Novas Tendências na Identificação Microbiana: Uso do MALDI-TOF MS, FT-IR e Biologia Molecular/LAMP

CONFERÊNCIA INTERNACIONAL

LIVRO DE RESUMOS

Editores

Nelson Lima
Ricardo Meirelles Cruz
Cristiane Viana Ladeira
Daniel Pereira
Fabiana Couto

MUM Where Science Connects
MICOTECA DA UNIVERSIDADE DO MINHO
30 ANOS YEARS

ID Microbiana

Conferência Internacional

14 A 17 de abril de 2026
EPAMIG | Belo Horizonte (MG) | Brasil

Novas Tendências na Identificação Microbiana: Uso do MALDI-TOF MS, FT-IR e Biologia Molecular/LAMP

LIVRO DE RESUMOS

Editores
Nelson Lima
Ricardo Meirelles Cruz
Cristiane Viana Ladeira
Daniel Pereira
Fabiana Couto

MUM
MICOTECA DA UNIVERSIDADE DO MINHO
Where Science Connects

Conferência Internacional

Novas Tendências na Identificação Microbiana:
Uso do MALDI-TOF MS, FT-IR e Biologia Molecular/LAMP

Livro de resumos

EPAMIG | Belo Horizonte (MG) | Brasil
14 a 17 de abril de 2026

Título:	Conferência Internacional – Novas Tendências na Identificação Microbiana: Uso do MALDI-TOF MS, FT-IR e Biologia Molecular/LAMP (Livro de Resumos)
Editores:	Lima N., Cruz R.M., Ladeira C.V., Pereira D., Couto F.
Capa, Arranjo Gráfico & Processamento de Texto:	Manuel G. Silva, Micoteca da Universidade do Minho
Publicado por:	MUM – Micoteca da Universidade do Minho https://www.micoteca.deb.uminho.pt/
1ª Edição:	Abril 2026
Cidade & País:	Braga, Portugal
Publicação Digital:	PDF
Depósito Legal:	562364/26
ISBN:	978-972-97916-7-3

© 2026 Micoteca da Universidade do Minho
Todos os direitos são reservados à Micoteca da Universidade do Minho, no entanto, os resumos podem ser livremente revistos, resumidos, reproduzidos ou traduzidos, no todo ou em parte, mas não para venda ou utilização com fins comerciais. As opiniões expressas ou implícitas nesta publicação, salvo indicação em contrário, não devem ser interpretadas como posições oficiais da Micoteca da Universidade do Minho.

Adicionalmente, o apoio parcial dos projetos europeus MALDIBANK (n.º 101188201) e Microbes-4-Climate (nº 101131818) implica que este documento reflete apenas a opinião dos autores, não sendo a Comissão Europeia responsável por qualquer utilização que possa ser feita das informações nele contidas.

Presidência da Conferência

Nelson Lima – Diretor da MUM – Micoteca da Universidade do Minho

Ricardo M. Cruz, CEO da SEC – Soluções para Eventos Científicos

Comissão Organizadora

Nelson Lima, MUM – Portugal

Ricardo Meirelles Cruz, SEC Brasil /UMinho – Portugal

Cristiane Viana Ladeira, EPAMIG – Brasil

Daniel Pereira, EPAMIG – Brasil

Fabiana Couto, IFMG – Brasil

Organização Conjunta

MUM Where Science Connects
MICOTECA DA UNIVERSIDADE DO MINHO 30 ANOS YEARS

SEC SOLUÇÕES PARA EVENTOS CIENTÍFICOS

EPAMIG Pesquisa Agropecuária

Parceria

Rede Mineira de Pesquisa em QUEIJOS ARTESANAIS

Agradecimentos

A Comissão Organizadora da **Conferência Internacional Novas Tendências na Identificação Microbiana: Uso do MALDI-TOF MS, FT-IR e Biologia Molecular/LAMP** manifesta o seu mais profundo e entusiástico agradecimento a todos aqueles que, ao longo de quase um ano, contribuíram com dedicação, empenho e visão para conceber, organizar e tornar este evento uma realidade com qualidade e excelência.

Este encontro só foi possível graças ao valioso apoio dos projetos europeus ***MALDIBANK*** - *Multi-domain Open MALDI Spectra Archive for Identification of Microorganisms* (contrato nº 101188201) e ***Microbes-4-Climate*** – *Microbial services addressing climate change risks for biodiversity and for agricultural and forestry ecosystems: enabling curiosity-driven research and advancing frontier knowledge* (contrato nº 101131818). Ambos os projetos são coordenados pela entidade europeia *Microbial Resource Research Infrastructure - European Research Infrastructure Consortium* (MIRRI-ERIC), com sede estatutária na Universidade do Minho (Portugal), instituição que também se associou, com grande entusiasmo, a esta Conferência.

Expressamos igualmente um reconhecimento muito especial à **EPAMIG** – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, pelo apoio dedicado e entusiástico a esta iniciativa, bem como à **SEC** – Soluções para Eventos Científicos, cuja competência, profissionalismo e incansável colaboração, desde o primeiro momento, foram determinantes para dar vida e forma a todas as atividades que compõem este evento.

Por fim, dirigimos um sincero e caloroso agradecimento a todas as instituições e empresas patrocinadoras, cujo contributo generoso e compromisso foram fundamentais para o sucesso desta Conferência Internacional.

A todos, o nosso mais profundo e sentido obrigado.

Patrocinadores

CRMV MG Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais

WDCM WORLD DATA CENTRE FOR MICROORGANISMS

MIRRI ERIC

MICROBES 4CLIMATE

MALDIBANK

STAB vida Your easy genetics laboratory

BRUKER

Controllab Lado a lado com você

SOLCAMPO

DSMA Desenvolvimento Sustentável e Monitoramento Ambiental

LNF LATINO-AMERICANA

Programa

Dia 1 Terça 14/04/2026	
13:00 – 14:00	*Recepção dos participantes*
14:00 – 14:30	*Sessão de abertura e objetivos da conferência* Nelson Lima, Diretor da MUM, UMinho, Portugal Pedro Arezes, Reitor da UMinho, Portugal Nilda de Fátima Ferreira Soares, Diretora da EPAMIG, Brasil
14:30 – 16:00	**Sessão 1 -** Moderadores: Nelson Lima e Ricardo Meirelles Cruz PL1: *Bioprospecção e seleção de novos microrganismos para aplicações industriais* Rosane Schwan (CCMA, UFLA, Brasil) PL2: *Importância para o meio ambiente da utilização de uma abordagem polifásica para a identificação da micobiota de cavernas de biomas brasileiros* Cristina Souza-Motta (URM, UFPE, Brasil)
16:00 – 16:30	*Coffee-break e visita aos banners*
16:30 – 17:30	**Sessão 2 -** Moderadores: Reginaldo Lima-Neto e Manoel Oliveira PL3: *Fundamentos e aplicações da espectrometria de massas (MALDI-TOF) e da espectroscopia de infravermelho (IR Biotyper) para identificação e tipagem microbiana* Luiz André Pelaes (Bruker, Brasil)
17:00 – 18:00	*Sessão de perguntas e respostas*
Dia 2 **Quarta 15/04/2026**	
09:00 – 09:45	**Sessão 3 -** Moderadores: Rosane Schwan e Reginaldo Lima-Neto PL4: *Conceitos básicos sobre espectrometria por MALDI-TOF e o projeto Europeu MALDIBANK* Nelson Lima (MUM, UMinho, Portugal)
09:45 – 10:30	*Sessão demonstrativa sobre MALDI-TOF MS e IR Biotyper* Luiz André Pelaes (Bruker, Brasil)
10:30 – 11:00	*Coffee-break e visita aos banners*

11:00 – 12:30	**Sessão 4 -** Moderadores: Disney Dias e Fabiana Couto
	PL5: ***Caracterização microbiana por espectroscopia na faixa do infravermelho:*** **Candida auris** ***e espécies de*** **Aspergillus** ***como modelos fúngicos*** Reginaldo Lima-Neto (UFPE, Brasil)
	PL6: ***MALDI-TOF MS e IR-Biotyper na identificação microbiana ambiental*** Manoel Oliveira (FioCruz, Brasil)
12:30 – 14:00	***Almoço***
14:00 – 14:30	**Sessão 5 -** Moderadores: Nelson Lima e Manoel Oliveira
	PL7: ***LAMP, fundamentos e aplicações*** *Eduardo Coelho* (StabVida, Portugal)
14:30 – 14:45	***Sessão de perguntas e respostas***
14:45 – 15:15	PL8: ***MALDI-TOF e ensaio de proficiência: precisão analítica sob novos desafios microbianos*** Shirley Lima (Controllab, Brasil)
15:15 – 15:45	PL9: ***Identificação de microrganismos por sequenciamento*** Marília Sanchez (DSMA, Brasil)
15:45 – 16:15	***Coffee-break e visita aos banners***
16:15 – 18:00	**Sessão 6: Comunicações orais selecionadas**
	Moderadores: Cristina Souza-Motta e Angelica Zaninelli Schreiber
	CO1: ***Aplicação do MALDI TOF MS (AutoTOF) com pré-tratamento FA Sandwich na identificação de espécies de*** **Aspergillus** ***provenientes de amostras clínicas e ambientais*** Juliana Moura-Mendes
	CO2: ***Identificação de*** **Candida** ***spp. isoladas de pacientes internados em um Centro de Terapia Intensiva, utilizando diferentes ferramentas*** Cíntia Lacerda Ramos
	CO3: ***Abordagem polifásica baseada em ferramentas biotecnológicas para a reclassificação de agentes da piedra branca*** Cícero Pinheiro Inácio
	CO4: ***Caracterização genômica e fenotípica de uma nova espécie de*** **Pannonibacter** ***isolada a partir de uma amostra clínica no Brasil*** Laís Costa Agra
	CO5: ***Detecção rápida da suscetibilidade a azóis em*** **Aspergillus fumigatus** ***por MALDI-TOF MS*** Bárbara Cipulo Legabão
	CO6: **Aplicação de espectroscopia por infravermelho para identificação rápida de espécies de** ***Aspergillus*** Arthur Felipe Cavalcanti de Matos

Dia 3 Quinta 16/04/2026	
09:00 – 10:45	**Sessão 7 -** Moderadores: Nelson Lima e José A. Teixeira PL10: ***WDCM data platform for microbial identification*** Juncai Ma (WDCM, Pequim, China) PL11: ***Código invisível: como a bioinformática desvenda o universo microbiano*** Flávia Aburjaile (UFMG, Brasil)
10:45 – 11:15	*Coffee-break e visita aos banners*
11:15 – 12:30	**Sessão 8 -** Moderadores: Reginaldo Lima-Neto e Daniel Pereira PL12: ***MALDI-TOF MS no Laboratório de Investigação em Fungos da FCM-UNICAMP: da pesquisa científica à rotina diagnóstica*** Angelica Zaninelli Schreiber (Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, Brasil) PL13: ***Microrganismos e a fermentação dos vinhos*** Angélica Bender (EPAMIG, Brasil)
12:30 – 14:00	*Almoço*
14:0 – 15:30	**Sessão 9 -** Moderadores: Ricardo Meirelles Cruz e Fabiana Couto PL14: ***30 Anos da MUM: trajetória, serviços e projetos*** Nelson Lima (MUM, UMinho, Portugal) PL15: ***Os desafios (bio)tecnológicos para a utilização da biodiversidade*** José A. Teixeira (CEB, UMinho, Portugal)
15:30 – 16:30	**Sessão 10: Comunicações orais selecionadas** Moderadores: Nelson Lima e Cristina Souza-Motta CO7: **Esporotricose: da invisibilidade epidemiológica à revolução biotecnológica no diagnóstico** Rejane Pereira Neves CO8: **Impacto da topografia da placa de alvo na qualidade da identificação de leveduras por MALDI-TOF MS** Tatiane Nobre Pinto CO9: **Biodegradação em solo de filmes do nanocompósito de PHBV reforçados com nanotubos de carbono** Natali Bomfim dos Santos CO10: **Prospecção de Actinobactérias em solos da região Tocantina: potencial biotecnológico para a descoberta de novos bioativos** Matheus Silva Alves
16:30 – 17:00	*Coffee-break e visita aos banners*

17:00 – 17:30	**Sessão 11 -** Moderadores: Angélica Bender e Daniel Pereira PL16: ***Identificação polifásica de fungos filamentosos nos queijos*** Fabiana Couto (IFMG, Brasil)
19:00	***COQUETEL DE GALA*** Espaço Gutierrez, Avenida Francisco Sá 1050, Gutierrez 30441-018, BH (MG, Brasil)

Dia 4 Sexta 17/04/2026	
10:00 – 10:45	**Sessão 12 -** Moderadores: Reginaldo Lima-Neto e Manoel Oliveira PL16: ***Aplicação do MALDI-TOF MS na identificação de leveduras com potencial biotecnológico*** Disney Dias (CCMA, UFLA, Brasil)
10:45 – 11:00	***LAMP, demonstração do seu funcionamento*** Nelson Lima & Ricardo M. Cruz (MUM, UMinho, Portugal)
11:00 – 11:30	***Coffee-break***
11:30 – 12:00	***LAMP, análise de resultados*** Nelson Lima & Ricardo M. Cruz (MUM, UMinho, Portugal)
12:00 – 12:30	*Cerimónia de Assinatura de Memorandos de Entendimento com a WDCM* Juncai Ma (Pequim, China)
12:30 – 13:00	***Sessão de encerramento com a entrega de prémios e certificados***

Lista de Conteúdos

PROGRAMA V
PREFÁCIO XIII
PALESTRAS 1

Bioprospecção e Seleção de Microrganismos para Aplicações Industriais
Rosane Freitas Schwan 3

Importância para o meio ambiente da utilização de uma abordagem polifásica para a identificação da micobiota de cavernas de biomas brasileiros
Cristina Souza-Motta, Joenny Lima, Alanis Trindade, José Prazeres, Jordane Nóbrega, Sabrina Alves, Vitória Alves, Pedro Félix-Oliveira, Jadson Bezerra, Renan Barbosa 7

Fundamentos e aplicações da espectrometria de massas (MALDI-TOF) e da espectroscopia de infravermelho (IR Biotyper) para identificação e tipagem microbiana
Luiz André Garrido Pelaes 13

Conceitos básicos sobre espectrometria por MALDI-TOF e o projeto europeu MALDIBANK
Nelson Lima 15

Caracterização microbiana por espectroscopia na faixa do infravermelho: *Candida auris* e espécies de *Aspergillus* como modelos fúngicos
Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto 19

MALDI-TOF MS na Identificação Microbiana Ambiental: Detecção e Identificação de Patógenos Emergentes em Ambiente Aquático
Manoel Oliveira 25

Doctor Vida Pocket equipment with LAMP technology
Eduardo Coelho 27

MALDI-TOF e Ensaio de Proficiência: Precisão Analítica sob Novos Desafios Microbianos
Shirley Lima 33

WDCM data platform for microbial identification
Juncai Ma, Linhuan Wu, Guomei Fan, Chongye Guo, Qian Zhang, Dongmei Liu, Qinglan Sun 37

MALDI-TOF MS no Laboratório de Investigação em Fungos da FCM-UNICAMP: da Pesquisa Científica à Rotina Diagnóstica
Angelica Zaninelli Schreiber 41

Microrganismos e a fermentação dos vinhos
Angelica Bender 45

30 Anos da Micoteca da Universidade do Minho (MUM): Trajetória, Serviços e Projetos
Nelson Lima 47

Os desafios (bio) tecnológicos para a utilização da biodiversidade
José A Teixeira 53

Fungos em queijos artesanais de casca florida natural: evidências científicas para a regulamentação em Minas Gerais
Fabiana Couto, Caio Marcelão, Mariana Souza, Jackie de Souza, Marta Taniwaki 57

Aplicação do MALDI-TOF MS na identificação de leveduras com potencial biotecnológico
Disney Ribeiro Dias 61

COMUNICAÇÕES ORAIS 65

Aplicação do MALDI TOF MS (AutoTOF) com pré-tratamento *FA Sandwich* na identificação de espécies de *Aspergillus* provenientes de amostras clínicas e ambientais
Juliana Moura-Mendes, Alicia Santa Cruz, Melissa Escobar, Amiliana Pineda, Monserrat Aldama, José Pereira 67

Identificação de *Candida* spp. isoladas de pacientes internados em um Centro de Terapia Intensiva, utilizando diferentes ferramentas
Paola Aparecida Alves Ferreira, Lucas Daniel Cibolli Rosol, Daniel Almeida Freitas, Ana Paula Pereira Bressani, Paulo Henrique da Cruz Ferreira, Cristiane Rocha Fagundes Moura, Rosane Freitas Schwan, Vanessa Amaral Mendonça, Cíntia Lacerda Ramos 71

Abordagem polifásica baseada em ferramentas biotecnológicas para a reclassificação de agentes da piedra branca
Cícero Pinheiro Inácio, Isabelly Guimarães Silva, Maria Alice Ribeiro Alves, Greicilene Maria Rodrigues Albuquerque, Reginaldo G. Lima-Neto, Rejane Pereira Neves 77

Caracterização genômica e fenotípica de uma nova espécie de *Pannonibacter* isolada a partir de uma amostra clínica no Brasil
Laís Costa Agra, Igor Vasconcelos Rocha, Beatriz Souza Toscano de Melo, João Luiz de Lemos Padilha Pitta, Carlos Alberto das Neves de Andrade, Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, Ana Carolina Mota de Faria, Marilia Lavocat Nunes, Gabriel da Luz Wallau, Túlio de Lima Campos, Karina Lidianne Alcântara Saraiva, Marise Sobreira, Alzira Maria Paiva de Almeida, Matheus Filgueira Bezerra 83

Detecção rápida da suscetibilidade a azóis em *Aspergillus fumigatus* por MALDI-TOF MS
Bárbara Cipulo Legabão, João Pedro Guedes Xavier, Ana Luisa Perini Leme Giordano, Angelica Zaninelli Schreiber 87

Aplicação de espectroscopia por infravermelho para identificação rápida de espécies de *Aspergillus*
Arthur Felipe Cavalcanti de Matos, Amanda Gabriela da Silva, Halana Lirena Naoma Oliveira, Camylla Carvalho de Melo, Karla Roberta Soares Rodrigues, Maria Luiza Brito de Lima, Carlos Alberto das Neves de Andrade, Wendell Wons Neves, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto 93

Esporotricose: da invisibilidade epidemiológica à revolução biotecnológica no diagnóstico
Rejane Pereira Neves, Isabelly Guimarães Silva, Maria Alice Ribeiro Alves, Greicilene Maria Rodrigues Albuquerque, Cícero Pinheiro Inácio 99

Impacto da topografia da placa de alvo na qualidade da identificação de leveduras por MALDI-TOF MS
Tatiane Nobre Pinto, Gisela Lara da Costa, Manoel M. E. Oliveira 105

Biodegradação em solo de filmes do nanocompósito de PHBV reforçados com nanotubos de carbono
Tatiana Fritzen Alves, Natali Bomfim dos Santos, Elisa Esposito[2], Ana Paula Lemes 109

Prospecção de Actinobactérias em solos da região Tocantina: potencial biotecnológico para a descoberta de novos bioativos
Marcos Vinicius Soares Silva, Maria Clara Silva dos Santos, Danilo Calisto dos Santos, Matheus Silva Alves 115

COMUNICAÇÕES BANNERS 119

Identificação de microrganismos em fermentações espontânea e inoculada na produção de cachaça por MALDI-TOF MS
Ana Paula Pereira Bressani, João Fernando Silva de Resende Chaves, Disney Ribeiro Dias, Rosane Freitas Schwan 121

Estudo molecular multi-locus para a identificação de uma presuntiva nova espécie de *Trichoderma* do arquipélago de Alcatrazes
Gabriel L. P. Gonçalves, Darcy D. T. Jiménez, João Trovão, Célia Soares, Nelson Lima, Roberto G. S. Berlinck, Simone P. Lira 127

Espectrometria de massas MALDI-TOF MS na identificação de patógenos da mastite bovina
Alessandra P. Sant Anna Salimena, Letícia Scafutto de Faria, Déborah Demarque Martins Silva, Braulio Castilho Silva, Junio Cesar Jacinto de Paula 131

Bactérias isoladas de lodo ativado como potenciais degradadoras de microplásticos
Manoella Almeida Candido, Virginia Medeiros de Siqueira, Fabricio Motteran, Ana Carolina Soares de Almeida, Jacqueline Santos Silva Cavalcanti 135

Caracterização polifásica da diversidade fúngica da salina de Lingua (Itália)
Maria Francesca Sannino, Raquel A. Pereira, Domenico Palatucci, Célia Soares, Nelson Lima, Antonino Pollio, João Trovão 139

Identificação da espécie fúngica de um sistema de reator aeróbio sequencial contaminado com o pesticida atrazina
Bárbara Chaves Aguiar Barbosa, Célia Soares, Laura Lima Alves, Glória Maria Marinho Silva, Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa, Nelson Lima 143

Identificação de linhagens do complexo *Acinetobacter baumannii* isoladas de um hospital no município do Rio de Janeiro por MALDI-TOF MS
Pâmalla Araujo, Paula Araujo de Souza, Rebeca Vitória da Silva Lage de Miranda, Talita Bernardo Valadão, Angela Maria Dantas, Debora Ribeiro de S. Santos, Marcelo Luiz Lima Brandão 149

Identificação por MALDI-TOF MS de linhagens de *Klebsiella* de origem clínica isoladas no Rio de Janeiro
Janaína Rodrigues de Souza, Paula Araujo de Souza, Rebeca Vitória da Silva Lage de Miranda, Talita Bernardo Valadão, Angela Maria Dantas, Marcelo Luiz Lima Brandão, Debora Ribeiro de S. Santos 155

Detecção de *Listeria monocytogenes* em sushi e sashimi pelos métodos ISO 11290-1, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e pelo Sistema de Detecção Molecular 3M™ diretamente a partir do caldo Fraser de enriquecimento
Rodrigo de Castro Lisbôa Pereira, Camilla Pires de Souza, João Paulo Ustritto Pontes, Vanessa de Souza Rodrigues, Karen Signori Pereira, Deyse Christina Vallim 161

Taxonomia genômica de isolados de *Leptospira* associados a casos humanos de leptospirose no Brasil
Jeniffer E. Fonseca, Jéssica A. S. Santana, Tatiane M.V.R., Luiza Aymée P. S. Virgilio, Keila C. F. A. Silva, Kayo C. B. Fernandes, Maysa B. M. Clementino, Myllena S. Pereira, Claudia S. Silva, Mariana C. Silva, Mariana S. Batista, Kátia E. S. Avelar, Ilana T. Balassiano 167

Avaliação retrospectiva da classificação taxonômica de isolados clínicos em uma coleção microbiológica
Irys Hany Lima Gonzalez, Stefany Mendes Dimas, Gabriela Alves da Silva, Bruno Rocha Pribul, Bruna Ribeiro Sued-Karam, Daiana Cristina Silva Rodrigues, Melise Chaves Silveira, Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef, Cláudio Marcos Rocha-de-Souza 173

Screening da Microbiota Fúngica em Pacientes com Doença de Crohn Utilizando o MALDI-TOF MS
Gisela Lara da Costa, Eduarda Borges Santos, Fernanda Brito, Flavia Martinez de Carvalho, Geraldo Oliveira Silva Junior, Cyrla Zaltman, Manoel Marques Evangelista de Oliveira 177

Diversidade microbiana do sourdough de trigo sob diferentes ambientes
Nádia Nara Batista, Sthefânia Ferreira Vilela, Silvia Juliana Martinez, Dirceu Melo, Ana Paula Pereira Bressani, Rosane Freitas Schwan 181

Prefácio

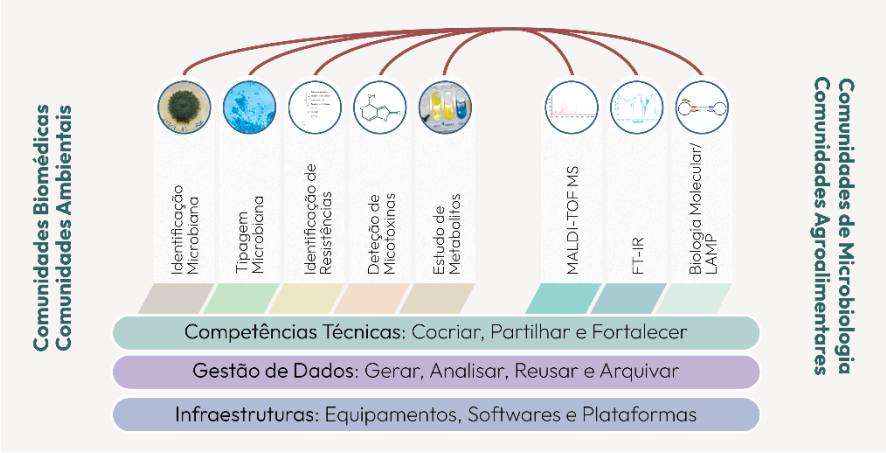
A presente **Conferência Internacional Novas Tendências na Identificação Microbiana** organiza-se como um espaço de diálogo científico e técnico para apresentação e discussão de inovações em métodos de caracterização e identificação de microrganismos, com especial enfoque nas tecnologias MALDI-TOF MS, FT-IR e Biologia Molecular/LAMP.

O evento insere-se numa conjunção interdisciplinar que abrange os domínios da microbiologia ambiental, agroalimentar e biomédica, refletindo a crescente necessidade de abordagens tecnológicas que sustentem práticas laboratoriais mais eficientes, precisas, seguras e interconectadas. Além dos avanços técnicos propriamente ditos, a conferência destaca três eixos transversais para o fortalecimento das diferentes comunidades de usuários:

Desenvolvimento de competências técnicas e analíticas — capacitação de profissionais para a cocriação, utilização e interpretação de resultados obtidos por meio de métodos de espectrometria de massa, espectroscopia e biologia molecular.

Gerenciamento e integração de dados — adoção de ferramentas digitais, softwares de análise e sistemas de gestão laboratorial que permitam interoperabilidade e o compartilhamento seguro de dados microbiológicos, promovendo a ciência aberta e colaborativa baseada nos princípios *FAIR* (*Findable*/Encontrável, *Accessible*/Acessível, *Interoperable*/Interoperável e *Reusable*/Reutilizável).

Infraestruturas de suporte científico e tecnológico — investimento em equipamentos de alto desempenho, plataformas digitais e ambientes laboratoriais adequados que sustentem o uso avançado destas tecnologias, incluindo micro/nanotecnologia e microfluídica, favorecendo inovação e transferência de conhecimento entre os setores público, privado e acadêmico.



Ao reunir especialistas, pesquisadores, técnicos e gestores de diferentes saberes, esta conferência pretende estimular sinergias entre comunidades, disciplinas e setores, contribuindo para o fortalecimento das redes de pesquisa e para a consolidação de práticas laboratoriais modernas, sustentáveis e alinhadas com os grandes desafios globais da microbiologia contemporânea endereçando, entre os objetivos do desenvolvimento sustentável (ODS), os seguintes: ODS2/zero fome, ODS3/saúde de qualidade, ODS4/educação de qualidade, ODS13/ação climática, ODS14 e 15/proteger a vida marinha e terrestre, e ODS17/parcerias.

A **Micoteca da Universidade do Minho (MUM)** celebra 30 anos de história, ciência, serviços e amizade. Queremos comemorar esta data, durante o ano de 2026, junto dos que contribuíram para essa caminhada e, neste caso particular, com os cientistas brasileiros que, ao longo dos anos, fizeram a sua formação connosco ou participaram em tantas colaborações e projetos significativos que marcaram pessoas e instituições.

É com uma enorme alegria que esta Conferência Internacional pode proporcionar o reencontro com os que ajudaram a construir a história da MUM e partilhar este momento de celebração e gratidão.

A participação de Portugal, China, Paraguai e, no Brasil, de 11 unidades federativas, AM, CE, GO, MA, MG, MS, PE, PR, RJ, SC e SP, evidencia a vitalidade desta conferência, bem como a relevância e atualidade de sua temática.

A presença do Presidente da Federação Mundial de Coleções de Culturas (WFCC), do Diretor do Centro Mundial de Dados de Microrganismos (WDCM), de renomados palestrantes de origens geográficas diversas e, finalmente, de participantes de diferentes comunidades de usuários de recursos microbianos garante a excelência desta Conferência Internacional.

Este Livro de Resumos é, por direito próprio, um marco integrante da cápsula do tempo da MUM.

A todos, desejamos uma excelente e inesquecível conferência.

A Presidência da Conferência

Nelson Lima
Ricardo Meirelles Cruz

ID Microbiana

Palestras

Bioprospecção e Seleção de Microrganismos para Aplicações Industriais PL1

Rosane Freitas Schwan

Departamento de Biologia, Laboratório Multiusuário de Microbiologia de Fermentações, Universidade Federal de Lavras, 37200-900 Lavras (MG), Brasil

E-mail: *rschwan@ufla.br*

Resumo: A utilização de microrganismos oriundos da biodiversidade brasileira como culturas iniciadoras industriais tem gerado impactos econômicos, sociais e estratégicos relevantes. A adoção de linhagens selecionadas promove maior eficiência produtiva, padronização fermentativa, redução de perdas e agregação de valor aos produtos nacionais. Em cadeias como cacau, café, cachaça, cerveja, vinho e bebidas funcionais, esses avanços estimulam a inovação regional, fortalecem pequenos e médios produtores e ampliam a competitividade internacional.

Palavras-chave: aplicações industriais; biodiversidade; bioprospecção; fermentação

1. Introdução

A bioprospecção microbiana aplicada a sistemas fermentativos agroindustriais tem permitido a identificação, caracterização e seleção de culturas iniciadoras com elevado potencial tecnológico, sensorial e funcional. O avanço no conhecimento da ecologia microbiana das fermentações de cacau, café, bebidas tradicionais brasileiras e silagens contribuiu de forma decisiva para o desenvolvimento de culturas comerciais e para a modernização de processos historicamente conduzidos de forma espontânea. Paralelamente, a investigação da microbiota de fermentações tradicionais em diferentes regiões do mundo ampliou o repertório de microrganismos com aplicação em alimentos vegetais fermentados, bebidas alcoólicas e produtos funcionais.

Fermentações espontâneas constituem ecossistemas dinâmicos nos quais bactérias ácido-láticas (BAL), leveduras e, em determinados sistemas, bactérias ácido-acéticas interagem em uma sucessão ecológica bem definida. Essa sucessão envolve, em geral, microrganismos heterofermentativos iniciais, seguidos por espécies mais acidotolerantes e adaptadas às novas condições ambientais. A compreensão dessas interações fornece base científica para a seleção racional de linhagens com características desejáveis, promovendo a padronização, a segurança e a previsibilidade dos processos fermentativos.

No Brasil, a biodiversidade microbiana vem sendo progressivamente incorporada à indústria de alimentos e bebidas. A seleção de microrganismos nativos adaptados às

condições tropicais e às diferentes matérias-primas regionais possibilita maior controle tecnológico e a construção de perfis sensoriais associados ao conceito de "terroir microbiano". Estudos sobre a fermentação do cacau demonstraram uma sucessão característica envolvendo leveduras, BAL e bactérias ácido-acéticas, diretamente relacionada à formação de precursores de aroma e à qualidade final do chocolate. De forma semelhante, na fermentação do café, a modulação da microbiota por meio de culturas selecionadas pode aprimorar os atributos sensoriais e reduzir a variabilidade entre lotes. Em silagens, a aplicação de BAL com elevada capacidade de acidificação acelera a queda de pH, reduz perdas nutricionais e melhora a estabilidade aeróbia.

A comparação entre fermentações tradicionais globais e sistemas tropicais brasileiros evidencia princípios ecológicos comuns que sustentam a seleção racional de culturas iniciadoras adaptadas a matrizes vegetais e alcoólicas. No Brasil, essa integração resultou em avanços concretos em diferentes cadeias produtivas.

2. Culturas Iniciadoras Tradicionais e Aplicações Globais

Os estudos voltados ao desenvolvimento de culturas iniciadoras seguem etapas integradas que incluem bioprospecção em matrizes fermentativas, isolamento e identificação de leveduras e bactérias, triagem funcional baseada no desempenho fermentativo, produção de compostos de aroma, atividade enzimática, tolerância a estresses (pH, temperatura, etanol e ácidos orgânicos), propriedades probióticas e antagonismo frente a contaminantes. Posteriormente, as linhagens selecionadas são avaliadas em ensaios-piloto, validadas em escala industrial e, quando pertinente, protegidas por patentes e transferidas ao setor produtivo.

Fermentações mediterrâneas, como as de olivas de mesa, apresentam predominância de *Lactiplantibacillus pentosus* e *Lacticaseibacillus paracasei*, associados a leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Debaryomyces hansenii*, microrganismos responsáveis pela degradação de compostos fenólicos, pela formação de ésteres e pela estabilização microbiológica. Na Ásia, o kimchi é inicialmente dominado por *Leuconostoc* e *Weissella*, seguido por *Lactiplantibacillus plantarum*, enquanto o sauerkraut apresenta uma sucessão semelhante, evidenciando padrões ecológicos convergentes. Na África Ocidental, fermentações de cereais como ogi e hausa koko envolvem principalmente *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum* e *Pediococcus acidilactici*, frequentemente associados a *Saccharomyces cerevisiae*. Na América Latina, bebidas como pozol, cauim, caxiri e chicha apresentam consórcios complexos de BAL e leveduras com atividade enzimática relevante, incluindo produção de fitases, exopolissacarídeos e metabólitos bioativos.

3. Integração entre Biodiversidade Microbiana e Inovação Industrial

Na produção de cachaça, tradicionalmente conduzida por fermentação espontânea do caldo de cana-de-açúcar, programas sistemáticos de isolamento e seleção tecnológica permitiram o desenvolvimento da cepa CA11 de *Saccharomyces cerevisiae*, a primeira levedura selecionada especificamente para essa finalidade. Desenvolvida na Universidade Federal de Lavras e comercializada desde 2007 pela LNF Latino Americana, a CA11

proporcionou maior rendimento alcoólico, redução do tempo de fermentação e maior padronização sensorial, representando um marco na modernização do setor.

No segmento cervejeiro, embora cepas clássicas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* predominem, estudos brasileiros identificaram leveduras nativas isoladas de frutas tropicais, de caldo de cana e de fermentações artesanais, com elevada produção de ésteres frutados e bom desempenho fermentativo. Além disso, espécies não convencionais, como *Torulaspora delbrueckii, Starmerella meliponinorum, Hanseniaspora uvarum* e *Metschnikowia pulcherrima*, vêm sendo utilizadas em fermentações sequenciais ou mistas, aumentando a complexidade aromática e permitindo a criação de estilos inovadores, como as Catharina sour e outras cervejas com frutas brasileiras.

Na vinificação, a seleção de leveduras autóctones de vinhedos do Sul e do Sudeste do Brasil tem contribuído para a valorização regional. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* adaptadas a temperaturas mais elevadas e leveduras não convencionais, como *Lachancea thermotolerans e Torulaspora delbrueckii*, são empregadas para modular a acidez e o perfil aromático. Na fermentação malolática, *Oenococcus oeni* é amplamente utilizado para converter o ácido málico em ácido láctico, promovendo a estabilidade microbiológica e a suavidade sensorial.

A crescente demanda por alimentos funcionais também impulsionou a seleção de microrganismos brasileiros para bebidas probióticas e fermentadas plant-based. Cepas de *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici* e leveduras isoladas de fermentações tradicionais apresentam tolerância a pH ácido e sais biliares, atividade antioxidante e produção de metabólitos bioativos. Essas linhagens são aplicadas em bebidas fermentadas de frutas tropicais, cereais, pseudocereais e matrizes vegetais como amêndoas, arroz, aveia e castanhas, bem como em kombuchas e fermentados mistos, nos quais a interação entre BAL, leveduras e bactérias ácido-acéticas resulta em produtos com perfil sensorial diferenciado e potencial funcional ampliado.

4. Conclusões e Impacto Social

A utilização responsável da biodiversidade, em consonância com a legislação nacional de acesso ao patrimônio genético e de repartição de benefícios, integra a inovação científica, a sustentabilidade ambiental e a responsabilidade socioeconômica.

Do ponto de vista estratégico, o domínio tecnológico sobre culturas iniciadoras nativas reduz a dependência de insumos importados e posiciona o Brasil como protagonista na bioeconomia global.

Assim, a bioprospecção microbiana consolida-se como instrumento estruturante para o desenvolvimento econômico, a inclusão social e o fortalecimento da soberania tecnológica brasileira.

Agradecimentos

Agradecemos às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e FINEP pelo apoio financeiro e institucional. Manifestamos também nosso reconhecimento à Syngenta Crop Protection, à LNF Latino-Americana e à Lallemand pelo suporte financeiro nos diferentes

projetos de fermentação. Agradecemos ao Laboratório Multiusuário de Microbiologia de Fermentação (LaMFe/UFLA) pelo suporte técnico e pela infraestrutura disponibilizada, bem como à Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola (CCMA/UFLA) pela disponibilização das linhagens de microrganismos para as pesquisas aqui citadas.

Importância para o meio ambiente da utilização de uma abordagem polifásica para a identificação da micobiota de cavernas de biomas brasileiros

PL2

Cristina Souza-Motta[1]*, Joenny Lima[1], Alanis Trindade[1], José Prazeres[1], Jordane Nóbrega[1], Sabrina Alves[1], Vitória Alves[1], Pedro Félix-Oliveira[2], Jadson Bezerra[2], Renan Barbosa[1]

[1]*Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil*

[2]*Universidade Federal de Goiás, Goiânia (GO), Brasil*

*E-mail: *cristina.motta@ufpe.br*

Resumo: A identificação da micobiota de cavernas em biomas brasileiros revela alta diversidade, incluindo espécies novas e com potencial biotecnológico. Ao mesmo tempo, essas cavernas podem abrigar fungos oportunistas com risco à saúde humana e de outros animais. A aplicação de uma abordagem integrativa, combinando morfologia e dados moleculares, é essencial para delimitação de espécies e gestão segura desses ecossistemas.

