

DISCRIMINAÇÃO ESPECTRAL DE *Acinetobacter baumannii* E *Pseudomonas aeruginosa* POR FT-IR E ANÁLISE DE AGRUPAMENTO

Camila Monteiro Santos Marques¹, Lucas Ferreira Lyra¹, Juliana Guerra Pinto², Kumiko Koibuchi Sakane¹, Juliana Ferreira-Strixino².

¹Laboratório de Espectroscopia Vibracional do Infravermelho, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento IP&D, Universidade do Vale do Paraíba - Univap. Avenida Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, São Paulo, Brasil, camonteiromarques@gmail.com, lucasferreiralira@gmail.com, kumiko.sakane@gmail.com

²Fotobiologia Aplicada à Saúde (PhotoBios) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Univap. Avenida Shishima Hifumi 2911, São José dos Campos, São Paulo, Brasil, jgbiomd@gmail.com, juferreira@univap.br

Resumo

A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica promissora para discriminação de microrganismos por meio da obtenção de perfis bioquímicos. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial discriminatório da combinação entre FT-IR e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), na diferenciação de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Foram utilizadas cepas *American Type Culture Collection* (ATCC), cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI). As amostras foram preparadas para aquisição dos espectros, os dados normalizados em relação à banda amida I, submetidos à segunda derivada e analisados nas regiões de 3000-2800 cm⁻¹ e 1800-900 cm⁻¹. Aplicou-se HCA com distância euclidiana e algoritmo de Ward. Os espectros em segunda derivada evidenciaram diferenças bioquímicas entre as espécies, e o dendrograma mostrou agrupamentos distintos confirmados pelos valores de similaridade. Os resultados demonstram que a associação entre FT-IR e HCA constitui uma abordagem rápida e confiável para discriminação de microrganismos.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. *Acinetobacter baumannii*. Análise Estatística Multivariada. Análise de Agrupamento Hierárquico.

Área do Conhecimento: Engenharia – Engenharia Biomédica

Introdução

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) tem sido cada vez mais empregada no campo da microbiologia devido à sua capacidade de gerar perfis bioquímicos altamente específicos. Cada espectro obtido de células bacterianas revela sua composição bioquímica, como proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos, resultando em uma impressão digital espectral capaz de discriminar microrganismos em nível de espécie e subespécie. Além disso, FT-IR é uma técnica rápida, de baixo custo, não destrutiva e que requer mínima preparação de amostra, o que a torna particularmente atrativa para estudos clínicos. (Maity *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2023; Marques *et al.*, 2025)

A complexidade dos espectros de células bacterianas, caracterizada pela sobreposição de bandas vibracionais, dificulta a interpretação visual direta, exigindo a aplicação de métodos estatísticos multivariados para ampliar seu poder discriminatório. Entre esses métodos, destaca-se a Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), uma técnica não supervisionada que organiza os espectros com base em sua similaridade representada graficamente por dendrogramas. Cada amostra é considerada como um ponto no espaço multidimensional, e as distâncias entre elas, frequentemente calculadas pela métrica euclidiana, são reunidas em uma matriz de proximidades. A partir dessa matriz, algoritmos específicos constroem dendrogramas que hierarquizam os níveis de similaridade, permitindo uma visualização bidimensional do conjunto de amostras. (Diziuba *et al.*, 2007; Neto *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2022; Miller *et al.*, 2024)

Considerando o impacto clínico e a preocupação crescente causados por patógenos multirresistentes, principalmente os do grupo ESKAPE, torna-se essencial dispor de métodos rápidos e confiáveis para sua diferenciação. (Denissen *et al.*, 2022)

Neste contexto, o presente estudo empregou a espectroscopia FT-IR em conjunto com a Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) para discriminar as cepas de *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), patógenos pertencentes ao grupo ESKAPE. O objetivo deste trabalho foi demonstrar o potencial discriminatório da combinação entre FT-IR e HCA, destacando o uso desta ferramenta para rápida diferenciação entre cepas bacterianas clinicamente relevantes.

Metodologia

Foram utilizadas cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) armazenadas no laboratório de Fotobiologia aplicada à Saúde do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), na cidade de São José dos Campos.

