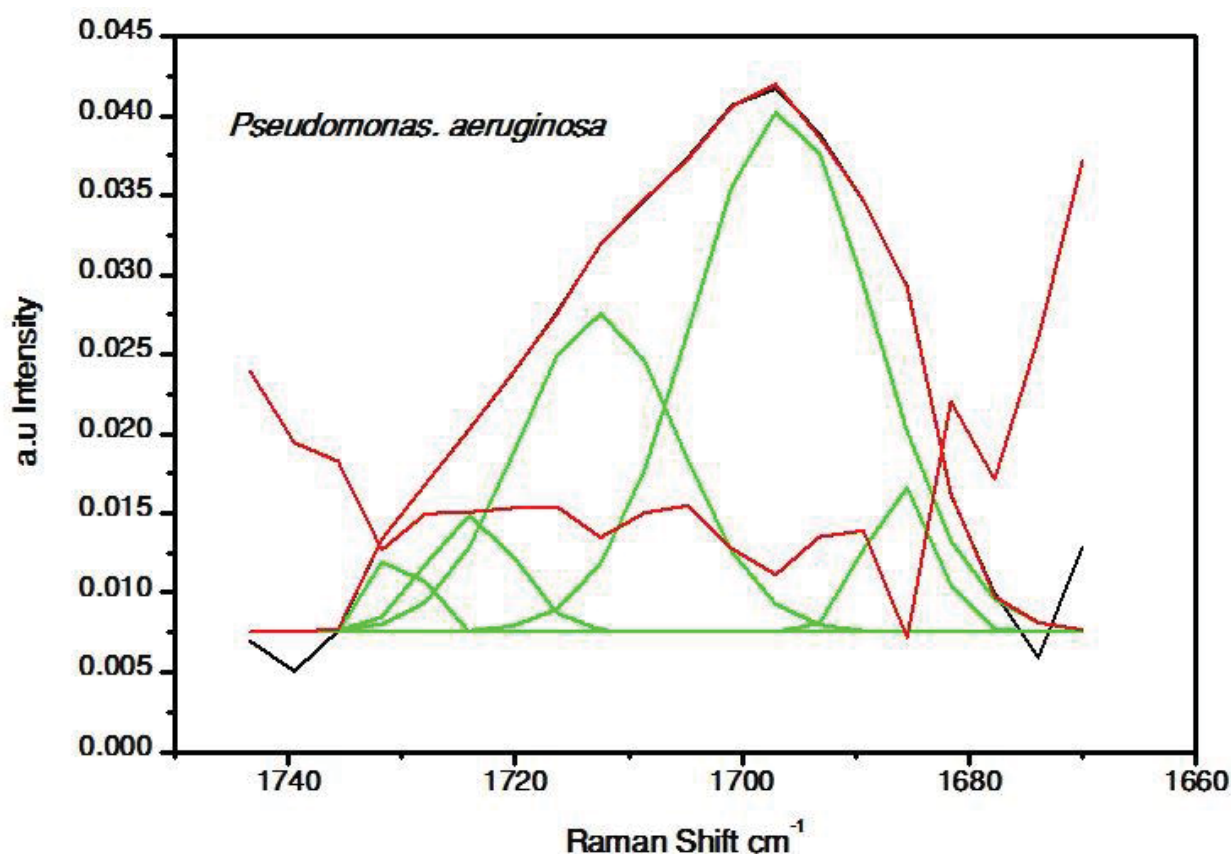


Figura 39: Espectro Raman de *P. aeruginosa*. Pico primitivo deconvolvido com sua 2ª derivada sobreposta e coincidindo-se entre si. Banda de Amida I nas regiões entre 1750–1500 cm^{-1}

Fonte: Autor, 2019

Estruturas proteicas na bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* do tipo β -sheet são encontradas nas regiões 1729, 1720, 1706 e 1676 cm^{-1} e na banda 1692 cm^{-1} encontramos a conformação β -turn. Atribuímos para a banda 1729 cm^{-1} o grupo éster, grupo de ácidos graxos com uma (C=O) para o estiramento de vibrações de Cortisona ($\text{C}_{21}\text{-H}_{28}\text{-O}_5$). 1720 apresenta (C=O) também inclusa dentro do grupo éster de ácidos graxos, 1706 cm^{-1} temos outra (C=O) ligada a Timina e Guanina. 1676 cm^{-1} é uma estrutura de folha β -sheet delimitando NADH ($\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$) livre. E finalmente a banda em 1692 atribuímos a mesma à vibração de alta frequência de β -sheet anti-paralela devido ao alongamento no plano da banda de (C=O) fracamente acoplado ao alongamento de (C-N) com flexão no plano na ligação de (N-H).

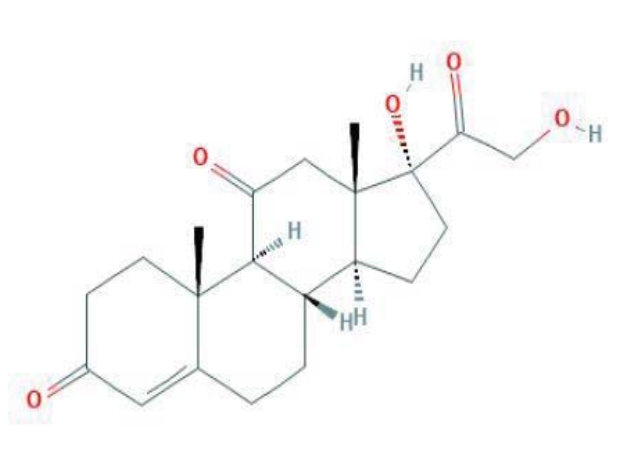


Figura 40: Estrutura molecular da Cortisona

Fonte: PubChem, 2019

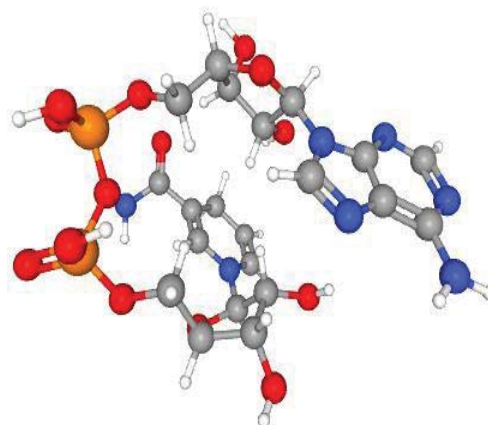


Figura 41: Estrutura em 3D da Nicotinamida

Adenina Dinucleotídeo (NADH) livre

Fonte: PubChem, 2019

- Área de β -turn: $0.41 = 0.41$
 - Área de β -sheet: $0.05 + 0.23 + 0.48 + 0.31 = 1.07$
 - β -turn: 0.41 ----- X
 - β -sheet: 1.07 ----- 100%
- $$X = 38\%$$
- Ponderação:
 - $100 + 38 = 138\%$
 - $(100 / 138) \times 100 = 72\%$
 - $(38 / 138) \times 100 = 28\%$

Conclusão: Para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* apresenta-se uma síntese de estrutura proteica do tipo β -sheet com 72% no seu total em relação à 28% de β -turn.

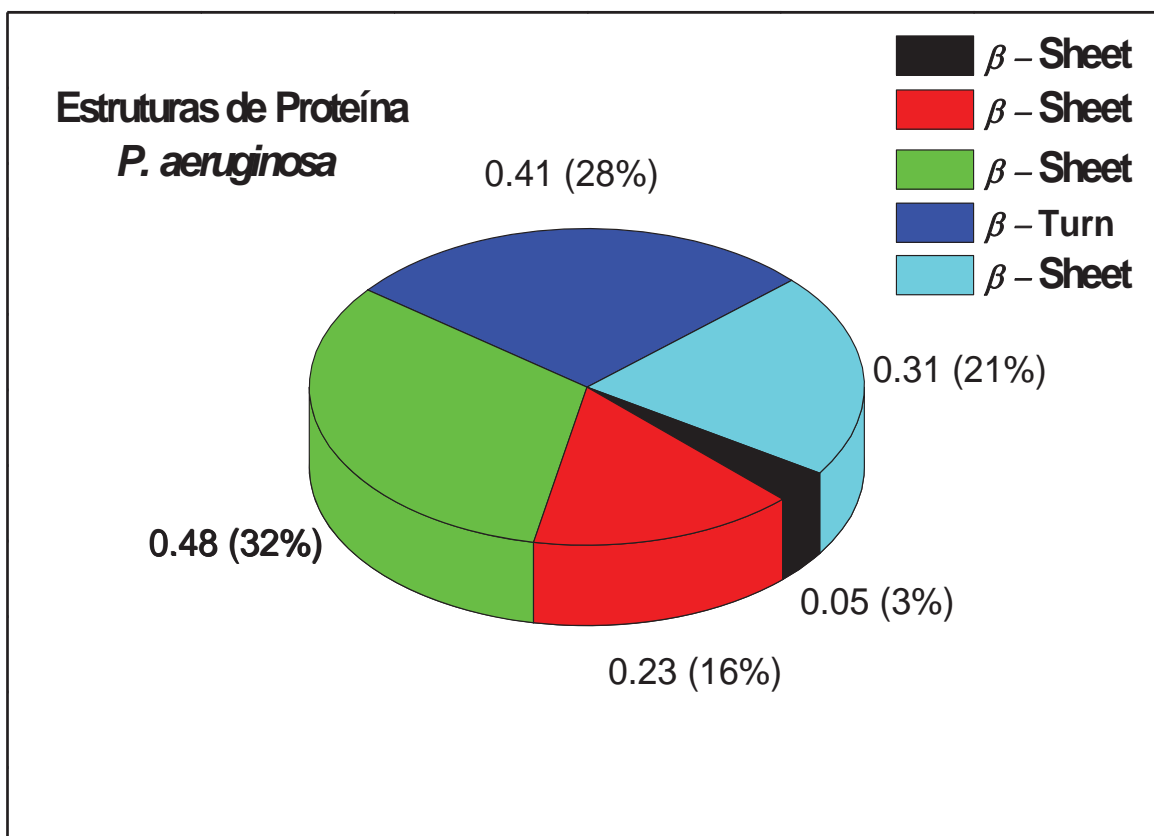


Figura 42: Diagrama Circular representando os valores médios das diferenças entre as estruturas proteicas do micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte: Autor, 2020