Palavras-chave: ambientes subterrâneos; *Ascomycota*; espeleomicologia

1. Introdução

As cavernas constituem ecossistemas singulares, caracterizados por estabilidade microclimática, limitação de nutrientes e ausência de luz na zona afótica, fatores que moldam comunidades biológicas especializadas. Esses ambientes contribuem para a preservação da biodiversidade ao abrigarem espécies raras, endêmicas e muitas vezes ainda desconhecidas. Além disso, mantêm interações ecológicas delicadas que conectam sistemas subterrâneos aos ecossistemas superficiais, reforçando seu papel na conservação ambiental. Nesse contexto, a microbiota cavernícola desempenha funções ecológicas essenciais. Os fungos atuam como importantes agentes de decomposição, participando da ciclagem de nutrientes e sustentando as cadeias tróficas subterrâneas por meio da transformação da matéria orgânica alóctone, além de servirem de alimento para outros organismos.

Apesar de sua relevância ecológica, o conhecimento sobre a diversidade fúngica subterrânea ainda é limitado (Prazeres *et al.*, 2025). Tradicionalmente, a identificação de fungos cavernícolas foi baseada exclusivamente em caracteres morfológicos apresentando restrições, especialmente diante da existência de espécies crípticas, convergência fenotípica e plasticidade morfológica (Prazeres *et al.*, 2025). Nesse cenário, a abordagem polifásica, integrando dados morfológicos, moleculares e ecológicos, emerge como ferramenta fundamental para delimitação taxonômica mais robusta e confiável. A identificação precisa, incluindo o reconhecimento de novas espécies, amplia a compreensão da biodiversidade brasileira e reduz lacunas no conhecimento da micobiota subterrânea. Esses dados são

essenciais para estratégias de manejo e conservação. Assim, planos de gestão espeleológica podem considerar também a micodiversidade que sustenta o funcionamento ecológico desses sistemas (Prazeres *et al.*, 2025). Assim, compreender o que existe nas cavernas é um passo indispensável para proteger esses ambientes frágeis e biologicamente estratégicos. Recentemente, novas espécies fúngicas, incluindo o novo gênero *Pseudolecanicillium*, foram descritas em ambientes cavernícolas do Nordeste do Brasil (Alves *et al.*, 2022). No contexto nacional, diferentes estudos têm registrado espécies inéditas dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geosmithia*, *Humicola*, *Malbranchea*, *Penicillium*, *Parahumicola*, *Pseudohumicola*, *Talaromyces* e *Tritirachium*, em ambientes cavernícolas de diferentes regiões do país (Alves *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2024; Nóbrega *et al.*, 2024).

No Brasil, uma parcela significativa dessa diversidade encontra-se resguardada em coleções biológicas, que desempenham papel estratégico na conservação e no uso sustentável da biodiversidade nacional. Essas pesquisas têm ampliado de forma consistente o conhecimento científico acerca da biodiversidade subterrânea, contribuindo para sua conservação e para a manutenção do equilíbrio ecológico desses ambientes. Além disso, os resultados obtidos subsidiam o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) na elaboração de planos de manejo e outros documentos técnicos que regulamentam as atividades turísticas em cavernas, promovendo maior segurança aos visitantes e reduzindo impactos ambientais. Como exemplos, destacam-se o Plano de Manejo Espeleológico (PME) da Caverna Furna Nova/Portaria ICMBio nº 1.074, primeiro PME aprovado na Região Nordeste a contemplar informações sobre fungos. Todas essas ações reforçam a integração entre pesquisa científica, gestão ambiental e conservação do patrimônio espeleológico brasileiro.

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo conhecer os fungos presentes em cavernas de biomas brasileiros, por meio da abordagem polifásica, visando maior precisão na identificação, bem como o registro de novas ocorrências e de táxons inéditos para a ciência.

2. Materiais e Métodos

Coleta e Isolamento

Cerca de 28 cavernas, presentes nos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica, foram analisadas quanto a sua micobiota. As coletas foram realizadas entre os anos de 2019 e 2025 e autorizadas pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA)/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (números SISBIO 68992–3 e 95115–1).

Para a coleta de fungos anemófilos, foi adotada a metodologia de sedimentação utilizando Ágar Sabouraud Dextrose (SAB) acrescido de cloranfenicol (100 mg/L), contido em placas Petri. Para o isolamento, as colônias morfologicamente diferentes foram isoladas e preservadas em tubos de polipropileno de 2 mL contendo 1,8 mL de glicerol a 30%. Para a amostragem de fungos dos sedimentos, foram coletados em triplicata, 10 g de sedimentos nos pontos amostrados, armazenados em recipientes esterilizados e encaminhado para processamento em laboratório. 1 g de sedimento foi suspenso em 9 mL de água destilada esterilizada e agitado por 20 min a 100 rpm e, em seguida, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-4} e 1 mL de cada diluição foi plaqueado na superfície dos meios Infusão Cérebro-

Coração, Ágar Mycosel e SAB (contidos em placas de Petri), e incubadas a 25 °C, por até sete dias, na ausência de luz. Também foi realizado o método de câmara úmida, 2 g de cada amostra de sedimento foram colocados em placas de Petri sobre papel de filtro umedecido com água esterilizada e incubados até o crescimento dos fungos.

Caracterização morfológica

Para a análise das características microscópicas e macroscópicas foram realizadas culturas em lâmina e consultadas literaturas específicas. As descrições foram comparadas à literatura para identificação em nível de gênero e, quando possível, de espécie.

Caracterização molecular

O DNA genômico foi extraído utilizando kit de extração da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit). Após a extração, regiões gênicas específicas foram selecionadas para amplificação e sequenciamento de acordo com o gênero ou grupo de fungos. As sequências de nucleotídeos foram editadas no programa MEGA v. 6.06 e comparadas no banco de dados do GenBank/NCBI. As sequências obtidas foram alinhadas usando a ferramenta online MAFFT v.7 e editadas manualmente usando MEGA v.7. Inicialmente, cada alinhamento, juntamente com o conjunto de dados combinado, foi analisado com base na análise de máxima verossimilhança (ML) usando RAxMLHPC BlackBox v. 8.2.12 no CIPRES Science Gateway. As árvores filogenéticas foram visualizadas usando o software FigTree.

Incorporação das culturas ao acervo da Micoteca URM

Os isolados representativos foram depositados em coleção de cultura pública, na Micoteca URM (Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Universidade Federal de Pernambuco), assegurando sua preservação a longo prazo, rastreabilidade e disponibilidade para estudos futuros.

3. Resultados e Discussão

A distribuição dos isolados fúngicos por substrato revelou predominância de isolados em solo/sedimento, indicando que esse constitui o principal substrato para a ocorrência de fungos no ambiente cavernícola, quando comparado ao ar das cavernas. As espécies de fungos encontradas neste estudo pertencem aos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Mucoromycota*. O filo *Ascomycota* é dominante em ecossistemas subterrâneos ao redor do mundo e no Brasil (Prazeres *et al.*, 2025), e nossos resultados também apontam uma presença expressiva de representantes desse filo em todos os substratos analisados.

A análise taxonômica revelou *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium*, como os mais frequentes e amplamente distribuídos em diferentes substratos (Lima *et al.*, 2024). Outros gêneros, como *Humicola* e *Talaromyces*, embora não tenham sido encontrados em grande abundância, também estiveram presentes nas amostras de sedimento. Novas espécies pertencentes a esses gêneros foram descritas em cavernas da Caatinga e da Mata Atlântica, incluindo *Aspergillus alvaroi*, *Aspergillus guanovespertilionum*, *Aspergillus lebretii*, *Cladosporium cavernicola*, *Cladosporium pernambucoense*, *Penicillium cecavii*, *Talaromyces cavernicola* e *Talaromyces potiguarorum* (Alves *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2024). Além disso, outras três novas espécies foram registradas em cavernas do bioma Caatinga: *Allophoma*

brasiliensis e *Pyrenochaetopsis cecavii*, isoladas de ectoparasitas de morcegos, e *Microascus luziarum*, isolado do corpo de morcegos (Silva *et al.*, 2025). Esses achados reforçam que cavernas brasileiras constituem importantes reservatórios de diversidade fúngica, incluindo múltiplos táxons inéditos, identificados por meio de abordagem morfológica associada à filogenia multilocus.

Ampliando nossos resultados para o bioma Amazônia (Nóbrega *et al.*, 2024), seis espécies inéditas de *Penicillium* isoladas de sedimentos da caverna Vale da Lua, no estado do Pará, região Norte do Brasil, foram descritas. Ao todo, 42 cepas do gênero foram obtidas, das quais 18 corresponderam a táxons até então desconhecidos. Esses representantes foram alocados na seção *Lanata-Divaricata*, série *Dalearum* (*P. parauapebasense*, *P. carajasense*, *P. albineum* e *P. aureosclerotiorum*), na série *Janthinella* (*P. reverso-vinaceum*) e na série *Simplicissima* (*P. lebretii*). O estudo apresentou ainda descrições detalhadas dos caracteres morfológicos, permitindo diferenciá-las de espécies filogeneticamente próximas. Além disso, foram descritas no bioma Amazônia e Cerrado as espécies *Humicola cerradensis* e *Parahumicola amazonica*. Esses achados ampliam o conhecimento sobre a diversidade de *Penicillium* e de outros fungos em ambientes cavernícolas tropicais e reforçam a importância da abordagem polifásica para uma identificação taxonômica robusta das espécies.

Determinadas espécies de fungos podem representar riscos à saúde humana e animal, como *Histoplasma capsulatum* e *Pseudogymnoascus destructans*, responsáveis por doenças respiratórias e pela síndrome do nariz branco em morcegos, respectivamente. Outros gêneros, como *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Penicillium*, já foram associados a alergias, micoses oportunistas e outras doenças respiratórias. Ambientes cavernícolas, especialmente aqueles abertos ao turismo, podem atuar como reservatórios e dispersores desses fungos, reforçando a necessidade de monitorar espécies com potencial patogênico. Neste estudo, não foram observadas espécies listadas como patogênicas pela World Health Organization, sendo a maioria dos fungos identificados oportunistas, necessitando de condições como imunossupressão para causar infecções. Nossos resultados foram incorporados aos planos de manejo espeleológico no Nordeste, incluindo as cavernas Crotes, Catedral, Furna Nova e Abrigo do Letreiro (ICMBio/CECAV), que registram informações sobre a micobiota cultivável presente, tanto no ar quanto nos sedimentos. A identificação e o monitoramento de fungos em cavernas são, portanto, fundamentais tanto para a segurança dos visitantes quanto para a conservação desses ecossistemas, fornecendo subsídios para estratégias de prevenção de riscos e turismo seguro.

4. Conclusões e Impacto Social

As cavernas estudadas abrigam uma micobiota diversa, com destaque para o solo/sedimento como principal reservatório e predominância de gêneros como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Talaromyces.* A abordagem polifásica, ao integrar dados morfológicos e moleculares, mostrou-se essencial para a identificação precisa dos isolados, incluindo táxons inéditos. Essa estratégia não apenas fortalece a taxonomia e a sistemática fúngica, mas também fornece subsídios para a conservação da biodiversidade subterrânea e a gestão sustentável das cavernas brasileiras.

Agradecimentos

ICMBio/IABS; FINEP; CNPq; CAPES e FAPEG.

Referências

Alves, V.C.S. et al. Unravelling the fungal darkness in a tropical cave: richness and the description of one new genus and six new species. *Fungal Systematics and Evolution* 2022, 10, 1, 139-167.

Lima, J.M.S. et al. *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* (Eurotiales) in Brazilian caves, with the description of four new species. *Fungal Systematics and Evolution* 2024, 14, 1, 89-107.

Prazeres, J.F.S.A. et al. Current knowledge on the cave fungi in Brazilian biomes. *Fungal Biology Reviews* 2025, 51, 100412.

Silva, E.A. et al. A polyphasic approach reveals *Microascus luziarum* (Microascales, Microascaceae), a new species from bat living in a cave in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2025, 75, 1.

Nóbrega, J.P. et al. Six new *Penicillium* species in the section Lanata-Divaricata from a cave in Amazon rainforest, Brazil. *Mycological Progress* 2024, 23, 71, 1-24.

Fundamentos e aplicações da espectrometria de massas (MALDI-TOF) e da espectroscopia de infravermelho (IR Biotyper) para identificação e tipagem microbiana PL3

Luiz André Garrido Pelaes

Especialista de Aplicações em Microbiologia, Bruker do Brasil, Atibaia (SP), Brasil

E-mail*: luiz.pelaes@bruker.com*

1. Fundamentos da espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS)

A técnica MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*) consiste na ionização das moléculas presentes em uma amostra microbiana e na subsequente aquisição de um espectro de massas dos íons gerados. A técnica analisa principalmente proteínas ribossomais abundantes, criando uma "impressão digital" característica de cada microrganismo.

Esta técnica tornou-se uma das ferramentas mais importantes da microbiologia moderna, especialmente em ambientes clínicos e laboratoriais. Ela revolucionou a forma como microrganismos são identificados, substituindo métodos bioquímicos demorados por uma abordagem rápida, precisa e de baixo custo.

O MALDI-TOF MS permite identificar bactérias, micobactérias e fungos em minutos, a partir de colônias cultivadas. Essa rapidez é crucial em hospitais, pois acelera o diagnóstico e possibilita iniciar o tratamento adequado mais cedo, sendo especialmente útil em casos de sepse, onde cada hora de atraso no tratamento pode aumentar a mortalidade. Em termos de micologia médica, a identificação de leveduras e fungos filamentosos, que antes exigiam testes morfológicos demorados, passou a contar com uma técnica muito mais ágil. O mesmo conceito pode ser aplicado para identificação de microrganismos de interesse veterinário, pois o instrumento analítico não é focado apenas no diagnóstico clínico humano, podendo ser utilizado como uma ferramenta de grande apoio para diagnóstico veterinário.

Esta técnica analítica pode ser aplicada para a segurança alimentar, podendo ser utilizada para identificar rapidamente contaminantes em alimentos, como *Salmonella* ou *Listeria*. Através de sua maior agilidade, permite monitorar a qualidade microbiológica em indústrias alimentícias, reduzindo riscos de surtos e recalls.

Para a indústria farmacêutica e biotecnologia, o MALDI-TOF MS apoia o controle de qualidade em processos de produção de medicamentos e probióticos, identifica contaminantes em linhas de produção, garantindo conformidade com normas regulatórias e facilita pesquisas sobre diversidade microbiana em ambientes industriais.

2. Fundamentos da espectrometria de infravermelho (IR Biotyper)

O IR Biotyper utiliza espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) para analisar a composição química global das células microbianas. Tendo como base que cada microrganismo apresenta padrões únicos de absorção de radiação infravermelha, relacionados a lipídios, carboidratos e proteínas. O IR Biotyper torna-se especialmente útil para tipagem e diferenciação de cepas, permitindo distinguir variantes de uma mesma espécie, rastrear fontes de contaminação, controlar a qualidade de um processo e promover uma investigação epidemiológica em ambientes clínicos, industriais e de segurança alimentar.

Para a microbiologia clínica, o IR Biotyper permite a diferenciação de cepas de patógenos, ajudando a identificar se infecções em diferentes pacientes têm a mesma origem. Enquanto o MALDI-TOF identifica a espécie, o IR Biotyper distingue variantes dentro dessa espécie, oferecendo maior precisão em estudos epidemiológicos. A tipagem por infravermelho é mais rápida que métodos tradicionais como PFGE ou MLST, acelerando decisões clínicas e de controle de infecção.

O mesmo princípio pode ser utilizado na segurança alimentar, pois o equipamento pode ser usado para identificar rapidamente a origem de surtos em cadeias de produção de alimentos, diferenciando cepas de *Salmonella*, *Listeria* ou *E. coli*, por exemplo. Para processos produtivos, em que o microrganismo empregado deve sempre se manter com as mesmas características, o IR Biotyper permite monitorar lotes de produção e detectar variações microbianas que possam comprometer a segurança do produto.

Em resumo, o MALDI-TOF e o IR Biotyper representam tecnologias complementares que transformaram a microbiologia moderna. O primeiro oferece identificação rápida e precisa de espécies, enquanto o segundo possibilita tipagem ágil de cepas, essencial em investigações epidemiológicas e controle de surtos. Juntos, fortalecem estratégias de diagnóstico, prevenção e segurança, tanto em ambientes clínicos quanto industriais. A integração dessas ferramentas não apenas otimiza o tempo de resposta, mas também eleva o padrão de qualidade e confiabilidade na microbiologia aplicada.

Conceitos básicos sobre espectrometria por MALDI-TOF e o projeto europeu MALDIBANK

PL4

Nelson Lima

Micoteca da Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal
LABBELS (Laboratório Associado, Braga/Guimarães), Universidade do Minho, Braga, Portugal

E-mail*: nelson@ie.uminho.pt*

Resumo: Em 1912, Joseph J. Thomson desenvolveu o primeiro espectrómetro de massa. A técnica MALDI-TOF surgiu nos anos 1980, permitindo analisar biomoléculas sem degradação. Baseia-se na ionização assistida por matriz e separação por tempo de voo. Amplamente aplicada na microbiologia, depende de bases de dados. O projeto MALDIBANK visa melhorar a identificação microbiana com inteligência artificial e ultrapassar as dificuldades encontradas nas atuais bases de dados.

Palavras-chave: base de dados; calibração; identificação microbiana; laser; matriz; proteínas ribossomais

1. Introdução

Em 1912, Joseph J. Thomson, com base na sua descoberta do eletrão em 1897, desenvolveu o primeiro espectrómetro de massa, inicialmente designado "espectrógrafo parabólico", nos laboratórios de Cavendish, em Cambridge (Reino Unido). Mais tarde, a utilização da técnica de massas por dessorção/ionização assistida por matriz com analisador de tempo de voo (MALDI-TOF MS) surge no contexto do desenvolvimento de métodos de espectrometria de massas capazes de analisar moléculas biológicas de elevada massa molecular sem as fragmentar.

Mais especificamente, a técnica foi desenvolvida na década de 1980, sendo resultado dos trabalhos pioneiros de dois grupos de investigação: 1) o grupo de Hillenkamp e Karas (1991), na Alemanha, que estabeleceram os princípios da ionização assistida por matriz; 2) paralelamente, Koichi Tanaka, no Japão, desenvolveu um método semelhante utilizando partículas metálicas e laser, trabalho que lhe valeu o Prémio Nobel da Química em 2002 (Tanaka, 1987; Tanaka *et al.*, 2003). Este prémio foi partilhado com John Fenn e Kurt Wüthrich por terem demonstrado a aplicação da tecnologia do laser na análise de macromoléculas biológicas.

O grande avanço introduzido pelo MALDI-TOF MS foi permitir a análise de biomoléculas sensíveis, como proteínas, peptídeos e polímeros, sem provocar a sua degradação

significativa, algo que as técnicas anteriores de ionização não conseguiam fazer de forma eficiente.

A partir da década de 1990, a técnica começou a ser amplamente aplicada em diversas áreas, incluindo: biotecnologia, microbiologia; proteómica; diagnóstico clínico; e na fitopatologia (como no caso da identificação de fitopatogéneos). No contexto específico da microbiologia a utilização de MALDI-TOF MS intensificou-se sobretudo a partir dos anos 2000, com o desenvolvimento de bases de dados de espectros proteicos, permitindo a identificação rápida e precisa de microrganismos. Em 2005, nos laboratórios da Micoteca da Universidade do Minho (MUM), iniciámos a utilização desta técnica para a identificação de fungos filamentosos que permitiu apresentar pela primeira vez, em 2006, no 8th International Mycological Congress, realizado em Cairns na Austrália, os nossos resultados aplicados a *Aspergillus* seção *Nigri* (Kallow *et al.*, 2006a). Depois, seguiu-se nas coleções de culturas microbianas europeias um trabalho cooperativo para testar e generalizar o uso desta técnica à identificação microbiana (Kallow *et al.*, 2006b).

2. A técnica MALDI-TOF MS

A espectrometria de massas por MALDI-TOF MS constitui atualmente uma técnica analítica sofisticada e amplamente aplicada na identificação de microrganismos, baseando-se na obtenção de perfis proteicos, com maior especificidade nas proteínas ribossomais. O princípio fundamental desta metodologia reside na desabsorção e ionização de moléculas orgânicas mediadas por uma matriz química, seguida da separação dos iões em função da sua razão massa/carga (m/z).

A matriz desempenha um papel central no processo analítico. Trata-se de um composto orgânico de baixo peso molecular, capaz de absorver radiação no comprimento de onda do laser utilizado. Entre as matrizes mais comuns destacam-se o ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB) e o ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), eficazes devido à elevada absorção na região ultravioleta. A matriz é preparada em solução, geralmente aquosa e acidificada, sendo misturada com o analito numa razão molar entre 100:1 e 50.000:1. Este excesso é crucial para a formação de cristais homogéneos durante a evaporação, permitindo a incorporação eficiente do analito. Este processo assegura transferência de energia controlada e ionização suave, minimizando a fragmentação das proteínas utilizadas como biomarcadores.

A ionização é desencadeada pela incidência de um laser pulsado sobre a mistura matriz/analito. Os lasers operam tipicamente nas regiões UV ou IR, podendo ser gasosos ou sólidos. O modo pulsado é essencial, pois a largura do pulso influencia a eficiência da ionização. Nos lasers UV, os pulsos têm duração de nanossegundos (0,5–20 ns), enquanto nos IR podem ultrapassar 200 ns. O laser de nitrogénio (N_2), com comprimento de onda de 337 nm, é o mais utilizado na identificação microbiana, devido à compatibilidade com as matrizes, baixo custo e eficiência energética.

Durante a irradiação, a matriz absorve a energia do laser, promovendo um rápido aumento de temperatura que conduz à sublimação explosiva, em que ocorrem simultaneamente a desabsorção e ionização das moléculas do analito.

Após a ionização, os iões são acelerados por um campo elétrico e organizados segundo a sua razão massa/carga, entrando no analisador de tempo de voo (TOF), onde a separação

ocorre com base na velocidade. Como todos os iões recebem energia cinética semelhante, os de menor massa atingem o detector primeiro. Este princípio permite determinar com precisão as massas moleculares. No caso dos microrganismos, as proteínas alvo apresentam massas entre 2.000 e 20.000 Daltons, sendo suficiente o modo linear para obter espectros com baixo ruído.

A calibração externa é essencial para garantir a exatidão das medições, sendo realizada com compostos de massas conhecidas. Devido ao custo dos calibrantes comerciais, recorrem-se frequentemente a alternativas biológicas, como proteínas ribossomais de microrganismos modelo. A bactéria *Escherichia coli*, nomeadamente as estirpes DH5α e K12, foi amplamente utilizada para este fim. As células são preparadas de forma semelhante às amostras, utilizando proteínas com massas definidas como referência, permitindo uma calibração precisa.

A preparação das amostras é simples, rápida e requer pouca biomassa. A amostra é depositada na placa de MALDI e recoberta com matriz acidificada, cuja acidez facilita a extração proteica e a ionização. Após evaporação, forma-se uma estrutura cristalina adequada à interação com o laser.

Os espectros obtidos são analisados por comparação com bases de dados contendo perfis de referência. A identificação baseia-se no padrão de picos das proteínas presentes, num processo conhecido como "fingerprinting proteico", que permite identificação rápida e precisa. A fiabilidade depende da qualidade e abrangência das bases de dados e da padronização experimental. Atualmente, o principal desafio desta técnica reside precisamente na qualidade e extensão das bases de dados disponíveis, sejam comerciais ou desenvolvidas internamente.

3. O projeto MALDIBANK

Para ultrapassar as limitações das bases de dados, o projeto Europeu MALDIBANK: *Multi-domain Open MALDI Spectra BANK for Identification of Microorganisms* (https://maldibank.eu/) procura aproveitar a tecnologia MALDI-TOF para inaugurar uma nova era na identificação microbiana. O objetivo do MALDIBANK é desenvolver uma plataforma aberta baseada num amplo banco de dados de espectros MALDI-TOF, abrangendo múltiplos táxons e ambientes, suportada por uma infraestrutura de dados robusta e oferecendo serviços de análise que permitam: carregar espectros e obter identificações de microrganismos de forma mais rápida e precisa; e realizar vigilância epidemiológica e caracterização de microrganismos por meio de algoritmos inovadores de inteligência artificial. Este projeto será apresentado na Conferência Internacional.

Agradecimentos

O autor agradece ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto UID/04469/2025; Doi: https://doi.org/10.54499/UID/04469/2025; ao LABBELS – Laboratório Associado de Biotecnologia, Bioengenharia e Sistemas Microelectromecânicos (LA/P/0029/2020); e, ainda, o apoio do programa de investigação e inovação Horizon Europe da União Europeia, ao

abrigo do acordo de subvenção n.º 101188201 (MALDIBANK) e de subvenção n.º 101188201 (Microbes-4-Climate).

Referências

Hillenkamp, F.; Karas, M. Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. Analytical Chemistry 1991, 63,1193-203.

Kallow, W.; Erhard, M.; Lima, N.; Santos, I.M.; Serra, R.; Venâncio, A.; Friedl, T.; Müller, J.; de Hoog, G.S.; Verkley G.J.M. Microbial strain characterisation by MALDI-TOF MS - possibilities and limits. *In* Proceedings of the Annual General Meeting of the European Culture Collections' Organisation. NCAIM, Corvinus University of Budapest: Hungary, 2006b; pp. 146-159.

Kallow, W.; Santos, I.; Erhard, M.; Serra, R.; Venâncio, A.; Lima, N. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* characterised by MALDI-TOF MS. *In* Meyer, W., Pearce, C. Eds. Proceedings of 8th International Mycological Congress. Medimond S.r.l.: Bologna, 2006a, pp. 189-193.

Tanaka, K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). Angewandte Chemie International Edition England 2003, 42, 3860–3870.

Tanaka, K.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry 1987, 185–188.

Caracterização microbiana por espectroscopia na faixa do infravermelho: *Candida auris* e espécies de *Aspergillus* como modelos fúngicos

PL5

Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto[1,2]

[1]*Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil*
[2]*Hospital das Clínicas de Pernambuco, Pernambuco, Brasil*

E-mail*: reginaldo.limant@ufpe.br*

Resumo: A espectroscopia na faixa do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) é uma ferramenta extremamente importante na microbiologia moderna, funcionando como um método rápido, não destrutivo e de alto rendimento para a caracterização, identificação e diferenciação de microrganismos. Ela atua obtendo uma "impressão digital" (*fingerprint*) molecular da célula inteira. Nesta palestra, iremos discutir sua aplicabilidade com dois fungos de relevância clínica.

Palavras-chave: *Aspergillus*; *Candida*; espectroscopia; infravermelho; tipagem

1. Introdução

A conscientização dos profissionais de saúde, melhores ferramentas de diagnóstico e disponibilidade de novos medicamentos antifúngicos têm melhorado o controle das infeções fúngicas. Uma grande preocupação e o desafio atual é o surgimento de novas espécies de fungos multirresistentes cuja epidemiologia e gestão ainda são insuficientes. É o caso de dois patógenos, *Candida auris* e *Aspergillus fumigatus*. A OMS classificou ambos no grupo de prioridade crítica, em uma lista de patógenos fúngicos prioritários publicada em 2022, que objetiva guiar e estimular a pesquisa, desenvolvimento e ações de saúde pública por parte de gestores em saúde, órgãos regulatórios e instituições de pesquisa dedicados a novos métodos de diagnóstico, tratamento e prevenção de casos e surtos (WHO, 2022).

Candida auris é um fungo emergente multirresistente. Está relacionada a surtos hospitalares em pacientes críticos e infecção invasiva em imunocomprometidos. Identificar leveduras de *Candida auris* é um desafio aos laboratórios clínicos, e a tipagem ao nível de clado só pode ser feita atualmente por métodos genômicos laboriosos e de alto custo, como *Multi-Locus Sequencing Typing* e *Whole Genome Sequencing*, em laboratórios de referência altamente especializados (Contreras e Morgan, 2022; De Melo *et al.,* 2025).

A aspergilose é uma infecção causada por fungos do gênero *Aspergillus* spp., principalmente *Aspergillus fumigatus*, e representa um desafio crescente para a saúde pública, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Suas manifestações clínicas são diversas, podendo variar desde quadros alérgicos até formas invasivas potencialmente fatais.

As metodologias diagnósticas tradicionais, como culturas e detecção de galactomanana, amplamente empregadas, apresentam limitações em termos de sensibilidade, especificidade e tempo de resposta, o que pode comprometer a conduta terapêutica. A identificação confiável ao nível de espécie é realizada por espectrometria de massas ou sequenciamento parcial de alguns genes, sendo a calmodulina a mais utilizada (Ferraz *et al.,* 2022)

Para determinar o perfil de sensibilidade desses patógenos, só é possível através da técnica de microdiluição em caldo, o que é realizado em laboratórios de pesquisa e de referência. O aumento de casos, a dificuldade na identificação ao nível de espécie/clado e os relatos de resistência aos antifúngicos destes dois patógenos mostram a importância da descoberta de novas abordagens de caracterização.

A espectroscopia na faixa do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) vem sendo amplamente utilizada na Europa e na América do Norte na identificação e tipagem de bactérias por meio da análise da composição bioquímica celular. Publicações recentes aplicaram essa metodologia na tentativa de identificar e distinguir os clados de *C. auris* (Contreras e Morgan, 2022; De Melo *et al.,* 2025). Trata-se de uma técnica vibracional na qual uma amostra é exposta a uma fonte de luz infravermelha, resultando na absorção de energia pela amostra biológica, a qual produz vibrações moleculares. A interação ocorre com compostos moleculares presentes na célula e como resultado são gerados espectros que representam impressões digitais únicas, permitindo a classificação de microrganismo ao *taxon* de espécie ou subtipo de forma rápida e não destrutiva (Medeiros *et al.*, 2026).

Diante do exposto, essa palestra objetiva evidenciar aos participantes desta conferência internacional as aplicabilidades do FT-IR, uma metodologia disruptiva para o campo da microbiologia, que vem sendo recentemente utilizada na identificação rápida de microrganismos, tipagem intra-específicas de cepas, além de sua potencialidade em detectar cepas resistentes.

2. Materiais e Métodos

Após a confirmação da identificação dos isolados utilizando o MALDI-TOF MS (MALDI Biotyper® Sirius, Bruker Daltoniks, Alemanha), cepas clínicas de *Candida auris* e *Aspergillus*, foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose (Plastlabor, São Paulo, Brasil) e incubadas a 35 °C por 24 h e 48 h, respectivamente. A massa celular foi diretamente adicionada a um microtubo de 1,5 mL com 70 µl de etanol a 70%, recentemente preparado. O protocolo de obtenção espectral foi adaptado de Morgan e Contreras (2022). Os microtubos contêm cilindros metálicos para auxiliar na homogeneização da amostra, os quais, após a inoculação, foram agitados em vórtex durante 2 min. Uma vez concluída a ressuspensão inicial do organismo, adicionou-se então igual volume de água deionizada ao microtubo e agitou-se em vórtex durante mais 2 min. Paralelamente, os controles IRTS1 e IRTS2 foram preparados adicionando 90 µL de água deionizada em cada microtubo, com posterior agitação em vórtex por 2 min, e adição de etanol não diluído em igual volume. A suspensão foi homogeneizada por mais 2 min em vórtex. Para realizar a aquisição de espectro, 15 µL da amostra processada serão inoculados nas placas de silicone com 96 spots em quintuplicatas (cinco spots) e deixadas secar em temperatura ambiente. Para garantir um alto nível de reprodutibilidade

técnica, o meio de cultura utilizado deverá ser padronizado e ser sempre do mesmo fabricante. Adicionalmente, a temperatura e tempo de incubação também serão controlados, e as amostras serão processadas e analisadas em três réplicas, ou seja, três dias consecutivos de quintuplicatas para cobrir a variação fenotípica do cultivo. Os espectros serão registrados utilizando o espectrofotômetro IR Biotyper® (Bruker Daltoniks, EUA). A análise de Repetições em Tandem Curtas (STR) foi utilizada para validar a abordagem espectroscópica relacionada às cepas de *C. auris* (De Melo *et al.,* 2025).

3. Resultados e discussão

Setenta e quatro cepas de *C. auris* dos clados I, II, III, IV e V foram analisadas e foi possível diferenciar os cinco clados através do FT-IR através dos 1.732 espectros obtidos (Figura 1). Sessenta e quatro eram cepas do clado IV, onde 59 foram obtidas de três surtos ocorridos no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil, duas da Venezuela e três da Colômbia. Nosso protocolo ajustado melhorou a qualidade espectral em 31,42% em comparação ao protocolo padrão. A FT-IR permitiu discriminar os clados I a V de *C. auris*. Além disso, importantes similaridades foram observadas em cepas de *C. auris* do clado IV obtidas de dois dos três hospitais com surto em Pernambuco, com base nos espectros de polissacarídeos (1300-800 cm^{-1}), sugerindo rotas de transmissão inter-hospitalar. A análise STR confirmou os resultados de similaridade obtidos por FT-IR agrupando as cepas de dois hospitais diferentes em um único cluster. Um protocolo de espectroscopia FT-IR ajustado (*splicing method*) foi aplicado para obter os perfis de carboidratos e lipídios (3000-2800 cm^{-1} e 1500-1400 cm^{-1}).

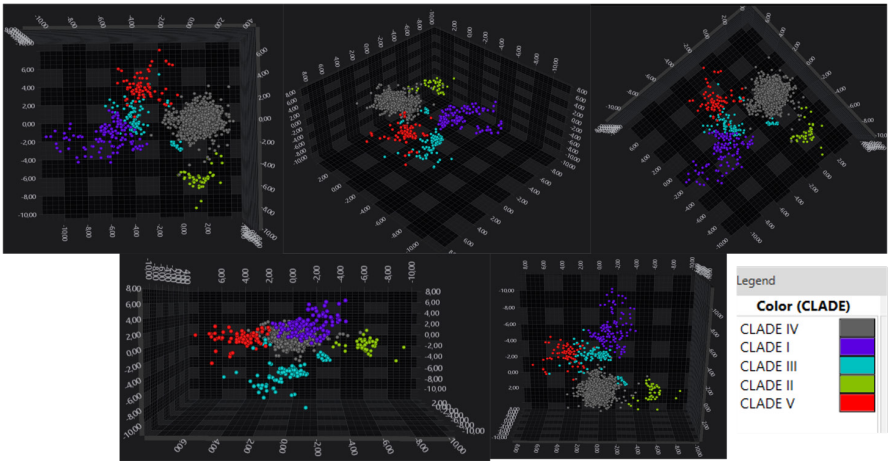


Figura 1. Gráficos de dispersão tridimensional onde cada ponto representa um espectro, com cores diferentes indicando os clados de *Candida auris*: isolados do Clado I em roxo, Clado II em verde, Clado III em azul, Clado IV em cinza e Clado V em vermelho. Um total de 1732 espectros são exibidos. O eixo X exibe LD1, o eixo Y exibe LD2 e o eixo Z exibe LD3, representando juntos 85,19% da variância.

Ao analisarmos conjuntamente os espectros de polissacarídeos e lipídeos, observamos uma leve diferença no agrupamento das cepas do clado IV de origem colombiana. Interessantemente, estas cepas são resistentes a anfotericina B.

Foram analisados nove isolados clínicos de *Aspergillus,* sendo seis *Aspergillus fumigatus*, dois *A. terreus*, um *A. niger* e um *A. versicolor*. A cepa de referência *A. fumigatus* ATCC 204305 foi incluída. Foram obtidos 150 espectros das 10 cepas de *Aspergillus*, que permitiram uma clara distinção entre *A. fumigatus* e as cepas de *A. versicolor* e *A. niger* com base nos espectros de polissacarídeos (1300-800 cm^{-1}). Observamos uma sobreposição espectral entre as cepas de *A. terreus* e duas cepas de *A. fumigatus*, evidenciando a necessidade de ampliação da quantidade de cepas estudadas e análise espectral de outras faixas de macromoléculas, como lipídeos e proteínas.

4. Conclusões e Impacto Social

Neste estudo, testamos um protocolo de preparação ajustado para otimizar as condições de geração de espectros FT-IR de alta qualidade, com foco no método de preparação da amostra. O IR Biotyper diferenciou com sucesso os clados I, II, III, IV e V de *C. auris*, oferecendo diferenciação de clados de alta resolução, rápida e com boa relação custo-benefício. Além disso, confirmamos a alta similaridade entre cepas de *C. auris* do clado IV provenientes de dois hospitais, conforme demonstrado por genotipagem, e hipotetizamos sua aplicabilidade para detecção rápida de resistência antifúngica. A diferenciação de espécies de *Aspergillus* também foi parcialmente obtida.

O IR Biotyper® é rápido, fácil de usar e uma alternativa promissora para laboratórios de complexidade moderada a alta que buscam uma plataforma de identificação e tipagem de cepas, acessível e com custo moderado. Além disso, essa técnica tem potencial para rastreamento da origem em nível de isolado, o que pode ser valioso para o monitoramento de rotas de transmissão em ambientes clínicos.