As cepas encontravam-se acondicionadas em freezer a - 20 °C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) com 5% de glicerol. Foram reativadas em temperatura ambiente, e inoculadas em caldo BHI e posteriormente incubadas a 37° C por 24 horas, semeadas em ágar BHI e incubadas novamente.

As colônias foram coletadas das culturas planctônicas e diluídas em solução salina (NaCl) a 0,9 % com posterior comparação visual com a escala 10 de *McFarland* (aproximadamente 30x10⁸ bactérias por mL).

A solução bacteriana foi depositada em janela de fluoreto de bário e lâminas (substrato transparente no infravermelho) e desidratada a 37°C, para obter uma película transparente.

Os espectros foram normalizados em 1 unidade de absorção (UA) em relação a banda amida I (~1655 cm⁻¹), dentro da faixa linear do detector MCT (*Mercury Cadmium Telluride*) utilizando os softwares *Spectrum 5.3* e *10.6*. Para cada espectro de FT-IR foram realizadas 32 varreduras, com resolução de 4 cm⁻¹, sob temperatura ambiente controlada em 20°C, totalizando 10 espectros analisados.

Os espectros processados com o software *Spectrum 5.3* e *10.6* foram plotados em gráficos no software *Origin Pro 8.5*. Posteriormente, a grande quantidade de dados foi submetida a Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis - PCA*) no software *Minitab 17* para a reduzir o conjunto de dados à menor matriz ortogonal por meio da covariância dos dados. A matriz obtida foi então submetida à Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) para classificar as variáveis em grupos de acordo com a similaridade estatística dos componentes avaliados. Para a análise de agrupamento, foram utilizados os seguintes parâmetros: a distância euclidiana como a medida de similaridade e o algoritmo de Ward, baseado na variância mínima, que permite agrupar os *clusters* de forma a produzir o menor aumento de variância. Os resultados foram representados em forma de dendrograma.

Para análises dos espectros utilizaram-se as regiões de 3000 a 2800 cm⁻¹ e 1800 a 900 cm⁻¹, excluindo faixas que apresentaram ruídos instrumentais sem informações estruturais relevantes. As bandas obtidas com base nos espectros em segunda derivada, foram suavizadas com 9 pontos utilizando algoritmo de Savitzky-Golay.

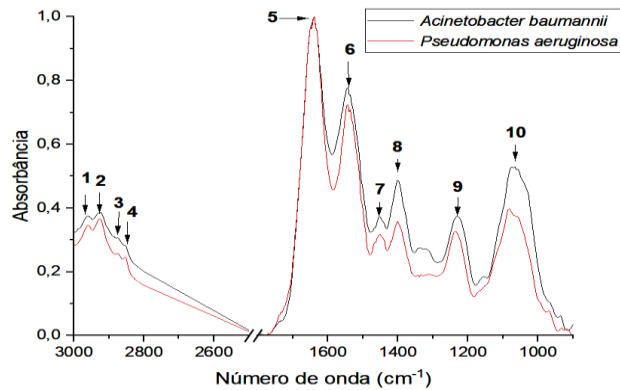
Resultados

A figura 1 mostra os espectros médios das cepas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. As principais bandas numeradas dos dois microrganismos com atribuições aproximadas baseadas na literatura (Stuart B., 1997), são apresentadas na Tabela 1.

As bandas de lipídeos e proteínas mostram valores de número de onda semelhantes entre os dois microrganismos, no entanto, as diferenças na posição de bandas em ácidos nucleicos e polissacarídeos sugerem diferenças estruturais entre eles. Os números de onda indicam a posição central de uma banda.

Formatado: Fonte: Itálico

Figura 1 - Espectros de absorção de cepas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* considerando a faixa de 3000 a 900 cm^{-1} .



Fonte: elaborado pelo próprio autor

Tabela 1- Atribuições aproximadas dos modos vibracionais de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.