18	N Total 5	<i>P. aeruginosa</i>				Atribuições	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	Variância
19	1729	1730	1727	1730	1730	Amida I- β -sheet	1729	1.30384	0.5831	1.7
20	0.06	0.04	0.07	0.04	0.04		0.05	0.01414	0.00632	2.00E-04
21	--	--	--	--	--		--	--	--	--
22	1713	1724	1714	1724	1724	Amida I- β -sheet	1720	5.76194	2.57682	33.2
23	0.54	0.07	0.39	0.07	0.07		0.228	0.22276	0.09962	0.04962
24	--	--	--	--	--		--	--	--	--
25	1695	1713	1696	1713	1713	Amida I- β -sheet	1706	9.59166	4.28952	92
26	0.66	0.35	0.67	0.35	0.35		0.476	0.17257	0.07718	0.02978
27	--	--	--	--	--		--	--	--	--
28	1686	1696	1687	1696	1696	Amida I β -turn	1692	5.21536	2.33238	27.2
29	0.05	0.65	0.06	0.65	0.65		0.412	0.32591	0.14575	0.10622
30	--	--	--	--	--		--	--	--	--
31	1637	1686	1686	1686	1686	Amida I- β -sheet	1676	21.91347	9.8	480.2
32	1.29	0.07	0.04	0.07	0.07		0.308	0.54911	0.24557	0.30152

10. MÉTODOS ESTATÍSTICOS E SEUS RESULTADOS

Aqui apresentamos os resultados adquiridos por intermédio dos métodos estatísticos: PCA (Análise de Componentes Principais) para análise da variabilidade dos conjuntos submetidos à esse método, espectros apresentando sua Média e Desvio Padrão e o Dendrograma de ligação de Ward para observação das dispersões e a discriminação de determinados grupos.

Nas figuras 43 à 46 é possível observar e considerar uma taxa de dispersão muito baixa evidenciando muito pouca discrepância nos seus dados com relação à média e ao desvio ao desvio padrão dos respectivos espectros Raman de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus epidermidis*, cuja as regiões entre 400 a 1800 cm^{-1} compreendem os picos de grande relevância no que diz respeito ao seu metabolismo e sínteses proteicas e lipídicas por intermédio do seu DNA.

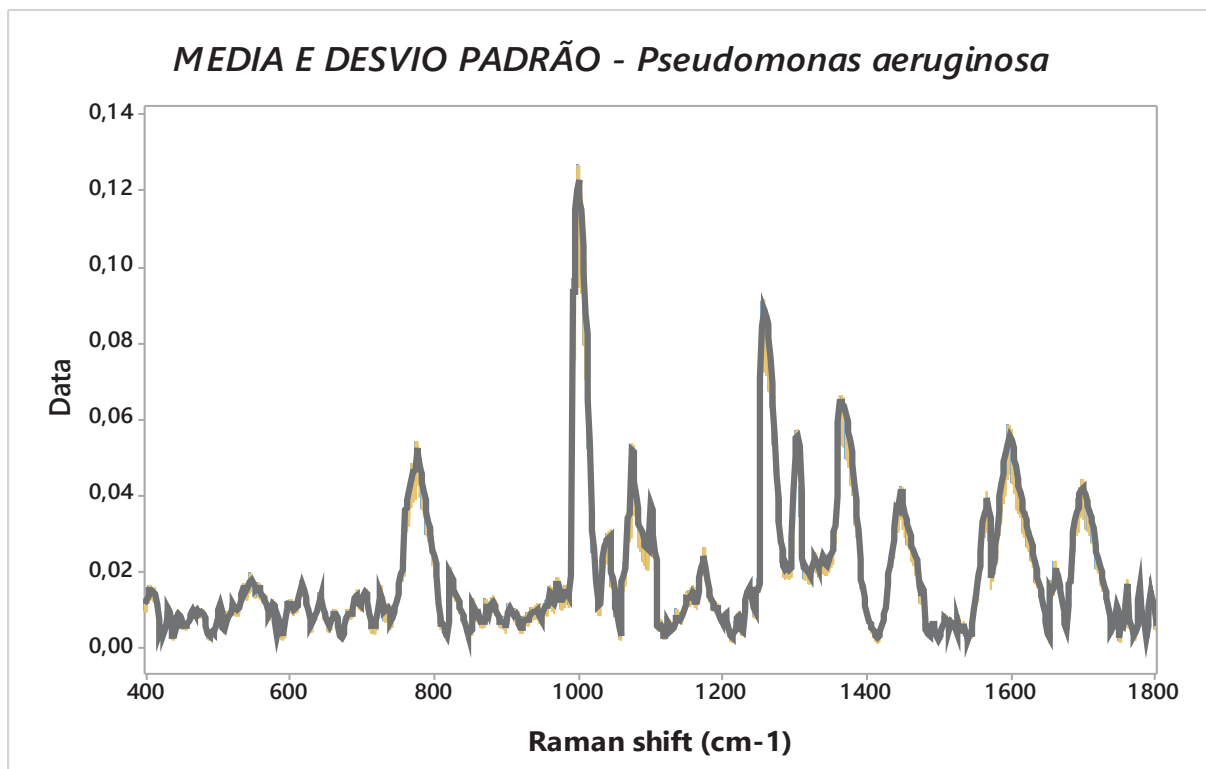


Figura 43: Média e Desvio Padrão do espectro Raman de *P. aeruginosa* nas regiões entre 400 a 1800 cm^{-1}

Fonte: Autor, 2019

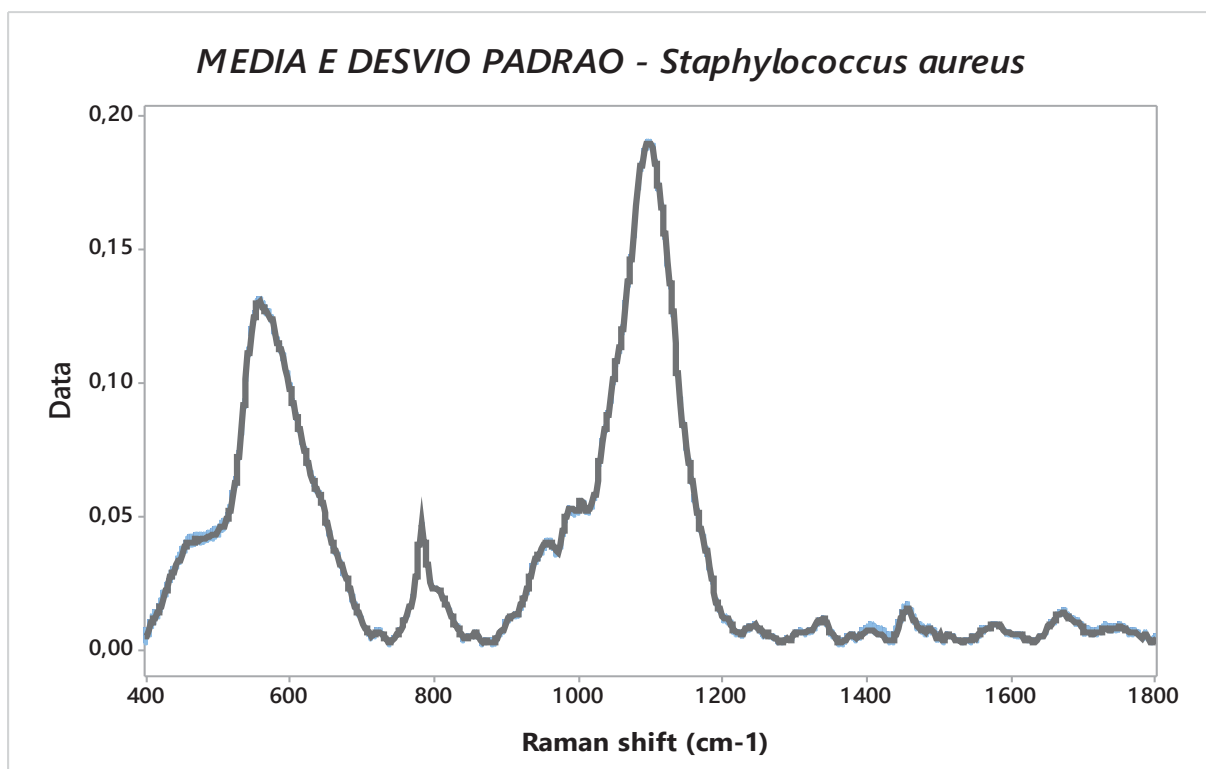


Figura 44: Média e Desvio Padrão do espectro Raman de *S. aureus* nas regiões entre 400 a 1800 cm^{-1}