Em termos tecnológicos, a aplicação de técnicas avançadas de caracterização espectral representa um salto inovador no estudo de microrganismos. Há cerca de 15 anos a espectrometria de massas por MALDI-TOF promoveu uma disruptura na identificação de microrganismos. Atualmente, existem mais de 70 equipamentos tipo MALDI-TOF MS em laboratórios clínicos no Brasil. Na atualidade, apenas oito FT-IR dedicados à microbiologia estão disponíveis no Brasil (Instituto Butantã, LACEN-PR, Universidade Estadual de Maringá, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Fiocruz, UNIFESP, Instituto Adolfo Lutz e UFPE). Contudo, é necessário consolidar a metodologia e capacitar recursos humanos para essa nova abordagem que irá promover outra disruptura na tipagem/caracterização microbiana nos próximos anos. Assim, os resultados obtidos poderão ser aplicados a médio prazo nas unidades do SUS que já possuem o equipamento ou passarão a adquirir nos próximos anos.

Agradecimentos

Agradecemos aos laboratórios e serviços de controle de infecção dos hospitais envolvidos e aos analistas científicos da Bruker Daltonics pelo suporte técnico. Este projeto foi parcialmente financiado pelo projeto de pesquisa aprovado na Chamada

CNPq/MCTI/FNDCT nº22/2024 - Programa Conhecimento Brasil - Apoio a Projetos em Rede, processo 444638/2024-5.

Referências

Contreras, D.A.; Morgan, M.A. Surveillance diagnostic algorithm using real-time PCR assay and strain typing method development to assist with the control of *C. auris* amid COVID-19 pandemic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2022, 12, 887754

De Melo, C.C. *et al.* Clade distinction and tracking of clonal spread by Fourier-transform infrared spectroscopy in multicenter *Candida (Candidozyma) auris* outbreak. *Mycoses* 2025, 68, e70085.

Ferraz, T.L.L. et al. Lethal destructive sinusopathy due to amphotericin B-resistant *Aspergillus flavus*: a case report. *Revista Iberoamericana de Micología* 2022, 39, 21–24.

Medeiros, A.G.J.; Nascimento, A.L.F; Rossato L. *et al.* Infrared spectroscopy as a promising tool for diagnosing and typing human pathogenic fungi. *Mycoses* 2026, 1, e70151.

WHO. World Health Organization. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. 2022, 49 pp.

MALDI-TOF MS na Identificação Microbiana Ambiental: Detecção e Identificação de Patógenos Emergentes em Ambiente Aquático

PL6

Manoel Oliveira

Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (RJ), Brasil

E-mail*: manoel.marques@fiocruz.br*

Resumo: Os fungos apresentam grande diversidade de espécies e relevância para a saúde pública. Destaco estudos voltados à detecção de leveduras potencialmente patogênicas em ambientes aquáticos do Rio de Janeiro, identificadas por meio de taxonomia polifásica, incluindo a metodologia de MALDI-TOF MS. Nesse contexto, foram identificadas espécies emergentes, como *Candida palmioleophila* e *Trichosporon japonicum*. O uso da espectrometria de massas demonstrou eficiência metodológica, contribuindo para a vigilância ambiental, a avaliação de riscos e o fortalecimento da abordagem de Saúde Única.

Palavras-chave: fungos; leveduras; MALDI-TOF MS; saúde única; taxonomia polifásica

1. Introdução

Os fungos constituem um dos reinos mais diversos em número de espécies, com estimativas de riqueza que têm evoluído significativamente nas últimas décadas, impulsionadas pelos avanços em metodologias moleculares. Esse aumento no conhecimento da diversidade fúngica, aliado a eventos como o surgimento do HIV/AIDS e a pandemia da COVID-19, reforçou a importância desses microrganismos na saúde pública, especialmente devido ao crescimento das infecções oportunistas. No entanto, a identificação precisa de espécies ainda é um desafio, exigindo a integração de abordagens fenotípicas, moleculares e proteômicas.

Nesse contexto, a água doce destaca-se como um recurso essencial para a saúde humana, ambiental e atividades industriais, sendo sua qualidade diretamente relacionada à segurança sanitária. Esta palestra aborda a detecção e identificação de patógenos emergentes em ambientes aquáticos, com ênfase na aplicação de ferramentas modernas, como o MALDI-TOF MS, aliado ao emprego da taxonomia polifásica, para identificação microbiana mais rápida e precisa.

2. Resultados e discussão

Estudos conduzidos em sistemas lagunares e amostras de esgoto no estado do Rio de Janeiro, incluindo monitoramento durante a pandemia de COVID-19, relataram a presença de leveduras potencialmente patogênicas, especialmente do gênero *Candida*. Sendo proposto um fluxo de trabalho inovador utilizando Colony PCR como alternativa ao PCR convencional, proporcionando maior agilidade e custo-benefício no monitoramento ambiental.

Destaca-se a identificação de *Candida palmioleophila* em esgoto bruto, incluindo a análise de fatores de virulência, como formação de biofilme e produção de enzimas extracelulares, sugerindo seu potencial como patógeno emergente. Adicionalmente, o uso do MALDI-TOF MS permitiu a identificação de *Trichosporon japonicum* em amostras marinhas provenientes de *Pseudobatos horkelii* (raia-viola), representando o primeiro relato dessa levedura nesse hospedeiro no Brasil. Esses achados destacam a diversidade fúngica em ambientes aquáticos e a relevância de métodos rápidos e confiáveis para sua detecção.

4. Conclusões e Impacto Social

Os resultados evidenciam o papel fundamental de abordagens integradas da taxonomia polifásica, utilizando a associação de técnicas moleculares para identificação, no monitoramento de microrganismos em ambientes aquáticos especialmente em áreas impactadas por ações antrópicas, reforçando a importância da abordagem Saúde Única na vigilância de patógenos emergentes, visto que espécies com potencial patogênico foram detectadas.

Do ponto de vista social, os resultados contribuem para a melhoria da qualidade da água, prevenção de riscos à saúde pública e fortalecimento de políticas de saneamento. Além disso, evidenciam a necessidade de estratégias integradas dentro do conceito de Saúde Única, promovendo benefícios para a saúde humana, animal e ambiental.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Doctor Vida Pocket equipment with LAMP technology PL7

Eduardo Coelho

STAB VIDA, Lisboa, Portugal

E-mail*: drvida@stabvida.com*

1. Introdução

Doctor Vida is a portable, handheld device for isothermal nucleic acid amplification. This smartphone-enabled device makes lab-grade equipment accessible and convenient. The sample types include nasal or nasopharyngeal swabs, blood, urine, cultured cells, bacteria, virus, water or stool. There is almost no sample preparation. No extraction and purification are needed. Time to result between 20 and 50 minutes maximum and delivered directly to owner smartphone. The Doctor Vida Pocket PCR equipment is suitable for research use only and can also be used for diagnostic purposes, depending on the application (Figure 1).



Figure 1 - Doctor Vida pocket equipment.

STAB VIDA holds several certifications, including ISO 9001, and has received awards and recognition for its innovation in biotechnology.

Dr Vida device core hardware

- Precise temperature control
- Integrated fluorescence sensing
- Compact, powerful ESP32 MCU
- Good capacity storage: up to 32 MB Flash
- Visual status feedback via RGB LED
- Instant audible alerts with buzzer



Core Firmware Capabilities

- Thermal Ramping
  Programmable temperature transitions;
- Isothermal Holds
  Stable temperature holds with configurable durations;
- Real-Time Fluorescence
  Live fluorescence signal acquisition during thermal processes



OTA Firmware Updates

- App checks API for new firmware
- Update sent via BLE to paired device
- Device auto-installs after verification



Dr Vida App v3.4.0

- iOS & Android compatible
- Controls up to 4 devices via Bluetooth
- QR code test startup (device + reagents)
- Live data display over Bluetooth



- Includes device with firmware, plus unlimited free access to the Dr Vida App and API, with all future updates included.



Dr Vida API v3.4.2

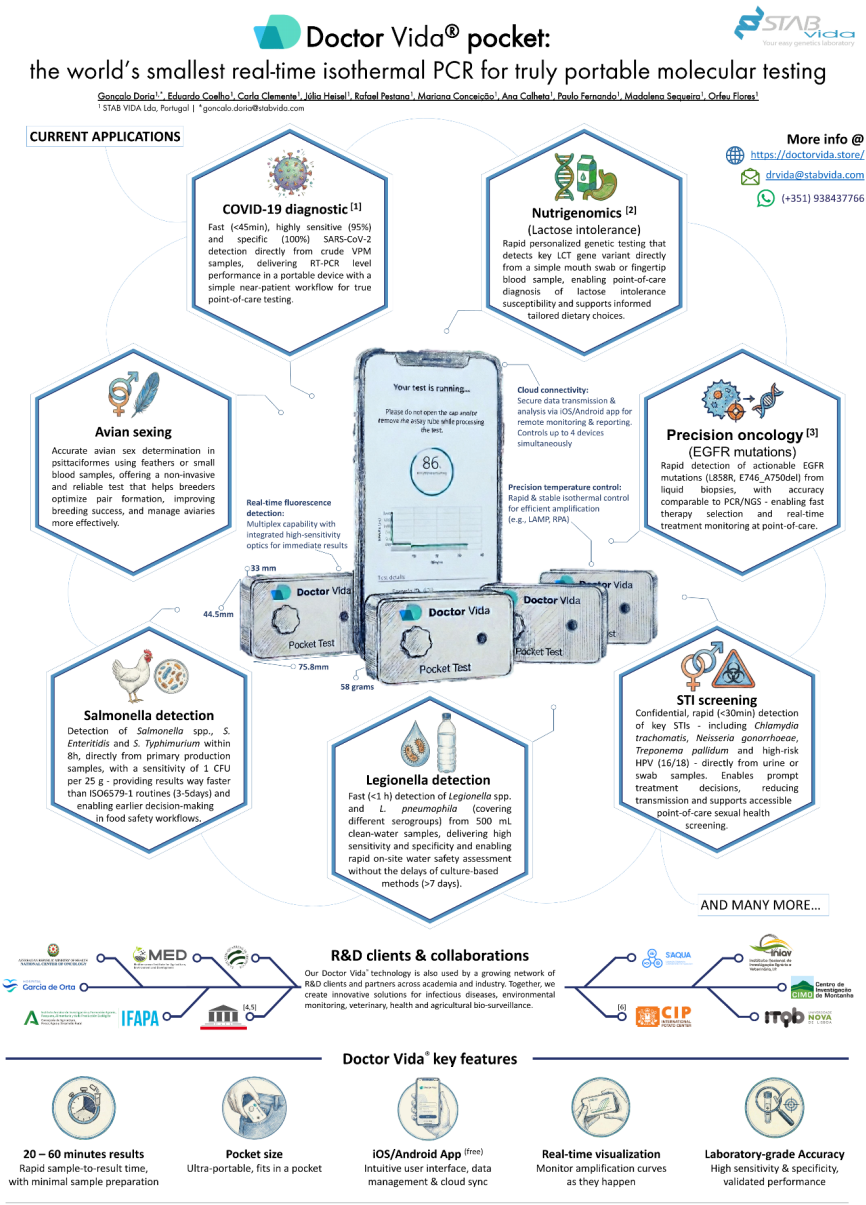
- Create user accounts
- Design and save custom test protocols, displayed as readable QR codes.
- Store and manage test data
- Built-in algorithm for data analysis



Optional Accessories

- Waterproof case with batteries (powers up to 2 devices) and one USB port
- Enhanced waterproof case with the same features plus an integrated peristaltic pump

2. DOCTOR VIDA® Current applications



3. DOCTOR VIDA® POCKET case for *Legionella* testing - Protective, powered, and travel-ready carrying case for Doctor Vida® systems

Core Case Capabilities

- Rugged protective design: Shock-resistant, waterproof hard case designed for safe transport, on-site testing, and rapid deployment scenarios. Custom-cut foam interior keeps devices and accessories perfectly organized and secured (Figure 2).
- Integrated high-capacity battery: Built-in 10,050 mAh rechargeable battery, enabling autonomous operation in the field. Designed to power up to two Doctor Vida® Pocket devices simultaneously.
- Future-ready compatibility: Fully compatible with Doctor Vida® Pocket and with Doctor Vida® Pocket Dual (upon commercialization).



Figure 2 - Travel-ready carrying case for Doctor Vida® systems.

Integrated Sample Processing System

- Integrated peristaltic pump module: Brushless peristaltic pump with digital RPM feedback for precise and reproducible sample processing.
- Pressure monitoring and control: Built-in pressure sensor enabling automated management of water sample filtration and processing, optimised for Legionella testing workflows in clean water samples.
- Automated sample handling: Closed and controlled system designed to reduce manual handling, improve reproducibility, and minimise contamination risk.
- Touch LCD interface: Integrated 4.6” touchscreen display for full system control and real-time monitoring of the sample processing and filtration workflow.

Referências

PT_Instruções de Utilização_Equipamento Doctor Vida e Software_v7 https://doctorvida.store/wp-content/uploads/2024/11/Instrucoes-de-Utilizacao_Equipamento-Doctor-Vida-e-Software_v7_RUO.pdf

EN_Instructions_for_use_Equipament Doctor Vida and Software_v7 https://doctorvida.store/wp-content/uploads/2024/11/Instructions_for_use_Equipament-Doctor-Vida-and-Software_v7.pdf

PT_EN_ES_Ficha técnica_Datasheet Dr Vida pocket_RUO https://doctorvida.store/wp-content/uploads/2024/11/Ficha-tecnica_Datasheet-Equipamento-Doctor-Vida_RUO_030824.pdf

The-first-point-of-care-genetic-test-for-lactose-intolerance-A-compact-lab-on-phone-diagnostic-assay https://doctorvida.store/wp-content/uploads/2024/11/The-first-point-of-care-genetic-test-for-lactose-intolerance-A-compact-lab-on-phone-diagnostic-assay.pdf

An isothermal lab-on-phone test for easy molecular diagnosis https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.07.042

European Commission success stories_Flexible research leads to pocket PCR test https://projects.research-and-innovation.ec.europa.eu/en/projects/success-stories/all/flexible-research-leads-pocket-pcr-test-covid-19

Fast and User-Friendly Detection of Flatfish Species https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c03917

Point-of-care suitable identification of the adulterants Carthamus tinctorius and Curcuma longa in Crocus sativus based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and lateral-flow-assay (LFA) https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109637

Food Authentication: The Detection of Arbutus unedo and Olea europaea Leaves as an Admixture of Oregano Using LAMP- and Duplex LAMP-Based Test Systems with Lateral-Flow Assays https://doi.org/10.3390/agriculture14040597

A Genetic Lab-on-Phone Test for Point-of-Care Diagnostic of Lactose Intolerance near Patient and in less than 90 Minutes https://doi.org/10.1093/jalm/jfad052

REASSURED Test System for Food Control—Preparation of LAMP Reaction Mixtures for In-Field Identification of Plant and Animal Species https://doi.org/10.3390/app142310946

A rapid Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) test for the detection of somatic variants, p.L858R and p.E746_A750del, in non-small cell lung cancer patients: comparison with real-time PCR and NGS https://doi.org/10.1016/j.premed.2025.100005

DrVida pocket PCR system Applications poster https://doctorvida.store/wp-content/uploads/2025/04/DrVidapocketPCRsystem.pdf

MALDI-TOF e Ensaio de Proficiência: Precisão Analítica sob Novos Desafios Microbianos

PL8

Shirley Lima

Controllab, Rua Ana Neri, 416, Benfica, Rio de Janeiro (RJ), Brasil

E-mail*: shirley.lima@controllab.com*

Resumo: A avaliação externa da qualidade (também conhecida como ensaio de proficiência), envolvendo *Phytobacter ursingii* e *Candidozyma auris* em mais de 200 laboratórios, evidenciou desafios na identificação desses microrganismos, com apenas alguns sistemas apresentando desempenho satisfatório. Os resultados sugerem limitações das plataformas atuais para a identificação de algumas espécies raras ou emergentes e ressaltam a importância da atualização das bases de dados e do monitoramento interlaboratorial para fortalecer a acurácia diagnóstica.

Palavras-chave: *Candidozyma auris;* ensaio de proficiência; MALDI-TOF MS; *Phytobacter ursingii*

1. Introdução

A identificação rápida e precisa de microrganismos é um componente essencial em todas as áreas da microbiologia, desde a clínica até as áreas ambiental, industrial e biotecnológica, impactando diretamente diagnósticos, monitoramento de processos e controle de qualidade. Tecnologias modernas, como a espectrometria de massas por MALDI-TOF, têm se consolidado como ferramentas eficazes para a identificação microbiana, oferecendo rapidez e confiabilidade superiores aos métodos tradicionais (Calderaro, 2024).

Apesar de seu potencial, a precisão analítica dessas metodologias depende de fatores como a atualização dos bancos de dados, revisões taxonômicas e competência laboratorial. Ensaios de proficiência, conduzidos por provedores acreditados segundo a ABNT NBR ISO/IEC 17043, são instrumentos fundamentais para monitorar o desempenho metodológico e garantir a confiabilidade dos resultados em diferentes contextos microbiológicos (ABNT NBR ISO/IEC 17043, 2024).

Neste estudo, analisamos estatisticamente o desempenho de diferentes metodologias de identificação microbiana, considerando os impactos das constantes atualizações tecnológicas e taxonômicas. O objetivo é fornecer uma visão abrangente dos desafios e das estratégias necessárias para manter a precisão analítica em todas as áreas da microbiologia.

2. Materiais e Métodos

Foram distribuídas duas amostras viáveis para avaliação externa da qualidade: *Candidozyma auris* (amostra líquida, fevereiro de 2024) e *Phytobacter ursingii* (material liofilizado, outubro de 2025). Participaram 164 laboratórios para o fungo e 231 laboratórios para a bactéria, utilizando oito e doze sistemas analíticos distintos, respectivamente, de diversos fabricantes.

A identificação microbiana foi realizada por MALDI-TOF MS e testes bioquímicos, em metodologias manuais, semi-automatizadas e automatizadas. As amostras foram preparadas e distribuídas por provedor acreditado, conforme a ABNT NBR ISO/IEC 17043, por meio do Programa de Avaliação Externa da Qualidade. Foram coletados dados sobre o número de participantes e percentual de conformidade, e foram realizadas análises estatísticas interlaboratoriais considerando diferenças metodológicas.

3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos, apresentados na Tabela 1 (Desempenho da identificação de *P. ursingii*) e na Tabela 2 (Desempenho da identificação de *C. auris*), indicam desafios na capacidade de alguns sistemas disponíveis para identificar corretamente esses microrganismos.

Tabela 1: Desempenho de identificação do *Phytobacter ursingii.*

Identificação	Vitek 2 Compact	Vitek 2	MALDI Biotyper	Phoenix	Manual	Phoenix M50	Vitek MS	WalkAway 40/96	MicroScan	Autosca 4	Vitek	MiniAPI	Resultados
Pantoea spp.	*81,6% (53)*	*78,1% (32)*	*3,6% (1)*	*47,8% (11)*	*31,6% (6)*	*22,2% (4)*	*35,7% (5)*	*50% (4)*	*87,5% (7)*	*75% (3)*	*100% (2)*	*100% (1)*	*55,8% (129)*
Phytobacter ursingii	*1,5% (1)*	-	*85,7% (24)*	-	-	-	*21,4% (3)*	*25% (2)*	-	-	-	-	*12,9% (30)*
Klebsiella pneumoniae	*1,5% (1)*	*2,4% (1)*	*3,6% (1)*	*43,5% (10)*	*5,3% (1)*	*61,1% (11)*	-	-	-	-	-	-	*10,8% (25)*
Kluyvera cryocrescens	*9,3% (6)*	*4,9% (2)*	-	*4,3% (1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	*3,9% (9)*
Citrobacter koseri (diversus)	-	-	-	-	*21,1% (4)*	*11,1% (2)*	-	-	-	*25% (1)*	-	-	*3,0% (7)*
(Outro, não listado)	*3,1% (2)*	*7,3% (3)*	-	-	-	-	*7,1% (1)*	*12,5% (1)*	-	-	-	-	*3,0% (7)*
Escherichia coli	-	*2,4% (1)*	*3,6% (1)*	-	*5,3% (1)*	-	*7,1% (1)*	-	-	-	-	-	*1,7% (4)*
Phytobacter spp.	*1,5% (1)*	-	-	-	*5,3% (1)*	-	*14,3% (2)*	-	-	-	-	-	*1,7% (4)*
Enterobacter agglomerans	-	-	-	-	*10,5% (2)*	*5,6% (1)*	-	*12,5% (1)*	-	-	-	-	*1,7% (4)*
Complexo Enterobacter cloacae	-	-	*3,6% (1)*	*4,3% (1)*	-	-	*7,1% (1)*	-	-	-	-	-	*1,3% (3)*
Klebsiella oxytoca	*1,5% (1)*	*2,4% (1)*	-	-	-	-	-	-	*12,5% (1)*	-	-	-	*1,3% (03)*
Complexo Cronobacter sakazakii	-	-	-	-	*10,5% (2)*	-	-	-	-	-	-	-	*0,8% (2)*
Cronobacter spp.	-	-	-	-	*5,3% (1)*	-	*7,1% (1)*	-	-	-	-	-	*0,8% (2)*
Proteus mirabilis	-	*2,4% (1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*0,4% (1)*
Complexo Acinetobacter baumannii	-	-	-	-	*5,3% (1)*	-	-	-	-	-	-	-	*0,4% (1)*

Tabela 2: Desempenho de identificação da *Candidozyma auris* (*Candida auris*).

Identificação	Manual	Vitek 2	MALDI Biotyper	Vitek MS	BD Phoenix 100/M50	WalkAway 40/ 96	Vitek	Autof MS1000	Resultados
Candida spp	72,1% (44)	76,7% (33)	-	4,5% (1)	16,7% (1)	80% (4)	66,7% (2)	-	51,9% (85)
Candidozyma auris (Candida auris)	19,7% (12)	11,6% (5)	100% (23)	90,9% (20)	66,7% (4)	-	33,3% (1)	100% (1)	40,9% (67)
Candida haemulonii	-	9,3% (4)	-	4,5% (1)	16,7% (1)	-	-	-	3,66% (6)
Candida glabrata	3,33% (2)	-	-	-	-	-	-	-	1,22% (2)
Candida parapsilosis	1,6% (1)	-	-	-	-	20% (1)	-	-	1,22% (2)
Candida albicans	1,6% (1)	-	-	-	-	-	-	-	0,61% (1)
Candida krusei (Issatchenkia orientalis)	1,6% (1)	-	-	-	-	-	-	-	0,61% (1)
(Outro, não listado)	-	2,3% (1)	-	-	-	-	-	-	0,61% (1)

Observou-se que 92% dos sistemas analíticos avaliados para identificação bacteriana e 63% dos sistemas utilizados para identificação fúngica apresentaram desempenho inferior ao esperado, com frequência relevante de identificações incorretas ou inconclusivas.

Entre os sistemas avaliados, apenas o MALDI Biotyper apresentou desempenho satisfatório para *P. ursingii* (85,7% de concordância). Para *C. auris*, três sistemas (MALDI Biotyper, Vitek MS e Autof MS1000) alcançaram média de 96,7% de concordância.

Esses resultados indicam que muitas plataformas apresentam capacidade limitada para algumas espécies raras ou emergentes, devido à proximidade filogenética com outros microrganismos (*Pantoea*, *Enterobacter*, *Candida haemulonii*) e à insuficiente representação em bases de dados. A reclassificação de *C. auris* para o gênero *Candidozyma* reforça a necessidade de atualização contínua das bases taxonômicas. Programas de avaliação externa da qualidade são essenciais para identificar limitações diagnósticas e aprimorar a acurácia interlaboratorial.

4. Conclusões e Impacto Social

A ocorrência de falhas na identificação microbiana pode comprometer a precisão dos dados epidemiológicos, dificultando a detecção e investigação de surtos. Além disso, pode favorecer a disseminação de genes de resistência antimicrobiana, reduzir a efetividade das medidas de controle e pode resultar em terapias menos adequadas. Esses aspectos destacam a importância da utilização de metodologias confiáveis, da atualização constante de bancos de dados e da participação em programas de ensaio de proficiência, como forma de monitorar a qualidade, a confiabilidade e a relevância dos resultados laboratoriais.

Agradecimentos

Agradeço à Controllab e ao seu fundador, Márcio Biasoli, pelo constante compromisso com a ciência e a educação, cuja visão e dedicação foram fundamentais para o

desenvolvimento e aprimoramento da microbiologia. Seu apoio inspira a busca contínua por qualidade, inovação e excelência no campo científico.

Referências

ABNT NBR ISO/IEC 17043:2024. Avaliação da conformidade — Requisitos gerais para a competência de provedores de ensaio de proficiência. Rio de Janeiro: ABNT, 2024.

Calderaro, A.; Chezzi, C**.** MALDI-TOF MS: A reliable tool in the real life of the clinical Microbiology Laboratory. *Microorganisms*, 2024, 12, 2, 322.

WDCM data platform for microbial identification PL10

Juncai Ma*, Linhuan Wu, Guomei Fan, Chongye Guo, Qian Zhang, Dongmei Liu, Qinglan Sun

WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms (WDCM), Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing, China

*E-mail: *ma@im.ac.cn*

Abstract: The WDCM data platform is a global resource for microbial identification, integrating over 19 million genomic sequences with standardised, high-quality data and AI-driven analytical tools. It supports surveillance, risk assessment, and early detection of pathogens, including influenza variants. By enabling data sharing and collaboration, it strengthens global health security, advances research, and improves responses to emerging infectious diseases worldwide.

Keywords: genomic databases; global health security; microbial identification; WDCM platform

1. Introduction

Microbial identification plays a pivotal role in public health, disease surveillance, and biosecurity. The WDCM, established in 1966 and currently hosted in China, is the global data center for microorganisms. It provides a comprehensive platform for microbial resource data integration, sharing, and utilisation, supporting microbial identification through extensive databases and advanced analytical tools. This article introduces the WDCM data platform, highlighting its contributions to microbial identification and global health security.

2. Materials and Methods

The WDCM data platform for microbial identification leverages an extensive array of databases and advanced analytical tools to facilitate comprehensive microbial surveillance, identification, and risk assessment. The materials and methods employed in this platform are designed to ensure high-quality data acquisition, processing, and analysis, thereby supporting accurate and efficient microbial identification.

Specifically, for influenza virus surveillance, the platform incorporates WDCM VarEPS-Influ database, which integrates 1,065,290 sequences from 224,927 influenza A, B, and C isolates retrieved from public resources (Chang *et al.*, 2024). This database employs a multi-dimensional evaluation strategy to assess the physical and chemical properties, primary,

secondary, and tertiary structures, receptor affinity, antibody binding capacity, and other aspects of viral variations.

To ensure data consistency and interoperability, the WDCM platform implements rigorous data standardization and quality control procedures. Sequence data are processed using tools such as Mafft for sequence alignment and checkM for assessing genome completeness and contamination (Parks *et al.*, 2015). Only sequence assemblies demonstrating >95% completeness and <5% contamination are retained for further analysis. Additionally, metadata associated with each sequence are manually curated to ensure accuracy and consistency, following guidelines from reputable sources such as the World Health Organization (WHO) and the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (Guo *et al.*, 2023).

The WDCM platform utilizes AI-driven algorithms and multi-dimensional assessment models to support microbial identification and risk assessment. For viral pathogens, the platform employs the VarEPS system, which integrates spatiotemporal monitoring, lineage analysis, mutation identification, and risk evaluation to provide comprehensive insights into viral genomic variations (Sun *et al.*, 2022). This system evaluates both observed and virtual (not yet occurred) mutations, addressing the time-lag issue in risk predictions. Similarly, for bacterial and fungal pathogens, the platform leverages the gcPathogen database, which provides a manually curated, comprehensive genomic resource encompassing antibiotic resistance genes (ARGs), virulence factors (VFs), and mobile genetic elements (MGEs) (Guo *et al.*, 2023). The gcPathogen database employs MLST and cgMLST analyses for high-resolution pathogen typing, enabling rapid and accurate microbial identification.

3. Results and Discussion

The WDCM data platform has successfully integrated over 19 million microbial genomic sequences, covering bacteria, fungi, viruses, and other pathogens. It provides a unified framework for microbial identification, enabling users to access high-quality, standardised microbial data from a single portal. The platform's microbial identification tools, powered by AI algorithms, facilitate rapid and accurate species identification, strain typing, and risk assessment. For instance, the platform's VarEPS system, a multi-dimensional assessment and early warning system for viral variants, has demonstrated success in predicting high-risk viral variants, such as the early warning of the Omicron variant. The platform's comprehensive databases and analytical tools have also supported global microbial surveillance efforts, contributing to the early detection and response to emerging infectious diseases.

Figures and tables within the platform illustrate the distribution and prevalence of various pathogens across different regions and time periods, providing valuable insights into microbial ecology and epidemiology. The platform's interactive visualisation tools enable users to explore and interpret complex microbial data, facilitating informed decision-making in public health and biosecurity.

4. Conclusions and Social Impact

The WDCM data platform for microbial identification represents a significant advancement in global microbial data integration and sharing. By providing a comprehensive and standardised framework for microbial identification, the platform enhances global health security by supporting early detection, surveillance, and response to emerging infectious diseases. Its international collaboration network and data sharing mechanisms promote global cooperation in microbial research and public health, fostering a more resilient and responsive global health system. The platform's social impact extends beyond public health, contributing to scientific research, biotechnology development, and environmental monitoring, thereby advancing our understanding of the microbial world and its interactions with humans and the environment.

Acknowledgement

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China, China (2021YFC2300900).

References

Chang, S.; Sun, Q.; Fan, G.; Peng, K.; Yu, Z.; Luo, Y.; ... Wu, L. VarEPS-Influ: a risk evaluation system of occurred and virtual variations of influenza virus genomes. Nucleic Acids Research 2024, 52, D1, D798-D807.

Guo, C.; Chen, Q.; Fan, G.; Sun, Y.; Nie, J.; Shen, Z.; ... Wu, L. gcPathogen: a comprehensive genomic resource of human pathogens for public health. Nucleic Acids Research 2023, gkad875.

Parks, D.H.; Imelfort, M.; Skennerton, C.T.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Research 2015, 25, 7, 1043-1055.

Sun, Q.; Shu, C.; Shi, W.; Luo, Y.; Fan, G.; Nie, J.; ... Wu, L. VarEPS: an evaluation and pre-warning system of known and virtual variations of SARS-CoV-2 genomes. Nucleic Acids Research 2022, 50, D1, D888-D897.

MALDI-TOF MS no Laboratório de Investigação em Fungos da FCM-UNICAMP: da Pesquisa Científica à Rotina Diagnóstica

PL12

Angelica Zaninelli Schreiber[1,2,3]

[1]*Departamento de Patologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas (SP), Brasil*
[2]*Laboratóriod e Investigação em Fungos, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas (SP), Brasil*
[3]*Laboratório de Microbiologia, Divisão de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas, UNICAMP, Campinas (SP), Brasil*

E-mail: *zaninele@unicamp.br*

Resumo: A espectrometria de massas tem revolucionado a rotina de identificação de microrganismos, desde sua implementação no Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas-UNICAMP. Beneficiam-se desta metodologia a Coleção de Fungos Patogênicos do Laboratório de Investigação em Fungos (LIF) assim como projetos de pesquisa desenvolvidos neste laboratório da Faculdade de Ciências Médicas – FCM e de outras unidades da UNICAMP.

Palavras-chave: espectrometria de massas; sensibilidade a antifúngicos; rotina diagnóstica

A espectrometria de massas tem revolucionado nossa identificação de microrganismos envolvidos em processos infecciosos, desde que o equipamento foi alocado no Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, em novembro de 2018.

Beneficiam-se desta metodologia, a Coleção de Fungos Patogênicos do Laboratório de Investigação em Fungos (LIF) do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas – FCM – UNICAMP (Giordano *et al.,* 2023; Legabão *et al.*, 2025), projetos de pesquisa desenvolvidos nesta e em outras faculdades da UNICAMP (Heckler *et al.,* 2024) e, principalmente, a rotina assistencial diagnóstica, na forma de exames realizados para toda a área de Saúde da UNICAMP e seus conveniados, onde são identificados cerca de 1500 microrganismos, isolados a partir de cerca de 10 a 12 mil exames mensais.

O LIF, ao longo de mais de 20 anos de trabalho junto à rotina diagnóstica do Hospital, construiu um acervo aproximado de 18.000 isolados de fungos filamentosos e leveduras, de interesse para saúde e farmacologia que, desde 2018, passaram a ser identificados por espectrometria de massas, combinada a métodos clássicos e moleculares, quando necessário.

Importante projeto em andamento, com financiamento Fapesp (chamada "Descoberta e Coleções"), tem como objetivos catalogar, organizar e autenticar os fungos de maior

interesse epidemiológico, científico e de desenvolvimento de novos fármacos depositados no acervo do LIF. Também busca estruturar um banco de espectros proteicos (Maldi-Tof) para identificação rápida de táxons pouco representados nos atuais bancos disponíveis e, finalmente, propor uma estrutura piloto para a organização das Coleções de Microrganismos da UNICAMP, em uma rede integrada.

Buscando gerar e expandir o conhecimento sobre o potencial de aplicação dos acervos das coleções da Unicamp, a proposta é agregar valor aos acervos, expandir o número de autenticações e disponibilizar as informações atualizadas sobre a aplicação das linhagens através de um catálogo *online*. Dentre as informações, pretendemos incluir também os espectros de cada linhagem. Acredita-se que a ampliação dos registros das coleções aumentará sua visibilidade, resultando em novas parcerias com instituições de pesquisa e empresas no Brasil e no exterior.

No entanto, a espectrometria de massas, não tem sido empregada apenas para identificação de isolados, uma de nossas linhas de pesquisa é utilizar a espectrometria para avaliação de sensibilidade de fungos frente aos antifúngicos, buscando a validação junto às metodologias padrão (CLSI e EUCAST) (Giordano *et al.*, 2023; Legabão *et al.*, 2025) e mais recentemente também, investindo na redução do tempo de teste, ainda mais relevante quando se trata de fungos filamentosos, causando infecções em pacientes imunocomprometidos.

As atividades da rotina diagnóstica, positivamente impactadas pela metodologia em termos de redução do tempo para identificação de patógenos como bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos, também têm sido acrescidas de identificação de micobactérias (tuberculosis e não tuberculosis) e *Bartonella* spp, mesmo sendo o nosso equipamento uma das primeiras versões e atualmente, sem acesso às atualizações de bibliotecas.

Como laboratório que atende Pronto-Socorro e UTIs, o Maldi-Tof tem possibilitado a identificação de microrganismos diretamente de material retirado de frascos de hemoculturas positivas e de sedimento de líquido cefalorraquidiano, adiantando a determinação do agente causal de quadros sépticos e meningite, respectivamente.

Apenas para exemplificar, o quanto a metodologia tem sido extremamente eficiente, podemos citar um caso muito emblemático, ocorrido em maio de 2023. Nosso primeiro e, ainda único, caso de Infecção em recém-nascido, pela temida *Candida auris*, foi identificado rapidamente a partir do crescimento do agente em ágar MacConkey (meio seletivo para bactérias Gram negativas), seguido de identificação realizada diretamente a partir de hemoculturas positivas. Fatores considerados determinantes para o desfecho positivo do caso (Schreiber *et al.*, 2025).

Estamos em processo de atualização de *hardware* e *softwares* de nosso equipamento, com vistas a uma oportunidade de ter acesso a um equipamento mais moderno e explorar ainda mais a metodologia.

Referências

Giordano A.L.P.L.; Pontes L.; Beraquet, C.A.G.; Lyra, L.; Schreiber, A.Z. Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry azole susceptibility

assessment in *Candida* and *Aspergillus* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2023, *13*, 118, e220213.

Heckler, C.; Vale, M.G.; Canales, H.D.S.; Stradiotto, G.C.; Giordano, A.L.P.L.; Schreiber, A.Z.; Sant'Ana, A.S. Spore-forming bacteria in gelatin: Characterization, identification by 16S rRNA and MALDI-TOF mass spectrometry (MS), and presence of heat resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology* 2024, 422, 110813.

Legabão, B.C.; Xavier, J.G.; Giordano, A.L.P.L.; dos Santos, K.A.; Schreiber, A.Z. Evaluation of antifungal susceptibility in *Candida* spp. through EUCAST, CLSI, and MALDI- TOF approaches. *In* 22º International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) Congress. Foz do Iguaçu, Brasil, 20-24 de maio de 2025; Resumo P595.

Schreiber, A.Z.; Giordano, A.L.P.L.; Legabão, B.C.; Pontes, L.; Luz, E.A.; Moreno, G.; Guedes, G.; Pacífico, S.; de Andrade, T.; do Valle, C.R.; Caldas, J. Successful management of *Candida auris* infection in a neonate: Importance of surveillance and antifungal testing. *In* 22º International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) Congress. Foz do Iguaçu, Brasil, 20-24 de maio de 2025, Resumo P428

Microrganismos e a fermentação dos vinhos PL13

Angelica Bender

EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Campo Experimental de Caldas, Santa Cruz, Caldas (MG), Brasil

E-mail*: angelica.bender@epamig.br*

1. Introdução

O vinho é produto de um ecossistema microbiano complexo e compreender quais microrganismos estão envolvidos e como eles interagem é essencial para a qualidade do produto. A levedura S. *cerevisiae* tem sido, há muito tempo, o principal microrganismo presente nas fermentações de vinhos devido à alta capacidade fermentativa e ao impacto previsível no vinho. No entanto, leveduras não-*Saccharomyces* têm cada vez mais ganhado espaço nas vinificações com o intuito de explorar seu potencial na criação de perfis de sabor mais sutis, vinhos com menor graduação alcoólica e redução na dependência de intervenções químicas.

