

## CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LEVEDURA DO FUNGO PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS POR ESPECTROSCOPIA (FTIR)

*Silva TJPS<sup>1</sup>, Vieira LS<sup>2</sup>, Matos T<sup>3</sup>, Campos C B<sup>4</sup>, Martin AA<sup>5</sup>, Raniero LJ<sup>6</sup>*

<sup>1</sup>Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, Fone: +55 12 3947-1166, São José dos Campos, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de São Paulo, Rua talim, 330, São José dos Campos, SP, Brasil

**Resumo-** O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termo-dimórfico (micélio e levedura) que causa a *Paracoccidioidomicose*. Na infecção humana os micélios são convertidos para leveduras, uma vez que a temperatura corpórea é ideal para que esse processo ocorra. Neste estudo o objetivo foi encontrar as características bioquímicas da levedura, através da técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier. Os espectros encontrados foram típicos de materiais biológicos, com bandas específicas, tornando possível assim a caracterização da levedura. E futuramente a diferenciação bioquímica entre o micélio e a levedura.

**Palavras chave:** Levedura, Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).

**Área de Conhecimento:** Biologia

### Introdução

O *Paracoccidioides brasiliensis* (PB) é um fungo termo-dimórfico (micélio e levedura) que causa a paracoccidioidomicose (*Borges-Walmsley et al., 2002*). Os países que apresentam maior incidência da doença são o Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia (*Restrepo et al., 2001*). No Brasil as áreas endêmicas são as regiões subtropicais, principalmente onde as atividades agrícolas são predominantes como o Sudeste, Sul e o Centro-Oeste.

Os grandes fatores de risco para aquisição da infecção são os contaminado com o fungo, como por exemplo, atividades agrícolas, terraplenagem, preparo de solo, práticas de jardinagens, transporte de produtos vegetais, profissões ou atividades relacionadas ao manejo do solo entre outras.

A incidência dessa doença é maior em homens do que em mulheres (13:1). Isso parece estar relacionado com fatores hormonais que poderiam, por sua vez, afetar a patogênese do fungo. Atualmente já se sabe que a via de principal contágio da doença é através das vias respiratórias. Quando alojado no organismo do hospedeiro, através de inalação de conidiósporos que na fase miceliana, atingem os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares, onde se transformam em leveduras. (*Giraldo et al., 1976; Londero & Severo, 1981; Restrepo, 1988; Montenegro & Franco, 1994; Bethlem et al.,*

1999). Embora o contágio ocorra, notadamente, pela via aérea, as vias transcutâneas e mucosas não devem ser desconsideradas (*Montenegro & Franco, 1994*).

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica baseada num feixe de radiação na região do infravermelho, que é transmitido através da amostra. Quando a frequência desta radiação é da ordem da ligação química acontece o processo de absorção do fóton. Os picos de absorção são correlacionados com a presença de ligações químicas de grupos funcionais. Neste trabalho propõe-se então fazer a caracterização bioquímica da levedura do PB identificando regiões de proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos e etc. Num trabalho futuro, os micélios serão caracterizados e será feita a diferenciação bioquímica das formas, micélio/levedura.

### Metodologia

A cepa do *Paracoccidioides brasiliensis*, (Pb18) utilizada foi fornecida pela UNIFESP, São Paulo. Estoques desta cepa sob a forma de levedura foram mantidos em meio sólido de YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose e 4% de Agar) a 4°C. Para a realização dos experimentos, uma alçada do estoque de Pb18 foi inoculada em 10 mL de meio HAM'SF12 líquido e cultivada a 37 °C sob agitação orbital por mais 5 dias.

Para análise no FT-IR foi necessário um processo de limpeza para remover o meio de cultura. Este processo foi feito por meio de

centrifugação, descarte do sobrenadante e ressuspensão em água ultra pura. O ciclo foi repetido 4 vezes para evitar qualquer interferência do meio nos espectros. Então uma gota foi depositada em janela de fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ), conforme mostra figura 1, e liofilizado em um concentrador a vácuo (*Concentrator 5301, Eppendorf*).



Figura 1: Janela de fluoreto de cálcio

A análise no FT-IR foi feita no equipamento *Spectrum Spotlight 400 – Perkin-Elmer*, na resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , na região espectral de  $900$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$  e com 64 varreduras, em triplicata.

## Resultados

A figura 2 mostra o depósito do *Pb* sobre a janela de  $\text{CaF}_2$ , imagem foi adquirida da câmera do microscópio do FT-IR, de aumento digital de 10x. Os espectros foram coletados das regiões com filme contínuo.



Figura 2: Aspecto geral da levedura sobre a Janela de fluoreto de cálcio para as análises de FTIR

A figura 3 mostra um espectro de absorção da levedura analisada. Este espectro é uma média dos 30 espectros coletados das amostras em triplicata.