Bandas	<i>P. aeruginosa</i> (cm^{-1})	<i>A. baumannii</i> (cm^{-1})	Atribuição de bandas
1	2958	2959	Lípídeos: estiramento assimétrico de C-H em $-\text{CH}_3$
2	2923	2927	Lípídeos: estiramento assimétrico de C-H em $-\text{CH}_2$
3	2873	2877	Lípídeos: estiramento simétrico de C-H em $-\text{CH}_3$
4	2853	2854	Lípídeos: estiramento simétrico de C-H em $-\text{CH}_2$
5	1637	1637	Proteínas: Amida I, estiramento de C=O
6	1545	1545	Proteínas: Amida II, deformação N-H e estiramento C-N
7	1454	1454	Lípídeos: deformação assimétrica de C-H em $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$
8	1401	1399	Proteínas: estiramento simétrico de COO^-
9	1236	1229	Ácidos nucleicos: estiramento assimétrico de PO_2^-
10	1083	1074	Polissacarídeos: estiramento de C-O, C-O-C

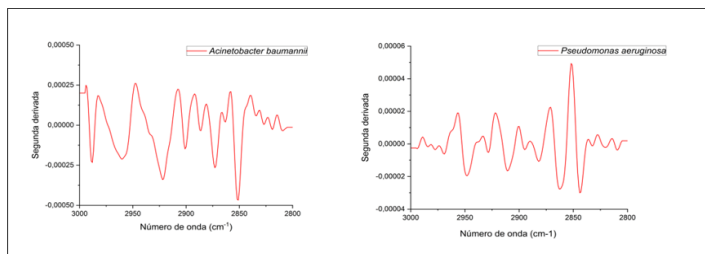
Stuart (1997)

A figura 2 mostra os espectros em segunda derivada de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* na região de 3000-2800 cm^{-1} evidenciando a diferença entre os espectros dos dois microrganismos em estudo.

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico

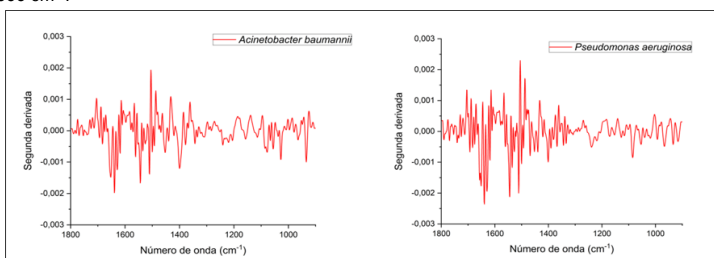
Figura 2 - Espectros em segunda derivada de cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* considerando a região de 3000 a 2800 cm^{-1} .



Fonte: elaborado pelo próprio autor

A figura 3 mostra os espectros em segunda derivada de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* na região de 1800-900 cm^{-1} .

Figura 3 - Espectros em segunda derivada de cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* considerando a região de 1800 a 900 cm^{-1} .

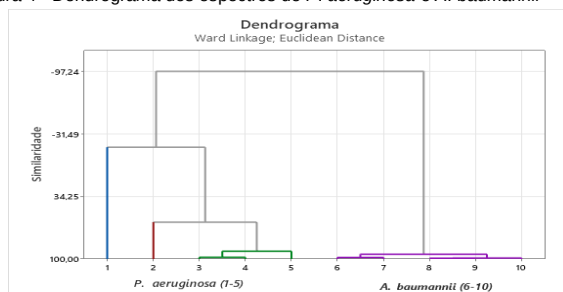


Fonte: elaborado pelo próprio autor

Na figura 4 visualizam-se os grupos formados no dendrograma para diferenciação de espectros de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.

Os espectros 6-10 possuem as linhas mais próximas ao eixo horizontal, indicando maior similaridade entre os espectros.

Figura 4 - Dendrograma dos espectros de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*



Fonte: elaborado pelo próprio autor

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

A tabela 2 mostra os valores de similaridade entre as cepas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.

Tabela 2 - Valores de similaridade entre os espectros de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.

Espectros	Similaridade
3 a 5	91,78%
2 a 5	61,34%
1 a 5	-17,42%
6 a 10	95,09%
(1 a 5) e (6 a 10)	-97,34%

Fonte: elaborado pelo próprio autor

Discussão

A figura 1 apresenta o espectro médio infravermelho das duas espécies bacterianas, abrangendo a região de 3000-900 cm^{-1} . Observa-se que diferenças sutis nos contornos de bandas podem ser identificadas entre as espécies, especialmente nas regiões associadas a lipídeos (3000-2800 cm^{-1}), proteínas (1800-1500 cm^{-1}), material nuclear e polissacarídeos (1800-900 cm^{-1}). Como se trata de um tecido biológico complexo, com inúmeros constituintes biomoleculares, muitos modos normais de vibração se sobrepõem, produzindo alargamento de bandas.(Xu, Jun-Li *et al.*, 2021)

Essa sobreposição de bandas é comum em análises visuais diretas, reforçando a necessidade de ferramentas matemáticas como a segunda derivada, que amplia a resolução e possibilita a visualização de variações de componentes constituintes pouco evidentes. (Czarnecki,2015)

A figura 2 apresenta os espectros em segunda derivada das cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* nas regiões de 3000-2800 cm^{-1} . Observa-se que as diferenças entre as espécies nos espectros em segunda derivada refletem as variações na composição lipídica, o que pode estar relacionado à organização e perfil lipídico das membranas celulares nos dois microrganismos.