2. Leveduras não-*Saccharomyces* como agentes bioprotetores

A bioproteção na vinificação envolve principalmente leveduras não-*Saccharomyces* para inibir a ação de microrganismos deteriorantes e melhorar a qualidade geral do vinho, reduzindo a dependência do dióxido de enxofre (SO_2) como conservante. A técnica de bioproteção consiste na inoculação de leveduras não-*Saccharomyces* que possuem capacidade de colonizar rapidamente o mosto de uva e afetar o crescimento dos microrganismos indesejados, devido à restrição de nutrientes. As espécies mais estudadas são leveduras *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Lachancea thermotolerans. M. pulcherrima* apresenta uma capacidade ativa de bioproteção devido à síntese de um agente antifúngico e antimicrobiano comprovado; T. *delbrueckii* pode produzir proteínas killer que controlam a população de bactérias deteriorantes; e L. *thermotolerans* possui alta capacidade antioxidante que pode dominar a fermentação mesmo diante de altas concentrações de oxigênio no mosto.

3. Bactérias como moduladores dos vinhos

As bactérias, em especial as láticas, desempenham um papel crucial na elaboração de vinhos, especialmente nos tintos, pois modulam naturalmente a acidez e aumentam a estabilidade microbiana convertendo o ácido málico, mais agressivo e forte, em ácido lático, mais suave e menos agressivo. Estas bactérias apresentam, ainda, propriedades de degradar

outras substâncias orgânicas, auxiliando na biodegradação de resíduos da vinícola e reduzindo o impacto ambiental dos efluentes da vinificação.

4. Conclusões e Impacto Social

A valorização de leveduras não-*Saccharomyces* e de bactérias láticas amplia as possibilidades tecnológicas, permitindo não apenas a diversificação sensorial dos vinhos, mas também a redução de insumos químicos e impactos ambientais. Conhecer as interações microbianas e sua aplicação prática na enologia moderna configura-se como um caminho essencial para a inovação e a sustentabilidade na cadeia vitivinícola.

30 Anos da Micoteca da Universidade do Minho (MUM): Trajetória, Serviços e Projetos

PL14

Nelson Lima

Micoteca da Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal
LABBELS (Laboratório Associado, Braga/Guimarães), Universidade do Minho, Braga, Portugal

E-mail*: nelson@ie.uminho.pt*

Resumo: A Micoteca da Universidade do Minho (MUM), fundada em 1996 no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Braga, Portugal), constitui uma infraestrutura científica de referência dedicada à preservação, caracterização e disponibilização de recursos de biodiversidade fúngica. Ao longo de três décadas, a MUM tem consolidado o seu papel no suporte à investigação científica, à inovação biotecnológica e à cooperação internacional, afirmando-se como um centro estratégico na área da microbiologia para o desenvolvimento da bioeconomia.

Palavras-chave: biodiversidade; bioeconomia; centro de recursos biológicos; preservação; satisfação do cliente

1. Introdução

A criação da MUM (www.micoteca.deb.uminho.pt) foi proposta há 30 anos, tendo sido estabelecida como um projeto transversal do Reitor da Universidade do Minho (Santos e Lima, 2001). Desde a sua origem, encontra-se sediada no Centro de Engenharia Biológica, com a missão de "ser um centro de recursos para a preservação da biodiversidade fúngica e para a disponibilização de informação, criando soluções para o desenvolvimento sustentável e o bem-estar humano" e cuja visão é "um mundo em que a diversidade fúngica é preservada e está disponível para todos".

Desde 2023, a MUM assume diretamente o estatuto de projeto institucional transversal, dependente da Reitoria, reforçando a sua relevância estratégica no contexto da Universidade do Minho.

Atualmente, a logomarca da MUM (Figura 1), para além de comemorar os seus 30 anos, pretende que a ciência conecte a sociedade e todas as partes interessadas para o desenvolvimento de uma sociedade baseada no conhecimento. A logomarca ainda reforça o símbolo do infinito, ou seja, a perpetuação da diversidade que preserva, mas também o nó, a interligação, a cooperação, a partilha e a união.

Figura 1 – Logomarca atual da MUM.

2. Áreas de especialização científica e tecnológica

A MUM destaca-se pela sua elevada especialização na identificação e caracterização de fungos filamentosos, na micologia alimentar (incluindo a análise de micotoxinas), no estudo de biofilmes fúngicos em sistemas aquáticos, na biodegradação e biorremediação, bem como na micologia clínica. Com base em tecnologias avançadas, a MUM expandiu a sua atuação para outras áreas da microbiologia, disponibilizando serviços de investigação, identificação, caracterização e preservação de microrganismos, apoiando tanto a academia como os setores de serviços e industriais. A sustentabilidade e a inovação são dois pilares essenciais na atuação diária da MUM (Lima, 2025).

3. Redes internacionais e reconhecimento institucional

A MUM integra importantes redes e organizações internacionais, sendo membro da *World Federation of Culture Collections* (WFCC) e da *European Culture Collections Organisation* (ECCO). Está registada no *World Data Center of Microorganisms* sob o número WDCM816.

Adicionalmente, já teve a Presidência da ECCO durante 6 anos e, atualmente, tem a presidência da WFCC. Coordena o nó português da infraestrutura europeia *Microbial Resource Research Infrastructure* (MIRRI-PT), participando ativamente no consórcio MIRRI-ERIC, cuja sede estatutária foi estabelecida em Portugal (Universidade do Minho) com o contributo direto da MUM. Como coordenadora da infraestrutura de Investigação MIRRI-PT, a MUM é membro do recém-criado Conselho Coordenador do Roteiro Nacional de Infraestruturas de Investigação de Interesse Estratégico (CC-RNIE), tendo sido eleita Coordenadora-Adjunta da sua Comissão Executiva.

O reconhecimento da sua capacidade científica e técnica culminou, em 2025, com a atribuição do estatuto de Autoridade Internacional de Depósito no âmbito do Tratado de Budapeste, pela OMPI.

A MUM assumiu a liderança e a responsabilidade de estabelecer o nó português do Sistema Global de Informação sobre Biodiversidade (GBIF), sendo, atualmente e de novo, como representante da WFCC, Chefe de Delegação desta organização.

Finalmente, integra a Rede Lusófona de Biobancos e Coleções Biológicas onde se procura partilhar experiência na área do estabelecimento de coleções biológicas e na implementação de Biobancos ou Centros de Recursos Biológicos (CRB) nos países lusófonos (Arez *et al.*, 2024).

4. Participação em projetos científicos nacionais e internacionais

A participação em projetos de investigação constitui um dos pilares fundamentais da atividade da MUM. Ao nível europeu, destaca-se o envolvimento em projetos estruturantes como o EMbaRC, que promoveu a harmonização de coleções microbianas, e o MIRRI, que estabeleceu as bases da infraestrutura europeia de recursos microbianos.

A MUM participou ainda no RItrain, focado na capacitação de gestores de infraestruturas científicas, e no IS_MIRRI21, orientado para a implementação operacional do MIRRI-ERIC.

Atualmente, integra projetos europeus de grande relevância, como o CanSERV, o iSIDORE, o Microbes-4-Climate e o MALDIBANK, que reforçam o seu papel em áreas emergentes como saúde, alterações climáticas e identificação microbiana avançada.

No contexto internacional, a MUM participa em iniciativas no Brasil (Attili-Angelis *et al.*, 2022), como o INCT CERBC, e em projetos de cooperação científica para prospeção de espécies com interesse biotecnológico e relevância em doenças endémicas, reforçando a sua dimensão global.

5. Infraestrutura, recursos e capacidade técnica

A MUM dispõe de infraestruturas laboratoriais avançadas no Campus de Gualtar (Braga), incluindo laboratórios de micologia, biologia molecular e análise química. Está equipada com tecnologias de ponta, como plataformas de sequenciação (Illumina MiSeqDX, Sanger e Nanopore), sistemas de identificação microbiana (MALDI-TOF MS) e cromatografia líquida (uPLC MS/MS) para estudo de metabólitos. A classificação de novas espécies, bem como a identificação microbiana na MUM segue a abordagem polifásica, razão pela qual a integração de várias técnicas é crítica (Simões *et al.*, 2013).

A coleção inclui cerca de 1500 estirpes em catálogo, com predominância de fungos filamentosos, apresentando uma taxa de crescimento anual de 5%. A preservação é assegurada por métodos como liofilização e criopreservação a baixas temperaturas, garantindo a estabilidade e qualidade dos recursos biológicos.

A MUM mantém um sistema de gestão da qualidade certificado segundo a norma ISO 9001 desde 2011, em que procura satisfazer e superar, se possível, a satisfação dos seus clientes, sendo auditada anualmente por entidades independentes (Simões *et al.*, 2016). O seu financiamento provém maioritariamente da Universidade do Minho, sendo complementado por fundos públicos de investigação, projetos competitivos e prestação de serviços especializados.

A atividade da MUM inclui ainda formação avançada (Antunes *et al.*, 2016), consultoria científica e prestação de serviços técnicos, contribuindo para a transferência de conhecimento e valorização económica da investigação.

6. Conclusões e Impacto Social

A MUM tem desempenhado um papel relevante na formação de investigadores e estudantes de pós-graduação provenientes de diversos países, bem como na organização de cursos avançados e congressos científicos internacionais (a título de exemplo, Braga

ECCO2003, Braga ECCO2012 e Braga ICCC15 em 2023 e, finalmente, no comité local do programa científico do próximo IUMS2026 em Lisboa de 4 a 6 de novembro).

Destaca-se também pela sua produção científica, incluindo artigos, capítulos de livros e publicações próprias, contribuindo para o avanço do conhecimento na área da micologia e microbiologia em interligação com outras áreas de interfase, como, por exemplo, a alimentar e agrícola (Cruz e Lima, 2021).

Ao longo de 30 anos, a MUM evoluiu de uma coleção de culturas para um centro de recursos biológicos como uma infraestrutura científica de excelência, com forte integração em redes internacionais e participação ativa em projetos de investigação de elevada relevância. A sua atuação contribui significativamente para a preservação da biodiversidade microbiana, para o avanço científico e para o desenvolvimento sustentável, posicionando-a como um ator central no panorama da microbiologia a nível global.

Agradecimentos

O autor agradece ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto UID/04469/2025; Doi: https://doi.org/10.54499/UID/04469/2025; ao LABBELS – Laboratório Associado de Biotecnologia, Bioengenharia e Sistemas Microelectromecânicos (LA/P/0029/2020); e, ainda, o apoio do programa de investigação e inovação Horizon Europe da União Europeia, ao abrigo do acordo de subvenção n.º 101188201 (MALDIBANK) e de subvenção n.º 101188201 (Microbes-4-Climate).

Referências

Antunes, A.; Stackebrandt, E.; Lima, N. Fueling the bio-economy: European culture collections and microbiology education and training. Trends in Microbiology 2016, 24, 77-79.

Arez, A.P.; Souto, A.; da Silva, M.; do Nascimento, C.R.S.; Couto, I.; Belo, S.; Lima, N. Biobanking for tropical health: leveraging collaborative initiatives in the Lusophone world. Frontiers in Tropical Diseases 2024, 5:1438842.

Attili-Angelis, D.; Taniwaki, M.H.; Silva, N. da; Oliveira, V.M.; Lima, N. Microbial ex situ preservation supporting science and bioeconomy in Brazil. Biota Neotropica 2022, 22, e20221438.

Cruz, R.M.; Lima, N. Contribuições dos recursos microbianos para uma agricultura e alimentação sustentável. *In* Anais do 4. Seminário Internacional sobre Ciências Agrárias e Ambientais: em busca da Sustentabilidade; Carbonera, R., Libardoni, F., Fernandes, S.B.V., Orgs.; Ed. Unijuí: Ijuí, Brasil, 2021; pp. 11-33.

Lima, N. Preserving and utilizing microbial diversity for innovation and sustainability. Microbiology 2025, 171, 001544.

Santos, I.M.; Lima, N. Criteria followed in the establishment of a filamentous fungal culture collection – Micoteca da Universidade do Minho (MUM). World Journal of Microbiology and Biotechnology 2001, 17, 215–220.

Simões, M.F.; Dias, N.; Santos, C.; Lima, N. Establishment of a quality management system based on ISO 9001 standard in a public service fungal culture collection. Microorganisms 2016, 22, 4, 21.

Simões, M.F.; Pereira, L.; Santos, C.; Lima, N. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: Concepts and applications. *In* Management of Microbial Resources in the Environment; Malik, A., Grohmann, E., Alves, M., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2013; pp. 91–118.

Os desafios (bio) tecnológicos para a utilização da biodiversidade PL15

José A Teixeira

Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal

E-mail*: jateixeira@deb.uminho.pt*

Resumo: A biodiversidade tem, sem dúvida, um papel fundamental no desenvolvimento da biotecnologia, através da sua aplicação em diferentes setores que vão desde a indústria alimentar até à indústria farmacêutica, contribuindo não só para o melhoramento de produtos/processos convencionais, mas também para o desenvolvimento de produtos/processos inovadores.

O setor alimentar é um dos setores onde o conhecimento e o controlo da biodiversidade têm um maior impacto, mas não há dúvida de que, no desenvolvimento de um qualquer processo biotecnológico, a utilização/seleção da cultura microbiana adequada desempenha um papel fundamental na sua implementação. A cultura microbiana deve contribuir para que os processos biotecnológicos sejam cada vez mais eficientes e que sejam capazes de responder aos desafios da sua intensificação de modo a garantir a sua efetiva implementação.

Palavras-chave: aplicações industriais; biodiversidade; bioprospecção; fermentação

1. Introdução

A importância da biodiversidade para a sobrevivência humana é amplamente reconhecida, contribuindo decisivamente para diferentes setores como segurança alimentar, farmacêutica e saúde, ambiente, qualidade da água e do ar e indústria. A biodiversidade está fortemente associada à sustentabilidade, economia circular, processos limpos, sendo a aplicação e desenvolvimento de processos biotecnológicos uma componente-chave na resposta aos desafios da sua utilização.

Todavia, a implementação destes processos e o aproveitamento de todo o potencial de utilização da biodiversidade exigem que seja avaliado o seu impacto social, ambiental e económico. Embora sejam evidentes o desenvolvimento da biotecnologia e o seu crescente impacto em diferentes setores de aplicação como consequência do conhecimento cada vez mais aprofundado da biodiversidade e do seu potencial de aplicação (reforçado pelos avanços em técnicas moleculares), é fundamental que os processos biotecnológicos sejam

cada vez mais eficientes e que sejam capazes de responder aos desafios da sua intensificação de modo a garantir a sua efetiva implementação.

2. Os desafios na implementação dos processos biotecnológicos

Um processo biotecnológico envolve três componentes principais – seleção/identificação e propagação da cultura a utilizar, produção em biorreator/fermentador e recuperação/purificação do produto, sendo evidente que a definição da melhor solução para o desenvolvimento de qualquer processo/produto exige uma avaliação integrada e complementar destas três componentes.

O desenvolvimento dos reatores biológicos deve ter em conta as variadíssimas culturas de microrganismos e de células de organismos superiores, apresentando uma enorme diversidade de características nutricionais, fisiológicas, metabólicas e morfológicas, que necessitam de ser controladas e integradas no ambiente do reator de modo a que a sua produtividade seja maximizada.

Também a seleção dos processos de recuperação/purificação a utilizar deve ter em conta as características da cultura utilizada bem como o seu modo de produção para garantir que sejam utilizadas as soluções mais eficientes em resposta às propriedades pretendidas para o produto final.

Quer na vertente de produção em biorreator quer na vertente de concentração/recuperação do produto final existem diversos desafios tecnológicos associados à intensificação dos processos que devem ser respondidos para aumentar a sua produtividade. Serão identificados os principais desafios que se colocam ao desenvolvimento destes processos e apresentadas estratégias que têm sido desenvolvidas para a sua intensificação desde a seleção de culturas microbianas mais eficientes até à utilização de sistemas que permitem aumentar a eficiência dos biorreatores e dos processos de separação, incluindo o desenvolvimento de biorreatores a operar em continuo.

De salientar que estes desafios se colocam quer em processos biotecnológicos tradicionais quer no desenvolvimento de novos processos/produtos.

3. Conclusões

A utilização da biodiversidade nos diferentes setores da biotecnologia exige uma profunda integração entre o conhecimento aprofundado da atividade microbiana e as diferentes componentes do processo tecnológico, pois só deste modo será possível ter processos otimizados que garantam uma resposta adequada aos desafios econômicos, ambientais e sociais que se colocam às nossas sociedades. O desenvolvimento da biotecnologia deve ser suportado, de uma maneira integrada, por um maior conhecimento da bioversidade e pelo desenvolvimento de tecnologias que contribuam para uma intensificação dos processos.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do Financiamento Estratégico da unidade UIDB/04469/2020 e do LABBELS – Laboratório Associado de Biotecnologia, Bioengenharia e Microelectromecânica, LA/P/0029/2020.

Fungos em queijos artesanais de casca florida natural: evidências científicas para a regulamentação em Minas Gerais

PL16

Fabiana Couto[1]*, Caio Marcelão[2], Mariana Souza[2], Jackie de Souza[1], Marta Taniwaki[2]

[1]*Instituto Federal de Minas Gerais, Campus Bambuí, IFMG, Bambuí (MG), Brasil*
[2]*Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, Campinas (SP), Brasil*

*E-mail: *fabiana.couto@ifmg.edu.br*

Resumo: A produção de queijos artesanais com casca florida natural vem crescendo em Minas Gerais, destacando-se por sua relevância cultural, econômica e gastronômica. Entretanto, o desenvolvimento de fungos na superfície desses queijos pode envolver espécies desejáveis, mas também isolados potencialmente toxigênicos. Estudos científicos são essenciais para compreender essa microbiota e subsidiar normas sanitárias e regulatórias aplicáveis a esse produto.

Palavras-chave: *Aspergillus* seção *Circumdati*; maturação; normatização; ocratoxina A

1. Introdução

A produção de queijos artesanais no Brasil possui expressiva relevância cultural, social, econômica e alimentar, com destaque para Minas Gerais, onde o Queijo Minas Artesanal representa não apenas um patrimônio gastronômico, mas também uma importante atividade produtiva vinculada aos territórios, aos modos de fazer tradicionais e à permanência de famílias no meio rural. No ano de 2024, a UNESCO reconheceu o modo de fazer o Queijo Minas Artesanal como sendo Patrimônio Cultural Imaterial da Humanidade, tornando um produto símbolo do estado de Minas Gerais. Nos últimos anos, a diversificação dessas tipologias queijeiras ampliou o interesse por produtos maturados com desenvolvimento superficial de fungos, entre eles o Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural, caracterizado pela formação espontânea de uma cobertura branca durante a maturação, predominantemente associada a *Geotrichum candidum*. Essa tipologia passou a ganhar visibilidade não apenas pelo apelo sensorial e mercadológico, mas também por representar uma expressão específica da interação entre leite cru, pingo, ambiente de maturação e microbiota de superfície. No entanto, a valorização desse produto exigiu o avanço simultâneo do conhecimento científico e do reconhecimento regulatório, uma vez que, por muito tempo, produtores que elaboravam queijos com casca florida natural atuaram sem uma categoria normativa própria que conferisse identidade, critérios técnicos e respaldo sanitário específicos a essa variedade.

Do ponto de vista tecnológico, é fundamental distinguir o Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural do queijo de casca lavada. No primeiro, a superfície é colonizada naturalmente por fungos brancos ao longo da maturação, sem escovação da casca, sob condições controladas de temperatura e umidade, formando uma cobertura esbranquiçada e contínua que participa ativamente da definição de textura, aroma e aparência do produto. Segundo a Portaria nº 2307 (IMA, 2024), essa variedade de queijo é elaborada com leite cru, cultura láctica natural, sem aditivos ou coadjuvantes, apresentando fungos brancos em toda a superfície, predominantemente *Geotrichum candidum*, além de ser vedada a escovação durante o processo de maturação. Já a casca lavada corresponde a outra lógica tecnológica de manejo da superfície, não baseada nessa formação natural da cobertura branca típica da casca florida. Essa distinção é importante porque mostra que não se trata apenas de uma diferença estética, mas de identidades microbiológicas, tecnológicas e regulatórias distintas.

Embora essa tipologia tenha se expandido em Minas Gerais, sua consolidação esbarrou, por muito tempo, em lacunas técnico-científicas e normativas. O Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural foi apenas recentemente formalizado no arcabouço regulatório mineiro, apesar de sua relevância crescente e da existência prévia de práticas produtivas informais em propriedades rurais. Esse movimento de transição, da produção sem enquadramento específico para um sistema regulado, foi impulsionado pela necessidade de definir identidade, padronizar requisitos mínimos de maturação e estabelecer parâmetros de inocuidade compatíveis com a realidade dos queijos de casca florida natural.

Com o crescente destaque do Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural em concursos internacionais, essa tipologia passou a agregar elevado valor econômico e simbólico, ampliando sua visibilidade no mercado e contribuindo para aumentar a renda dos produtores. Nesse contexto de prestígio e valorização comercial, a identificação correta das espécies fúngicas tornou-se essencial, não apenas do ponto de vista científico e sanitário, mas também para garantir credibilidade aos resultados e favorecer sua aceitação pela comunidade produtora, diretamente envolvida na construção e no reconhecimento desse produto. Portanto, o objetivo deste trabalho foi utilizar a abordagem taxonômica polifásica para identificar com precisão os fungos filamentosos associados ao Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural, gerando evidências científicas robustas para subsidiar a avaliação de espécies desejáveis e potencialmente toxigênicas, fortalecer a credibilidade dos resultados junto à comunidade produtora e contribuir para o processo de regulamentação desse produto em Minas Gerais.

2. Materiais e Métodos

Foram analisadas 130 amostras de queijos artesanais com casca mofada, em diferentes períodos de maturação, coletadas em propriedades produtoras e mercados dos estados de Minas Gerais e São Paulo. Além das amostras de queijo, também foram analisadas amostras de ar e raspados de prateleiras das salas de maturação. Para o isolamento, foram preparadas diluições seriadas e inoculadas nos meios de cultivo, ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) e ágar Dicloran Glicerol 18% (DG18), com incubação por 7 dias a 25 °C. As culturas puras foram transferidas para placas de Petri contendo ágar extrato de levedura Czapek (CYA) e ágar extrato de Malte (MEA), também incubadas a 25 °C por 7 dias, sendo então realizada a identificação das espécies com o uso de manuais específicos. Para a

caracterização molecular, foram utilizados dados de sequências nucleotídicas de porções do gene da calmodulina. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas já depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology and Information (NCBI), utilizando a ferramenta BLAST. Adicionalmente, foi avaliada a capacidade de produção de ocratoxina A pelos isolados de *Aspergillus* seção *Circumdati* em meio Agar Extrato de Levedura e Sacarose (YESA), com posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A presença de ocratoxina A nas amostras de queijo também foi determinada por HPLC após extração e purificação em coluna de imunoafinidade.

3. Resultados e Discussão

Os resultados evidenciaram que os queijos artesanais avaliados apresentaram condições favoráveis ao crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* seção *Circumdati*, especialmente ao longo do aumento do tempo de maturação, uma vez que a atividade de água diminuiu progressivamente nesse período, criando ambiente propício ao desenvolvimento de espécies xerofílicas e potencialmente ocratoxigênicas. Entre os isolados identificados por biologia molecular, *Aspergillus westerdijkiae* foi a espécie predominante (67%), seguida por *A. ostianus* (22%) e *A. steynii* (11%). Todos os isolados testados foram capazes de produzir ocratoxina A (OTA), confirmando o potencial toxigênico desses fungos nos queijos analisados. A OTA foi detectada em 22% das 130 amostras analisadas, com concentrações variando de 1,0 µg/kg a valores superiores a 1000 µg/kg, sendo os maiores níveis observados principalmente na casca dos queijos e em produtos submetidos a maturações mais prolongadas. Esses dados reforça a importância da casca como principal sítio de colonização fúngica e acúmulo da micotoxina, embora em alguns casos também tenha sido observada migração para a porção interna do queijo. De modo geral, amostras provenientes de ambientes de maturação com condições precárias de higiene, presença visível de fungos em prateleiras e paredes, além de "ambiente caverna" ou câmaras com controle insuficiente de temperatura e umidade, apresentaram maior frequência de contaminação. Observou-se ainda que produtores com melhores práticas de higiene, ambientes mais novos ou com limpeza adequada e maturação mais curta apresentaram ausência ou menores níveis de OTA, enquanto ambientes com queijos muito maturados, presença de fungos coloridos e superfícies porosas favoreceram a persistência de *Aspergillus* seção *Circumdati*. Esses resultados indicam que o tempo de maturação, a qualidade sanitária do ambiente e o manejo das câmaras de cura são fatores críticos para a segurança do queijo artesanal. Assim, o estudo destaca a necessidade de monitoramento microbiológico contínuo e adoção de boas práticas de fabricação e maturação, a fim de reduzir o risco de contaminação por fungos ocratoxigênicos e pela OTA ao longo da cadeia produtiva (Marcelão *et al*., 2024).

A predominância de *Aspergillus westerdijkiae* entre os isolados obtidos e sua associação com a produção de OTA em queijos artesanais podem ser discutidas a partir de estudos prévios que demonstram a adaptação dessa espécie a matrizes animais salgadas e proteicas. Vipotnik *et al*. (2017) observaram que *A. westerdijkiae* apresenta ampla capacidade de crescimento e elevada produção de OTA em meio à base de presunto curado, especialmente em faixas de atividade de água compatíveis com produtos maturados. Além disso, Anelli *et al*. (2019) relataram a ocorrência de *A. westerdijkiae* e *A. steynii* produtores de OTA em queijos de caverna italianos, reforçando que fungos da seção *Circumdati* encontram em

ambientes de maturação condições favoráveis para colonização e produção de ocratoxina. Assim, os resultados observados corroboram a ideia de que a maturação prolongada, aliada à redução da atividade de água, favorece a seleção de fungos xerofílicos potencialmente ocratoxigênicos, com destaque para *A. westerdijkiae*.

4. Conclusões e Impacto Social

Os resultados demonstraram que queijos artesanais de casca florida natural podem abrigar fungos filamentosos com potencial ocratoxigênico, especialmente em condições de maturação prolongada e em ambientes com controle higiênico-sanitário insuficiente. A predominância de espécies da seção *Circumdati*, associada à detecção de OTA em parte das amostras analisadas, evidencia a necessidade de monitoramento microbiológico e de adoção de boas práticas de fabricação e de maturação. Além de contribuir para a compreensão da ecologia fúngica desses queijos, o estudo gerou informações técnico-científicas essenciais para subsidiar o processo de regulamentação do Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural, redigida pelo Instituto Mineiro de Agropecuária de Minas Gerais (IMA), fortalecendo a construção de critérios sanitários compatíveis com a identidade e a segurança desse produto tradicional.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2022/10378-0, 2017/50349-0, 2021/07937-4 e 2022/06905-4, pelo financiamento desta pesquisa; à CAPES (Código de Financiamento 001) e ao CNPq, processo 304036/2022-6, pelas bolsas concedidas a C.V.P.M. e M.H.T.

Referências

Anelli, P.; Haidukowski, M.; Epifani, F.; Cimmarusti, M.T.; Moretti, A.; Logrieco, A.; Susca, A. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. *Food Microbiology* 2019, 78, 62–72.

IMA-Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 2307, de 12 de junho de 2024. Estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Artesanal de Casca Florida Natural. Governo do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2024.

Marcelão, C.V.P.; Souza, M.C.; Silva, J.J.; Couto, F.A.; Lacorte, G.A.; Pinto, U.M.; Maffei, J.T.; Zacarchenco, P.B.; Iamanaka, B.T.; Taniwaki, M.H. Unveiling ochratoxin A and ochratoxigenic fungi in Brazilian artisanal cheeses: Insights from production to consumption. *Food Research International* 2024, 183, 1-7.

Vipotnik, Z.; Rodríguez, A.; Rodrigues, P. *Aspergillus westerdijkiae* as a major ochratoxin A risk in dry-cured ham based-media. *Food Microbiology* 2017, 241, 244–251.

Aplicação do MALDI-TOF MS na identificação de leveduras com potencial biotecnológico

PL17

Disney Ribeiro Dias

Departamento de Ciência de Alimentos, Laboratório Multiusuário de Microbiologia de Fermentações, Universidade Federal de Lavras, 37200-900 Lavras (MG), Brasil

E-mail*: diasdr@ufla.br*

Resumo: A prospecção e identificação de leveduras produtoras de metabólitos de interesse agroindustrial são estratégicas para a bioeconomia. Esses microrganismos convertem resíduos em produtos de alto valor agregado. O MALDI-TOF MS permite identificação rápida e confiável, acelerando a triagem de linhagens promissoras e o desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis, fortalecendo a inovação na agroindústria.

Palavras-chave: bioprocessos sustentáveis; metabólitos microbianos; single cell oil (SCO); single cell protein (SCP); valorização de subprodutos agroindustriais

1. Introdução

A crescente demanda por processos produtivos sustentáveis e pela valorização de resíduos agroindustriais tem impulsionado o desenvolvimento de plataformas biotecnológicas baseadas em microrganismos capazes de converter substratos de baixo custo em compostos de alto valor agregado. Nesse contexto, leveduras destacam-se como sistemas celulares versáteis, com elevada plasticidade metabólica, robustez fisiológica e capacidade de síntese de metabólitos de interesse agroindustrial, como lipídios microbianos (Single Cell Oil – SCO), proteínas unicelulares (Single Cell Protein – SCP), ácidos graxos, aminoácidos, polióis e compostos aromáticos.

A seleção eficiente desses microrganismos depende de estratégias rápidas e confiáveis de identificação e caracterização. A espectrometria de massas por MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) tem-se consolidado como ferramenta de alto desempenho para identificação microbiana, permitindo análises rápidas, reprodutíveis e com elevada capacidade de processamento amostral. O MALDI-TOF MS baseia-se na ionização de proteínas ribossomais e na geração de perfis espectrais característicos, que funcionam como "impressões digitais" proteômicas das espécies analisadas. Sua aplicação em estudos de diversidade microbiana e triagem de leveduras com potencial biotecnológico representa avanço significativo na aceleração da pesquisa e no desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis.

Leveduras oleaginosas e produtoras de metabólitos secundários desempenham papel estratégico na transição para uma bioeconomia circular. Espécies dos gêneros *Yarrowia*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Lipomyces* e *Candida* apresentam elevada capacidade de acumular lipídios intracelulares, podendo atingir teores superiores a 20–60% da biomassa seca, dependendo das condições de cultivo. A produção de SCO tem sido explorada para aplicações na indústria de alimentos, nutrição animal, cosméticos e biocombustíveis. De forma complementar, a produção de SCP surge como alternativa sustentável às fontes proteicas convencionais. Aminoácidos, polióis (como eritritol e xilitol) e compostos aromáticos também ampliam o portfólio de produtos obtidos por via microbiana. Entretanto, a exploração da biodiversidade microbiana exige metodologias rápidas para identificação taxonômica e triagem de linhagens promissoras. Métodos clássicos baseados em características fenotípicas e sequenciamento molecular, embora robustos, podem ser onerosos e demorados quando aplicados a grandes coleções microbianas.

2. Culturas Iniciadoras Tradicionais e Aplicações Globais

O fluxo metodológico integra três etapas principais:

2.1. Prospecção e isolamento

Coleta de amostras ambientais e agroindustriais;
Isolamento seletivo de leveduras em meios específicos;
Purificação e preservação das linhagens.

2.2. Identificação por MALDI-TOF MS

Preparação proteica das amostras;
Aquisição dos espectros de massas;
Comparação com bancos de dados comerciais e internos;
Análise estatística de similaridade espectral.

A aplicação do MALDI-TOF MS permite a rápida classificação taxonômica das linhagens isoladas, reduzindo o tempo de identificação quando comparado a métodos moleculares tradicionais.

2.3. Triagem metabólica

As linhagens identificadas são submetidas a ensaios de:

Produção de lipídios totais;
Perfil de ácidos graxos;
Teor proteico (SCP);
Produção de metabólitos específicos (aminoácidos, polióis e aromas);
Crescimento em substratos alternativos derivados de resíduos agroindustriais.

A integração entre identificação rápida e triagem metabólica permite selecionar cepas com maior potencial de aplicação industrial.

3. Integração entre Biodiversidade Microbiana e Inovação Industrial

Os resultados demonstram que a aplicação do MALDI-TOF MS acelera significativamente o processo de identificação de leveduras isoladas de diferentes matrizes agroindustriais. A

técnica mostrou elevada confiabilidade na diferenciação entre espécies próximas e permitiu a organização eficiente de coleções microbianas.

A integração entre dados espectrais e desempenho metabólico possibilitou:

Identificação rápida de leveduras oleaginosas;

Seleção de linhagens com perfil lipídico favorável;

Triagem de microrganismos capazes de converter resíduos agroindustriais em biomassa rica em proteínas e lipídios;

Otimização do direcionamento de estudos de bioprocessos.

A utilização de resíduos como substrato reforça o caráter sustentável da abordagem, alinhando-se aos princípios da economia circular e à redução de impactos ambientais.

4. Conclusões e Impacto Social

A aplicação da espectrometria de massas por MALDI-TOF MS na prospecção e identificação de leveduras com potencial biotecnológico demonstra-se estratégica para a aceleração da pesquisa científica e para a consolidação de plataformas microbianas voltadas à agroindústria. A técnica permite reduzir significativamente o tempo entre o isolamento de microrganismos e sua caracterização taxonômica, favorecendo a triagem direcionada de linhagens com elevado desempenho metabólico. Essa integração entre identificação rápida e avaliação funcional fortalece o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes, reprodutíveis e economicamente viáveis.

Do ponto de vista científico e tecnológico, o estudo contribui para a ampliação do conhecimento sobre biodiversidade microbiana com aplicação industrial, além de fomentar a estruturação de coleções microbianas estratégicas e bancos de dados espectrais. A abordagem proposta também impulsiona a formação de recursos humanos qualificados na interface entre microbiologia, biotecnologia e engenharia de bioprocessos. Os impactos sociais decorrem, principalmente, da valorização de resíduos e subprodutos agroindustriais como substratos para a produção de compostos de alto valor agregado, promovendo a economia circular e reduzindo passivos ambientais. A utilização de leveduras na produção de lipídios microbianos, proteínas unicelulares e outros metabólitos contribui para o desenvolvimento de alternativas sustentáveis nas cadeias de alimentos, nutrição animal e insumos industriais, com potencial de geração de renda e fortalecimento de cadeias produtivas regionais.

Além disso, a consolidação de tecnologias voltadas à bioeconomia pode ampliar a competitividade do setor agroindustrial brasileiro, promovendo inovação, sustentabilidade e desenvolvimento socioeconômico. Dessa forma, a aplicação do MALDI-TOF MS transcende o âmbito laboratorial, configurando-se como ferramenta estratégica para o avanço científico, tecnológico e social no contexto da agroindústria sustentável.

Agradecimentos

Agradecemos às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e FINEP pelo apoio financeiro e institucional. Agradecemos ao Laboratório Multiusuário de Microbiologia de Fermentação (LaMFe/UFLA) pelo suporte técnico e pela infraestrutura disponibilizada, bem

como à Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola (CCMA/UFLA) pela disponibilização das linhagens de micro-organismos para as pesquisas aqui citadas.

Referências

de Sousa Melo, D.; Linhares da Silva, L.; Martins, P.M.M; Buttrós, V.H.; Vilas Boas, E.V.B.; Dias, D.R.; Schwan, R.F. Taro (*Colocasia esculenta*) extract fermented by a probiotic co-culture as a wall material for microencapsulation of *Lactiplantibacillus plantarum* and functional food development. *Food Bioscience* 2025, 75, 108056.

Paula, M.S.B.; Fernandes, N.A.T.; Simoes, L.A.; Parente, M.L.; Schwan, R.F.; Dias, D.R. Sustainable sweeteners: unveiling the sustainability and biotechnological promise of novel yeast strains for low-calorie sweetener production. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2025, 61, 01x90.

Castro, A.T.; Souza, A.C.; Silva, C.F.; Martinez, S.J.G.; Schwan, R.F.; Dias, D.R. Biotechnological valorization of yeast strains for lipids and carotenoids production from renewable resources. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2025, 64, 103499.

Resende, I.F.; Martins, P.M.M.; de Souza Melo, D.; Magnani, M.; Dias, D.R.; Schwan, R.F. Development and characterization of microencapsulated *Pichia kluyveri* CCMA 0615 with probiotic properties and its application in fermented beverages. *International Journal of Food Microbiology* 2024, 427, 110967.

ID Microbiana

Comunicações Orais

Aplicação do MALDI TOF MS (AutoTOF) com pré-tratamento *FA Sandwich* na identificação de espécies de *Aspergillus* provenientes de amostras clínicas e ambientais CO1

Juliana Moura-Mendes[1,3]*, Alicia Santa Cruz[1,3], Melissa Escobar[1,2], Amiliana Pineda[2,3], Monserrat Aldama[2], José Pereira[2,3]

[1]*Universidad Nacional de Asunción; Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT-UNA). San Lorenzo, Paraguay*
[2]*Centro de Especialidades Dermatológicas, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Asunción, Paraguay*
[3]*Grupo de Investigación en Bioprospección de Productos Naturales – BioProsNat. CEMIT-UNA. Campus UNA, San Lorenzo, Paraguay*

E-mail: jmendes@rec.una.py*

Resumo: A identificação rápida e confiável de fungos filamentosos é essencial para o diagnóstico e vigilância clínica e ambiental. Avaliou-se o desempenho do MALDI-TOF MS da marca Autobio na identificação de *Aspergillus* provenientes de amostras clínicas e ambientais utilizando o método direto com ácido fórmico. Os resultados demonstram elevada acurácia para *A. flavus* e *A. fumigatus*, reforçando o potencial da técnica como ferramenta de rotina em micologia diagnóstica.