Fonte: Autor, 2019

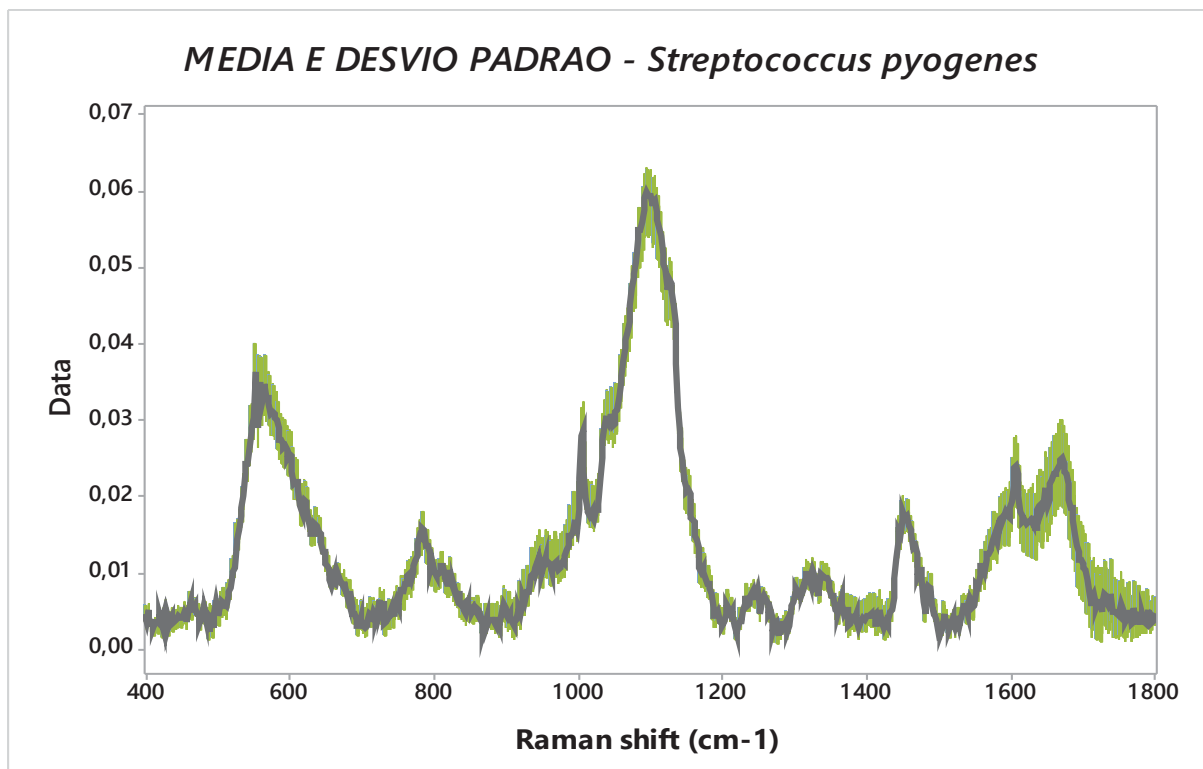


Figura 45: Média e Desvio Padrão do espectro Raman de *S. pyogenes* nas regiões entre 400 a 1800 cm⁻¹

Fonte: Autor, 2019

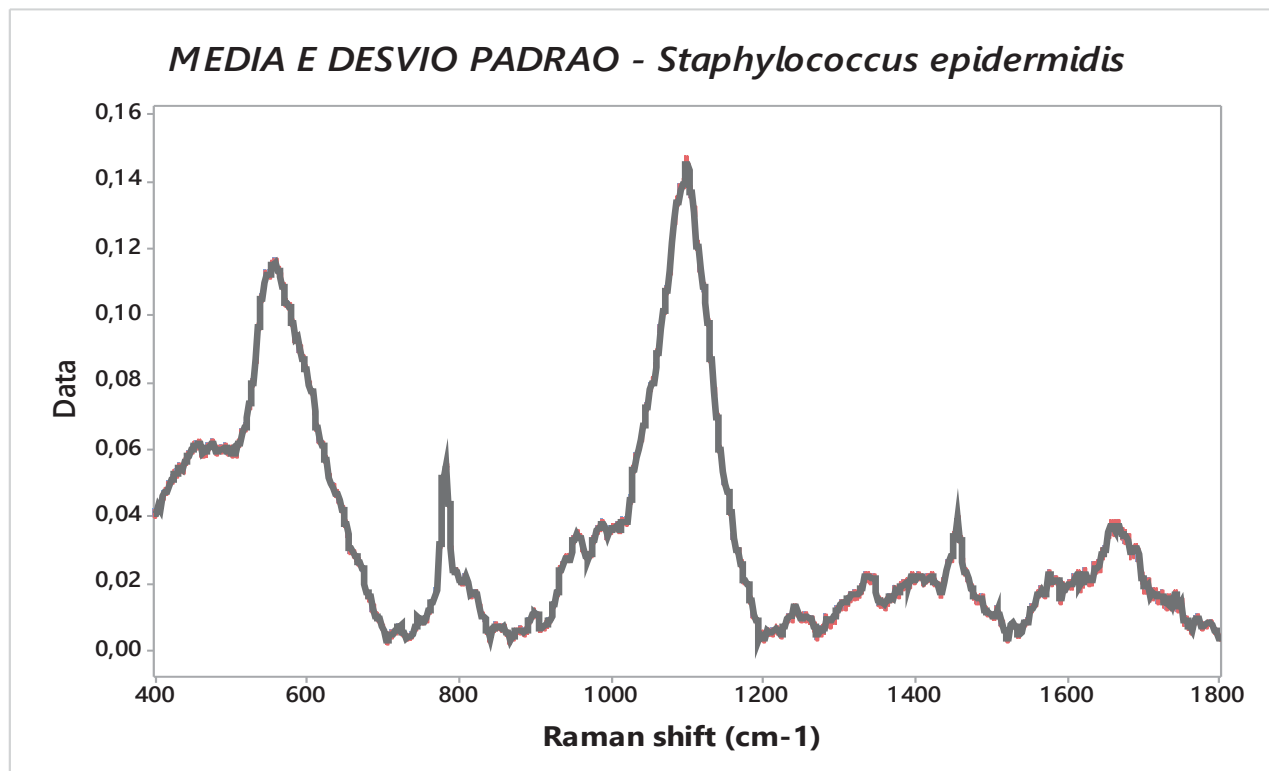


Figura 46: Média e Desvio Padrão do espectro Raman de *S. epidermidis* nas regiões entre 400 a 1800 cm⁻¹

Fonte: Autor, 2019

O método de Análise de Componentes Principais nos permitiu explorar com detalhes cada uma das regiões em PC1 e PC2. Pode-se observar os 4 micro-organismos submetidos à esta análise perfeitamente agrupados de forma a se considerar, muito pouca dispersão em PC1 e PC2. Observa-se claramente entre as variáveis uma separação muito bem organizada entre os clusters dos micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes* na região positiva do eixo X e eixo Y e os clusters de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na região negativa do eixo X e eixo Y.

Também é possível ver nesse Scatterplot o modo como os grupos de cada gênero e espécie dos micro-organismos estão dispostos, de forma que *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* em seus grupos, apresentam aproximadamente em 0,05 e 0,13 respectivamente, no eixo X da PC1, um único elemento relativamente disperso em cada um de seus grupos, o que não agrava ou torna estes grupos discrepantes em termos de anormalidade. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* apresentam-se perfeitamente agrupados, praticamente não há dispersões, como ilustra abaixo a figura 47.

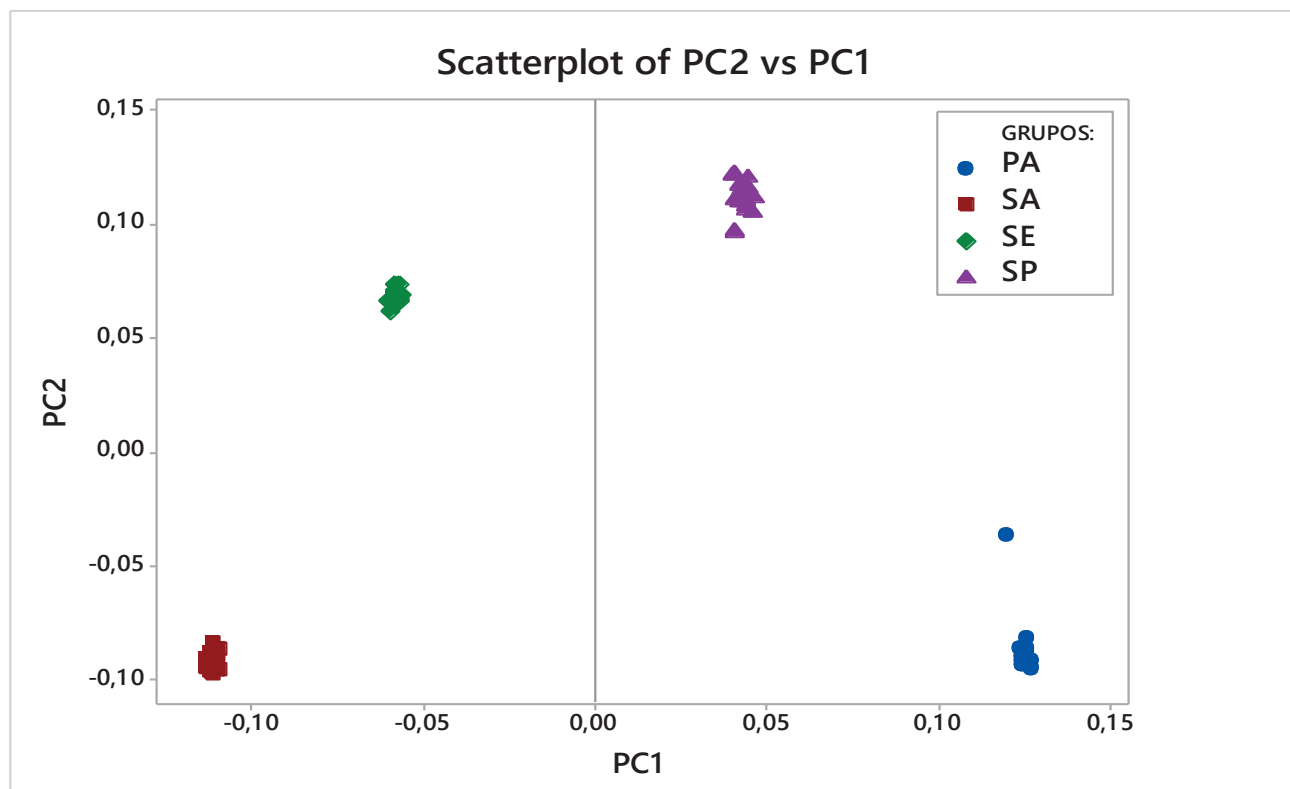


Figura 47: Classificação e separação das 4 bactérias por Análise de Componentes Principais (PCA)

Fonte: Autor, 2019

Corroborando com os resultados decorrentes da PCA (Análise de Componentes Principais) está o Dendrograma de Ligação de Ward.