A figura 3 apresenta os espectros em segunda derivada das cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* na região de 1800-900 cm^{-1} . Observa-se que as variações nos espectros em segunda derivada estão relacionadas principalmente a proteínas, polissacarídeos e material nuclear. Essas variações podem estar relacionadas a alterações tanto na composição proteica quanto em constituintes do material nuclear, evidenciando perfis bioquímicos distintos. (Jain *et al.*, 2025)

Essas diferenças observadas nos espectros foram importantes para discriminação entre as cepas, o que foi confirmado pela HCA representada na figura 4. Observa-se que as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (1–5) e *Acinetobacter baumannii* (6–10) foram organizadas em agrupamentos distintos, evidenciando que a análise estatística multivariada separou as duas espécies bacterianas com base em seus perfis espectrais. Houve discriminação entre os dois microrganismos, entretanto, os espectros 6-10 apresentaram maior homogeneidade, evidenciada pela proximidade com a linha horizontal.

Essas diferenças espectrais e o padrão de agrupamento mostrado no dendrograma (Figura 4) corroboram com os valores de similaridade apresentados na Tabela 2. A comparação entre os dois grupos resultou em valor negativo (-97,34%), indicando baixa similaridade e clara discriminação entre as espécies.

Esses resultados confirmam que as diferenças bioquímicas observadas nos espectros permitiram a separação entre as duas cepas.

Dessa forma, a associação entre FT-IR e HCA demonstra grande potencial como ferramenta rápida e confiável para diferenciação de espécies bacterianas de relevância clínica.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que a espectroscopia FT-IR, associada à HCA, foi capaz de discriminar com eficiência as cepas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, confirmando o potencial desta

Formatado: Fonte: Itálico, Cor da fonte: Automática

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico, Cor da fonte: Automática

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico, Cor da fonte: Automática

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico

abordagem como ferramenta rápida, não destrutiva e confiável para discriminação de bactérias clinicamente relevantes.

Referências

CZARNECKI, Mirosław A. Resolution enhancement in second-derivative spectra. **Applied spectroscopy**, v. 69, n. 1, p. 67-74, 2015.

DENISSEN, Julia et al. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 244, p. 114006, 2022.

DZIUBA, Bartłomiej et al. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. **International dairy journal**, v. 17, n. 3, p. 183-189, 2007.

MAITY, Jyoti Prakash et al. Identification and discrimination of bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 116, p. 478-484, 2013.

MARQUES, Camila Monteiro Santos et al. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) of *Pseudomonas aeruginosa* post photodynamic therapy with Curcumin in vitro. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 285, p. 121916, 2023.

MARQUES, Camila Monteiro Santos et al. Analysis of the biomolecular profile by Fourier transform vibrational spectroscopy (FT-IR) in *Acinetobacter baumannii* after application of photodynamic therapy with curcumin "in vitro". **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 330, p. 125740, 2025.

MILLER, William R.; ARIAS, Cesar A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 598-616, 2024.

NETO, JM Moita et al. Estatística multivariada: uma visão didática-metodológica. **Revista crítica na rede-Filosofia da ciência**, v. 9, 2015.

STUART, B. *Biological applications of infrared spectroscopy*. Chichester: Wiley, 1997.

XIE, Jinghang et al. Protein FT-IR amide bands are beneficial to bacterial typing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 207, p. 358-364, 2022.

XU, Jun-Li et al. Characterisation and classification of foodborne bacteria using reflectance FTIR microscopic imaging. **Molecules**, v. 26, n. 20, p. 6318, 2021.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001.

Os autores agradecem a FAPESP pela aquisição do *software Spectrum 10.6* da PerkinElmer por processo 2017/04013-0.