Palavras-chave: *Aspergillus*; identificação microbiana; MALDI-TOF MS; micologia clínica

1. Introdução

A identificação de fungos filamentosos continua sendo um desafio relevante na microbiologia clínica e ambiental devido à variabilidade morfológica, ao tempo de crescimento e à necessidade de especialistas treinados. Métodos tradicionais baseados em características macro- e micromorfológicas apresentam limitações importantes, especialmente entre espécies crípticas do gênero *Aspergillus* (Fernandez-Pittol *et al.*, 2022). Avanços tecnológicos têm impulsionado o uso de ferramentas rápidas e robustas, como MALDI-TOF MS e métodos moleculares, que vêm sendo amplamente explorados para superar essas limitações. Entre essas tecnologias, o MALDI-TOF MS destaca-se pela rapidez, baixo custo por teste e capacidade de gerar perfis proteicos altamente específicos, permitindo a identificação confiável de diversos microrganismos, inclusive fungos filamentosos (Klugherz *et al.*, 2025).

Estudos recentes demonstram que a acurácia do MALDI-TOF MS depende da qualidade da biblioteca espectral, do protocolo de preparação e do fabricante do equipamento, fatores

que podem influenciar diretamente a confiabilidade dos resultados (Klugherz *et al.*, 2025). A aplicação do método direto com ácido fórmico tem sido descrita como uma alternativa eficiente para fungos filamentosos, reduzindo o tempo de processamento sem comprometer a qualidade espectral. No entanto, a performance de diferentes plataformas comerciais ainda é pouco explorada em contextos ambientais e clínicos de países da região (Peng *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho do sistema MALDI-TOF MS da marca Autobio na identificação de espécies de *Aspergillus* provenientes de amostras clínicas e ambientais, utilizando o método direto com ácido fórmico.

2. Materiais e Métodos

Foram analisadas culturas das amostras clínicas (Escarro, lavado broncoalveolar (BAL), aspirado traqueal e unha) coletadas entre 2023 e 2026 e ambientais (milho) que fazem parte da coleção de cultivos de microrganismos UNA (CCM-UNA). Todas as amostras foram incubadas em meio Sabouraud dextrose por 72 horas, até o desenvolvimento de micélio maduro. Para o preparo das amostras, foram selecionadas hifas dos bordos das colônias, região que apresentou crescimento ativo e menor compactação estrutural.

A identificação foi realizada utilizando o sistema Autobio MALDI-TOF MS, seguindo o protocolo de processamento direto com ácido fórmico (*Formic Acid Sandwich – FA Sandwich*). Em cada ponto da placa metálica, foi aplicado 1 µL de ácido fórmico a 70%. Em seguida, uma pequena porção das hifas dos bordos foi transferida para o ponto contendo o ácido fórmico, promovendo lise proteica imediata. Após a completa secagem do material, foi adicionada a matriz HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico). As amostras foram então submetidas à leitura espectral, e os perfis obtidos foram comparados com a biblioteca comercial do equipamento.

Os resultados foram expressos como valores de score, interpretados conforme os critérios do fabricante Autobio:

- 9,500–10,000: identificação confiável ao nível de espécie, com possibilidade de subespécie;
- 9,000–9,500: identificação confiável ao nível de espécie;
- 6,000–9,000: identificação confiável ao nível de gênero;
- 0,000–6,000: identificação não confiável.

Os dados foram organizados em planilhas e analisados descritivamente, considerando procedência, tipo de amostra, espécie identificada e score obtido.

3. Resultados e Discussão

Foram analisados 20 isolados de *Aspergillus*, dos quais 55% eram de origem ambiental e 45% de origem clínica. As espécies identificadas incluíram *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. alabamensis*, *A. oryzae* e *Aspergillus sp*. A Tabela 1 apresenta a distribuição das espécies, procedência e valores de score.

Tabela 1 - Distribuição das espécies.

Código	Procedência	Tipo de amostra	Identificação	Score
CCMPy- 01	Ambiental	Milho	*A. oryzae*	9,438
CCMPy- 15	Ambiental	Milho	*A. flavus*	9,300
CCMPy- 16	Ambiental	Milho	*A. flavus*	9,354
CCMPy- 40	Ambiental	Milho	*A. flavus*	9,449
CCMPy- 54	Ambiental	Milho	*A. flavus*	9,480
CCMPy- 64	Ambiental	Milho	*A. flavus*	9,437
CCMPy- 107	Ambiental	Milho	*Aspergillus sp*	9,446
CCMPy- 113	Ambiental	Milho	*A. flavus*	9,545
CCMPy- 118	Ambiental	Milho	*A. flavus*	9,427
CCMPy- 214	Clínico	Aspirado traqueal	*A. flavus*	9,029
CCMPy- 215	Clínico	BAL	*A. fumigatus*	9,400
CCMPy- 216	Clínico	Unha do pé	*A. terreus*	9,155
CCMPy- 218	Clínico	Unha do pé	*A. alabamensis*	9,066
CCMPy- 219	Clínico	Escarro	*A. fumigatus*	9,181
CCMPy- 220	Clínico	Escarro	*A. fumigatus*	9,169
CCMPy- 221	Clínico	BAL	*A. fumigatus*	9,651
CCMPy- 222	Clínico	BAL	*A. fumigatus*	9,244
CCMPy- 223	Clínico	BAL	*A. fumigatus*	9,423
CCMPy- 224	Clínico	BAL	*A. fumigatus*	9,482
CCMPy- 225	Clínico		*A. flavus*	9,279

Os scores variaram entre 9,029 e 9,651, indicando elevada confiabilidade na identificação proteômica. *A. flavus* foi predominante nas amostras ambientais de milho, enquanto *A. fumigatus* prevaleceu nas amostras clínicas, padrão compatível com a literatura sobre ecologia e patogenicidade do gênero (Chen *et al.*, 2023; Morrissey *et al.*, 2024). A detecção de *A. terreus* e *A. alabamensis* em amostras de unha reforça a diversidade de agentes etiológicos associados a infecções superficiais.

A concordância entre procedência e espécie identificada sugere boa performance do equipamento Autobio para fungos filamentosos, mesmo utilizando o método direto com ácido fórmico, que reduz etapas de extração. A ausência de resultados inconclusivos ou de baixa qualidade espectral indica que o protocolo aplicado foi adequado para os isolados avaliados. Esses achados corroboram estudos que demonstram a aplicabilidade do MALDI-TOF MS para identificação rápida de *Aspergillus*, especialmente quando associado a bibliotecas atualizadas e protocolos otimizados.

4. Conclusões e Impacto Social

O sistema MALDI-TOF MS da marca Autobio mostrou desempenho consistente na identificação de espécies de *Aspergillus* provenientes de amostras clínicas e ambientais, com scores predominantemente dentro das faixas consideradas confiáveis pelo fabricante. O método direto com ácido fórmico “sanduíche” aplicado a colônias de 72 horas demonstrou

ser rápido, simples e adequado para a obtenção de perfis proteicos de boa qualidade, permitindo discriminar espécies relevantes para diagnóstico e vigilância ambiental.

A utilização de uma ferramenta de identificação rápida como o MALDI-TOF MS contribui para reduzir o tempo de resposta laboratorial, favorecendo decisões clínicas mais oportunas e melhorando o manejo de infecções fúngicas. No âmbito ambiental e agrícola, a identificação confiável de espécies potencialmente toxigênicas apoia ações de monitoramento e prevenção, reforçando a segurança sanitária e o impacto positivo sobre a saúde pública.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da UNESCO e do Centro Internacional de Investigação para o Desenvolvimento (IDRC) do Canadá. As opiniões expressas no presente documento não refletem necessariamente as da UNESCO-TWAS, da OWSD, do IDRC nem do seu Conselho de Administração.

Os autores expressam o seu agradecimento à RIIMICO (Rede Ibero-Americana de Investigadores em Micologia) por facilitar as sinergias interdisciplinares entre os investigadores, o que permitiu ampliar a profundidade e o alcance da nossa investigação científica.

Referências

Chen, X.; Abdallah, M.F.; Landschoot, S.; Audenaert, K.; De Saeger, S.; Chen, X. *et al. Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* and their main mycotoxins: global distribution and scenarios of interactions in maize. Toxins 2023, 15, 577.

Fernandez-Pittol, M.; Alejo-Cancho, I.; Rubio-García, E.; Cardozo, C.; Puerta-Alcalde. P.; Moreno-García, E. *et al.* Aspergillosis by cryptic *Aspergillus* species: a case series and review of the literature. Rev Iberoam Micol. 2022, 39, 44–49.

Klugherz, I.; Kölli, B.; Reinmüller, M.; Willinger, B.; Leitner, E.; Steinmetz, I. *et al.* Identification of filamentous fungi: an evaluation of three MALDI-TOF mass spectrometry systems. Mycoses. 2025, 68(6), e70078.

Morrissey, C.O.; Kim, H.Y.; Duong, T.-M.N.; Moran, E.; Alastruey-Izquierdo, A.; Denning, D.W. *et al. Aspergillus fumigatus* a systematic review to inform the World Health Organization priority list of fungal pathogens. Med Mycol. 2024, 62(6), myad129.

Peng, D.; Zhu, X.; Liu, Y.; Li, X.; Chen, G.; Li, Y. *et al.* Evaluation of formic acid sandwich (FA-sandwich): A pretreatment method for filamentous fungi, for the identification of clinically relevant filamentous fungi by two MALDI-TOF MS systems. Med Mycol. 2022, 60(4), myac018.

Identificação de *Candida* spp. isoladas de pacientes internados em um Centro de Terapia Intensiva, utilizando diferentes ferramentas CO2

Paola Aparecida Alves Ferreira[1], Lucas Daniel Cibolli Rosol[1], Daniel Almeida Freitas[1], Ana Paula Pereira Bressani[2], Paulo Henrique da Cruz Ferreira[1], Cristiane Rocha Fagundes Moura[1], Rosane Freitas Schwan[2], Vanessa Amaral Mendonça[1], Cíntia Lacerda Ramos[1]*

[1]Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina (MG), Brasil
[2]Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras (MG), Brasil

E-mail: cintia.ramos@ufvjm.edu.br*

Resumo: Este estudo identificou 131 cepas de *Candida* isoladas de pacientes na Unidade de Terapia Intensiva de Diamantina-MG. Foram utilizados CHROMagar *Candida*, MALDI-TOF MS e sequenciamento de DNA para identificação. *C. albicans* foi predominante (37,4%), seguida por *C. tropicalis, C. krusei, C. glabrata, C. parapsilosis, C. dubliniensis, C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*. Foram observadas pequenas discrepâncias na identificação entre os métodos empregados.

Palavras-chave: *Candida* spp.; identificação; MALDI-TOF MS; meio cromogênico; sequenciamento de DNA

1. Introdução

O gênero *Candida* é considerado um dos patógenos fúngicos oportunistas humanos mais comuns, com várias espécies que apresentam enorme diversidade filogenética e fenotípica. Representa a segunda causa mais frequente de infecções fúngicas no mundo, sendo responsável por 90-100% das infecções de mucosa e associando-se a uma taxa de mortalidade de 35-50% em indivíduos gravemente imunocomprometidos que sofreram procedimentos clínicos invasivos ou que requerem tratamento prolongado em unidades de terapia intensiva (Pfaller *et al.*, 2019).

Uma questão importante a ser destacada é que, para obter um diagnóstico oportuno e tratamento adequado de infecções por *Candida* spp., é imprescindível a identificação em nível de espécie. Diferentes métodos de estudo são utilizados para a identificação de leveduras, que se baseiam em técnicas fenotípicas, bioquímicas, imunológicas, genéticas e espectroscópicas (Lockhart *et al.*, 2022).

Este estudo visou identificar espécies de *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados em um CTI adulto, por meio de três métodos de identificação: CHROMagar, MALDI-TOF MS

e sequenciamento de DNA. Foram também avaliadas a presença de fatores de virulência e a resistência aos antifúngicos dos isolados de *Candida*.

2. Materiais e Métodos

Foram utilizadas 131 cepas de *Candida* spp. previamente isoladas de secreções orais e traqueobrônquicas de pacientes internados em um CTI adulto, na cidade de Diamantina, MG (Ferreira *et al*., 2025). As cepas estocadas a -80 °C foram reativadas em caldo YEPG (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona) a 37 °C por 48 horas. Posteriormente, as cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrosado 2% (Biolog®) e incubadas a 37 °C por 48 horas, para posterior realização das análises.

Para identificação fenotípica, as leveduras previamente reativadas foram inoculadas em microgotas de 10 µL em placas contendo o meio de cultura CHROMagar® e incubadas a 37 °C por 48 horas. Para identificação, as colorações das colônias crescidas foram comparadas às fornecidas pelo fabricante. O experimento foi realizado em triplicata.

As 131 cepas de leveduras também foram identificadas pela técnica MALDI-TOF no equipamento MALDI-TOF microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), utilizando o sistema automático MALDI Biotyper 2.2. As análises foram realizadas em triplicata. A cepa *Escherichia coli* K12, obtida da coleção de culturas Portuguesa da Universidade do Minho (MUM, http://www.micoteca.deb.uminho.pt), foi usada como padrão para calibração externa do MALDI-TOF MS. Representantes de cada espécie identificada pelas técnicas descritas acima (CHROMagar e MALDI-TOF MS) foram selecionados e submetidos à análise de sequenciamento da região ITS para confirmação da identificação. Um total de 17 leveduras foi selecionado e seu DNA foi extraído com o InstaGeneTM Matrix (Bio-Rad, Hercules, CA), conforme as instruções do fabricante. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com os primers ITS1 (50-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-30) e ITS4 (50-TCCTCCGCTTATTGATATGC-30). Os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento na ACTGene (Alvorada, RS, Brasil), e as sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados do GenBank, utilizando o algoritmo BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para identificação das espécies.

Os dados obtidos após a análise das amostras foram tabulados e apresentados em frequência absoluta (n) e relativa (%), e analisados por meio de estatística descritiva simples.

3. Resultados e Discussão

Neste estudo, 131 cepas de *Candida* previamente isoladas de secreções orais (79) e traqueobrônquicas (52) de pacientes internados em uma UTI de adultos na cidade de Diamantina, Brasil (Ferreira *et al*., 2025), foram identificadas por meio de três métodos: análise fenotípica em meio de cultura cromogênico, MALDI-TOF MS e sequenciamento da região ITS do rDNA. As leveduras foram isoladas de 135 pacientes intubados internados na UTI, de fevereiro de 2022 a março de 2023, dos quais 61,5% eram do sexo masculino, com idade média de 57,6 anos. A maioria dos pacientes (63%) apresentava uma ou nenhuma comorbidade (Ferreira *et al*., 2025). Espécies de *Candida* foram detectadas e isoladas de secreções traqueais e orais em 35% e 44,4% dos pacientes avaliados, respectivamente. Vale

ressaltar que as cepas haviam sido previamente identificadas com o meio de cultura CHROMagar *Candida*, por meio de plaqueamento direto de secreções orais e traqueais, sem cultivo prévio nem isolamento em ágar Sabouraud.

Foram observadas pequenas discrepâncias na identificação de leveduras entre os métodos empregados. O método cromogênico, anteriormente utilizado para identificar cepas por meio do plaqueamento direto de secreções, não conseguiu identificar 15 cepas devido a alterações cromogênicas incompatíveis com as colorações do meio de cultura. Esse fato pode ser atribuído ao meio cromogênico utilizado, que é muito útil para identificar apenas cinco espécies clínicas importantes de *Candida: C. tropicalis, C. albicans, C. krusei, C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Outro fato relevante é a reação/interação do meio cromogênico com componentes das secreções orais e traqueais, que pode gerar resultados positivos/negativos. Comparando essa identificação com o sequenciamento da região ITS do rDNA, 72 cepas (55,0%) foram identificadas em termos de espécie.

Ao utilizar o meio cromogênico para identificar leveduras purificadas, não foi possível identificar 29 cepas. Inicialmente, o fato de terem sido identificadas menos cepas do que as presentes nas secreções foi surpreendente. Espera-se maior eficácia na identificação quando a levedura é isolada e purificada, pois não há interferência de componentes presentes nas secreções, o que resulta em cores de colônia mais nítidas. No entanto, quando comparadas ao sequenciamento de DNA, 85 cepas (64,9%) apresentaram correspondência. Das 29 cepas não identificadas, 20 eram *C. tropicalis*, que apresentavam coloração acinzentada, enquanto a cor da colônia deveria ser azul, conforme o manual do fabricante. A identificação utilizando meios de cultura cromogênicos é amplamente empregada em estudos clínicos devido à sua rapidez, baixo custo e facilidade de execução. Contudo, estudos mostram que a acurácia diagnóstica para os isolados mais comuns não é de 100% (e.g. Pfaller *et al.*, 1996). Algumas espécies, como *C. tropicalis* e *C. krusei*, não apresentaram coloração exclusiva após 48 horas de incubação, reforçando a necessidade de outros métodos de identificação para obter uma identificação mais precisa das espécies.

No presente estudo, a técnica MALDI-TOF MS permitiu a identificação de 110 cepas em nível de espécie (84%) (pontuação ≥ 2,00) e de 20 cepas em nível de gênero (15,3%) (pontuação < 2,00–1,70). A técnica MALDI-TOF MS demonstrou ser um método promissor para a identificação microbiana e, com a expansão dos bancos de dados, pode diferenciar com sucesso fungos em nível de espécie. Por meio do sequenciamento da região ITS do rDNA, confirmou-se a identificação de 129 cepas. A identificação correta em nível de espécie é extremamente importante tanto para o tratamento eficaz com a terapia adequada, evitando, assim, a resistência a medicamentos, quanto para avaliar o surgimento de espécies emergentes e/ou novas (Lockhart *et al*., 2022). Informações sobre espécies endêmicas e suas características patogênicas em regiões do país também são altamente relevantes para aprimorar o conhecimento e desenvolver tratamentos eficazes, prevenindo, assim, a disseminação de cepas resistentes e virulentas.

De acordo com os resultados, 131 cepas isoladas de pacientes internados na UTI foram analisadas, sendo *Candida albicans* a predominante (37,4%). As seguintes espécies também foram identificadas: *Candida tropicalis* (26,0%), *Candida krusei* (16,0%), *Candida glabrata* (13,7%), *Candida parapsilosis* (2,3%), *Candida dubliniensis* (2,3%), *Candida lusitaniae* (1,5%) e *Candida guilliermondii* (0,8%) (Figura 1).

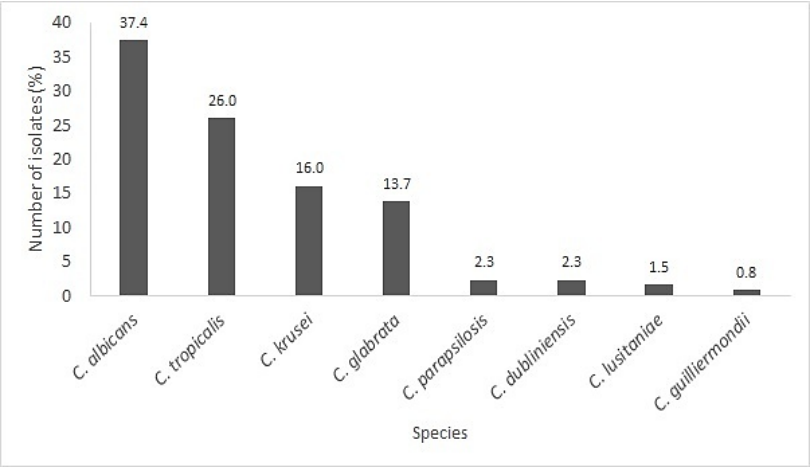


Figura 1. Percentagem de isolados de cada espécie de *Candida* identificados em pacientes internados na UTI.

Outros estudos identificaram *Candida albicans* como a espécie prevalente em infecções (Parambath *et al*., 2024). Um estudo realizado pelo Programa de Vigilância Antifúngica SENTRY analisou 20.788 isolados de *Candida* coletados em 135 centros médicos de 39 países entre 1997 e 2016, como parte de um esforço global de vigilância. Entre esses isolados, a maioria era *C. albicans* (46,9%). As espécies *C. glabrata* (18,7%), *C. parapsilosis* (15,9%), *C. tropicalis* (9,3%), *C. krusei* (2,8%) e outras espécies (6,5%), incluindo *C. dubliniensis*, também foram identificadas (Pfaller *et al.*, 2019). Embora a *C. albicans* ainda seja a principal causa de candidemia, vários estudos relatam um número crescente de espécies de *C.* não-*albicans* como agentes causadores de infecções fúngicas, com alta incidência em adultos, associada à alta mortalidade (e.g., Pfaller *et al.*, 2019). Essa condição deve-se principalmente ao surgimento de cepas resistentes a antifúngicos comerciais (Pfaller *et al.*, 2019).

4. Conclusões e Impacto Social

Os resultados deste estudo demonstraram que, embora os meios cromogênicos representem uma abordagem rápida e prática para a identificação de *Candida*, podem não proporcionar discriminação precisa em nível de espécie. A identificação correta em nível de espécie é crucial para o diagnóstico oportuno e o tratamento adequado, o que ajuda a prevenir a resistência a medicamentos e a avaliar o surgimento de novas espécies. *C. albicans* foi a espécie predominante entre os isolados.

Este estudo fornece dados críticos e clinicamente significativos sobre a epidemiologia e identificação de espécies de *Candida* em um ambiente específico de UTI. Isso reforça a necessidade de uma identificação precisa das espécies, essencial para o suporte à vigilância eficaz de infecções e ao manejo clínico em unidades de terapia intensiva, o que, assim, melhora os resultados para os pacientes.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Código 001.

Referências

Ferreira, P.H.d.C.; Moura, C.R.F.; Lage, V.K.S.; Teixeira, L.A.C.; Costa, H.S.; Figueiredo, P.H.S.; Santos, J.N.V.; de Jesus, P.H.C.; Freitas, D.A.; Lacerda, A.C.R.; Ramos, C.L.; Mendonça, V.A. Factors associated with the presence of *Candida* spp. in oral and tracheobronchial secretions of adult intensive care unit patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2025, 111(3), 116687.

Lockhart, S.R.; Lyman, M.M.; Sexton, D.J. Tools for Detecting a "Superbug": Updates on Candida auris Testing. *Journal of Clinical Microbiology* 2022, 60(5), e00808-21.

Pfaller, M.A.; Diekema, D.J.; Turnidge, J.D.; Castanheira, M.; Jones, R.N. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: Results for *Candida* species from 1997–2016. *Open Forum Infectious Diseases* 2019, 6, S79–S94.

Pfaller, M.A.; Houston, A.; Coffmann, S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1996, 34(1), 58-61.

Parambath, S.; Dao, A.; Kim, H.Y.; Zawahir, S.; Izquierdo, A.A.; Tacconelli, E.; Govender, N.; Oladele, R.; Colombo, A.; Sorrell, T.; Ramon-Pardo, P.; Fusire, T.; Gigante, V.; Sati, H.; Morrissey, C.O.; Alffenaar, J.W.; Beardsley, J. *Candida albicans* — a systematic review to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. *Medical Mycology* 2024, 62(6), myae045.

Abordagem polifásica baseada em ferramentas biotecnológicas para a reclassificação de agentes da piedra branca CO3

Cícero Pinheiro Inácio*, Isabelly Guimarães Silva, Maria Alice Ribeiro Alves, Greicilene Maria Rodrigues Albuquerque, Reginaldo G. Lima-Neto, Rejane Pereira Neves

Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil

*E-mail: *cicero.inacio@ufpe.br*

Resumo: A piedra branca é uma infecção fúngica causada por leveduras do gênero *Trichosporon*, caracterizada por nódulos nos pelos. O estudo objetivou a autenticação taxonômica de 18 isolados da Micoteca URM por identificação polifásica, incluindo taxonomia clássica, MALDI-TOF MS e sequenciamento ITS, IGS1 e D1/D2. Métodos moleculares mostraram maior precisão, identificando *T. asahii*, *T. faecale*, *T. montevideense*, *T. mycotoxinivorans* e *Hyphopichia burtonii*.

Palavras-chave: identificação; morfologia; levedura; *Trichosporon*

1. Introdução

Em humanos, as infecções invasivas causadas por espécies do gênero *Trichosporon* são incomuns e quase sempre associadas a uma alta taxa de mortalidade (Almarhabi *et al.,* 2025). O diagnóstico impreciso dos casos de tricosporonose e a identificação incorreta do agente fúngico constituem um desafio. Essa situação pode representar um risco à vida do paciente e obscurecer as informações epidemiológicas relativas a essa infecção.

Dessa forma, as informações taxonômicas são cruciais para evitar erros de identificação, especialmente porque o gênero *Trichosporon* possui uma história evolutiva controversa. Em laboratórios médicos, a identificação desse patógeno é, geralmente, baseada em sistemas automatizados e em características morfofisiológicas. No entanto, esses sistemas são insuficientes para a identificação correta a nível de espécie desse patógeno, sendo recomendado o sequenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA LSU e do ITS para a identificação rotineira das espécies, e a região IGS1 para a resolução de táxons intimamente relacionados ou novos e para genotipagem/epidemiologia (Ma *et al.* 2019).

Adicionalmente, a espectrometria de massa de ionização por desorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF MS) surgiu como uma ferramenta importante, apresentando um melhor desempenho quando os bancos de dados são especificamente expandidos com linhagens de referência bem sequenciadas (Parashar *et al.* 2022). Portanto, o uso de uma abordagem polifásica é necessário para obter uma identificação precisa, para fins epidemiológicos e para o conhecimento da diversidade de *Trichosporon*. Assim,

apresentamos aqui uma abordagem polifásica abrangente para esclarecer a identificação de *Trichosporon* e espécies relacionadas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Cepas e condições de crescimento

Neste estudo, foram recuperadas 18 cepas de *Trichosporon* da Coleção de Culturas Micoteca URM (www.ufpe.br/micoteca). As cepas de levedura foram isoladas de amostras clínicas, que foram previamente identificadas morfologicamente e armazenadas em óleo mineral para preservação a longo prazo. Essas culturas foram reativadas em caldo de glicose e mantidas em meio ágar Sabouraud com dextrose (Difco) a 30 °C.

2.2 Identificação convencional

Para identificar as espécies de leveduras, foram registradas as características morfológicas em ágar Sabouraud com glicose e SDS (Difco) a 28 °C e 37 °C, após 3 e 7 dias de incubação. Além disso, foram examinadas as características fisiológicas das espécies de leveduras por meio de métodos padrão de identificação de leveduras.

2.3 Extração de DNA, sequenciamento e testes filogenéticos

Após a extração de DNA foi realizada a amplificação das regiões ITS e IGS1. Para identificação das espécies foi realizada a amplificação das regiões ITS, IGS1 e dos domínios D1/D2. As reações de PCR foram realizadas em volumes finais de 12,5 µL contendo 7,45 µL de ddH_2O, 1 µL de cada primer (5 pmol), 1,25 µL de tampão de PCR, 0,5 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,25 µL de dNTP (10 mM), 0,05 µL de Taq DNA polimerase 5U (Invitrogen, Brasil) e 1 µL de DNA molde. Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit GenJET PCR Purification (Thermo Fisher, Reino Unido), de acordo com as recomendações do fabricante, e sequenciados em ambas as direções com os mesmos primers, seguindo os protocolos da Plataforma de Sequenciamento do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

2.4 Identificação por espectrometria de massa de ionização por desorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF MS)

A extração de proteínas foi realizada utilizando um protocolo de extração com etanol (70%) e ácido fórmico (70%). Os espectros do perfil proteico foram gerados por um laser de nitrogênio (337 nm). Os perfis proteicos foram gerados pelo software Biotyper™ 3.1 (Bruker Daltonics). Posteriormente, o conjunto de dados espectrais foi comparado com espectros de massa de referência do software MALDI Biotyper (Bruker Daltonics). A identificação correta no nível de espécie foi considerada quando o resultado da análise do BioTyper apresentou um valor de pontuação logarítmica superior a 2.

3. Resultados e Discussão

A identificação de dezoito isolados pertencentes ao gênero *Trichosporon*, provenientes da Micoteca URM, foi conduzida por meio de uma abordagem polifásica, incluindo análises

morfológicas, fisiológicas, moleculares e proteômicas. Como resultado, os isolados foram identificados como *Trichosporon asahii* (8), *Trichosporon faecale* (3), *Trichosporon montevideense* (5), *Trichosporon mycotoxinivorans* (1) e *Hyphopichia burtonii* (1) (Tabela 1).

Inicialmente, os dados morfológicos e fisiológicos revelaram características relativamente homogêneas entre os isolados. A maioria apresentou colônias de coloração creme, com aspecto cerebriforme, crescimento ótimo a 28 °C e redução do desenvolvimento a 37 °C. Microscopicamente, observaram-se hifas hialinas septadas, artroconídios e blastoconídios, características compatíveis com o gênero *Trichosporon*. No entanto, tais atributos mostraram-se insuficientes para discriminação em nível de espécie. Apenas três isolados foram corretamente identificados por métodos fenotípicos (URM 5781, 6074 e 6356), e o isolado URM 1080, previamente identificado como *Trichosporon beigelii*, apresentou perfil incompatível com o gênero. Esses achados evidenciam que a identificação fenotípica foi apenas parcialmente corroborada, reforçando limitações já descritas para leveduras basidiomicéticas (Vu *et al.*, 2016).

Tabela 1. Identificação polifásica dos isolados gênero *Trichosporon* utilizados no estudo por meio de MALDI-TOF MS e de sequenciamento das regiões ITS e IGS1.

Código URM	Espécie	MALDI-TOF MS	ITS/IGS
6356	*T. asahii*	*T. asahii*	*T. asahii*
6074	*T. asahii*	*T. asahii*	*T. asahii*
5781	*T. asahii*	*T. asahii*	*T. asahii*
4437	*T. beigelii*	***T. mycotoxinivorans***	***T. mycotoxinivorans***
4251	*T. beigelii*	***T. montevideense***	***T. montevideense***
4250	*T. beigelii*	***T. faecale***	***T. faecale***
1080*	*T. beigelii*	---	---
6295	*T. cutaneum*	---	***T. asahii***
6073	*T. cutaneum*	***T. montevideense***	***T. montevideense***
5743	*T. cutaneum*	***T. asahii***	***T. asahii***
6261	*T. inkin*	***T. asahii***	***T. asahii***
5973	*T. inkin*	***T. asahii***	***T. asahii***
6763	*T. ovoides*	***T. asahii***	***T. asahii***
6293	*T. ovoides*	***T. asahii***	***T. montevideense***
6292	*T. ovoides*	***T. montevideense***	***T. montevideense***
6291	*T. ovoides*	***T. montevideense***	***T. montevideense***
4259	*T. pullulans*	***T. faecale***	***T. faecale***
3963	*T. pullulans*	***T. faecale***	***T. faecale***

*O isolado URM1080 (*Hyphopichia burtonii*) foi identificado pelo sequenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA.

A análise molecular baseada nas regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA revelou maior poder discriminatório quando comparada aos métodos fenotípicos. Embora tenha havido concordância parcial com os dados morfofisiológicos, inconsistências relevantes foram detectadas. O isolado URM1080, por exemplo, foi claramente reposicionado fora do gênero *Trichosporon*, sendo identificado como *Hyphopichia burtonii*. Esse resultado evidencia a

importância do ITS como marcador molecular padrão para identificação fúngica, embora sua resolução possa ser limitada em alguns casos (Vu *et al.*, 2016).

A análise complementar da região IGS demonstrou maior variabilidade e poder de discriminação, corroborando os resultados obtidos pelo ITS e apresentando elevada concordância com a maioria das características morfológicas observadas. Esse achado está em acordo com estudos que apontam a região IGS como marcador mais robusto para diferenciação intraespecífica em *Trichosporon* (Ma *et al.* 2018). Assim, a combinação das regiões ITS e IGS mostrou-se essencial para uma identificação taxonômica mais precisa.

A espectrometria de massa por MALDI-TOF MS demonstrou alta eficiência na identificação dos isolados, com dez apresentando score ≥ 2,0 e seis com valores entre 1,700 e 1,999. No total, 15 dos 16 isolados analisados apresentaram concordância com os resultados moleculares. Foram identificados oito isolados como *Trichosporon asahii*, cinco como *Trichosporon montevideense* (incluindo sua reclassificação como *Apiotrichum montevideense*), três como *Trichosporon faecale* e um como *Trichosporon mycotoxinivorans*. Entretanto, não foram obtidos espectros confiáveis para os isolados URM 1080 e URM 6295, e o isolado URM 6293 foi identificado erroneamente como *Trichosporon asahii*, divergindo dos dados moleculares. Essas limitações estão possivelmente associadas à cobertura dos bancos de dados espectrais, como descrito na literatura (Parashar *et al.* 2022).

Os testes de assimilação de carboidratos também demonstraram padrões variáveis entre as espécies, mas com sobreposição significativa. Por exemplo, isolados de *Trichosporon asahii* não assimilaram melibiose, rafinose e inulina, enquanto *Trichosporon faecale* apresentou perfil ainda mais restrito. Já *Trichosporon montevideense* exibiu padrão semelhante, dificultando a distinção entre espécies próximas. Por outro lado, *Trichosporon mycotoxinivorans* demonstrou maior capacidade assimilativa, enquanto *Hyphopichia burtonii* foi o único isolado uréase negativo, destacando-se fenotipicamente dos demais.

De forma integrada, os resultados demonstram que a identificação fenotípica não foi suficiente para caracterização precisa dos isolados, enquanto as análises moleculares forneceram maior confiabilidade e permitiram a correção de identificações equivocadas. O MALDI-TOF MS, por sua vez, destacou-se como uma ferramenta rápida e eficiente, com elevada concordância com os métodos moleculares, embora dependente da qualidade dos bancos de dados. Esses achados reforçam a necessidade de integração de múltiplas ferramentas para estudos taxonômicos e diagnósticos envolvendo leveduras de importância clínica.

4. Conclusões e Impacto Social

Este estudo demonstrou que a abordagem polifásica, integrando métodos morfológicos, proteômicos e moleculares, foi essencial para a identificação taxonômica precisa dos isolados do gênero *Trichosporon*. Os resultados evidenciaram limitações dos métodos fenotípicos isolados e reforçaram a maior confiabilidade das ferramentas moleculares, além da eficiência do MALDI-TOF MS como método rápido e complementar para identificação de leveduras de importância clínica. Do ponto de vista social, a correta identificação dessas leveduras contribui para a melhoria do diagnóstico laboratorial, auxiliando na escolha de terapias antifúngicas mais adequadas e na redução de erros diagnósticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Referências

Almarhabi, H.; Alharbi, A.; Alfagi, R.; Al-Amri, A. *Trichosporon* species bloodstream infections in a tertiary care hospital in the western region of Saudi Arabia: A 7-year retrospective chart review from 2016 to 2022. *Medical Mycology* 2025, 63(4), myaf029.

Ma, X.; Jiang, Y.; Wang, C.; Gu, Y.; Cao, S.; Huang, X.; *et al.* Identification, genotyping, and pathogenicity of *Trichosporon* spp. Isolated from Giant pandas (Ailuropoda melanoleuca). *BMC Microbiology* 2019, 19(1), 113.

Parashar, A.; Rastogi, V.; Rudramurthy; S.M.; Ghosh, A.K.; Chander, J., Kindo, A.J. Faster and accurate identification of clinically important *Trichosporon* using MALDI TOF MS. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2022, 40(3), 359-364.

Vu, D.; Groenewald, M.; Szöke, S.; Cardinali, G.; Eberhardt, U.; Stielow, B.; *et al.* DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Studies in Mycology* 2016, 85(1), 91-105.

Caracterização genômica e fenotípica de uma nova espécie de *Pannonibacter* isolada a partir de uma amostra clínica no Brasil

CO4

Laís Costa Agra[1]*, Igor Vasconcelos Rocha[1], Beatriz Souza Toscano de Melo[1], João Luiz de Lemos Padilha Pitta[1], Carlos Alberto das Neves de Andrade[1,2], Reginaldo Gonçalves de Lima Neto[2], Ana Carolina Mota de Faria[3], Marilia Lavocat Nunes[3], Gabriel da Luz Wallau[1], Túlio de Lima Campos[1], Karina Lidianne Alcântara Saraiva[1], Marise Sobreira[1], Alzira Maria Paiva de Almeida[1], Matheus Filgueira Bezerra[1]

[1]*Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães -IAM, Fiocruz, Recife (PE), Brasil*

[2]*Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Doenças Tropicais - LPDDT, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil*

[3]*Coordenação Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças Transm itidas por Vetores, Secretaria de Vigilância Sanitária e Ambiental, Ministério da Saúde (MS), Brasil*

*E-mail: *lais.agra@fiocruz.br*

Resumo: O presente estudo visa descrever as características genômicas, fenotípicas, bioquímicas e de resistência antimicrobiana de um isolado clínico suspeito de tularemia e identificado como uma nova espécie de *Pannonibacter*, geneticamente distinta de táxons previamente conhecidos. Os resultados reforçam a integração de ferramentas proteômicas e genômicas para a identificação precisa de patógenos bacterianos raros e para o apoio à vigilância microbiológica.

Palavras-chave: filogenômica; genômica bacteriana; MALDI-TOF MS; microrganismos emergentes*; Pannonibacter* sp.