Neste dendrograma é possível observar as diferenças e similaridades entre os grupos das 3 bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes*, como também o único grupo de Gram negativa, o grupo de *Pseudomonas aeruginosa*. Podemos observar que para as 4 bactérias foram formados clusters ou, grupos dos 30 registros espectrais adquiridos para cada um dos micro-organismos totalizando os 120 registros espectrais e que esses grupos foram encadeados pelas barras de ligação de forma a se apresentarem em 4 grupos diferentes relacionados ao seu gênero e espécie. A distância ou, correlação produto-momento de Pearson observadas no gráfico com relação à posições das barras de ligação dos clusters no dendrograma, é usada para avaliar a força e a direção da associação entre duas variáveis contínuas que são linearmente relacionadas. Seu coeficiente ρ (Rô grego) indica a força e a direção desse relacionamento e pode variar de -1 para um perfeito relacionamento linear negativo a +1 para um perfeito relacionamento linear positivo. Um valor 0 (zero) indica que não há relação entre as duas variáveis. Podemos tomar como exemplo a correlação de Pearson para entender se existe uma associação entre as quatro bactérias em análise e seus mecanismos de ação variados ou similares entre si (ou seja, temos duas variáveis que seriam "mecanismos de ação de bactérias" medidas na observação de como as bactérias se comportam no ambiente aonde se instalaram e "que tipos de elementos ou, substâncias bioquímicas elas produzem, modificam, ou secretam", medidas ou observadas pelas lesões ocorridas em pele com DA). Se houvesse uma associação forte e positiva, poderíamos dizer que as quatro bactérias possuem similaridades em relação ao que produzem, modificam, ou secretam e como se comportam associadas à DA, estando associadas a uma acurácia mais alta do teste. Se houver uma associação moderada e negativa, poderíamos dizer que há diferenças em seus mecanismos de ação e resistência, sobre o produzem, modificam, secretam e como se comportam associadas à DA.

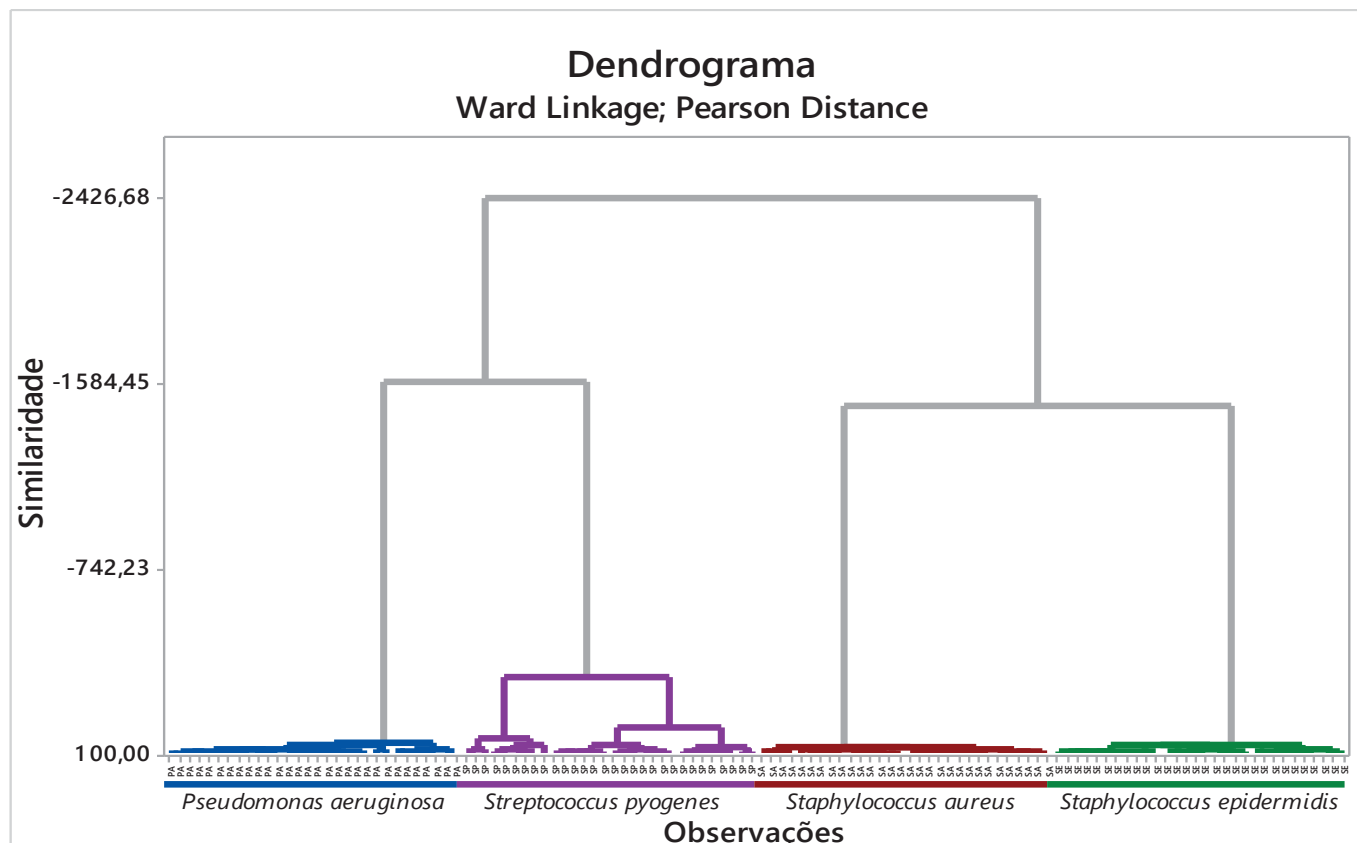


Figura 48: Dendrograma de ligação de Ward apresentando as diferenças e similaridades entre os grupos das bactérias Gram positivas: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e a Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte: Autor, 2019

11. DISCUSSÃO

Neste trabalho realizou-se um estudo sobre a capacidade e eficiência da microespectroscopia FT-Raman na identificação e caracterização de micro-organismos que procuram colonizar o tecido cutâneo lesado por Dermatite Atópica. Os resultados ilustram a eficácia da técnica para uma rápida e precisa identificação bacteriana.

Nota-se no dendrograma de Ward que os grupos de *S. aureus* e *S. epidermidis*, que são bactérias de gêneros iguais, porém de espécies diferentes, apresentam diferenças quando observamos a separação dos vários pequenos grupos destas 2 bactérias e ao mesmo tempo há similaridades entre essas bactérias quando vemos o encadeamento desses pequenos grupos em 1 único grupo, indicando essa similaridade entre elas. Ocorre portanto, em relação ao comportamento bioquímico ou, metabólico desses micro-organismos, similaridades e diferenças entre si. Isso ocorre também nos grupos de *P. aeruginosa* e *S. pyogenes* porém, observa-se que mesmo sendo ambas as bactérias de gêneros e espécies diferentes, a primeira Gram

negativa, a segunda Gram positiva, ambas apresentam algum nível de similaridade entre si. Encontramos diferenças, a separação dos grupos, o que é natural, mas a nível bioquímico e metabólico, ambas apresentam grau relevante de similaridade.

Propomos nesta pesquisa embasada nos experimentos de (Riedel et al., 2001; Tashiro et al., 2013; Davies; Marques, 2008; Ryan et al., 2008) a ideia de que para a leve similaridade de perfis apresentada nos clusters de *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes* sendo estas, de gêneros e espécies diferentes e no qual as barras de ligação e distância de Pearson no dendrograma de Ward indicam, não somente a capacidade de estar presente adaptando-se ao meio, no qual também podem estar presentes outros micro-organismos e de outros gêneros e outras espécies mas sim, a capacidade de liberar, secretar os mesmos elementos ou substâncias advindas dos seus metabolismos bioquímicos apresentando desta forma interações em um ambiente colonizado por inúmeros micro-organismos diferentes em gênero, espécie e subespécie tornando-se plenamente possível o fenômeno de *quorum sensing*, que é a adaptação ao meio e para isto sintetizam mecanismos de defesa mantendo desta forma uma simbiose em seu meio colonizado, como é o caso de *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes* apresentados neste trabalho.

(Ryan et al., 2008) apresenta em sua pesquisa um quadro interessante sobre o comportamento e relações que ocorrem entre diferentes nichos de gêneros e espécies microbianas. Nessa pesquisa foi relatado que a bactéria do gênero *Xanthomonas campestris*, uma bactéria Gram negativa que causa deterioração em plantas, sintetiza e libera um elemento químico de origem lipídica, um ácido (ácido cis-11-metil-2-dodecenóico) de grupo funcional ($C_{13}H_{24}O_2$) e chamado DSF (Diffusible Signal Factor) ou, FSD (Fator de Sinal Difusível), esse ácido graxo é capaz de não apenas modular a formação de biofilme e virulência em *Xanthomonas campestris*, mas também altera a morfologia de outras bactérias (Ryan et al., 2008; An; Tang, 2018).