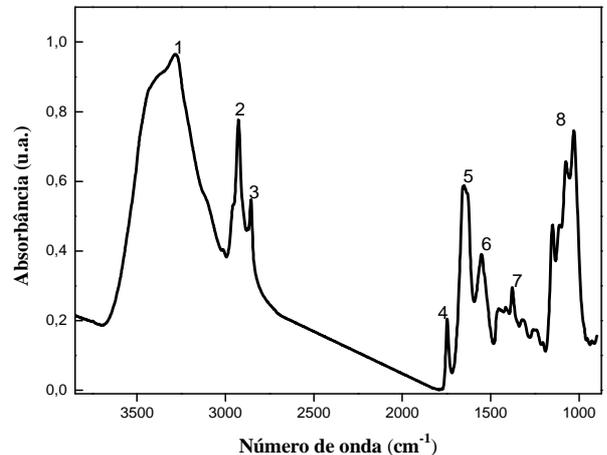


Figura 3: Espectro FT-IR característico da Leveda de ( $1000$  a  $3500 \text{ cm}^{-1}$ )

Os espectros apresentaram as principais bandas nas seguintes regiões: 1)  $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$  estiramento simétrico O-H de água dentro do microorganismo, de carboidratos e de aminoácidos; 2)  $\sim 2926 \text{ cm}^{-1}$  estiramento assimétrico de C-H e  $\text{CH}_2$  de lipídios de membrana, ribossomos e também de carboidratos de parede celular); 3)  $\sim 2854 \text{ cm}^{-1}$  estiramento simétrico de C-H e  $\text{CH}_3$  de lipídios de membrana, ribossomos e também de carboidratos de parede celular; 4)  $\sim 1746 \text{ cm}^{-1}$  estiramento de C=O de lipídios; 5)  $\sim 1632 \text{ cm}^{-1}$  amida I de proteínas; 6)  $\sim 1552 \text{ cm}^{-1}$  amida II de proteínas 7)  $\sim 1383 \text{ cm}^{-1}$  conformação de purina; 8)  $\sim 1180\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$  região ampla com contribuição de açúcares, polissacarídeos, fosfolipídios e DNA.

## Discussão

O processo de lavagem para retirar o meio de cultivo foi alcançado com sucesso e um filme fino de *Pb* foi depositado sobre as janelas de  $\text{CaF}_2$ , onde foi observado, na figura 2, regiões contínuas deste filme que possibilitaram as análises de FTIR, no modo de transmitância. O espectro médio das análises de FT-IR mostrou um

espectro típico de material biológico com uma banda intensa de O-H (região 1), que principalmente são contribuições provenientes de moléculas da água confinada no interior do microorganismo (Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., Dott, W. 2006). Outra região característica de microorganismos é a região de estiramento de entre 3200-2800  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento de lipídios e proteínas das estruturas do fungo, como por exemplo, da membrana mais externa. A região de deformação observou-se os picos característicos das amidas I e II, região de DNA, principalmente uma contribuição muito forte na região 8, a qual não é observada em bactérias, como por exemplo na *Escherichia coli*, ou na *Proteus mirabilis* (Mariey, L., Signolle, J.P., Amiel, C., Travert, J. 2001). Esta região neste caso tem a contribuição maior de açúcares presente na estrutura externa do fungo.

## Conclusão

Os resultados mostraram que as sucessivas lavagens do fungo e a secagem da solução na superfície da janela de  $\text{CaF}_2$  possibilitou a formação de um filme fino de *Pb*. A análise de FTIR mostrou um espectro típico de um material biológico. Entretanto, o espectro mostrou uma forte contribuição das bandas de açúcares, que são provenientes da parece mais externa do fungo. Esta análise possibilitará comparar numa nova fase, os espectros da forma de micélio e identificar as mudanças bioquímicas entre as duas formas.

## Agradecimentos

Ao CNPQ pela bolsa de IC. A FAPESP pelo suporte financeiro.

## Referências

1. The pathobiology of paracoccidioides brasiliensis. trends microbiol. (BORGES-WALMSLEY), (2002).
2. General clinical aspects: Polar forms of Paracoccidioidomycosis. (DEL NEGRO, In FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO A.; DEL NEGRO, G). Paracoccidioidomycosis., (1994).
3. Livro: "Vibrational Spectroscopy in Life Science", (F. Siebert e P. Hildebrandt), , (2008.)
4. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. (FRANCO, M.; MONTENEGRO MR, MENDES RP, MARQUES SA, DILLON NL, MOTA). (1987).
5. Chromosomal polymorphism, systemic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis. Fungal Genet. Biol., (FEITOSA, L. dos S.; CISALPINO, P.S.; DOS SANTOS, M.R.). (2003).
6. Paracoccidioidomycose: Blastomycose Sul-americana. (LONDERO.A.T). Epidemiologia. In: (Del Negro, G., Lacaz, C.S., Fiorillo, A.M). (1982).
7. Biochemistry of Paracoccidioides brasiliensis. Dimorphism (FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G). (1994).
8. FT-IR spectroscopy as tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. (Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., Dott, W). (2006).
9. Classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. Vib. Spectrosc ( Mariey, L., Signolle, J.P., Amiel, C., Travert, J.) (2001).
10. Identification of Fourier transform infrared photoacoustic spectral features for detection of Aspergillus flavus infection in corn. Int. J. Food Microbiol. (Gordon, S.H., Schudy, R.B., Wheeler, B.C., Wicklow, D.T., Greene, R.V). (1997)