1. Introdução

Pannonibacter spp. são bacilos Gram-negativos, não fermentadores, com descrições raras em contextos clínicos (Wang *et al*., 2014). No entanto, o uso crescente de ferramentas avançadas de identificação microbiana tem revelado gêneros incomuns envolvidos em infecções oportunistas, particularmente em indivíduos imunocomprometidos (Castellana *et al.,* 2024; Diniz *et al*., 2025; Jenks & Shaw, 1997; McKinley *et al.*,1990). A caracterização taxonômica adequada é crucial para a compreensão de seu significado clínico e para a identificação de novas espécies.

Portanto, o presente trabalho visa descrever as características genômicas, fenotípicas, bioquímicas e de resistência antimicrobiana de um isolado clínico identificado como uma nova espécie de *Pannonibacter*, geneticamente distinta de táxons previamente conhecidos.

2. Materiais e Métodos

O isolado, denominado CBAS 1226, foi recuperado de uma hemocultura de um paciente pediátrico imunocomprometido e, inicialmente, identificado erroneamente como *Francisella tularensis* por um sistema automatizado. A cepa foi processada em laboratório de nível de biossegurança 3 (NB-3), submetida a análises via espetrometria de massa *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight* (MALDI-TOF MS) e sequenciamento do gene 16S rRNA. Devido à correspondência espectral parcial com *P. phragmitetus* em bancos de dados comerciais, investigações adicionais incluíram sequenciamento de genoma completo (WGS), identidade nucleotídica média (ANI), hibridização DNA-DNA *in silico* (isDDH), análise filogenética, perfil bioquímico com painéis de identificação clínica, caracterização morfológica por observação macroscópica e análises microscópicas utilizando coloração de Gram, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), incluindo os testes de sensibilidade antimicrobianos (TSA).

3. Resultados e Discussão

As análises genômicas revelaram que a cepa CBAS 1226 apresenta valores de ANI < 95% e isDDH < 70% (Figura 1D), valores considerados abaixo dos limiares de delimitação de espécies em comparação com P. *phragmitetus* e outros táxons validamente descritos, confirmando assim seu status como uma nova espécie dentro do gênero *Pannonibacter* (Figura 1C). Os resultados bioquímicos também diferiram daqueles das cepas tipo de P. *phragmitetus* e P. *indicus* (Figura 1B). Morfologicamente, o isolado formou colônias discretas, e os testes antimicrobianos mostraram resistência a β-lactâmicos, mas suscetibilidade a carbapenêmicos e fluoroquinolonas (Figura 1E). Os perfis proteômicos obtidos por MALDI-TOF MS foram compatíveis com apenas dois dos cinco espectros de referência de P. *phragmitetus* presentes no banco de dados (Figura 1A).

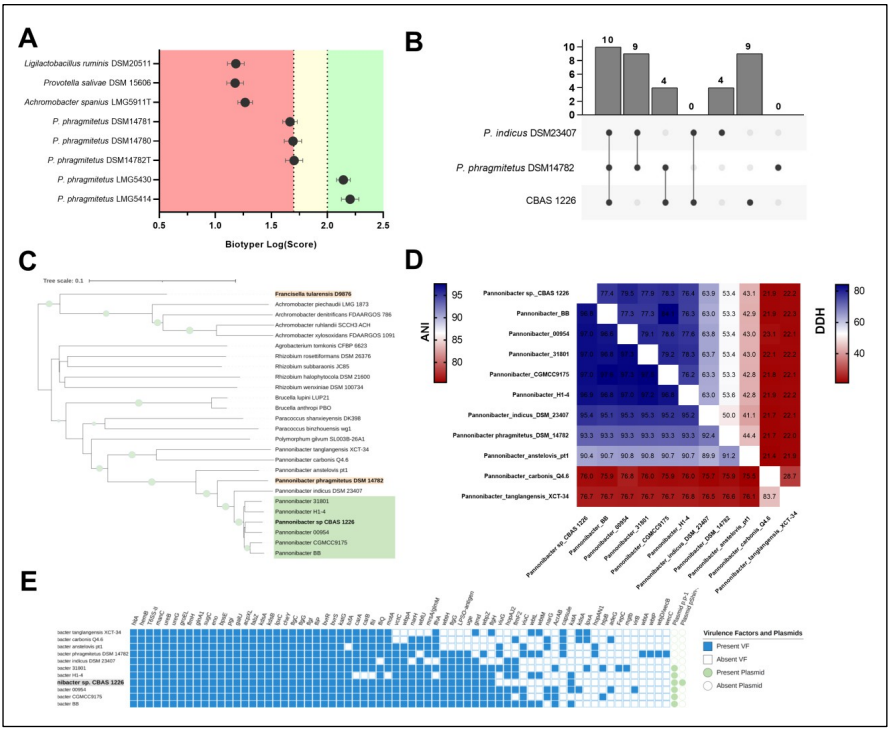


Figura 1 - Caracterização filogenética, genômica e metabólica de Pannonibacter sp. CBAS 1226.

(A). Comparação dos espectros proteicos de *Pannonibacter* sp. CBAS 1226 com as principais espécies de *Pannonibacter* disponíveis no banco de dados do MALDI *Biotyper.*

(B). Comparação bioquímica de *Pannonibacter* sp. CBAS 1226 com *P. phragmitetus* DSM 14782 e *P. indicus* DSM 23407, destacando características metabólicas compartilhadas e distintas.

(C). A análise filogenética baseada em sequências do genoma central mostra que *Pannonibacter* sp. CBAS 1226 forma um agrupamento distinto, separado de *P. phragmitetus* e das outras espécies de *Pannonibacter* incluídas na análise.

(D). Matriz de análises de dDDH (hibridização DNA-DNA in silico) e ANI (identidade média de nucleotídeos) mostrando valores abaixo dos limites de delineamento de espécie, corroborando a classificação do isolado como uma nova espécie dentro do gênero *Pannonibacter.*

(E). Anotação funcional de genes de resistência aos antimicrobianos, fatores de virulência e visão geral do genoma mostrando plasmídeos ausentes em outras espécies de *Pannonibacter.*

4. Conclusões e Impacto Social

Este estudo destaca a descoberta de uma cepa distinta de *Pannonibacter* com características genômicas e fenotípicas únicas, representando uma nova espécie dentro do gênero. Os resultados reforçam a importância da integração de ferramentas proteômicas e

genômicas para a identificação precisa de patógenos bacterianos raros e para o apoio à vigilância microbiológica.

Agradecimentos

Agradecemos ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM, bem como ao LPDDT pelo suporte e análises. Também manifestamos nossa gratidão ao MS pelo apoio institucional; ao Centro de Informações de Vigilância Estratégica em Saúde do Estado do Pará (CIEVS-PA) e ao Laboratório de Referência em Saúde Pública do Estado do Pará (Lacen-PA) pela colaboração epidemiológica e diagnóstica; bem como ao Hospital de Oncologia Infantil Octávio Lobo (Belém, Pará) pelo atendimento aos pacientes e encaminhamento de amostras.

Referências

Wang, M.; Zhang, X.; Jiang, T.; Hu, S.; Yi, Z.; Zhou, Y.; Ming, D.; Chen, S. Liver abscess caused by *Pannonibacter phragmitetus*: case report and literature review. Frontiers in Medicine 2017, 4, 1-4.

Castellana, S.; De Laurentiis, V.; Bianco, A.; Del Sambro, L.; Grassi, M.; De Leonardis, F.; Derobertis, A.M.; De Carlo, C.; Sparapano, E.; Mosca, A.; Stolfa, S.; Ronga, L.; Santacroce, L.; Chironna, M.; Parisi, M.; Capozzi, L.; Parisi, A. *Pannonibacter anstelovis* sp. nov. isolated from two cases of bloodstream infections in paediatric patients. Microorganisms 2024, 12, 1-17.

Diniz, L.R.; Carneiro, S. de S.; Pimenta, R.B.C.L.; Gramacho, Y.A.; Nolasco, D.L. Bacteremia causada por *Pannonibacter phragmitetus* em paciente submetida a cirurgia de revascularização miocárdica. Brazilian Journal of Health Review 2025, 8, e79416.

Jenks, P.J.; Shaw, E.J. Recurrent septicaemia due to *Achromobacter* group B. Journal of Infection 1997, 34, 143-145.

McKinley, K.P.; Laundy, T.J.; Masterton, R.G. *Achromobacter* Group B replacement valve endocarditis. Journal of Infection 1990, 20, 262-263.

Detecção rápida da suscetibilidade a azóis em *Aspergillus fumigatus* por MALDI-TOF MS

CO5

Bárbara Cipulo Legabão, João Pedro Guedes Xavier, Ana Luisa Perini Leme Giordano, Angelica Zaninelli Schreiber*

Departamento de Patologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas (SP), Brasil

*E-mail: *zaninele@unicamp.br*

Resumo: A resistência aos azólicos em *Aspergillus fumigatus* representa um desafio clínico crescente. Este estudo avaliou um protocolo simplificado de teste de suscetibilidade antifúngica por MALDI-TOF MS (TSAF-MS), utilizando apenas três concentrações de voriconazol e itraconazol, após 10 horas de incubação. O método apresentou concordância categórica de 100% com o método de referência EUCAST, demonstrando potencial para aplicação rápida em rotina laboratorial.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*; azólicos; MALDI-TOF MS; resistência; suscetibilidade antifúngica

1. Introdução

As infecções fúngicas invasivas, em especial a aspergilose invasiva causada por *Aspergillus fumigatus*, estão associadas a elevada morbimortalidade, sobretudo em pacientes imunocomprometidos (Lockhart *et al.*, 2023). Voriconazol (VCZ) e itraconazol (ITZ) são antifúngicos azólicos amplamente utilizados no tratamento dessas infecções; entretanto, o aumento da resistência a esses fármacos tem sido relatado globalmente, frequentemente relacionado a mutações no gene *cyp51A* (Pontes *et al.*, 2022).

Os métodos convencionais de teste de suscetibilidade antifúngica, como a microdiluição em caldo segundo o EUCAST, são considerados padrão-ouro, porém apresentam tempo de execução prolongado, o que pode atrasar decisões terapêuticas críticas. Nesse contexto, a espectrometria de massas por MALDI-TOF tem emergido como uma alternativa promissora para a detecção rápida da resistência antifúngica (Giordano *et al.*, 2023). O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de um protocolo simplificado de TSAF-MS para a determinação da suscetibilidade de isolados clínicos de *A. fumigatus* ao VCZ e ao ITZ após 10 h de incubação.

2. Materiais e Métodos

Foram avaliados nove isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* e a cepa de referência *A. fumigatus* ATCC 204305. Os isolados foram incubados a 35 °C, sob agitação constante, por 10 horas na presença de VCZ e ITZ nas concentrações de 0, 2 e 8 µg/mL, correspondentes, respectivamente, ao controle sem antifúngico, à concentração intermediária (ponto de corte de resistência definido pelo EUCAST) e à concentração máxima. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação, realizou-se a extração proteica seguida da aquisição dos espectros por MALDI-TOF MS. A análise dos dados foi conduzida no software Biotyper™ (Bruker Daltonics), utilizando o Índice de Correlação de Compósitos (ICC). Para essa análise, cada espectro foi dividido em 12 intervalos de igual tamanho (417 Da cada), e a similaridade espectral foi determinada por meio da comparação entre correlações e autocorrelações dos espectros. Valores de ICC próximos de 1 indicaram alta similaridade entre os perfis proteicos, enquanto valores próximos de 0 indicaram maior diversidade.

As correlações obtidas foram organizadas em uma matriz 3×3 e, automaticamente, convertidas em mapas de calor para facilitar a visualização dos dados. Espectros com alto grau de similaridade foram representados por cores quentes (vermelho escuro a amarelo), enquanto aqueles com baixa similaridade foram indicados por cores frias (azul escuro a verde claro). Com base na comparação dos valores médios de ICC e na coloração dos mapas de calor entre as diferentes concentrações de antifúngico, os isolados foram classificados como suscetíveis ou resistentes.

Os resultados obtidos pelo TSAF-MS simplificado foram comparados ao método de referência EUCAST, sendo calculada a concordância categórica (CC) entre as metodologias. A CC foi utilizada para comparar a classificação dos isolados como suscetíveis, intermediários ou resistentes (S, I ou R), de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo método de referência. Os erros foram classificados conforme o impacto clínico: erro muito grave (EMG) foi definido quando isolados resistentes segundo o EUCAST foram classificados como suscetíveis pelo TSAF-MS, representando o desfecho mais crítico devido ao risco de falha terapêutica. Erro grave (EG) ocorreu quando isolados suscetíveis foram interpretados como resistentes pelo TSAF-MS, podendo resultar no uso desnecessário de antifúngicos mais tóxicos ou de amplo espectro. Já o erro menor (EM) envolveu discrepâncias relacionadas à categoria intermediária, com menor relevância clínica, porém indicativas de divergência entre os métodos. Como a metodologia proposta não permitiu a categorização direta de isolados como intermediários, erros menores (EM) foram considerados apenas quando o EUCAST indicou perfil intermediário para isolados classificados como suscetíveis ou resistentes pelo TSAF-MS.

3. Resultados e Discussão

O TSAF-MS apresentou CC de 100% em relação ao método de referência para ambos os antifúngicos testados, sem a ocorrência de EMG, EG ou EM, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Suscetibilidade a voriconazol (VCZ) e itraconazol (ITZ) dos isolados de *A. fumigatus* pelos métodos de microdiluição em caldo e TSAF-MS, com valores de concordância categórica (CC).

Antifúngico	Nº LIF	CIM (μg/mL)	Categoria	AFST-MS	CC%
VCZ	3297	2	R	R	100%
	3309	4	R	R	
	3365	4	R	R	
	3492	2	R	R	
	3495	0,5	S	S	
	3519	1	S	S	
	3545	4	R	R	
	3546	4	R	R	
	3608	8	R	R	
	A. fumigatus ATCC 204305	1	S	S	
ITZ	3297	0,25	S	S	100%
	3309	0,5	S	S	
	3365	0,5	S	S	
	3492	0,5	S	S	
	3495	1	S	S	
	3519	0,5	S	S	
	3545	1	S	S	
	3546	2	R	R	
	3608	2	R	R	
	A. fumigatus ATCC 204305	1	S	S	

Todos os isolados de *Aspergillus fumigatus* foram corretamente classificados quanto à suscetibilidade ao VCZ e ITZ após apenas 10 horas de incubação. Isolados previamente caracterizados com mutações no gene *Cyp51A* foram corretamente identificados como resistentes, reforçando a confiabilidade do método; um exemplo representativo da categorização da suscetibilidade pelo TSAF-MS simplificado é apresentado na Fig. 1. Este é o primeiro estudo a demonstrar, em *A. fumigatus*, a viabilidade do TSAF-MS com apenas três concentrações de antifúngicos azólicos e um tempo de incubação reduzido, destacando o potencial do método para análises rápidas de suscetibilidade antifúngica.

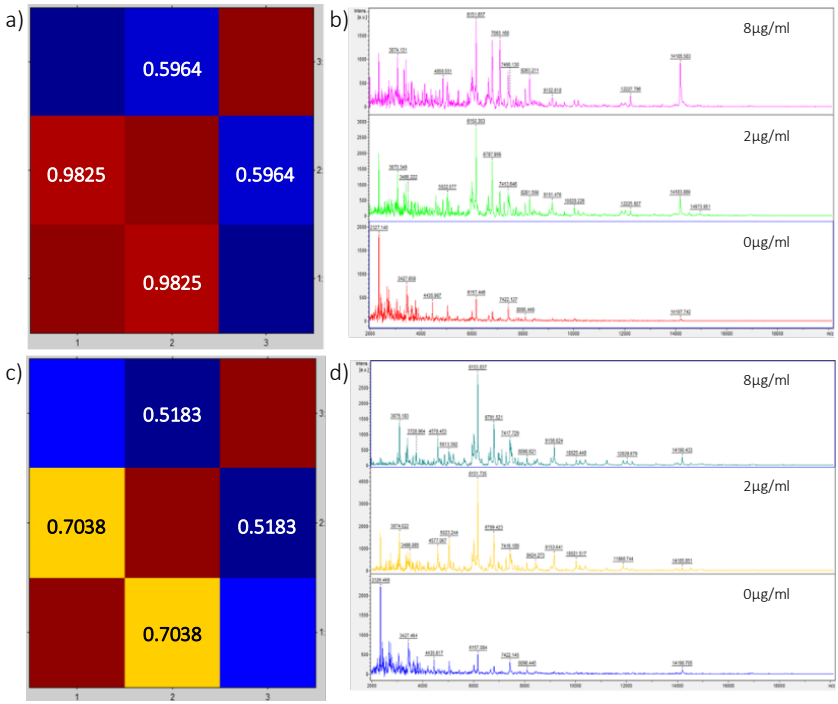


Fig 1. Exemplos representativos da categorização de suscetibilidade pelo TSAF-MS para o isolado *A. fumigatus* LIF3546 frente ao VCZ e ao ITZ.

As subfiguras a) e b) correspondem aos ensaios com VCZ, enquanto as subfiguras c) e d) referem-se aos ensaios com ITZ. Em a) e c), apresentam-se as matrizes de correlação derivadas do ICC dos espectros de massa obtidos por MALDI-TOF MS. O isolado LIF3546, previamente identificado como portador de mutações no gene *Cyp51A*, foi classificado como resistente a ambas as drogas, apresentando ICC entre 2 e 8 µg/mL inferior ao ICC entre 2 e 0 µg/mL (VCZ: 0,5964 < 0,9825; ITZ: 0,5183 < 0,7038). As subfiguras b) e d) exibem os espectros representativos obtidos para cada concentração (0, 2 e 8 µg/mL), visualizados no software FlexControl 3.4 (Bruker Daltonics, Alemanha). Alterações mínimas após a exposição ao antifúngico são observadas em ambos os compostos.

4. Conclusões e Impacto Social

O TSAF-MS simplificado apresentou bom desempenho na avaliação rápida da suscetibilidade antifúngica de *A. fumigatus* a VCZ e ITZ, reduzindo significativamente o tempo de resposta em comparação aos métodos convencionais. A implementação dessa metodologia pode contribuir para decisões terapêuticas mais precoces, otimização do uso de antifúngicos e, com isso, redução da mortalidade associada à aspergilose invasiva, representando um impacto direto na saúde pública.

Agradecimentos

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de estudos, ao Laboratório de Microbiologia do HC-Unicamp e ao Laboratório de Investigação em Fungos (LIF) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pelo apoio à realização deste trabalho.

Referências

Lockhart, S.R.; Chowdhary, A.; Gold, J.A.W. The rapid emergence of antifungal-resistant human-pathogenic fungi. Nature Reviews Microbiology 2023, 21, 818–32.

Pontes, L.; Beraquet, C.A.G.; Arai, T.; Pigolli, G.L.; Lyra, L.; Watanabe, A. *et al. Aspergillus fumigatus* clinical isolates carrying *CYP51A* with *TR34/L98H/S297T/F495I* substitutions detected after four-year retrospective azole resistance screening in Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2020, 21;64, e02059-19.

Giordano, A.L.P.L.; Pontes, L.; Beraquet, C.A.G.; Lyra, L.; Schreiber, A.Z.; Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry azole susceptibility assessment in *Candida* and *Aspergillus* species. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2023, 118, e220213.

Aplicação de espectroscopia por infravermelho para identificação rápida de espécies de *Aspergillus*

CO6

Arthur Felipe Cavalcanti de Matos[1]*, Amanda Gabriela da Silva[1,2], Halana Lirena Naoma Oliveira[1,2], Camylla Carvalho de Melo[1,2], Karla Roberta Soares Rodrigues[1,2], Maria Luiza Brito de Lima[1], Carlos Alberto das Neves de Andrade[1], Wendell Wons Neves[1], Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto[1,2]

[1]*Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Doenças Tropicais, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil*
[2]*Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil*

E-mail: arthur.cavalcanti@ufpe.br*

Resumo: A aspergilose representa um desafio para a saúde pública, especialmente em pacientes imunocomprometidos. O objetivo desta abordagem foi aplicar a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier na identificação de isolados clínicos de *Aspergillus*. Foram obtidos espectros de quatro espécies a partir de 10 isolados. Os resultados demonstraram discriminação entre as espécies, evidenciando o potencial da técnica como ferramenta promissora para o diagnóstico.

Palavras-chave: *Aspergillus* spp.; aspergilose; FT-IR; identificação de fungos

1. Introdução

A Aspergilose é uma infecção causada por fungos do gênero *Aspergillus* e representa um desafio crescente para a saúde pública, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Suas manifestações clínicas são diversas, podendo variar desde quadros alérgicos até formas invasivas potencialmente fatais (Lamberto *et al.,* 2023). O diagnóstico da aspergilose invasiva (AI) baseia-se em critérios que integram fatores relacionados ao hospedeiro com evidências clínicas, laboratoriais e radiológicas, conforme estabelecido pelo Comitê de Infecções Fúngicas Invasivas da *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) em colaboração com o *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID/NIH/USA). As metodologias diagnósticas tradicionais, como o isolamento do agente etiológico em cultura e a pesquisa do antígeno galactomanana, apesar de amplamente empregadas, apresentam limitações em termos de sensibilidade, especificidade e tempo de resposta, o que pode comprometer a conduta terapêutica. Nesse cenário, técnicas moleculares baseadas em proteômica vêm ganhando destaque por sua precisão e rapidez. Entre elas, a espectrometria de massas por MALDI-TOF tem sido utilizada com sucesso para a

identificação de *Aspergillus* spp. (Ferraz *et al.,* 2022). Recentemente, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) emergiu como uma ferramenta promissora na identificação fúngica, por ser uma metodologia rápida, não destrutiva e baseada em perfis moleculares únicos das espécies (Medeiros *et al*., 2026). Assim, essa abordagem permite a detecção baseada em perfis biomoleculares exclusivos, promovendo uma identificação eficiente sem a necessidade de etapas de cultivo demoradas. Considerando o impacto clínico da aspergilose e as limitações das técnicas convencionais, investir em metodologias inovadoras, como o FT-IR para a identificação rápida de isolados clínicos de *Aspergillus* spp., representa um avanço significativo para o diagnóstico micológico, com potencial para reduzir a morbimortalidade associada à infecção e otimizar o manejo terapêutico dos pacientes.

2. Materiais e Métodos

As cepas clínicas de *Aspergillus* foram isoladas de lavado broncoalveolar, semeadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol. As placas foram incubadas em triplicata, à temperatura ambiente, a 37 e 40 °C por até 15 dias. Após o crescimento, as colônias foram identificadas com base em suas características macro- e micromorfológicas e proteômica. Para obtenção dos espectros proteicos por MALDI-TOF, os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose a 37 °C por 48 h (Lima-Neto *et al.*, 2019). Após o crescimento, o material superficial da colônia foi aplicado em placa de aço e recoberto com ácido fórmico e matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). Os espectros foram obtidos utilizando laser Nd:YAG, na faixa de massas entre 2.000 e 20.000 Da, com acúmulo de 600 disparos por espectro. As listas de picos geradas foram comparadas ao banco de dados do software MALDI Biotyper 5.1.420. Para análise por espectroscopia de infravermelho, os isolados foram inicialmente semeados em ágar Sabouraud dextrose e incubados à temperatura ambiente por, no mínimo, 48 h. Após o crescimento, foi preparada uma suspensão celular padronizada na escala 10^{10} de McFarland, seguida da adição de 70 mL de etanol a 70% e 70 mL de água ultrapura (1:1). Para cada isolado, cinco réplicas foram depositadas em placa de silício e analisadas em IR Biotyper®. Os espectros foram adquiridos com 32 varreduras, resolução de 6 cm^{-1} e posteriormente processados no software OPUS v8.2. Apenas espectros que atenderam aos critérios de qualidade pré-estabelecidos foram considerados para análise. Os dados espectrais foram submetidos ao cálculo da segunda derivada, normalização por vetor e cálculo da média dos espectros válidos, com posterior geração de dendrogramas utilizando distância euclidiana e método de Ward. A diferenciação entre espécies foi realizada por meio da seleção de regiões espectrais específicas e da comparação entre a segmentação espectral (*splicing method*) utilizando a faixa de polissacarídeos. A interpretação dos dados foi conduzida por Análise Discriminante Linear (LDA), utilizando a identificação dos isolados como variáveis de agrupamento. Foram gerados gráficos bidimensionais e tridimensionais baseados em até 40 componentes principais (PCA).

3. Resultados e Discussão

Foram analisados 10 isolados clínicos de *Aspergillus*. A identificação das espécies foi realizada através de espectrometria de massas por MALDI-TOF, conforme tabela 1.

Tabela 1. Identificação proteômica dos isolados.

Isolados	Espécie	Score MALDI-TOF
ATCC 204305	*Aspergillus fumigatus*	1,80
59B/2024	*Aspergillus terreus*	1,97
76/2024	*Aspergillus fumigatus*	2,15
92/2025	*Aspergillus niger*	2,21
112/2024	*Aspergillus versicolor*	2,22
168/2025	*Aspergillus fumigatus*	2,16
169/2024	*Aspergillus terreus*	1,76
224/2025	*Aspergillus fumigatus*	1,72
259/2025	*Aspergillus fumigatus*	1,89
3590 HOF	*Aspergillus fumigatus*	1,89

Foram obtidos 150 espectros das 10 cepas analisadas, sendo 15 espectros de cada amostra. As amostras foram semeadas em três réplicas biológicas, em dias diferentes e inoculadas em quintuplicatas técnicas conforme protocolo descrito por De Melo *et al.* (2025). Todas as amostras foram submetidas aos critérios de análise de qualidade espectral do software e foram aprovadas. Gráficos 2D e 3D foram gerados utilizando o parâmetro PCA 0.92/20, na faixa espectral 1300-800 cm^{-1}, com análise de seis componentes principais, obtendo-se uma variância de 96,7%, onde se observou o agrupamento dos espectros de acordo com os isolados clínicos (Figuras 1 e 2).

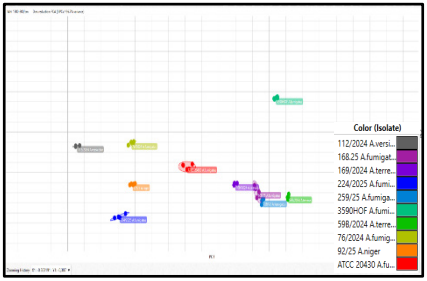


Figura 1- Gráfico bidimensional obtido pela análise espectral por *splicing* na faixa de carboidratos.

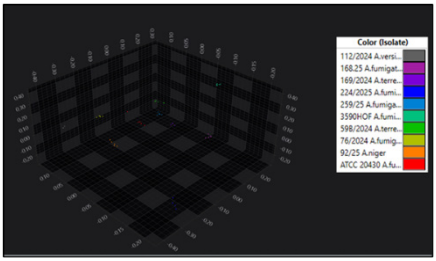


Figura 2 - Distribuição espectral tridimensional obtida por splicing na faixa de carboidratos.

Pequenas variâncias intra-específicas foram observadas entre as cepas de *A. fumigatus*, contudo, foi possível obter uma clara distinção espectral entre essa espécie e os espectros obtidos das cepas de *A. versicolor* e *A. niger*. Uma análise de agrupamento hierárquico foi realizada e um dendrograma foi gerado (Figura 3), utilizando o algoritmo da distância Euclidiana e UPGMA para avaliar a similaridade entre os dados, sendo o valor de *cut-off* 0,1017, calculado automaticamente

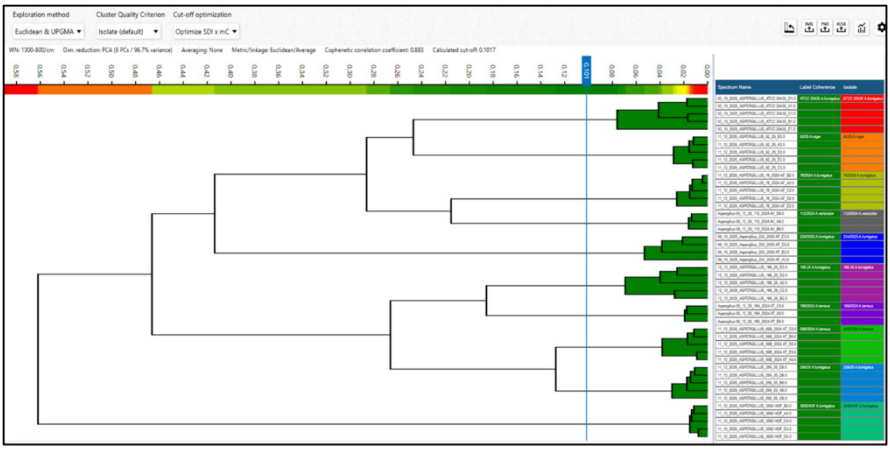


Figura 3 - Dendrograma gerado pelo método Euclidiano e UPGMA.

Conforme observado nas Figuras 1 e 2, além do dendrograma, os isolados foram distribuídos conforme a espécie. Os espectros agruparam-se nos nós correspondentes, não havendo dispersão dos espectros entre as espécies. Nas Figuras 1 e 2 foi observada uma sobreposição de espectros entre a cepa de *A. terreus* e duas cepas de *A. fumigatus.* Na Figura 3 foi observada proximidade entre os clusters de *A. fumigatus* e *A. terreus,* indicando a necessidade de ampliar o estudo espectral a partir da obtenção de novos isolados. Análises utilizando FT-IR em isolados de fungos filamentosos ainda não se encontram consolidadas na literatura, entretanto, análises com amostras de bactérias e leveduras já apresentaram resultados consistentes, tendo sido observada diferenciação de espécies e de clados inter-específicos (De Melo *et al.,* 2025).

4. Conclusões e Impacto Social

Nossas análises iniciais utilizando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) diferenciaram com sucesso cepas de *Aspergillus* de espécies diferentes, apresentando-se como uma metodologia rápida, inovadora e de baixo custo com potencial para a identificação de fungos filamentosos. Entretanto, se faz necessária a obtenção de novas cepas para tornar os dados mais robustos e reprodutíveis. A identificação precisa de espécies de *Aspergillus* possui importância significativa no direcionamento da terapêutica adequada, reduzindo a morbimortalidade associada à infecção e aos custos hospitalares.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) pelo apoio concedido por meio da Chamada CNPq/MCTI nº 22/2024 (processo nº 444638/2024-5). Agradecemos também à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro disponibilizado através do Edital FACEPE nº 01/2025, no âmbito do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), que contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências

De Melo, C.C. *et al.* Clade distinction and tracking of clonal spread by Fourier-transform infrared spectroscopy in multicenter *Candida (Candidozyma) auris* outbreak. *Mycoses* 2025, 68, e70085.

Ferraz, T.L.L. *et al.* Lethal destructive sinusopathy due to amphotericin B-resistant *Aspergillus flavus*: a case report. *Revista Iberoamericana de Micología* 2022, 39, 21–24.

Lamberto, Y. *et al.* Aspergilosis invasiva: definiciones, diagnóstico y tratamiento. *Medicina (Buenos Aires)* 2023, 83, 82–95.

Lima-Neto, R.G.; Le Pape, P.; Neves, R.P. *Aspergillus* spp. pocket guide to mycological diagnosis. 2021, 83-89.

Medeiros, A.G.J.; Nascimento, A.L.F; Rossato, L. *et al.* Infrared spectroscopy as a promising tool for diagnosing and typing human pathogenic fungi *Mycoses* 2026, 1, e70151.

Esporotricose: da invisibilidade epidemiológica à revolução biotecnológica no diagnóstico

CO7

Rejane Pereira Neves*, Isabelly Guimarães Silva, Maria Alice Ribeiro Alves, Greicilene Maria Rodrigues Albuquerque, Cícero Pinheiro Inácio

Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil

*E-mail: *rejane.neves@ufpe.br*

Resumo: A esporotricose é uma micose emergente no Brasil, frequentemente associada à transmissão zoonótica. Neste estudo, 74 casos foram confirmados entre 1.039 pacientes avaliados em Pernambuco, com predominância de *Sporothrix brasiliensis*. A identificação molecular e por MALDI-TOF MS mostrou alta concordância, evidenciando a utilidade dessas abordagens no diagnóstico rápido e preciso da doença.

Palavras-chave: Esporotricose; *Sporothrix brasiliensis;* diagnóstico; MALDI-TOF; zoonose

1. Introdução

O gênero *Sporothrix* reúne espécies ambientais, comumente associadas à madeira, plantas e solo em decomposição, e de importância clínica. Algumas espécies pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, como *S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu stricto*, *S. globosa* e *S. luriei*, têm importância clínica, pois estão diretamente envolvidas na ocorrência de esporotricose em humanos e animais (Gremião *et al.*, 2017).

Esses microrganismos são termodimórficos, sendo que o parasitismo no hospedeiro é representado pela forma leveduriforme (Gremião *et al.*, 2017). A esporotricose foi comumente associada a uma infecção benigna, limitada à pele e ao tecido subcutâneo. Contudo, quadros mais graves e disseminados podem ocorrer. Em humanos, a infecção costuma resultar da inoculação traumática do fungo na pele ou nas mucosas, frequentemente durante o contato com solo, vegetação ou matéria orgânica. No Brasil, com destaque para o estado de Pernambuco, também tem sido amplamente documentada a transmissão zoonótica.

Do ponto de vista de identificação microbiológica, este ainda é demorado e representa uma limitação importante, particularmente em apresentações clínicas atípicas. Assim, a classificação do agente etiológico costuma basear-se em características fenotípicas, incluindo aspectos macro- e microscópicos das colônias, além de perfis bioquímicos. Entretanto, abordagens exclusivamente baseadas na taxonomia clássica frequentemente

não permitem uma distinção precisa entre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii* (Rodrigues *et al.*, 2016; Rudramurthy e Chakrabarti, 2017).

Diante dessas limitações, métodos mais rápidos e acurados têm sido propostos. Entre eles, destacam-se as abordagens moleculares baseadas em PCR, com sequenciamento de genes como calmodulina e beta-tubulina, que apresentam elevada sensibilidade e especificidade, além de custo relativamente acessível. Ainda assim, há poucos estudos que exploram a aplicação direta dessas técnicas em amostras clínicas (Rodrigues *et al.*, 2015; Rudramurthy e Chakrabarti, 2017). Outra ferramenta que vem ganhando espaço em laboratórios de microbiologia é a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS), que permite a identificação rápida de bactérias e fungos. Apesar do seu potencial, os sistemas comerciais atualmente disponíveis ainda não dispõem de bancos de dados suficientemente robustos para diferenciar as espécies associadas à esporotricose. Assim, torna-se necessária a construção de bibliotecas proteômicas específicas para os membros do complexo *Sporothrix* (Oliveira *et al.*, 2015). Nesse contexto, a integração de diferentes abordagens ômicas se mostra essencial para aumentar a precisão diagnóstica e reduzir erros decorrentes de identificação inadequada.

2. Materiais e Métodos

2.1 Obtenção e processamento das amostras clínicas

As amostras clínicas foram obtidas de pacientes atendidos no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos e no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas, ambos da UFPE, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.

2.2 Estudos genómicos e filogenéticos

Após a extração de DNA foi realizada a identificação molecular por sequenciamento das regiões genômicas da calmodulina (primers CL1- 5'-GA(AG)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC-3' e CL2A- 5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3') e beta tubulina (primers Bt2F –5'-GG[CT]AACCA(AG)AT(ATC)GGTGC(CT)-3'e Bt2R -5'ACCCTC(AG)GTGT AGTGACCCTTGGC-3'). Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit GenJET PCR Purification (Thermo Fisher, Reino Unido), de acordo com as recomendações do fabricante, e sequenciados, seguindo os protocolos da Plataforma de Sequenciamento do Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

2.3 Identificação por espectrometria de massa de ionização por desorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF MS)

A extração proteica foi conduzida por meio de um protocolo baseado no uso de etanol a 70% e ácido fórmico a 70%. Os espectros de massa dos perfis proteicos foram obtidos utilizando um laser de nitrogênio com comprimento de onda de 337 nm. A análise dos espectros foi realizada com o software Biotyper™ versão 3.1 (Bruker Daltonics), sendo os dados gerados posteriormente confrontados com a biblioteca de referência disponível no sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonics). A identificação em nível de espécie foi considerada confiável quando os valores de escore logarítmico obtidos foram superiores a 2.

3. Resultados e Discussão

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 73003017400005208), foram iniciadas as coletas de amostras clínicas de pacientes com suspeita de esporotricose. No ano de 2018, um total de 1.039 pacientes foi atendido no Setor de Dermatologia do Hospital das Clínicas e no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos (UFPE). Dentre esses, 74 casos (7,1%) tiveram confirmação laboratorial para esporotricose, evidenciando a relevância da micose na rotina clínica regional.

A análise epidemiológica demonstrou maior frequência da infecção em indivíduos do sexo feminino (64,9%) em comparação ao sexo masculino (35,1%), com ampla distribuição etária (2 a 83 anos). Esse padrão pode estar associado ao maior contato doméstico com animais, especialmente felinos, reconhecidos como importantes reservatórios e transmissores do agente no Brasil, reforçando o perfil zoonótico da doença descrito por Gremião *et al.* (2017). Além disso, a diversidade etária observada confirma o caráter não restritivo da esporotricose, podendo acometer diferentes grupos populacionais.

Foram obtidas 74 culturas fúngicas pertencentes ao complexo *Sporothrix*, das quais 26 foram genotipicamente identificadas por meio do sequenciamento parcial do gene da calmodulina (CAL). Entre essas, houve predomínio expressivo de *Sporothrix brasiliensis* (24 isolados), enquanto 2 isolados foram identificados como *Sporothrix schenckii* (Figura 1).