Este conteúdo lipídico, o DSF também é secretado por *Stenotrophomonas maltophilia* e causa uma alteração na formação de biofilmes de *P. aeruginosa* e aumenta a resistência contra o antibiótico polimixina por intermédio de um sensor chamado quinase PA1396, essa proteína quinase PA1396 em associação com o DSF modifica outras proteínas adicionando quimicamente grupos fosfato a elas ocorrendo a fosforilação. A fosforilação geralmente resulta em uma alteração funcional da proteína alvo, ou seja, o substrato, alterando a atividade enzimática, a localização celular ou a associação com outras proteínas. *S. maltophilia* existe em vários ambientes, assim como *P. aeruginosa*, e pode-se considerar que essa interação é relevante em diversos nichos e corroborando com este trabalho e os resultados

apresentados de similaridades entre os conteúdos de proteínas e lipídicos podemos observar também por outras literaturas que a *P. aeruginosa*, Gram negativa e *S. pyogenes* Gram positiva também interagem e secretam fatores de sinalização difusivos, fatores esses que são produtos de estruturas proteicas e lipídicas sintetizadas por seus metabolismos como o ácido cis-2-decenóico, que estruturalmente é similar ao DSF e que pode interagir com biofilmes formados por *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. mirabilis*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *S. aureus* e leveduras como *C. albicans*, assim como podem secretar quatro tipos de moléculas autoindutoras como o Autoindutor-1, 2, 3 e 4 como por exemplo N-acil-homoserina lactona (AHL), alquil quinolona e hidroxicetonas (Tashiro *et al.*, 2013; Soheili *et al.*, 2015; Bhunia, 2018).

Foram observados também e executados também os devidos cuidado na incubação dos microrganismos neste trabalho é de fato observado com atenção no intuito de que a amostra, ou inóculo bacteriano pudesse estar 100% viável, no seu pico máximo de metabolismo, desta forma há maior oportunidade na aquisição de um melhor sinal ou espectro Raman, respeitando o tempo ideal para as alçadas no prazo dentro da conformidade com a fase de crescimento exponencial dos microrganismos, declínio e morte celular, Sandt *et al* (2006) relatou tempos de incubação de 10 horas para *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* para obtenção de amostras com espectros reprodutíveis e de qualidade e pode-se realizar também como ferramenta de trabalho o método de estampagem de microcolônias como preparação de amostra. (Maquelin *et al*, 2003; Sandt *et al*, 2006; Ngo-thi, Kirschner, Naumann, 2003).

Outra metodologia de preparação de amostra citada na literatura é a diluição em água destilada, porém pode ter a possibilidade de plasmólise, pode-se romper a parede bacteriana por conta da entrada excessiva de água no interior do microrganismo ocorrendo por conta disso a pressão osmótica, lisando dessa forma a sua bicamada fosfolipídica (Bosh, 2008; Helm, 1991; Kirschner *et al*, 2001). Os espectros das amostras foram considerados reprodutíveis. A reprodutibilidade é importante para a correta classificação espectral e os espectros podem ser considerados altamente reprodutíveis através da consistência entre as intensidades relativas das bandas.

A reprodutibilidade espectral foi alcançada por conta padronização das condições de cultura bacteriana e preparação das amostras e as variações na intensidade de banda resultantes de pequenas diferenças de espessura na amostra foram minimizadas com a correção de linha de base e normalização vetorial. Encontramos neste trabalho concernente às colônias microbianas, diferenças

significativas quando submetidas ao equipamento Raman. Diferenças nas regiões de conteúdo proteico e lipídico ($\text{CH}_2 / \text{CH}_3$) e regiões de Amida I, são características importantes no que diz respeito aos mecanismos intrínsecos de defesa e formação de possíveis biofilmes microbianos no tecido cutâneo porquanto indicam mudanças estruturais referentes à maquinaria metabólica, membrana plasmática proteínas, ácidos graxos grupos funcionais envolvendo fosfatos, carboidratos, ácidos nucleicos (Natai, 2017; Spiegel, 2007).

O objetivo deste trabalho foi claramente estudar o comportamento dos micro-organismos na região de tecido cutâneo, qual as suas reações e influência nas lesões, equilíbrio e desequilíbrio da microbiota cutânea, visto que há a necessidade de preservação e integridade dos tecidos da pele para que este seja um dos fatores nos quais a dermatite atópica, cujo é uma doença recidiva, mas que ao menos por conta da microbiologia envolvida, haja prevenção e tratamento, Addor, 2010; Barnard, 2016, Campana, 2018).

Outro fato relevante são diretamente os resultados esperados em si, deste trabalho. Encontramos uma variação de conteúdo proteico comparado ao lipídico para a bactérias *Staphylococcus epidermidis* de 65% contra 35% de lipídeos, para o *Staphylococcus aureus* 86% de proteínas e 14% no seu total a bactéria *Streptococcus pyogenes* encontra-se com 63% de conteúdo proteico para 37% de conteúdo lipídico e finalizando a bactéria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* é o micro-organismos no qual apresenta maior estrutura na síntese de proteínas no seu metabolismo, 96% para apenas 4% de lipídeos ou ácidos graxos, outra bactéria que contem grande volume proteico é *S. aureus* em relação aos demais 86% contra 65% de *S. epidermidis* e 63% de *S. pyogenes*. Assim como a *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* é bem conhecido pela facilidade com que pode formar biofilme em pele, algumas cepas possuem mecanismo de resistência contra Meticilina, o que corrobora perfeitamente com a literatura (Martin, 2017; Soto, 2018; Chan, 2006).

O que observa-se claramente é que o micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa* quando comparado com os demais micro-organismos, é o que dentre todos possui o maior volume de conteúdo proteico, enquanto que seu lipídeos são muito inexpressivos. Sabemos que *P. aeruginosa* possui a sua parede celular menos espessa em relação às demais bactérias por conta de ser Gram-negativa, a bicamada fosfolipídica das demais que são Gram-positiva, se sobressai. Isso é compensado por parte de *P. aeruginosa* com outros elementos nos quais conferem virulência significativa como os LPSs (Lipopolissacarídeos) de parede celular, um componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, aparentemente, é uma das

principais toxinas responsáveis pelo início de reações fisiopatológicas observadas durante graves infecções e choques sépticos. Esses Lipopolissacarídeo (LPS) de membrana externa, envolvendo tudo que diz respeito ao espaço periplasmático, peptidoglicano da membrana citoplasmática, antígeno K, cadeia O, cerne polissacarídeo e ligado ao lipídeo A, as porinas Ex. OmpF Lipoproteína OmpA Fosfolipídeo reações frequentemente observadas são: febre, leucopenia, taquicardia, taquipnéia, hipotensão, coagulação intravascular disseminada e insuficiência de múltiplos órgãos (Lamping *et al*, 1998; Ulmer *et al*, 2000;).

Em relação às estruturas de proteínas, também são outro fator importante e relevante no que diz respeito ao possível fator de resistência e virulência quando da formação dos biofilmes em pele lesada por dermatite atópica. Genes responsáveis pela codificação de bombas de efluxo, mudança na conformação das porinas, dificultando a penetração dos fármacos, das pomadas, ou loções para tratamento da pele, podem perfeitamente estar contribuindo para a resistência aos antibióticos quando da mudança ou conformação de estrutura proteica mais complexa em relação às outras de outros gêneros, espécies, ou sub-espécies de micro-organismos como relata (Chevalier, 2017; Azghani, 2007; Bellido, 1992; Biswas, 2008). Encontramos variações significativas nas estruturas proteicas das quatro bactérias neste trabalho, sendo as estruturas moleculares de proteínas destes micro-organismos as conformações α -hélice, β -Sheet e β -Turn. Podemos observar as variações e as diferenças de estrutura para cada célula bacteriana com os seguintes resultados: Para a bactéria *Staphylococcus epidermidis* apresenta-se uma síntese de estrutura proteica do tipo α -hélice em 61% maior com relação à estrutura proteica do tipo β -sheet com 39%. Portanto a diferença é de 22% a mais para a existência de proteína na conformação α -hélice em *Staphylococcus epidermidis*.

A bactéria *Streptococcus pyogenes* apresenta estrutura de β -sheet em 60 % comparada a α -hélice com 40%. A conformação β -sheet contém 70% em relação à β -Turn com 30%. Estrutura de α -hélice apresenta 61% comparada à 39% de β -Turn.

Outro micro-organismo no qual apresenta grande variedade e diferenças em suas conformações proteicas é o *Staphylococcus aureus*. Dentre os quatro micro-organismos, este é o que realmente apresentou maior variabilidade em sua síntese proteica. Os resultados apresentados foram: α -hélice possui 77% de comparada a 23% da estrutura de 3_{10} -Hélice e α -hélice sendo comparada a β -Turn possui 70% para 30%. α -hélice comparada a β -Sheet possui 65% em relação a 35% β -Turn possui 75% de variabilidade com relação a 3_{10} -Hélice e finalizando β -Turn possui um arranjo proteico de 56% a mais em relação a 44% de β -Sheet.

A metodologia aplicada a este trabalho ilustra exatamente como (Soto, 2018) realiza sua busca por diferenças e variabilidades significativas quando se utiliza de ADB (Análise de Deconvoluções de Bandas) e 2ª derivativa, o perfil quantitativo de estruturas de proteínas, conteúdo lipídico e proteico são perfeitamente avaliados por ajuste Gaussiano e o autor chega a um resultado conclusivo estabelecendo uma caracterização e identificação rápida para micro-organismos sensíveis e multirresistentes.