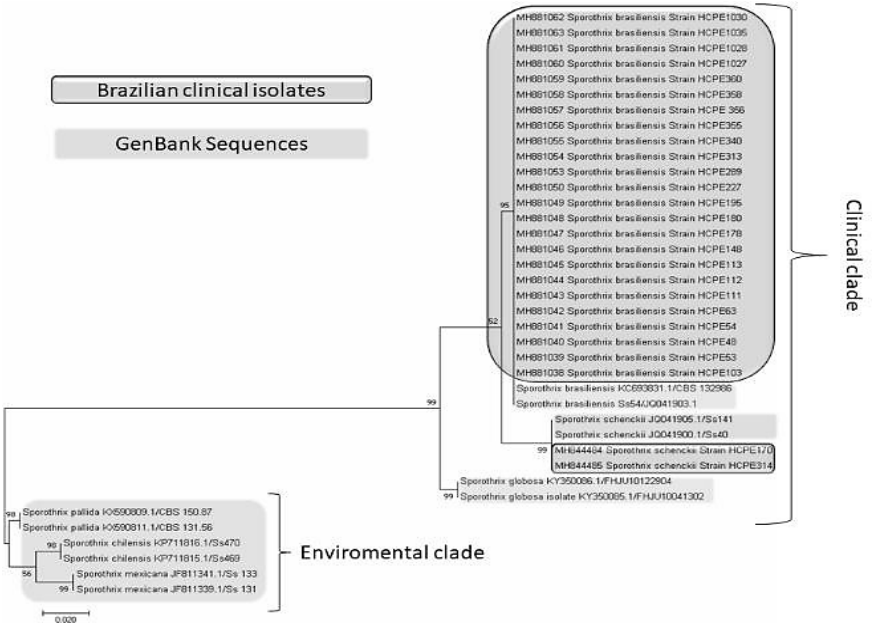


Figura 1: Filograma do complexo *Sporothrix schenckii* a partir da PCR do gene CAL, gerado pelo método de Máxima Verossimilhança através do software Mega7.0.

Esse achado corrobora estudos prévios que apontam *S. brasiliensis* como a principal espécie envolvida nos surtos zoonóticos no Brasil, frequentemente associada a maior virulência e capacidade de disseminação (Rodrigues *et al.*, 2015; Almeida-Paes *et al.,* 2017).

A predominância de *S. brasiliensis* também pode explicar, em parte, o aumento do número de casos na região, uma vez que essa espécie apresenta maior adaptação ao hospedeiro felino, favorecendo a transmissão entre animais e humanos (Gremião *et al.*, 2017). Esse cenário reforça a necessidade de vigilância epidemiológica contínua e de estratégias de controle voltadas à interface humano-animal.

De forma complementar, a identificação das cepas por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) apresentou resultados concordantes com a análise molecular, evidenciando o potencial dessa técnica como ferramenta rápida e confiável para identificação de espécies do complexo *Sporothrix*. A utilização do MALDI-TOF tem sido amplamente discutida como alternativa promissora na micologia médica, devido à sua rapidez e alta reprodutibilidade. No entanto, sua aplicação ainda depende da disponibilidade de bancos de dados robustos e bem curados, especialmente para microrganismos emergentes, como destacado por Oliveira *et al.* (2015).

Embora métodos moleculares, como o sequenciamento do gene CAL, permaneçam como referência para identificação precisa das espécies, técnicas como o MALDI-TOF MS representam um avanço significativo na rotina laboratorial, reduzindo o tempo diagnóstico e possibilitando intervenções terapêuticas mais precoces. Contudo, a padronização e ampliação de bibliotecas proteômicas específicas ainda são desafios a serem superados para consolidar seu uso na identificação de fungos dimórficos (Rudramurthy e Chakrabarti, 2017).

Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo reforçam o papel predominante de *S. brasiliensis* na epidemiologia da esporotricose em Pernambuco e destacam a importância da integração de métodos fenotípicos, moleculares e proteômicos para uma identificação mais precisa e rápida dos agentes etiológicos. Essa abordagem integrada é fundamental para o aprimoramento do diagnóstico, manejo clínico e controle da doença

4. Conclusões e Impacto Social

Os resultados deste estudo evidenciam a predominância de *Sporothrix brasiliensis* como principal agente etiológico da esporotricose na região de Pernambuco, reforçando o papel central da transmissão zoonótica, especialmente envolvendo felinos. A associação entre métodos moleculares e proteômicos demonstrou ser uma estratégia eficaz para a identificação rápida e precisa das espécies, contribuindo para o aprimoramento do diagnóstico laboratorial. Do ponto de vista social, a esporotricose configura-se como um importante problema de saúde pública, sobretudo em áreas urbanas com alta densidade populacional e significativa interação entre humanos e animais domésticos. O aumento de casos relacionados à transmissão por gatos destaca a necessidade de ações integradas de vigilância, educação em saúde e controle de zoonoses. Nesse contexto, os achados deste trabalho podem subsidiar políticas públicas voltadas ao diagnóstico precoce, tratamento adequado e prevenção da disseminação da doença, promovendo impactos positivos tanto na saúde humana quanto no bem-estar animal.

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio financeiro de importantes agências de fomento à pesquisa no Brasil. Nesse sentido, os autores reconhecem e agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento que viabilizou o desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

Almeida-Paes, R.; de Oliveira, M.M.E.; Freitas, D.F.S.; do Valle, A.C.F.; Zancopé-Oliveira, R.M. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to in vivo resistance. Medical Mycology 2017, myw103.

Gremião, I.D.F.; Miranda, L.H.M.; Reis, E.G.; Rodrigues, A.M.; Pereira, S.A. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: Cat to human transmission. PLoS Pathogens 2017, 13(1), e1006077.

Oliveira, M.M.E.; Santos, C.; Sampaio, P.; Romeo, O.; Almeida-Paes, R.; Pais, C.; Lima, N.; Zancopé-Oliveira, R.M. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. Research in Microbiology 2015, 166, 102–110.

Rodrigues, A.M.; de Hoog, G.S.; Camargo, Z.P. Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. Frontiers in Microbiology 2015, 6, 1385.

Rudramurthy, S.M.; Chakrabarti, A. Sporotrichosis: Update on diagnostic techniques. Current Fungal Infection Reports 2017, 11, 134–141.

Impacto da topografia da placa de alvo na qualidade da identificação de leveduras por MALDI-TOF MS

CO8

Tatiane Nobre Pinto*, Gisela Lara da Costa, Manoel M. E. Oliveira

Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, (RJ), Brasil

E-mail: tatianepinto@aluno.fiocruz.br*

Resumo: Este estudo avaliou a eficácia das placas-alvo MALDI de aço polido e aço fosco na identificação de leveduras. A análise estatística de teste t pareado indicou diferença estatística significativa (p = 0,023) e as placas de aço fosco apresentaram pontuações *log-score* mais altas, sugerindo que a microtopografia da placa-alvo influencia o desempenho do MALDI-TOF MS.

Palavras-chave: leveduras; MALDI-TOF MS; placas-alvo

1. Introdução

A técnica de espectrometria de massas assistida por matriz de ionização a laser por dessorção (MALDI-TOF MS) se baseia na ionização de amostras por meio da absorção de energia de um laser por uma matriz cristalina, seguida pela separação dos íons com base em sua razão massa/carga (m/z) em um analisador de massas do tipo tempo de voo (Tran *et al.*, 2020). Essa técnica apresenta diversas vantagens como a capacidade de análise de biomoléculas, como proteínas, com alta sensibilidade, precisão e rapidez, a possibilidade de análise direta de amostras, a relativa simplicidade de preparo de amostras e o baixo custo frente a outras técnicas moleculares (Roemling *et al.*, 2020). Dessa forma, MALDI-TOF MS tem sido aplicada em diversas áreas, inclusive na identificação de fungos.

Com o aumento global de infecções fúngicas invasivas, impulsionadas por fatores como as mudanças climáticas, a resistência antifúngica e o aumento da população imunocomprometida, a identificação rápida de leveduras emergentes se tornou crítica, e o sistema MALDI-TOF MS trouxe agilidade ao diagnóstico (Roemling *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020). Apesar disso, a técnica apresenta algumas dificuldades para a identificação de fungos relacionadas à qualidade da amostra, preparação do material e limitações das bases de dados. Além disso, as características particulares da parede celular dos fungos, que apresenta maior rigidez e pigmentação, dificultam a lise celular e afetam a ionização das proteínas, impactando a geração de espectros de massa consistentes. Dessa forma, a identificação de fungos por MALDI-TOF MS exige protocolos de extração específicos como, por exemplo, a lise química *on-target* com ácido fórmico a 70% (Buchan *et al.*, 2013). Sabendo que a eficácia da lise e a subsequente co-cristalização com a matriz (HCCA) podem

ser afetadas pela microtopografia da placa de alvo, e que a maioria das pesquisas foca em métodos de extração proteica, bancos de dados espectrais e otimização do tempo e meio de cultivo para melhorar a identificação fúngica, sem detalhar o papel da superfície física da placa (Kurbatova *et al.*, 2025). Este estudo compara o desempenho das placas de aço polido e aço fosco na otimização dos *log-scores* de identificação de leveduras.

2. Materiais e Métodos

2.1. Isolados e preparação

Foram selecionados 248 isolados de origem clínica e ambiental que foram analisados no período de outubro de 2025 e fevereiro de 2026. Para o crescimento das leveduras foi utilizado meio Sabouraud dextrose ágar. Após a inoculação das amostras, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 a 48 h. Cada isolado foi testado em ambos os tipos de placas e o preparo e a aplicação das amostras nas placas foram realizados, simultaneamente, sempre pelo mesmo analista, totalizando 8 análises consecutivas. As amostras foram aplicadas diretamente sobre as placas de aço polido e aço fosco (não polido), seguidas da aplicação de 1 µl de ácido fórmico a 70% e, após secagem, de 1 µl de matriz HCCA. Para evitar carry-over, após cada análise executada, as placas eram limpas e submetidas a banho de limpeza com etanol no ultrassom por 5 minutos.

2.2. Aquisição dos espectros

A aquisição dos espectros de massa foi realizada em equipamento do sistema Microflex LT/SH (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O equipamento foi operado em modo linear positivo, controlado pelo software flexControl (versão 3.4) e os dados foram processados pelo servidor MALDI Biotyper (versão 4.1.100). Previamente a cada sessão de leitura, o equipamento foi calibrado utilizando o padrão bacteriano de referência (*Bacterial Test Standard* - BTS 255343, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A faixa de massa analisada compreendeu o intervalo de 2.000 a 20.000 Da, foco principal para a detecção de proteínas ribossomais. A biblioteca de referência utilizada para a comparação foi a MBT Filamentous Fungi Library da MALDI Biotyper® Reference Library. As placas foram processadas em intervalos de tempo imediatos de maneira a garantir as mesmas condições operacionais do espectrômetro de massa.

2.3. Análise estatística

Os dados obtidos foram exportados do software MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e submetidos a uma análise comparativa pareada. A avaliação de desempenho de cada placa foi realizada conforme os parâmetros do fabricante e classificada em três categorias de confiança na identificação: Identificação de alta fiabilidade: *Log-score* ≥ 2,00, com a identificação confiável a nível de espécie; Identificação de baixa fiabilidade: *Log-score* entre 1,70 e 1,99, com identificação confiável ao nível de gênero; e Identificação de organismo impossível: *Log-score* ≤ 1,70 ou ausência de picos detectáveis (score 0,00).

A eficiência técnica foi calculada com base na capacidade de cada placa em gerar uma identificação válida (*Log-score* ≥ 1,70) na primeira tentativa de aquisição de espectros. Casos de "nenhum pico encontrado" (*no peaks found*) foram contabilizados como falhas técnicas

de dessorção/ionização relacionadas à superfície do alvo. As análises foram executadas em duplicatas técnicas processadas simultaneamente.

Os resultados das duas placas foram analisados estatisticamente por meio de teste *t* pareado, considerando que as mesmas amostras foram analisadas em ambas as placas, utilizando o programa GraphPad Prism, versão 9.5 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA). O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Os limites de concordância foram definidos como a diferença média ± 1,96 desvio padrão.

3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos na identificação das amostras estão descritos na tabela 1 e demonstraram os scores e identificações por tipo de placa. Os resultados demonstraram que a placa de aço fosco proporciona *log-scores* consistentemente superiores em comparação às placas de aço polido. A análise estatística de teste *t* pareado demonstrou que não foi observada diferença significativa entre as placas ($p = 0,023$). A placa 2 demonstrou uma capacidade superior de atingir scores na faixa "Ótima" para leveduras com 39,11% das amostras analisadas frente a 25,8% da placa 1.

Tabela 1. Distribuição das classificações dos *scores* obtidos nas análises de identificação microbiana por MALDI-TOF MS nas duas placas analíticas independentes. Os resultados são apresentados como número absoluto de amostras (n) e porcentagem (%).

Classificação do Score	Interpretação	Placa de aço polido (n)	Placa de aço polido	Placa de aço fosco (n)	Placa de aço fosco
≥ 2,0	Identificação confiável em nível de espécie	64	25,8%	96	39,11%
1,7 – 1,99	Identificação provável em nível de gênero	108	43,5%	97	38,70%
Identificação impossível	Falha na capacidade de gerar uma identificação válida (Log-score ≥ 1,70)	76	30,6%	55	22,11%

As análises estatísticas realizadas e a diferença estatisticamente significativa entre as placas na identificação por MALDI-TOF MS, conforme demonstrado pelo teste *t* pareado ($p = 0,023$), demonstram que há evidência estatística de que o score na placa não polida é maior que na placa polida em nossas amostras. Além disso, a placa 2 não apenas reduziu o número de falhas (Identificação impossível), como também elevou a confiabilidade diagnóstica, aumentando o número de identificações a nível de espécie com alta confiança.

Essa superioridade das placas foscas pode estar associada à sua rugosidade microscópica, que pode atuar como sítio de ancoragem para o ácido fórmico e a matriz, evitando o "efeito borda" que pode ser observado em superfícies polidas. Em placas polidas, a amostra tende a se dispersar radialmente, gerando cristais heterogêneos. Na superfície não polida, a cristalização é mais uniforme, garantindo que o laser encontre o melhor ponto

de ionização com maior frequência. Embora a placa de aço fosco exija protocolos de limpeza mais rigorosos, sua eficiência diagnóstica justifica a implementação na rotina de micologia.

A sincronia temporal das execuções experimentais reforça a confiabilidade dos resultados, assegurando que as condições operacionais do espectrômetro de massa, como, por exemplo, a estabilidade da fonte de vácuo, a energia do laser de nitrogênio e a temperatura ambiente do laboratório, permaneceram constantes durante a comparação. Dessa forma, as discrepâncias observadas nos *log-scores* e a superioridade na taxa de sucesso da placa de aço fosco não podem ser atribuídas a oscilações instrumentais ou derivas de calibração, mas sim à eficiência intrínseca da microtopografia da superfície do alvo na promoção de uma co-cristalização superior do analito.

4. Conclusões e Impacto Social

A escolha da superfície da placa de alvo não é meramente operacional, mas um fator determinante na qualidade do dado proteômico. Para a identificação de leveduras, a combinação de placas de aço fosco associada à extração ácida *on-target* representa a estratégia mais robusta, elevando os índices de confiança e otimizando o fluxo de trabalho laboratorial. Novas avaliações são necessárias para compreensão dos mecanismos que estão envolvidos na otimização dos resultados na placa de aço fosco.

Agradecimentos

Agradecemos à Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) e a todas as agências de financiamento pelo apoio a este projeto. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

Tran. A., Alby. K., Bhakta. A., Waddington, M., Lingenfelter B., Miller, M.B. Cost savings realized by implementation of routine microbiological identification by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. Journal of Clinical Microbiology 2020, 5, 53(8), 2473-2479.

Roemling, U.G., Bader, O. MALDI-TOF MS for the diagnosis of fungal infections. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine 2020, 41(01), 069-083.

Santos, C., Galeano, P., Neto, R., Oliveira, M., Lima, N. MALDI-TOF MS and its requirements for fungal identification. *In* Bridge, P.; Smith, D.; Stackebrandt, E. (Eds); Trends in the Systematics of Bacteria and Fungi, CABI International, 2020, 119-140.

Buchan, B.W., Ledeboer, N.A. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of Clinical Microbiology 2013, 51(5), 1359-66.

Kurbatova, I., Rakitina, D.V. Identification of filamentous fungi with MALDI-TOF: methods and perspectives (literature review). Hygiene and Sanitation 2025. 104(4), 503-509.

Biodegradação em solo de filmes do nanocompósito de PHBV reforçados com nanotubos de carbono

CO9

Tatiana Fritzen Alves[1], Natali Bomfim dos Santos[1]*, Elisa Esposito[2], Ana Paula Lemes[1]*

[1]Laboratório de Tecnologia de Polímeros e Biopolímeros (TecPBio), Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São José dos Campos (SP), Brasil
[2]Laboratório de Sistemas Microbianos, Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São José dos Campos (SP), Brasil

E-mail: aplemes@unifesp.br/natali.bomfim@unifesp.br*

Resumo: Filmes de PHBV e do nanocompósito PHBV/NTC (1% m/m de NTC) foram biodegradados em solo e avaliados por ensaio respirométrico e identificação de microrganismos por meio de plaqueamento em meio TSA e BDA. O PHBV/NTC apresentou maior taxa final de biodegradação em 46 dias de ensaio e maior diversidade microbiana, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e crescimento fúngico expressivo.

Palavras-chave: biodegradação; PHBV; nanocompósitos; nanotubos de carbono

1. Introdução

A substituição dos polímeros sintéticos de origem petroquímica por biopolímeros biodegradáveis, tem se mostrado cada vez mais atrativa devido a sua origem renovável e sua biodegradabilidade. Apesar dessas vantagens, os biopolímeros biodegradáveis possuem limitações para aplicação em diversos setores industriais, como baixa resistência mecânica e baixa estabilidade térmica. Porém, essas propriedades podem ser aprimoradas com a adição de aditivos, como plastificantes, antioxidantes, nucleantes e agentes de reforço, modificando suas propriedades de forma análoga aos polímeros sintéticos.

Dentre esses biopolímeros biodegradáveis está o poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (PHBV), sintetizado por bactérias, pertencente à família dos polihidroxialcanoatos (PHA) (Kaniuk *et al.,*2021). Nanocompósitos de PHBV reforçados com nanotubos de carbono (NTC) têm sido descritos na literatura, uma vez que os NTC são nanocargas capazes de proporcionar melhorias ópticas, térmicas e mecânicas em diferentes polímeros (Rivera-Briso *et al*., 2018).

Apesar de melhorar determinadas propriedades, a inclusão de aditivos pode alterar e/ou prejudicar o processo de biodegradação. Por esse motivo, o presente trabalho teve como objetivo o estudo do processo de biodegradação em solo dos nanocompósitos de PHBV/NTC, contendo 1% de NTC (m/m), por meio de um sistema respirométrico e identificação de microrganismos mais ativos no processo.

2. Materiais e Métodos

No trabalho foram utilizadoa PHBV Natureplaste (400.000–500.000 g·mol^{-1}; 2% mol de HV) e NTC de paredes múltiplas NC7000™ (≥ 90% de pureza, ~9,5 nm de diâmetro e ~1,5 µm de comprimento). Nanocompósitos PHBV/NTC (1% m/m) e filmes de PHBV puro foram produzidos por extrusão e moldagem por compressão. A biodegradação em solo comercial foi avaliada por ensaio respirométrico conforme ASTM D5988-18 (2018), com captura de CO_2 em KOH e titulação com HCl ao longo de 46 dias. Após cerca de 46 dias, amostras foram plaqueadas em meios BDA Merck (Batata Dextrose Ágar) e TSA Kasvi (Triptona Soja Ágar) para isolamento e identificação microbiológica por características morfológicas e coloração de Gram ou azul de algodão.

3. Resultados e Discussão

A Figura 1 abaixo apresenta a taxa de biodegradação no decorrer dos 46 dias. Como esperado, foi observada uma maior taxa de biodegradação para o amido, uma vez que se tratava do controle positivo do ensaio. A cinética de biodegradação do amido mostrou uma maior taxa de biodegradação nos primeiros 11 dias, atingindo ~18%, seguida por uma diminuição da taxa nos 10 dias seguintes, atingindo ~27% de biodegradação (21 dias totais). Após esse período, observa-se que a variação na taxa de biodegradação diminui acentuadamente, resultando em uma taxa quase constante entre 25 e 46 dias de biodegradação, atingindo um valor máximo de ~38%.

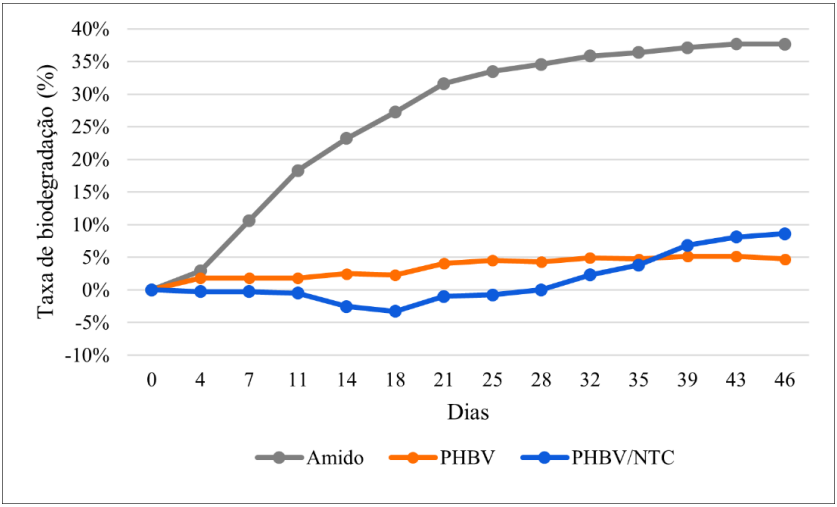


Figura 1. Taxa de biodegradação calculada a partir das emissões cumulativas de CO_2 do amido, PHBV e do PHBV/NTC ao longo dos 46 dias.

No caso das amostras de PHBV e PHBV/NTC, a variação e valor máximo da taxa de biodegradação foram menores em comparação ao controle, atingindo 5% para o PHBV e 9% para o PHBV/NTC. O PHBV apresentou uma taxa de biodegradação superior ao PHBV/NTC nos primeiros 30 dias de ensaio, mas foi superado a partir do 39º dia pelo PHBV/NTC, que atingiu um valor final quase duas vezes maior em comparação ao PHBV. Este resultado não era esperado, uma vez que os NTC são inertes e hidrofóbicos, dificultando a princípio o processo de biodegradação, como verificado no trabalho de Silva *et al.* (2019). Nesse trabalho, foram realizados ensaios de biodegradação em meio líquido, usando consórcio de microrganismos extraídos do solo, e obtidas medidas de perda de massa das amostras ao longo do tempo. Os autores verificaram que filmes de PHBV/NTC com 1 e 2% (m/m) de NTC permaneciam biodegradáveis, mas com menor taxa de biodegradação em função da concentração de NTC, quando comparados ao PHBV puro.

A Figura 2 apresenta as amostras de PHBV e PHBV/NTC após 46 dias do ensaio de biodegradação que foram plaqueadas em meio TSA. Nela, observa-se que a amostra de PHBV apresentou apenas bactérias Gram-positivas, enquanto a amostra de PHBV/NTC apresentou bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Assim, a presença de NTC pode ter promovido alterações na estrutura e morfologia do material, modificando a dinâmica de colonização microbiana, acelerando a biodegradação e/ou aumentando a diversidade da microbiota envolvida no processo. Esse resultado concorda com o resultado obtido no ensaio respirométrico, no qual se verificou uma maior velocidade de biodegradação para a amostra de PHBV/NTC.

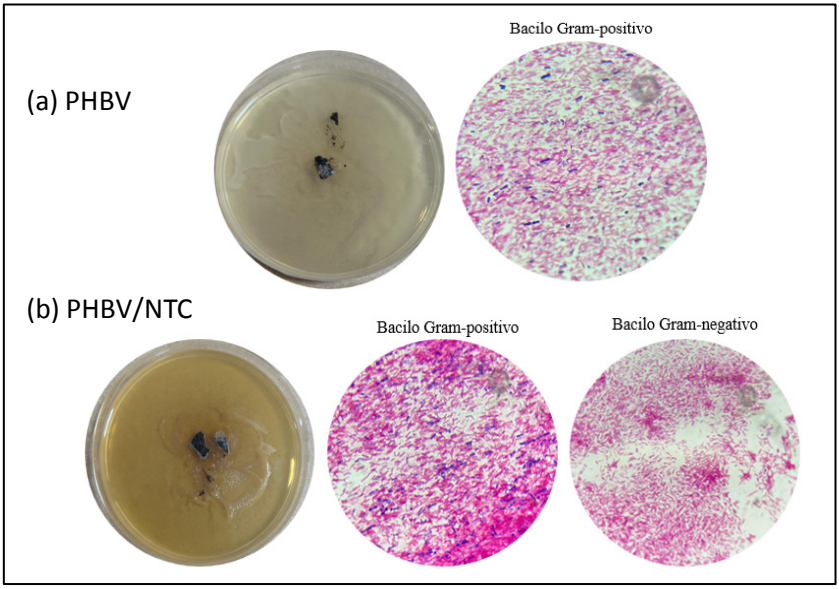


Figura 2. Imagens do plaqueamento em meio TSA das amostras de PHBV (a) e PHBV/NTC (b) e sua análise em microscópio óptico após 46 dias do ensaio de biodegradação. Ampliação em 1.000x.

A Figura 3 apresenta as amostras de PHBV e PHBV/NTC após 46 dias do ensaio de biodegradação que foram plaqueadas em meio BDA.

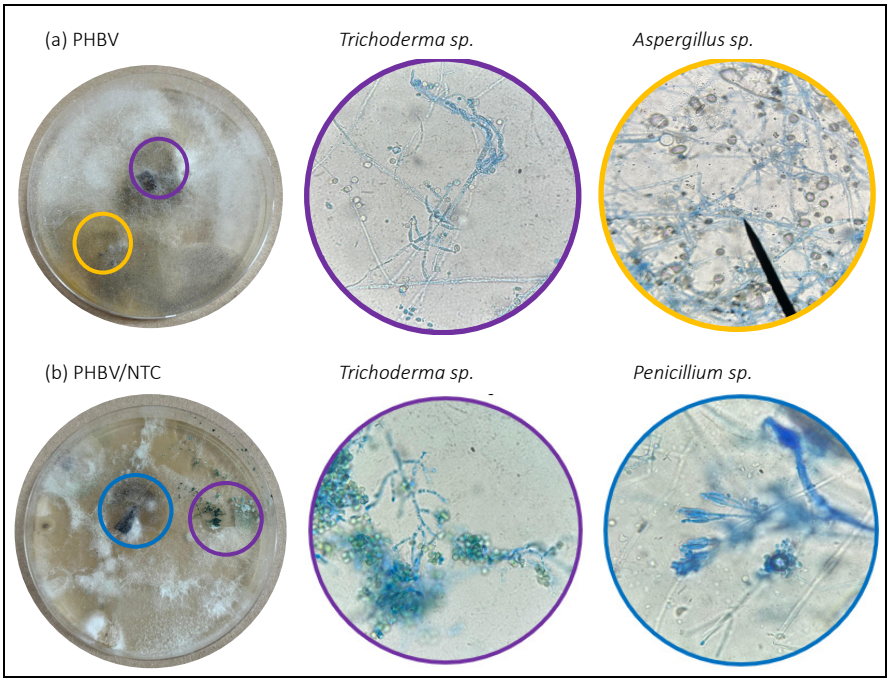


Figura 3. Imagens do plaqueamento em meio BDA das amostras de PHBV (a) e PHBV/NTC (b) e sua análise em microscópio óptico após 46 dias do ensaio de biodegradação. Ampliação em 1000x.

Os resultados da Figura 3 demonstraram um crescimento expressivo de colônias fúngicas, principalmente sobre as amostras de PHBV/NTC. Em geral, foram identificados os gêneros *Aspergillus, Trichoderma e Penicillium,* do filo *Ascomycota*, e leveduras em forma de bastonete. Esses organismos são saprófitas, alimentam-se de matéria orgânica e desempenham um papel crucial na reciclagem de nutrientes nos ecossistemas, por meio de enzimas que quebram complexos orgânicos em moléculas menores, liberando CO_2 e devolvendo esses nutrientes ao solo (Dresch *et al*., 2019). Silva *et al.* (2013) encontraram uma variedade de gêneros similar à encontrada no presente trabalho, em um solo que exibiu maior diversidade fúngica do que bacteriana, e atribuíram ao solo ácido da Amazônia, utilizado no estudo. Além do tipo de solo, característica da amostra, como rugosidade, hidrofobicidade, composição química e grau de cristalinidade, também podem influenciar a seleção das espécies presentes no processo de biodegradação.

4. Conclusões e Impacto Social

Conclui-se que o PHBV e PHBV/NTC permaneceram biodegradáveis em solo, embora com taxas inferiores ao controle positivo (amido). A presença de NTC promoveu uma mudança na dinâmica do processo, resultando em maior taxa final de biodegradação e maior diversidade microbiana, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de crescimento fúngico expressivo. Esses resultados sugerem que os NTC podem ter modificado a estrutura do material e favorecido a colonização microbiana, contribuindo para uma biodegradação mais eficiente ao longo do tempo. Do ponto de vista de impacto social, este estudo contribui para a validação de biopolímeros reforçados como alternativas viáveis aos plásticos convencionais, reduzindo a dependência de materiais de origem petroquímica e promovendo a economia circular. A demonstração de que nanocompósitos PHBV/NTC são biodegradáveis em solo natural é fundamental para sua aceitação regulatória e comercial em aplicações de embalagem e outros usos de curta duração.

Agradecimentos

Agradecemos a UNIFESP, ao Lab TecPBio, e às agências de fomento à pesquisa FAPESP (processo 2019/15976-0) e ao CNPq (processo 308937/2022-8).

Referências

Kaniuk, L.; Stachewicz, U. Development and advantages of biodegradable PHA polymers based on electrospun PHBV fibers for tissue engineering and other biomedical applications. American Chemical Society 2021, 7, 5339-5362.

Rivera-Briso, A.L.; Serrano-Aroca, A. poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate): enhancement strategies for advanced applications. *Polymers*, 2018, 10, 732.

ASTM D5988-18, Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials in soil. ASTM International 2018, West Conshohocken.

Silva, A.P.; Montanheiro, T.L.A.; Montagna, L.S.; Andrade, P.F.; Durán, N.; Lemes, A.P. Effect of carbon nanotubes on the biodegradability of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanocomposites. Journal of Applied Polymer Science 2019, 40, 48020.

Dresch, F.; Lana, D.; Jachetti, M.M. Avaliação das comunidades fúngicas encontradas em amostras de solo: uma revisão sistemática da literatura. Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais 2019, 10, 67-76.

Silva, S.P.; Almeida, S.S.D.; Pinheiro, R.M.L.; Matos, V.I.J.; Lima, S.R.; Araújo, J.P.V.; Oliveira, C.H. Diversity and microbial community in new dark earth soils in Tailândia-Pará, *Brazil* Semina: Ciências Agrárias 2013, 34, 3245-3256.

Prospecção de Actinobactérias em solos da região Tocantina: potencial biotecnológico para a descoberta de novos bioativos CO10

Marcos Vinicius Soares Silva[1]*, Maria Clara Silva dos Santos[2], Danilo Calisto dos Santos[2], Matheus Silva Alves[3]

[1]*Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL), Imperatriz (MA), Brasil*
[2]*Discente do curso de Biomedicina, Universidade Ceuma, Imperatriz (MA), Brasil*
[3]*Universidade Ceuma, Imperatriz (MA), Brasil*

E-mail: marcos.soares@uemasul.edu.br*

Resumo: Este estudo tem como objetivo a prospecção de actinobactérias em solos da Região Tocantina do Maranhão visando identificar linhagens com o potencial biotecnológico para a produção de metabólitos bioativos. As amostras do solo foram coletadas em diferentes ambientes, incluindo os impactados com resíduos sólidos e as margens do rio Tocantins. Após a coleta realizou-se o isolamento por microdiluição seriada e cultivou-se em meio seletivo seguido da caracterização morfológica macroscópica e microscópica. A produção de metabólitos secundários foi obtida em meio líquido para extratação com acetato de etila e posterior avaliação da atividade biológica. Foram obtidos isolados com características típicas de actinobactérias filamentosas evidenciando a diversidade microbiana presente nos solos analisados. Embora não tenham sido observados halos de inibição nos testes antimicrobianos frente a microrganismos indicadores, parte dos isolados apresentou atividade antioxidante significativa. Esses resultados indicam que os solos da Região Tocantina constituem um reservatório promissor de microrganismos com potencial para aplicações biotecnológicas e farmacêuticas.

Palavras-chave: atividade antioxidante; bioprospecção; diversidade microbiana; microbiologia do solo

1. Introdução

As actinobactérias constituem um grupo de bactérias Gram-positivas filamentosas caracterizadas por elevado teor de guanina e citosina (G+C) em seus genomas. Esses microrganismos apresentam crescimento por extensão apical e ramificação de hifas, formando estruturas complexas semelhantes às observadas em fungos filamentosos (Barka *et al.*, 2015). Além de sua diversidade morfológica, as actinobactérias são amplamente reconhecidas como importantes fontes de metabólitos secundários bioativos, incluindo antibióticos, antifúngicos, agentes antitumorais e imunossupressores. Estima-se que mais de

10.000 metabólitos secundários já tenham sido descritos para esse grupo, sendo o gênero *Streptomyces* responsável por mais de 70% dos produtos naturais de origem microbiana conhecidos (Rashad *et al.*, 2015).

No Brasil, a diversidade ambiental representa um importante reservatório de microrganismos com potencial biotecnológico ainda pouco explorado. O estado do Maranhão apresenta uma condição singular de transição entre os biomas Amazônia, Cerrado e Caatinga, o que resulta em elevada heterogeneidade de solos e fitofisionomias (Spinelli-Araújo *et al.*, 2016). Nesse contexto, a Região Tocantina destaca-se como uma área de grande interesse para estudos de prospecção microbiana, uma vez que ambientes de transição ecológica frequentemente abrigam comunidades microbianas altamente diversificadas.

Diante desse cenário, a investigação de actinobactérias presentes em solos da Região Tocantina pode contribuir para a ampliação do conhecimento sobre a diversidade microbiana local e para a identificação de linhagens produtoras de compostos bioativos com potencial aplicação biotecnológica. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar o isolamento e a caracterização morfológica de actinobactérias a partir de amostras de solo coletadas em diferentes áreas da região de Imperatriz, Maranhão.

2. Materiais e Métodos

Trata-se de um estudo experimental realizado a partir de amostras de solo coletadas em diferentes áreas da cidade de Imperatriz, Maranhão, incluindo ambientes impactados por resíduos sólidos e áreas próximas ao rio Tocantins.

As amostras de solo foram submetidas à técnica de diluição seriada em solução salina estéril e, posteriormente, semeadas em meio de cultura seletivo para o isolamento de actinobactérias. As placas foram incubadas em temperatura adequada para o crescimento microbiano, sendo posteriormente avaliadas quanto ao desenvolvimento de colônias com características morfológicas típicas desse grupo.

As colônias suspeitas de pertencer ao grupo das actinobactérias foram isoladas e purificadas, sendo submetidas à caracterização morfológica macroscópica e microscópica. Para a análise microscópica foram empregadas as técnicas de laminocultivo e microcultivo, com coloração utilizando azul de algodão, possibilitando a observação da formação de hifas ramificadas e estruturas reprodutivas características.

Para a obtenção de metabólitos secundários, os isolados selecionados foram cultivados em meio líquido sob condições controladas de incubação. Após o período de crescimento, os cultivos foram centrifugados para a separação da biomassa e do sobrenadante contendo os metabólitos extracelulares. A extração dos compostos bioativos foi realizada utilizando acetato de etila como solvente orgânico, seguida da concentração do extrato em rotaevaporador. O extrato obtido foi ressuspendido em dimetilsulfóxido (DMSO 10%) e utilizado nos ensaios de avaliação biológica.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em ágar, utilizando microrganismos indicadores. Após o período de incubação, os halos de inibição foram mensurados para determinar o potencial antibacteriano dos extratos obtidos.

Adicionalmente, foi realizada triagem para avaliação da atividade antioxidante dos isolados, visando identificar possíveis compostos bioativos com potencial biotecnológico.

3. Resultados e Discussão

A análise dos isolados obtidos a partir das amostras de solo revelou características morfológicas típicas de actinobactérias filamentosas, evidenciadas pela presença de hifas ramificadas observadas em microcultivo. Esses achados confirmam a eficácia do processo de isolamento empregado e indicam a presença de microrganismos pertencentes presumptivamente ao gênero *Streptomyces*.

No que se refere à atividade biológica, os extratos obtidos não apresentaram halos de inibição frente aos microrganismos indicadores avaliados, sugerindo ausência de atividade antimicrobiana nas condições experimentais utilizadas. Entretanto, a triagem antioxidante demonstrou resultado positivo em parte dos isolados provenientes da área de disposição de resíduos sólidos, indicando a produção de compostos com potencial capacidade de neutralização de espécies reativas de oxigênio. A Tabela 1 apresenta a sistematização dos isolados obtidos, suas origens ambientais, bem como os resultados observados nos ensaios microbiológicos e de atividade antioxidante.

A Tabela 1 sistematiza os achados morfológicos e os resultados dos testes biológicos efetuados.