Coincidindo com toda a metodologia analítica para essas amostras biológicas e resultados alcançados por intermédio das ADB e 2ª derivativas inclui-se a Análise Estatística Multivariada aplicando-se a PCA (Análise de Componentes Principais, o perfil de Média e Desvio Padrão dos espectros dos 4 micro-organismos e o Dendrograma de Ligação de Ward. Estes métodos estatísticos, muito bem estabelecidos em outras pesquisas analíticas e literárias como de (Ngo-Thi *et al.*, 2003) coincidem com a metodologia apresentada neste trabalho porquanto na pesquisa realizada pelo autor, foram aplicadas as análises por luz infravermelha, (sendo o mesmo princípio analítico em relação ao Raman) na caracterização e identificação de micro-organismos de diferentes cepas, incluindo leveduras como *Candida sp* Ngo-Thi e colaboradores pode realizar a aquisição dos espectros de várias espécies de bactérias Gram positivas como por exemplo, vinte e duas cepas selecionadas de diferentes espécies do gênero *Staphylococcus* os quais foram medidas repetidamente e pode ser realizado um agrupamento correto de espécies utilizando-se das análises por clusters hierárquicos e dendrograma de Ward . Além disso, os resultados indicaram que o método do pesquisador também permite identificações no nível de subespécies (Riedel *et al.*, 2001; Ngo-Thi *et al.*, 2003; Davies; Marques, 2008; Ryan *et al.*, 2008). A literatura também nos mostra um estudo piloto para análise do fenômeno *quorum sensing* em *P. aeruginosa*, fenômeno esse no qual essa bactéria se utiliza da capacidade de autoinduzir mudanças estruturais em sua bioquímica, como diferentes mecanismos de resistência conforme o que ocorre no ambiente em torno de si mesma, o autor desta metodologia alcançou resultados expressivos utilizando-se das análises estatísticas podendo apresentar o comportamento de *quorum sensing* da mesma em três diferentes condições nutricionais e ambientais: Placa com Agar Mueller Hinton (Pa4 estampa), NaCl 0,9% (Pa NaCl 10 µL) e H₂O (Pa H₂O 10 µL) respectivamente (Barbosa *et al.*, 2014).

Os resultados alcançados aqui também coincidem com o uso da PCA na literatura para avaliação da determinação e dinâmica essencial de proteínas utilizando vetores para analisar estruturas de proteínas e identificar subconjuntos atômicos

dentro da proteína como por exemplo conjuntos de carbono alfa e outros e desta forma mostrando a capacidade efetiva do uso dos métodos estatísticos em determinar a dinâmica estrutural de proteínas (David, Jacobs; Lange, Grubmüller, 2014). O objetivo de desenvolver um modelo de previsão que combina a PCA e um algoritmo genético (AG) para identificar conjuntos de espécies bacterianas e a observação de biomarcadores nas mesmas abordado por (Zhang *et al.*, 2019) mostrou-se eficaz quando explicaram a maior variação na amostra e aos modelos construídos com variáveis originais selecionadas. As vantagens de combinar PCA a com os algoritmos genéticos foram de fato demonstradas.

12. CONCLUSÃO

A proposta deste trabalho foi realizar um diagnóstico preciso, rápido, não subjetivo e conclusivo por intermédio da espectroscopia Raman aliado às ferramentas e métodos analíticos de ordens estatísticas quanto ao comportamento microbiano na pele humana. Avaliou-se as estruturas de síntese genética para possíveis mecanismos de resistência a fármacos de uso cutâneo como pomadas, loções e substâncias que de alguma forma são utilizadas no intuito de aliviar as dores, o prurido, o inchaço e desacelerar ou inativar a enzimas e substâncias secretadas na pele. O diagnóstico rápido e preciso do comportamento, estruturas e conteúdos intrínsecos e extrínsecos diz muito no momento da abordagem, da forma como tratar, o que aplicar, qual alvo específico alcançar. Obtendo o conhecimento das estruturas de proteínas e conteúdo de síntese metabólica nos micro-organismos, abre-se portas para novas formulações e vias de tratamento de lesões de pele por dermatite atópica. Já está consolidado em diversas literaturas formas e fármacos e formulações para aplicação nesse tipo de lesão contudo, o meio científico está sempre aberto para novas metodologias, aplicações de diferentes métodos de diagnóstico rápido e preciso como por exemplo a espectroscopia Raman, na qual foi aplicada neste trabalho.

A espectroscopia Raman mostra-se qualificada como ferramenta analítica para caracterização e identificação nos vários campos microbiológicos como microbiologia clínica, ambiental ou alimentar, e pela rápida diferenciação e triagem de diversas espécies microbianas. Além disso, o presente estudo demonstra que heterogeneidades e similaridades bioquímicas muito sutis apresentam até dentro de uma microcolônia distintas diferenças entre os espectros adquiridos de várias posições ou pontos dentro de uma colônia. Isso indica que a espectroscopia Raman pode ser útil para entender melhor a interação do crescimento microbiano

apresentando similares ou diferentes perfis no que diz respeito ao seu comportamento dentro de habitats complexos e de importância clínica dermatológica responsáveis por infecções e lesões do tecido cutâneo em pacientes com dermatite atópica.

13. TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão a trabalhos futuros, há um caminho considerado viável e oportuno decorrente deste trabalho no que diz respeito ao uso de N voluntários para a análise e caracterização de elementos envolvendo a dermatite atópica (DA) diretamente na pele desses pacientes por intermédio da espectroscopia Raman Confocal, desde a observação do processo inflamatório envolvendo ou não os micro-organismos, níveis de lesão cutânea, níveis de hidratação e estrutura das camadas da pele envolvendo derme e epiderme avaliando as condições dos aminoácidos em tecido normal e com DA.

14. ATUAÇÃO EM EVENTOS E CONGRESSOS DURANTE A PESQUISA

Trabalhos em Eventos Científicos

SOARES, E., FORTES, S.A., PHILIPPOV, R., TÉLLEZ-SOTO, C.A – Análise do Espectro UV-Vis do Complexo $[Cr(DDTC)_2(OH_2)_2]$ – VII Encontro de Pós-Graduação – UniBr – São Paulo – SP, 2019.

SOARES, E., FORTES, S.A., PHILIPPOV, R., TÉLLEZ-SOTO, C.A – Orbitais Naturais de Ligação no Complexo $[Cr(DDTC)_2(OH_2)_2]$ – VII Encontro de Pós-Graduação – UniBr – São Paulo – SP, 2019.

OLIVEIRA, R. P. ; SORGE, C. ; MEDEIROS NETO, L. P. ; TEODORO, G. R. ; KHOURI, S. ; TÉLLEZ S, C.A. ; PIZZOL, C. D. ; OLIVEIRA, D. B. ; MARTÍN, A. A. . ANÁLISE DA MICROBIOTA CUTÂNEA EM PACIENTES COM DERMATITE ATÓPICA POR ESPECTROSCOPIA RAMAN CONFOCAL. In: VII Encontro de pós-graduação da Universidade Brasil, 2019, São Paulo. ANAIS DO VII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO (VII EPG). São Paulo: Universidade Brasil, 2019. v. 1. p. 524-530.

PHILIPPOV, R., MENDES, M.R.V., FORTES, S.A., MÜLLER, G., JUNIOR, A.C., TÉLLEZ-ZEPEDA, C.A., TÉLLEZ-SOTO, C.A - Espectro Vibracional da Isoniazida,

Estrutura e Orbitais Naturais de Ligação (NBO) - XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB) - Búzios – RJ, 2018.

PHILIPPOV, R., KHOURI. S., TÉLLEZ-SOTO, C.A., MARTIN, A.A – Levantamento Bibliográfico da Análise da Microbiota Residente e Patogênica da Pele Humana por Espectroscopia Raman Confocal – V Encontro de Pós-Graduação – UniBr – São Paulo – SP, 2017.

PHILIPPOV, R., KHOURI. S., BARBOSA, I.M., TÉLLEZ-SOTO., C.A., MARTIN, A.A – Análise da Microbiota Residente e Patogênica da Pele Humana por Espectroscopia Raman Confocal – V Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman (EnBraER) – Campos do Jordão – SP, 2017.

*PHILIPPOV, R. Intervenções no Controle de Infecções Nosocomiais: Biomedicina / Enfermagem – Seminário - UNIESP - Faculdade FAMA - Mauá - SP, 2017.

Trabalho publicado

TANAKA, I., Tellez-Zepeda, C. A., Philippov, R., Fávero, P., Martin, A. A., Téllez Soto, C. A. Enhanced Infrared Absorption in a Comparative Study Between Multi-Sensitive and Multiresistant Bacteria of the Genus *Klebsiella sp.* *Vibrational Spectroscopy*, 96, 83–92. doi:10.1016/j.vibspec.2018.02.012

*Apresentação Oral

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SAYED, P. *et al.* Cell therapies for skin regeneration: an overview of 40 years of experience in burn units. Publication Date: 19.05.2019 *Swiss Med Wkly.* 2019;149:w20079. doi: 10.4414/smw.2019.20079

ADDOR, F.A.S.A; AOKI, V. Barreira cutânea na dermatite atópica. *Anais Bras Dermatol. Ambulatório de Dermatite Atópica. Departamento de Dermatologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) - São Paulo (SP), Brasil* 2010;85(2):184-94.

ALBERTS, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. - New York: Garland Science; 2002.

ALEXANDER, H. *et al.* The Role of Bacterial Skin Infections in Atopic Dermatitis: Expert Statement and Review from the International Eczema Council Skin Infection Group. *British Journal of Dermatology.* (2019). doi:10.1111/bjd.18643

AN, S-Q.; TANG, J-L. Diffusible Signal Factor Signaling Regulates Multiple Functions in the Opportunistic Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. BMC Research Notes (2018). doi: 10.1186/s13104-018-3690-1

ARCHER, NK *et al.*, Injury, dysbiosis, and filaggrin deficiency drive skin inflammation through keratinocyte IL-1 α release. J Allergy Clin Immunol. 2019 Apr;143(4):1426-1443.e6. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.08.042. Epub 2018 Sep 19.

AZGHANI, A *et al.* . *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. Microb Pathog 2002;33:109–14.

BARBOSA, I.M *et al.* Estudo Piloto do Fenômeno *Quorum Sensing* e as Respectivas Alterações Estruturais Bioquímicas da *Pseudomonas aeruginosa* em Ágar Mueller Hinton, NaCl 0,9% e H₂O Através da Microespectroscopia no infravermelho. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB 2014, Uberlândia

BARNARD, E; LI, H. Shaping Of Cutaneous Function by Encounters With Commensals. The Journal of Physiology J Physiol 000.0 (2016) pp 1–14 doi: 10.1113/JP271638

BELLIDO, F *et al.* Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. J Bacteriol 1992;174:5196–203.

BERG, J.M *et al.* Protein Structure and Function. Biochemistry. 5th edition. Chapter 3. New York: W H Freeman; 2002.

BHUNIA, A.K. Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. Food Science Text Series Springer - New York City: 2018, Edition: 2nd ed. pag.93. ISBN: 978-1-4939-7347-7, (e-book) 978-1-4939-7349-1

BISWAS, S *et al.* Crystal structure of the outer membrane protein OpdK from *Pseudomonas aeruginosa*. Structure 2008;16:1027–35.

BONIFAZ, A *et al.* Superficial Mycoses Associated with Diaper Dermatitis. Mycopathologia. 2016; 181(9): 671–679. doi: 10.1007/s11046-016-0020-9

BONIFAZ, A *et al.* Superficial Mycoses Associated with Diaper Dermatitis. Mycopathologia. 2016; 181(9): 671–679. doi: 10.1007/s11046-016-0020-9

BRAUN, V *et al.* The bacterial cell envelope: Structure, function, and infection interface. International Journal of Medical Microbiology , 305(2), 175–177 (2015). doi:10.1016/j.ijmm.2014.12.003

CAMPANA, R. *et al.* – Molecular aspects of allergens in atopic dermatitis. Europe PMC Funders Group - 2018 Apr 26. doi: 10.1016/bs.ai.2018.03.002

BROWN, L. *et al.* Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 620–630 (2015). doi:10.1038/nrmicro3480

CHAICHI, A. *et al.* Raman Spectroscopy and Microscopy Applications in Cardiovascular Diseases: From Molecules to Organs. *Biosensors*, 8(4), 107. (2018) doi:10.3390/bios8040107

CHEVALIER, S. *et al.* Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 41, Issue 5, September 2017, Pages 698–722, <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>

CHAN, W. D. S. *et al.* Microraman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophysical Journal* 90 (2006) 648-656.

CHARTIER, M.P.C; KULAKAUSKAS, S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria - *Microb Cell Fact.* 2014; 13(Suppl 1): S9. Published online 2014 Aug 29. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S9

COULON, C. *et al.* Chemical Analysis of Cellular and Extracellular Carbohydrates of a Biofilm-Forming Strain *Pseudomonas aeruginosa* PA14 - *PLoS One.* 2010; 5(12): e14220. Published online 2010 Dec 3. doi: 10.1371/journal.pone.0014220

DAVID, C.C; JACOBS, D.J - Principal Component Analysis: A Method for Determining the Essential Dynamics of Proteins - *Methods Mol Biol.* 2014; 1084: 193–226. doi: 10.1007/978-1-62703-658-0_11

DAVIES, D. G.; MARQUES, C. N. H. A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1393–1403.(2008). doi:10.1128/jb.01214-08

DI DOMENICO, E.G *et al.* Inflammatory cytokines and biofilm production sustain *Staphylococcus aureus* outgrowth and persistence: a pivotal interplay in the pathogenesis of Atopic Dermatitis - *Scientific Reports* (2018) 8:9573 doi:10.1038/s41598-018-27421-1

DINA, N. E. *et al.* Rapid Single-cell Detection and Identification of Bacteria by Using Surface-enhanced Raman Spectroscopy. *Procedia Technology*, 27, 203–207. (2017) doi:10.1016/j.protcy.2017.04.086

FAHY, E. *et al.* (2011). Lipid Classification, Structures and Tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 637–647. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.009

- FERREIRA, A.M *et al.* Enhanced tunability afforded by aqueous biphasic systems formed by fluorinated ionic liquids and carbohydrates - Green Chem. Author manuscript; available in PMC 2016 Sep 23. . 2016 Feb 21; 18(4): 1070–1079. DOI: 10.1039/C5GC01610J
- FITZ-GIBBON.S *et al.*, *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne. J Invest Dermatol. 2013 Sep;133(9):2152-60. doi: 10.1038/jid.2013.21. Epub 2013 Jan 21.
- FYHRQUIST, N. *et al.* Microbe-Host Interplay in Atopic Dermatitis and Psoriasis. NATURE COMMUNICATIONS | (2019) 10:4703 | doi: 10.1038/s41467-019-12253-y
- FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. - Constructing and Deconstructing the Bacterial Cell Wall. Protein Science. doi:10.1002/pro.3737
- GELDER, J.D *et al.* Reference Database of Raman Spectra of Biological Molecules - Journal of Raman Spectroscopy J. Raman Spectrosc. 2007; 38: 1133–1147 Published online 11 April 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/jrs.1734
- GEORGE,K; DOUGLAS,B - Bacterial Cell Mechanics - Biochemistry. 2017 Jul 25; 56(29): 3710–3724. Published online 2017 Jul 11. doi: 10.1021/acs.biochem.7b003
- GNIADACKA, M. *et al.* (1998). Water and Protein Structure in Photoaged and Chronically Aged Skin. Journal of Investigative Dermatology, 111(6), 1129–1133. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00430.x
- GUNS, P. Vibrational Molecules – An Introduction to the Interpretation of Infrared and Raman Spectra. London: William Clowes & Sons Limited, 1971
- HALDIKI, M. *et al.* On Clustering Validation Techniques - Journal of Intelligent Information Systems, 17:2/3, 107–145, 2001 Kluwer Academic Publishers.
- HO, C.-S. *et al.* Rapid Identification of Pathogenic Bacteria Using Raman Spectroscopy and Deep Learning. Nature Communications, 10(1) (2019). doi:10.1038/s41467-019-12898-9
- JAMAL, M. *et al.* Bacterial Biofilm and Associated Infections. Journal of the Chinese Medical Association, 81(1), 7–11. (2018) doi:10.1016/j.jcma.2017.07.012
- JECKEL, H *et al.* - Learning the space-time phase diagram of bacterial swarm expansion. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019 - doi:10.1073/pnas.1811722116

JUN, S. *et al.* Fundamental Principles in Bacterial Physiology—History, Recent Progress, and the Future with Focus on Cell Size Control: A Review. (2018). Reports on Progress in Physics, 81(5), 056601. doi:10.1088/1361-6633/aaa628

JUNQUEIRA, L. C. U; CARNEIRO, J. Histologia Básica / L.C. Junqueira, José Carneiro – 11 ed. – [Reimp] – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. ISBN 978-85-277-1402-0

KIM, J.; KIM, H. Microbiome of the Skin and Gut in Atopic Dermatitis (AD): Understanding the Pathophysiology and Finding Novel Management Strategies. Journal of Clinical Medicine, 8(4), 444. (2019) doi:10.3390/jcm8040444

KONEMAN, E *et al.* Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, pg. 314, 317. ISBN: 978-85-277-1377-1

KONEMAN, E *et al.* Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, pg. 181-186, 1221, 1222. ISBN: 978-85-277-1377-1

KOSECKA-STROJEK, M. *et al.* Development of a Reference Data set for Assigning *Streptococcus* and *Enterococcus* Species Based on Next Generation Sequencing of the 16S–23S rRNA Region. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 8(1) (2019). doi:10.1186/s13756-019-0622-3

LAL, D. *et al.* Exploring Internal Features of 16S rRNA Gene for Identification of Clinically Relevant Species of the Genus *Streptococcus*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 10(1), 28. (2011). doi:10.1186/1476-0711-10-28

LAMPING, N. *et al.* LPS-binding Protein Protects Mice from Septic Shock Caused by LPS or Gram-negative Bacteria. J. Clin. Invest, v. 101, n. 10, p. 2065–2071, 1998.

LANCEROTTO, L *et al.*, Layers of the abdominal wall: anatomical investigation of subcutaneous tissue and superficial fascia. Surg Radiol Anat (2011) 33:835–842 . doi 10.1007/s00276-010-0772-8

LANGE O.F; GRUBMÜLLER.H - Can Principal Components Yield a Dimension Reduced Description of Protein Dynamics on Long Time Scales? J Phys Chem B. 2006 Nov 16;110(45):22842-52.

LAUFS,U. *et al.* Clinical review on triglycerides. European Heart Journal. doi:10.1093/eurheartj/ehz785

LAWRENCE F. EICHENFIELD *et al.*, GUIDELINES OF CARE FOR THE MANAGEMENT OF ATOPIC DERMATITIS. J Am Acad Dermatol. 2014 February ; 70(2): 338–351. doi:10.1016/j.jaad.2013.10.010.

- LODISH H, *et al.* Structure of Nucleic Acids - Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000.
- MAMY, L *et al.* Prediction of the Fate of Organic Compounds in the Environment From Their Molecular Properties: A Review - Crit Rev Environ Sci Technol. 2015 Jun 18; 45(12): 1277–1377.
- MARTIN, A.A *et al.* Infrared and Confocal Raman Spectroscopy to Differentiate Changes in the Protein Secondary Structure in Normal and Abnormal Thyroid Tissues - Wiley Journal of Raman Spectroscopy - Accepted: 19 February 2018. DOI: 10.1002/jrs.5370. (2015). DOI: 10.1080/10643389.2014.955627
- MEISEL, S. *et al.*, Identification of Meat-Associated Pathogens via Raman Microspectroscopy - Food Microbiol. 2014, 38, 36. doi: 10.1016/j.fm.2013.08.007
- MAQUELIN, K. *et al.* Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. Journal of Microbiological Methods, v. 51, p. 255–271, 2002.
- MAZMANIAN, S.K. *et al.* *Staphylococcus aureus* Sortase, an Enzyme that Anchors Surface Proteins to the Cell Wall. Science 1999, 285:760-763.
- MOSCHIONI, M *et al.* Adhesion Determinants of the *Streptococcus* Species. Microb Biotechnol. 2010 Jul; 3(4): 370–388. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00138.x
- MOVASAGHI, Z *et al.* Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues - Applied Spectroscopy Reviews, 43: 134–179, 2008 - ISSN 0570-4928 print/1520-569X online - DOI: 10.1080/05704920701829043
- MOVASAGHI, Z *et al.* Raman Spectroscopy of Biological Tissues - Article in Applied Spectroscopy Reviews - July 2007 - DOI: 10.1080/05704920701551530
- MURRAY, P.R. *et al.* Microbiologia Médica, 6^a ed. Rio de Janeiro - Elsevier Editora, 2010, cap. 33. ISBN 978-85-352-3446-6
- NAIK, S *et al.* Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. Science. 2012 August 31; 337(6098): 1115–1119. doi:10.1126/science.1225152.
- NARALA, S; HATA, T.R. Adult Atopic Dermatitis with Comorbid Atopic Disease is Associated with Increased Risk of Infections: A Population-Based Cross-Sectional Study. Dermatol Ther (Heidelb) (2017) 7:111–121. December 15, 2016 / Published online: January 30, 2017. doi: 10.1007/s13555-017-0172-7
- NAUMANN, D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. Encyclopedia of Analytical Chemistry in 2006 by John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9780470027318.a0117
- NCSS Statistical Software. Hierarchical Clustering / Dendrograms - Chapter 445 - <https://ncss-wpengine.netdna-ssl.com/wp>

content/themes/ncss/pdf/Procedures/NCSS/Hierarchical_Clustering

Dendrograms.pdf - acesso em 2019

NELSON, D.L; COX, M.M – Princípios de Bioquímica de Lehninger – 5ª ed. – Porto Alegre: ARTMED, 2011. Pgs.113, 234, 271,343.

PORTO, S.P.S; WOOD, D.L – J. Opt. Soc. Am. 52 (1962) 251.

NAKAMOTO, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. New York: John Wiley & Sons, 1986

NEUGEBAUER, U. *et al.* Raman spectroscopy towards clinical application: drug monitoring and pathogen identification. International Journal of Antimicrobial Agents, 46, S35–S39. (2015). doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.10.014

NITAI C.H; APARNA, M. The Role of Sphingosine-1-Phosphate and Ceramide-1-Phosphate in Inflammation and Cancer Mediators of Inflammation Volume 2017, Article ID 4806541, 17 pages. doi.org/10.1155/2017/4806541

PETRY, V. *et al.* Bacterial Skin Colonization and Infections in Patients with Atopic Dermatitis. Anais Brasileiros de Dermatologia, 87(5), 729–734. (2012) doi:10.1590/s0365-05962012000500010

PUBMED HEALTH GLOSSARY. Dermis, Papillary Dermis, Reticular Dermis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022668/> acesso em: 13/04/2017.

REBROŠOVÁ, K. *et al.* Rapid Identification of Staphylococci by Raman Spectroscopy. Scientific Reports, 7(1) (2017). doi: 10.1038/s41598-017-13940-w

RIEDEL, K. *et al.* N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. Microbiology, 147(12), 3249–3262. (2001). doi:10.1099/00221287-147-12-3249

RITTLÉ, L; FISHER G.J, Natural and Sun-Induced Aging of Human Skin Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 Jan; 5(1): a015370. doi: [10.1101/cshperspect.a015370](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015370)

RODRIGUES, R.N.S *et al.* Avaliação do teste de contato com aeroalérgenos em pacientes com dermatite atópica. Anais Bras Dermatol. 2011;86(1):37-43. Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo – São Paulo (SP), Brasil <file:///E:/Papers%20sobre%20Dermatite%20At%C3%B3pica%20e%20Micro-organismos/Avalia%C3%A7%C3%A3o%20do%20Teste%20de%20Contato%20com%20%20Aeroal%C3%A9rgenos%20em%20Pacientes%20com%20Dermatite%20At%C3%B3pica.pdf> Acesso em 14/04/2017

SALA, O. *et al.* Espectroscopia Molecular – Princípios e Aplicações. Universidade de São Paulo, 1984

SALA, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho. São Paulo – Editora da Universidade Estadual Paulista – Ciência e Tecnologia

- SALA, O. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho. 2ª ed. São Paulo: Editora UNESP, 2008, pg. 14,15. ISBN 978-85-7139-868-9
- SCHNEEWIND, O *et al.* Sorting of Protein A to the *Staphylococcal* Cell Wall . Cell 1992, 70(2), 267–281. doi:10.1016/0092-8674(92)90101-h
- SEGGER, D. *et al.* Multicenter Study on Measurement of the Natural pH of the Skin Surface. IFSCC Magazine, V. 10, N. 2, p. 107-110, 2007.
- SIEGEL, S. D *et al.* Biogenesis of the Gram-positive bacterial cell envelope. Current Opinion in Microbiology, 34, 31–37.(2016) doi:10.1016/j.mib.2016.07.015
- SILVA, I.F. Caracterização e Identificação Rápida de Bactérias em Culturas Puras e Mistas por Microespectroscopia Ft-Ir. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2010.
- SINGH, R. C. V. Raman and the Discovery of the Raman Effect. Phys. perspect. 4 (2002) 399 – 420 1422 – 6944/02/040399 – 22
- SEGGER, D. *et al.* Multicenter Study on Measurement of the Natural pH of the Skin Surface. IFSCC Magazine, V. 10, N. 2, p. 107-110, 2007.
- SOHEILI, V. *et al.* The Novel Effect of cis-2-Decenoic Acid on Biofilm Producing *Pseudomonas Aeruginosa*. Microbiology Research; volume 6:6158 (2015). doi: 10.4081/mr.2015.6158
- SOTO, C.A.T *et al.* Enhanced Infrared Absorption in a Comparative Study between Multi-Sensitive and Multiresistant Bacteria of the Genus *Klebsiella sp* - Vibrational Spectroscopy. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.02.012>
- SPIEGEL, S.; MILSTIEN. S. , “Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid,” Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 4, pp. 397–407, 2003. View at Publisher · View at Google Scholar · View at Scopus
- SZABÓ, K *et al.* Factors Shaping The Composition Of The Cutaneous Microbiota, Department of Dermatology and Allergology, University of Szeged, Hungary 03-Jul-2016 doi: 10.1111/bjd.14967.
- TAHERI-ARAGHI, S. *et al.* Cell-Size Control and Homeostasis in Bacteria. Current Biology, 25(3), 385–391. (2015) doi:10.1016/j.cub.2014.12.009.
- TASHIRO, Y. *et al.* Interspecies Interaction Between *Pseudomonas aeruginosa* and Other Microorganisms. Microbes and Environments, 28(1), 13–24. (2013) doi:10.1264/jsme2.me12167

- THIES, J.E. Molecular Approaches to Studying the Soil Biota. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Fourth Edition) 2015, pg. 153. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00006-2>
- THOMSEN, S.F., Atopic Dermatitis: Natural History, Diagnosis, and Treatment. Department of Dermatology, Bispebjerg Hospital, Bispebjerg Bakke 23, 2400 Copenhagen NV, Denmark. *ISRN Allergy*. 2014; 2014: 354250. Published online 2014 Apr 2. doi: [10.1155/2014/354250](https://doi.org/10.1155/2014/354250)
- TORTORA, G. *et al.* *Microbiologia*. 10. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2012, pg. 173, 174. Editado também como livro impresso em 2012. Catalogação na publicação: Ana Paula M. Magnus – CRB 10/2052 - ISBN 978-85-363-2698-6
- TRABULSI, L.R *et al.* *Microbiologia.*, 4ª ed. São Paulo – Editora Atheneu, 2005, pg.32-34,190. CDD-579 –NLM-QW - 04-0530
- TRUN, N.; TREMPY, J. *Fundamental Bacterial Genetics*. New York: Wiley- Blackwell , 2003. p.304
- TSAI, H.H.G *et al.* A Molecular Dynamics Study of the Structural and Dynamical Properties of Putative Arsenic Substituted Lipid Bilayers - *International Journal of Molecular Sciences* - 2013, 14(4), 7702-7715; doi.org/10.3390/ijms14047702
- ULMER, A.J. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). *Toxicology*, v. 152, p. 37 - 45, 2000.
- WANG, C. *et al.* Emergent Properties in *Streptococcus mutans* Biofilms Are Controlled through Adhesion Force Sensing by Initial Colonizers. *mBio*, 10(5) (2019). doi:10.1128/mbio.01908-19
- WU, W. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology*, 753–767. (2015). doi:10.1016/b978-0-12-397169-2.00041-x
- ZHANG, P. *et al.* Selection of microbial biomarkers with genetic algorithm and principal component analysis - *BMC Bioinformatics*. 2019; 20(Suppl 6): 413. Published online 2019 Dec 10. doi: [10.1186/s12859-019-3001-4](https://doi.org/10.1186/s12859-019-3001-4)