ISOLADOS	ORIGEM	MICROCULTIVO	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (FORMAÇÃO DE HALO)	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
P1 10^{-5}	Rio Tocantins	Hifas ramificadas	Ausente	Negativo
Lic 1	Lixão	Hifas ramificadas	Ausente	Negativo
Lic 2	Lixão	Hifas ramificadas	Ausente	Positivo
Lic 3	Lixão	Hifas ramificadas	Ausente	Positivo

Esses resultados sugerem que os ambientes estudados, especialmente áreas antropizadas, podem atuar como reservatórios de microrganismos com adaptações metabólicas relevantes, reforçando o potencial biotecnológico das actinobactérias presentes nos solos da Região Tocantina.

4. Conclusões e Impacto Social

O presente estudo confirmou a presença de actinobactérias filamentosas em amostras de solo coletadas na região de Imperatriz, Maranhão, evidenciada pela observação de hifas ramificadas características desse grupo microbiano. Embora os extratos obtidos não tenham apresentado atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados nas condições experimentais adotadas, parte dos isolados demonstrou atividade antioxidante, indicando a produção de metabólitos bioativos com potencial aplicação biotecnológica.

Esses resultados reforçam a importância da prospecção microbiana em ambientes naturais e antropizados da Região Tocantina, os quais podem atuar como reservatórios de

microrganismos produtores de compostos de interesse farmacêutico, industrial e ambiental. Assim, a exploração da diversidade microbiana regional contribui não apenas para o avanço do conhecimento científico, mas também para o desenvolvimento de biotecnologias voltadas à saúde e à sustentabilidade.

Referências

Barka, E.A. *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. Microbiology and *Molecular Biology Reviews* 2015, 80, 1, 1-43.

Rashad, F.M. *et al.* Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiological Research* 2015, 175, 34-47.

Spinelli-Araújo, L. *et al.* Conservação da biodiversidade do estado do Maranhão: cenário atual em dados geoespaciais. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2016.

Donald, L. *et al. Streptomyces*: still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. *Microbiology Research* 2022, 13, 3, 418-465.

ID Microbiana

Comunicações
Banners

Identificação de microrganismos em fermentações espontânea e inoculada na produção de cachaça por MALDI-TOF MS

CB1

Ana Paula Pereira Bressani[1]*, João Fernando Silva de Resende Chaves[1], Disney Ribeiro Dias[1], Rosane Freitas Schwan[2]

[1]Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, (MG), Brasil
[2]Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, (MG), Brasil

*E-mail: *apbressani@gmail.com*

Resumo: Este estudo avaliou a microbiota presente em fermentações espontâneas e inoculada na produção de cachaça utilizando *Saccharomyces cerevisiae* CA11. Microrganismos foram isolados no início e no final da fermentação e identificados por MALDI-TOF MS. Foram obtidos 113 isolados, incluindo 69 leveduras e 44 bactérias. As fermentações apresentaram composições microbianas distintas, com predominância de *S. cerevisiae* na inoculada e *Candida valida* na espontânea.

Palavras-chave: cachaça; CA11; cultura iniciadora; MALDI-TOF MS

1. Introdução

A cachaça, uma das bebidas mais representativas do Brasil, possui uma longa história desde a época da colonização portuguesa. Ao longo dos séculos, a bebida se tornou não apenas tradição cultural, como também um produto de importância econômica significativa para o país (de Oliveira *et al.*, 2023).

A produção de cachaça envolve diferentes etapas, dentre elas o plantio da cana, a moagem, fermentação, destilação e armazenamento. Na fermentação, o mosto da cana-de-açúcar desempenha papel crucial na formação de aromas e sabores únicos da cachaça (Mutton *et al.*, 2020; de Oliveira *et al.*, 2023).

A fermentação espontânea ocorre com os microrganismos presentes naturalmente no caldo de cana e no ambiente. Esse tipo de fermentação é conhecido por conferir à cachaça a riqueza de sabores e aromas característicos, muitas vezes associados ao terroir de cada região produtora. No entanto, essa abordagem também traz desafios, como a suscetibilidade a contaminações e variações na qualidade do produto final, em relação a variações nos teores de ácidos orgânicos e compostos secundários presentes. (Ratkovich *et al.*, 2023). Em contraste, a fermentação inoculada com leveduras selecionadas oferece maior controle, previsibilidade de fermentação, mais eficiência (Mutton *et al.*, 2020).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* CA11 é robusta, mais adaptada ao processo de fermentação da cachaça, permanece no processo produtivo, possui fácil separação do mosto

e compete tanto com leveduras não selecionadas quanto com bactérias contaminantes (Mutton *et al.*, 2020; de Oliveira *et al.*, 2023). Além disso, Mutton *et al.* (2020) relacionaram a cachaça fermentada com CA11 com um produto de maior qualidade e melhores características químicas.

Como cada região apresenta características ambientais e microbiota próprias, é possível que as leveduras autóctones possam atribuir características sensoriais diferenciadas da localidade. E mesmo com as dificuldades de padronização, alguns produtores ainda realizam a fermentação espontânea do caldo de cana para fabricação de cachaça sem conhecimento da microbiota presente.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar e identificar a microbiota presente na fermentação espontânea e inoculada com *S. cerevisiae* CA11, além de avaliar a performance de cada fermentação.

2. Materiais e Métodos

2.1 Matéria-prima e processamento da cachaça

O caldo de cana foi obtido a partir da cana saudável (variedade CO-421) e moída no mesmo dia em que a fermentação foi realizada. Para a produção da cachaça a partir da fermentação espontânea, foi utilizado o processamento padrão do alambique (Fazenda Boa Vista, Coronel Xavier Chaves, Minas Gerais, Brasil).

O "pé de cuba" foi elaborado a partir de 20 Kg de farelo de milho (fubá) no fundo do cocho de fermentação. Em seguida, foram adicionados 20 L de água potável, fornecida pela COPASA – Companhia de Saneamento de Minas Gerais, aquecidos a 35 ºC. Esperou-se cerca de 10 dias, e foram adicionados 10 L de caldo a 5 ºBrix e 35 ºC, seguindo assim por mais três dias, abaixando a diluição do caldo, aumentando o volume colocado no cocho e mantendo o aquecimento da mistura. Até que se estabeleça o "pé de cuba" e o fermento espontâneo esteja pronto para uso. Quando a quantidade mínima de biomassa é alcançada (em volume de 150 L), o caldo não passa mais por diluição, sendo colocado direto no cocho, neste experimento foi de 20 °Brix, em temperatura ambiente, com volume final de 600 L.

Para a fermentação utilizando levedura inoculada (*S. cerevisiae* CA11), também foram utilizados 600 L, porém com diluição do teor de açúcar até 14 °Brix. O processamento seguiu o protocolo do fabricante em quatro etapas: as leveduras foram hidratadas com 1:10 em água; ativadas com adição de caldo diluído a 8 ºBrix e aeração do sistema; propagação das leveduras com adição de um volume maior de caldo diluído a 10 ºBrix e aquecido; fermentação com caldo diluído a 16 ºBrix.

Durante o processo fermentativo foram retiradas amostras no início (tempo 0 h- T0) e ao final da fermentação (24 h- T24), quando o ºBrix estava zerado. As amostras foram retiradas na terceira batelada de fermentação, em tubos tipo Falcon estéreis de 50 mL em triplicata.

2.2 Método de isolamento de microrganismos

As amostras coletadas foram imediatamente congeladas e levadas para o laboratório das Fermentações, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA. Para crescimento e isolamento de leveduras foi utilizado o meio de cultura YEPG com pH 3,5 [(g/L:

extrato de levedura 10 (HiMedia), glicose 20 (Dinamica), peptona 20 (HiMedia) e ágar 20 (HiMedia)]. Para crescimento e isolamento de bactérias foi utilizado o meio de cultura Ágar Nutriente com 0,4% de nistatina [Prati Donaduzzi], sendo utilizados 28 g/L.

A técnica de diluição seriada foi realizada com diluições de 10^{-1} a 10^{-5} UFC/mL e plaqueadas em triplicata. As placas de Petri foram incubadas a 28 °C para leveduras e 37 °C para bactérias por 48 h. Após o crescimento dos microrganismos, foram realizadas a contagem e identificação dos morfotipos crescidos nas placas. As características morfológicas foram avaliadas e os morfotipos diferentes foram isolados por estria composta para posterior identificação.

2.3 Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF MS

Para a identificação dos microrganismos, os isolados foram cultivados durante 18 h em placas de YEPG (para leveduras) e Ágar Nutriente (para bactérias). A extração de proteínas foi de acordo com o protocolo estabelecido pela Bruker, utilizando ácido fórmico e acetonitrila (Bruker Daltonics: Bremen, Germany). Um mL de extração foi colocado em cada spot da placa (triplicata), após a secagem, foi coberto com 1 mL da solução matriz alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) previamente preparada em uma concentração final de 10 mg/mL de solução orgânica [etanol:acetonitrila:ácido trifluoracético (10%) 1:1:1]. As placas foram secas em temperatura ambiente e analisadas por MALDI-TOF MS (UltrafleXtreme MALDI-ToF MS—Bruker Daltonics; Bremen, Germany).

Os isolados identificados com score acima de 2,0, foram crescidos em 500 µL de seus respectivos meios de cultura líquido (YEPG e Ágar Nutriente) por 48 h a 28 °C e 37 °C, respectivamente. Após o crescimento, foram adicionados 500 µL de glicerol 40% para preservação e congelamento.

3. Resultados e Discussão

Foram isolados 113 microrganismos, sendo 44 bactérias e 69 leveduras, demonstrando uma ampla diversidade microbiológica no mosto inicial, possivelmente devido à prática de não-pasteurização do caldo. Do total de isolados, apenas 13 bactérias e 6 leveduras não foram identificadas.

Os gráficos presentes na Fig. 1 apresentam leveduras e bactérias identificadas (com score acima de 2 para identificação de espécie e acima de 1,7 para identificação de gênero) em cada período da fermentação.

A microbiota identificada foi diferente durante a fermentação nos tratamentos. Em TC, foram identificados no início da fermentação as leveduras *S. cerevisiae* (predominantemente), *Saccharomycodes ludwigii* e o gênero *Zygosaccharomyces. Pseudmonas stutzeri*, *Microbacterium* e *Pseudoxanthomonas* foram as bactérias identificadas. No final da fermentação, o gênero *Saccharomyces* foi o único identificado para leveduras e *Acinetobacter radioresistens* e *Pseudomonas* para bactéria (Fig. 1).

A presença de *S. ludwigii* pode estar relacionada com a contaminação do caldo de cana, já que foi identificada apenas no início da fermentação. Essa levedura é muito utilizada na produção de cerveja sem ou com baixos teores de álcool devido à sua incapacidade de

fermentar a maltose. Para a cachaça, ela pode ser interessante devido a sua capacidade de produzir compostos aromáticos que agregam sabor à bebida (PUERARI *et al.*, 2016).

Em TE as seguintes leveduras foram identificadas no início da fermentação, predominantemente *Candida valida* (também é conhecida como *Pichia membranifaciens* em telemorfo) e em menor quantidade, o gênero *Saccharomyces*. *P. stutzeri*, *S. aureus*, *Microbacterium* e *Pseudoxanthomonas* foram as bactérias identificadas no início da fermentação. Esse resultado pode indicar que essas bactérias são contaminantes do solo, da cana, da água ou do ambiente de produção. De acordo com Nova (2009), leveduras do gênero *Candida* são frequentemente encontradas em fermento espontâneo e têm a capacidade de se multiplicar no meio dependendo das condições do processo e da reinserção de microrganismos através do caldo de cana.

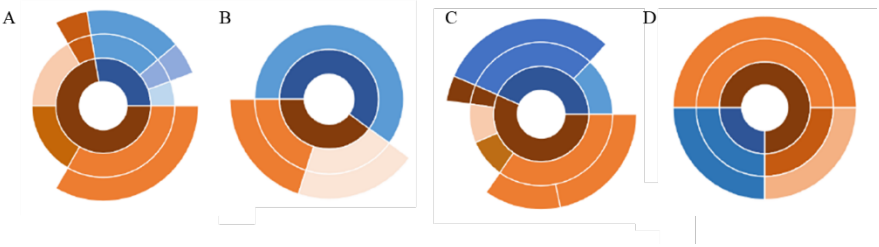


Fig. 1. Identificação dos microrganismos isolados no início e final de fermentação do mosto.

Fermentação com CA11: A = início de fermentação, B = 24 h de fermentação; Fermentação Espontânea: C = início de fermentação, D = 24 h de fermentação.
■ Leveduras: ■ *Saccharomyces/ S. cerevisiae*, ■ *Candida valida*, ■ *Saccharomycodes ludwigii*, ■ *Zygosaccharomyces*.
■ Bactérias: ■ *S. aureus*, ■ *Pseudomonas/ P. stutzeri*, ■ *Microbacterium*, ■ *Bacillus/B. megaterium*, ■ *B. cereus*, ■ *Pseudoxanthomonas*, ■ *Acinetobacter radioresistens*.

Ao final da fermentação espontânea, apenas *C. valida*, *B. cereus* e *Pseudomonas* foram detectados. A persistência de bactérias ao longo da fermentação demonstra que algumas delas têm mais tolerância ao aumento da concentração de etanol e à diminuição do pH no mosto. A bactéria que mais persistiu em ambos os tratamentos (TC e TE) foi a *Pseudomonas stutzeri* que normalmente tem sua origem a partir da água ou do solo.

4. Conclusões e Impacto Social

A técnica MALDI-TOF MS demonstrou ser uma ferramenta rápida e eficiente para a identificação de microrganismos envolvidos na fermentação da cachaça. A composição microbiana variou entre as fermentações espontâneas e inoculadas ao longo do processo fermentativo. Na fermentação inoculada, observou-se predominância de *S. cerevisiae* ao final do processo, indicando maior estabilidade microbiológica e controle da fermentação. Já a fermentação espontânea apresentou predominância de *C. valida* e maior presença de bactérias.

Do ponto de vista social e produtivo, o conhecimento da microbiota associada à fermentação pode contribuir para o aprimoramento do controle microbiológico, da qualidade e da padronização da cachaça. Esses resultados podem auxiliar produtores na adoção de práticas mais seguras e eficientes, fortalecendo a cadeia produtiva e agregando valor a um produto tradicional brasileiro.

Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Laboratório Multiusuário em Microbiologia das Fermentações (LaMFe) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Referências

de Oliveira, A.C.D.; de Oliveira, C.A.F.; KAMIMURA, E.S. Microbial contamination in the ethanol and cachaça fermentation process: impacts and applications. Food Science and Technology 2023, 43, 1-8.

Mutton, M.J.R.; Garcia, G.; Teixeira, V.; Silva, A.F.; Costa, G.H.G.; Ferreira, O.E. The clarification of sugarcane juice and the use of CA-11 yeast produces better quality cachaça. Revista Ciência Agronômica 2020, 51, 1-8.

NOVA, M.X.V.; Schuler, A.R.P.; Brasileiro, B.T.R.V.; Morais Jr., M.A. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. Food Microbiology 2009, 26, 460-466.

PUERARI, C.; Strejc, J.; Souza, A.C.; Karabín, M.; Schwan, R.F.; Bránÿik, T. Optimization of alcohol-free beer production by lager and cachaça yeast strains using response surface methodology. Journal of the Institute of Brewing 2016, 122, 69-75.

Ratkovich, N.; Esser, C.; de Resende Machado, A.M.; Mendes, B.A.; Cardoso, M.G. The spirit of cachaça Production: An umbrella review of processes, flavour, contaminants and quality improvement. Foods 2023, 12, 17, 3325.

Estudo molecular multi-locus para a identificação de uma presuntiva nova espécie de *Trichoderma* do arquipélago de Alcatrazes

CB2

Gabriel L. P. Gonçalves[1], Darcy D. T. Jiménez[1], João Trovão[2,3], Célia Soares[2,3], Nelson Lima[2,3], Roberto G. S. Berlinck[4], Simone P. Lira[1]*

[1]*Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, (SP), Brasil*
[2]*Micoteca da Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal*
[3]*LABBELS (Laboratório Associado, Braga/Guimarães), Universidade do Minho, Braga, Portugal*
[4]*Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, (SP), Brasil*

E-mail: splira@usp.br*

Resumo: Foi realizada análise molecular *multi-locus* para a identificação de uma presuntiva nova espécie de *Trichoderma* proveniente da planta *Begonia venosa* do arquipélago de Alcatrazes. O fungo *Trichoderma* sp. apresentou elevada similaridade do ITS e *tef1* com *Trichoderma* spp. já descritas, porém não apresentou similaridade do *rpb2* superior a 96% com outra espécie de *Trichoderma*, indicando a possibilidade de se estar perante uma nova espécie.

Palavras-chave: *Begonia venosa*; *hotsptot*; Mata Atlântica

1. Introdução

O arquipélago de Alcatrazes, localizado no litoral norte do estado de São Paulo - Brasil, é um *hotspot* de biodiversidade do bioma Mata Atlântica integrando ecossistemas terrestres, marinhos e costeiros de elevada relevância ecológica, caracterizada por alto endemismo e isolamento geográfico. O arquipélago possui o maior ninhal de Fragatas (*Fregata magnificens*) do Atlântico Sul e abriga mais de 1300 espécies, sendo dezenas delas consideradas Criticamente em Perigo (CR) (CNCFlora, 2012), como é o caso da planta *Begonia venosa* (Begoniaceae) (ICMBio, 2016). O contexto ecológico do arquipélago favorece a presença de espécies, linhagens e comunidades microbianas ainda não descritas e pouco exploradas, com aplicação biotecnológica nas áreas farmacêutica, agrícola e ambiental. As plantas do arquipélago representam, portanto, uma fonte promissora de isolamento de microrganismos endofíticos para o desenvolvimento de produtos e estratégias inovadoras do uso sustentável da biodiversidade. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi o estudo fenotípico e molecular *multi-locus* para a identificação de uma presuntiva nova espécie de *Trichoderma* isolada da planta *B. venosa* coletada no arquipélago de Alcatrazes.

2. Materiais e Métodos

O fungo *Trichoderma* sp. foi isolado da planta *B. venosa* coletada na ilha de Alcatrazes, litoral Norte de São Paulo, Brasil. O indivíduo de *B. venosa* foi coletado sobre paredão rochoso (Latitude: 24° 6' 1.62" S, Longitude: 45° 41' 38.40" W, elevação 56 m). O fungo foi isolado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) (500 g L^{-1} de infusão de batata, 4 g L^{-1} de glicose, 15 g L^{-1} de ágar, pH 5,6) e encontra-se preservado pelo método Castellani na coleção de trabalho do Laboratório de Microbiologia e Química de Produtos Naturais da ESALQ. As amostras foram coletadas com autorização do SISbio (acesso 37256-4) e registradas no Sisgen (A046A6C).

A identificação fenotípica para nível de gênero foi realizada por microscopia óptica. A identificação molecular do fungo foi realizada com base no protocolo proposto por Cai & Druzhinina (2021). O protocolo inclui o sequenciamento e análise das regiões ITS, *tef1* e *rpb2* do DNA de fungos e estabelece critérios de comparação com espécies já descritas. A extração e purificação de DNA do fungo foram realizadas com kit comercial (Genomic Wizard® - Promega). A amplificação das regiões do ITS (Internal Transcribed Spacer rRNA gene), *tef1* (Elongation Factor-1α 1) e *rpb2* (RNA polymerase II subunit 2) foi feita pelo método de PCR (Polymerase Chain Reaction) e o sequenciamento dos nucleotídeos foi realizado pelo método Sanger (Applied Biosystems, modelo 3730XL). Os primers utilizados foram ITS 1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3'), ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), TEF 1-α EF1-983F (5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3'), TEF 1-α EF1-2218R (5'-ATGACACCRACRGCRACRGTYTG-3'), fRPB2-5f (5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3') e fRPB2-7cr (5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3'). As sequências de nucleotídeos (formato FASTA) da região do ITS, *tef1* e *rpb2* de cepas tipo de outras espécies de *Trichoderma* foram obtidas nas bases de dados Trichokey com a ferramenta Trichoblast (https://trichokey.com/), NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e na base de dados UNITE (Unified System for DNA-based identification of fungi).

3. Resultados e Discussão

O fungo endofítico isolado da planta *Begonia venosa* coletada na ilha de Alcatrazes foi analisado por microscopia óptica e identificado como sendo do gênero *Trichoderma*. A seguir, foram realizadas análises moleculares *multi-locus* com os genes nas regiões *ITS*, *tef1* e *rpb2* do DNA. Para indivíduos de *Trichoderma* spp. serem considerados pertencentes à mesma espécie, devem apresentar similaridade maior que 76% do ITS, maior que 99% do *rpb2*, maior que 97% do *tef1* e convergência entre a análise filogenética do *tef1* e do *rpb2* analisados separadamente (Cai & Druzhinina, 2021). A similaridade (%) de sequências de nucleotídeos (ITS, *rpb2* e *tef1*) entre espécies de *Trichoderma* e o fungo endofítico *Trichoderma* sp. foi comparada e pudemos verificar que nenhuma espécie descrita do gênero *Trichoderma* apresenta conjuntamente uma similaridade maior que 99% do *rpb2* e maior que 97% do *tef1*. Além disso, não houve convergência no agrupamento da árvore filogenética do *tef1* com o *rpb2*.

O fungo endofítico *Trichoderma* sp. apresentou a maior similaridade do ITS com os fungos *Trichoderma chetii* (99,08%), *Trichoderma euskadiense* (98,75%) e *Trichoderma andinense* (98,57%). Em relação ao *tef1* apresentou maior similaridade com os fungos *Trichoderma solani* (100%), *Trichoderma rugosum* (98,95%), *Trichoderma aquatica* (98,1%) e *T. euskadiense* (98,81%). No entanto, o fungo endofítico *Trichoderma* sp. não apresentou similaridade do *rpb2* maior que 96% com alguma outra espécie de *Trichoderma*. Na árvore

filogenética com base no ITS e *rpb2* o posicionamento do fungo endofítico foi similar, agrupando com *T. euskadiense* e *T. andinense*. Porém, na análise filogenética com o *tef1*, o fungo endofítico isolado agrupou-se com *Trichoderma reesei*.

Tendo em vista a identificação inequívoca do fungo endofítico *Trichoderma* sp., estamos no momento realizando uma nova amplificação e sequenciamento utilizando o primer forward EF1-728F para o gene *tef1* (Montoya *et al.*, 2016; Gezgin *et al.*, 2023). A utilização deste primer permitirá obter uma região mais comparável com as sequências de referência disponíveis para *Trichoderma* (clado Longibrachiatum), permitindo uma análise filogenética mais robusta e conclusiva.

4. Conclusões e Impacto Social

Pode-se afirmar que o fungo *Trichoderma* sp., isolado de *B. venosa*, pertence ao clado Longibrachiatum do gênero *Trichoderma*. A análise molecular *multi-locus* indicou que o *Trichoderma* sp. não apresentou similaridade suficiente do *tef1* e *rpb2* e convergência nas árvores filogenéticas para ser considerado pertencente a alguma espécie de *Trichoderma* já descrita. O estudo de microrganismos isolados de plantas de ilhas apresenta grande impacto econômico e social para o desenvolvimento de produtos e estratégias inovadoras do uso sustentável da biodiversidade que estão alinhados aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), principalmente aos objetivos 14 e 15 que são fundamentais para a conservação e o uso sustentável dos oceanos e dos ecossistemas terrestres.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo: 141902/2023-0) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - código 001) pela concessão das bolsas de estudos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [FAPESP BIOTA/BIOprospecta (2013/50228-8); Processo FAPESP: nº 2019/17721-9]; à USP-ESALQ, bem como ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto UID/04469/2025; Doi: https://doi.org/10.54499/UID/04469/2025; e pelo LABBELS – Laboratório Associado de Biotecnologia, Bioengenharia e Sistemas Microelectromecânicos (LA/P/0029/2020).

Referências

CNCFlora. Begonia venosa. In: Lista Vermelha da flora brasileira. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Begonia%20venosa. Acesso em: 10/03/2026.

ICMBio-Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Refúgio de Vida Silvestre do Arquipélago de Alcatrazes: informações sobre visitação e biodiversidade. 2016. Disponível em: https://www.gov.br/icmbio. Acesso em: 10/03/2026

Cai, F.; Druzhinina, I.S. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. Fungal diversity 2021, 107, 1-69.

Gezgin, Y.; et al. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates used as biocontrol agents by DNA barcoding. *European Journal of Biology* 2023, *82*, 59-69.

Montoya, Q.V.; et al. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. Antonie van Leeuwenhoek 2016, 109, 633-651.

Espectrometria de massas MALDI-TOF MS na identificação de patógenos da mastite bovina

CB3

Alessandra P. Sant Anna Salimena*, Letícia Scafutto de Faria, Déborah Demarque Martins Silva, Braulio Castilho Silva, Junio Cesar Jacinto de Paula

Instituto de Laticínios Cândido Tostes / EPAMIG, Juiz de Fora (MG), Brasil

*E-mail: *alessandrasalimena@yahoo.com.br*

Resumo: A mastite bovina compromete produtividade e qualidade do leite, exigindo diagnóstico rápido e confiável. A espectrometria de massas por MALDI-TOF MS permite identificar microrganismos com alto desempenho, reduzindo o tempo de resposta em relação aos métodos tradicionais. Este trabalho discute aplicações, vantagens, limitações e perspectivas do MALDI-TOF MS na identificação de patógenos da mastite bovina, com foco em *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: identificação molecular; infecção intramamária; microbiologia; qualidade do leite; *Staphylococcus aureus*

1. Introdução

A mastite bovina constitui uma das principais enfermidades que acometem rebanhos leiteiros, sendo considerada a doença mais onerosa da bovinocultura leiteira. Essas perdas estão associadas à redução da produção, à diminuição da qualidade do leite e ao aumento do uso de antimicrobianos (Ferreira *et al.,* 2025). Diversos microrganismos podem estar envolvidos na etiologia da doença; entretanto, um grupo relativamente restrito de bactérias responde pela maior parte dos casos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Escherichia coli* (Braga *et al.,* 2018). Entre esses agentes, *S. aureus* destaca-se pela capacidade de estabelecer infecções persistentes e de difícil controle nos rebanhos leiteiros.

Isolados de *S. aureus* associados à mastite bovina frequentemente apresentam fatores de virulência relacionados à produção de polissacarídeos capsulares e à formação de biofilme, características que favorecem a persistência do microrganismo no tecido mamário. Estudos com isolados de rebanhos leiteiros brasileiros demonstram elevada frequência de genes associados a esses mecanismos e alta capacidade de formação de biofilme *in vitro*, indicando importante potencial de patogenicidade (Salimena *et al*., 2016).

Apesar dos avanços no diagnóstico microbiológico, a rotina laboratorial ainda se baseia predominantemente em métodos convencionais de cultura e testes fenotípicos, que podem

demandar vários dias para a obtenção dos resultados e apresentar limitações na diferenciação entre espécies próximas (Braga *et al*., 2018; Oliveira *et al.*, 2021). Nesse cenário, a necessidade de diagnósticos mais rápidos tem impulsionado a adoção de métodos analíticos mais ágeis e padronizáveis (Ferreira *et al*., 2025).

Entre essas abordagens, destaca-se a espectrometria de massas por MALDI-TOF MS, que permite a identificação microbiana rápida após o crescimento das colônias por meio da análise do perfil proteico dos microrganismos (Oliveira *et al*., 2021). Essa tecnologia vem sendo progressivamente incorporada à microbiologia diagnóstica e a laboratórios de qualidade do leite, contribuindo para otimizar o fluxo de trabalho na investigação da mastite bovina (Braga *et al*., 2018; Ferreira *et al*., 2025).

2. Metodologia

O presente estudo consiste em uma revisão bibliográfica sobre a aplicação MALDI-TOF MS na identificação de patógenos associados à mastite bovina. O objetivo da revisão foi reunir e analisar estudos que avaliaram o desempenho dessa tecnologia em comparação com métodos microbiológicos convencionais, bem como sua utilização na rotina de laboratórios de diagnóstico microbiológico do leite.

A busca bibliográfica foi realizada nas bases de dados PubMed, SciELO e em portais de editoras científicas internacionais. Foram utilizados descritores em inglês e português relacionados ao tema, incluindo: *bovine mastitis*, *MALDI-TOF MS*, *microbial identification*, *milk microbiology* e *S. aureus*. As estratégias de busca combinaram os termos por meio de operadores booleanos (AND e OR).

Foram incluídos estudos sobre a aplicação do MALDI-TOF MS na identificação de microrganismos associados à mastite bovina, especialmente aqueles que compararam a técnica com métodos convencionais ou descreveram sua aplicação em laboratórios de diagnóstico. Também foram considerados trabalhos sobre a caracterização fenotípica e molecular de *S. aureus* relacionados à persistência da infecção.

3. MALDI TOF MS e a identificação de patógenos da mastite bovina

Estudos conduzidos com amostras de mastite bovina demonstram que a espectrometria de massas por MALDI-TOF MS apresenta alta concordância na identificação dos principais patógenos isolados em rotina laboratorial, incluindo *S. aureus*, estreptococos e enterococos (Braga *et al*., 2018). Em muitos casos, a técnica pode substituir testes bioquímicos tradicionais, reduzindo significativamente o tempo entre o crescimento das colônias e a liberação do resultado (Ferreira *et al*., 2025).

Para *S. aureus*, estudos relatam elevado desempenho na identificação em nível de espécie, com resultados comparáveis à confirmação molecular. Além disso, alguns estudos têm explorado a subtipagem espectral por MALDI-TOF MS, visando identificar perfis associados à resistência à meticilina, o que indica potencial aplicação da técnica em estudos epidemiológicos e no monitoramento da disseminação de linhagens específicas (Lopes *et al*., 2023).

De modo geral, o desempenho da técnica tem se mostrado comparável ou superior ao de sistemas automatizados e testes bioquímicos para diferentes espécies bacterianas, desde que os bancos de dados incluam isolados de origem animal. Nesse contexto, a ampliação e atualização contínua dessas bibliotecas são fundamentais para garantir a acurácia da identificação em diferentes cenários de diagnóstico, incluindo a mastite bovina.

Uma das principais vantagens da técnica é a rapidez na obtenção dos resultados. Após o crescimento das colônias bacterianas, a identificação pode ser realizada em poucos minutos, permitindo a emissão de laudos em até 24 horas (Braga *et al*., 2018). Essa agilidade favorece a tomada de decisões no manejo sanitário do rebanho, contribuindo para o controle da mastite e para a melhoria da qualidade do leite (Ferreira *et al*., 2025).

Apesar dessas vantagens, ainda existem desafios relacionados à identificação direta de patógenos a partir do leite, sem etapa prévia de cultivo. Nesse caso, a presença de componentes da matriz e a baixa carga bacteriana podem limitar a aplicação da técnica (Ferreira *et al*., 2025). Além disso, o custo inicial do equipamento e a necessidade de treinamento especializado podem dificultar sua adoção em alguns contextos, favorecendo a utilização da tecnologia por meio de serviços laboratoriais centralizados ou parcerias institucionais.

A integração dos resultados obtidos por MALDI-TOF MS com dados fenotípicos, moleculares e de virulência, como os descritos para *S. aureus* associado à mastite bovina, pode fortalecer estratégias de vigilância epidemiológica e ampliar a compreensão da dinâmica desses agentes no rebanho (Salimena *et al*., 2016; Lopes *et al*., 2023). Dessa forma, a identificação rápida pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle da mastite e para programas de melhoria da qualidade do leite.

4. Conclusões e Impacto Social

A aplicação do MALDI-TOF MS na microbiologia da mastite bovina representa um avanço significativo ao combinar rapidez, precisão e padronização na identificação de *S. aureus* e de outros patógenos relevantes (Braga *et al*., 2018; Lopes *et al*., 2023). A redução do tempo entre o crescimento bacteriano e a liberação dos resultados contribui para diagnósticos mais ágeis e para o uso mais criterioso de antimicrobianos no manejo da doença (Ferreira *et al*., 2025).

No contexto da cadeia produtiva do leite, a adoção dessa tecnologia pode fortalecer os programas de monitoramento da mastite, melhorar a qualidade do leite e favorecer práticas de produção mais sustentáveis. A atualização contínua dos bancos de dados espectrais, a capacitação de profissionais e a integração com abordagens moleculares tendem a ampliar o potencial de aplicação do MALDI-TOF MS na realidade da produção leiteira brasileira (Lopes *et al*., 2023).

Agradecimentos

Os autores agradecem às instituições que contribuíram diretamente para a execução desse trabalho, como a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

(FAPEMIG) e a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais Instituto de Laticínios Cândido Tostes (EPAMIG - ILCT).

Referências

Braga, P.A.C. *et al*. Rapid identification of bovine mastitis pathogens by MALDI-TOF mass spectrometry. Pesquisa Veterinária Brasileira 2018, 38.

Ferreira, L.S.; Showemimo, T.; Juliano, L.B.; Rodriguez, Z.; Ruegg, P.L. Use of MALDI-TOF to identify mastitis pathogens originally identified by conventional microbiological methods. JDS Communications 2025.

Lopes, T.; Fidelis, C.E.; Silva, A.T.F.; Mota, R.A.; Rall, V.L.M.; Santos, M.V.; Gonçalves, J.L. MALDI–TOF bacterial subtyping for rapid detection of biomarkers in *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis. Journal of Applied Microbiology 2023134(11).

Oliveira, T.C.A.; Brito, M.A.V.P.; Marval, M.G.; Vicentini, N.M.; Lange, C.C. Identification of bovine mastitis pathogens using MALDI–TOF mass spectrometry in Brazil. Journal of Dairy Research 2021, 88(3).

Salimena, A.P.S.; Lange, C.C.; Camussone, C.; Signorini, M.; Calvinho, L.F.; Brito, M.A.V.P.; Borges, C.A.V.; Guimarães, A.S.; Ribeiro, J.B.; Mendonça, L.C.; Piccoli, R.H. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. Veterinary Research Communications 2016, 40.

Bactérias isoladas de lodo ativado como potenciais degradadoras de microplásticos

CB4

Manoella Almeida Candido[1], Virginia Medeiros de Siqueira[1]*, Fabricio Motteran[2], Ana Carolina Soares de Almeida[3], Jacqueline Santos Silva Cavalcanti[1]

[1]Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife (PE), Brasil
[2]Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), Brasil
[3]Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife (PE), Brasil

E-mail: virginia.siqueira@ufrpe.br*

Resumo: Este estudo investigou bactérias isoladas de lodo ativado de uma Estação de Tratamento de Efluentes Industriais (ETEI) como potenciais degradadoras de microplásticos. Quatorze colônias foram selecionadas e identificadas por MALDI-TOF MS como *Bacillus cereus*, *Priestia megaterium*, *Citrobacter freundii* e *Escherichia coli*. Os resultados destacam o lodo ativado como uma fonte promissora de bactérias com potencial para biodegradação de microplásticos e remediação ambiental.

Palavras-chave: MALDI TOF MS; ETEI; poluentes

1. Introdução

O lodo ativado (LA) é um dos sistemas biológicos mais amplamente utilizados para o tratamento de águas residuais domésticas e industriais. Nesse ambiente, os microrganismos se organizam em flocos biológicos, nos quais estabelecem complexas interações ecológicas responsáveis pela remoção de matéria orgânica e contaminantes. Entre esses microrganismos, as bactérias se destacam devido à sua ampla versatilidade metabólica, que possibilita a degradação de compostos recalcitrantes e xenobióticos, tornando o lodo ativado uma fonte promissora para o isolamento de linhagens com potencial biotecnológico (Schneier *et al.*, 2024).

No contexto da poluição por microplásticos (MPs), o LA surge como um reservatório estratégico para a prospecção de bactérias capazes de colonizar superfícies plásticas e iniciar processos de biodegradação. A exposição constante desses microrganismos a compostos sintéticos em sistemas de tratamento pode favorecer a seleção de populações adaptadas à degradação de materiais plásticos. Assim, o presente estudo teve como objetivo isolar e identificar bactérias provenientes do LA de uma ETEI, correlacionando os resultados com o potencial de biodegradação de MPs. Com base nos resultados obtidos, espera-se contribuir

para o desenvolvimento de métodos mais eficazes e sustentáveis de remediação ambiental, colaborando significativamente para a conservação dos ecossistemas.

2. Materiais e Métodos

O lodo ativado foi coletado na ETEI localizada no Complexo Industrial Multifabril, no município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. A amostra foi coletada a uma profundidade de 2 metros utilizando um braço amostrador de aço inoxidável de 3 metros. Após a coleta, o LA foi colocado em um frasco e transportado para o Laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental (LAMAA) da UFRPE, onde foi mantido sob refrigeração até o processamento. Para o isolamento bacteriano, 30 mL de LA foram lavados e submetidos à diluição seriada. Em seguida, 100 µL de cada diluição foram inoculados em placas contendo meio ágar BHI. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C por até 144 h. Após esse período, as colônias bacterianas foram selecionadas para purificação e identificação.

A metodologia de MALDI-TOF foi baseada em Chudzik *et al.* (2024). Os isolados foram cultivados em ágar nutriente (NA), ágar infusão cérebro-coração (BHI), ágar sangue de ovelha (BL), ágar tripticase-soja-tioglicolato (TS) e ágar extrato de levedura-glicose a 25 °C por 2 a 7 dias, seguidos pelo método de transferência direta. A análise por MALDI-TOF MS foi realizada utilizando um espectrômetro de massas Ultraflex (Bruker Daltonics, Alemanha), com o software Biotyper 3.1 e um banco de dados contendo 6.904 entradas. Os espectros foram registrados no modo linear de íons positivos, em uma faixa de massa de 2.000 a 20.000 Da. A soma dos espectros de 2.800 disparos de laser foi obtida em porções de 700 disparos provenientes de quatro posições diferentes da amostra. Os critérios de identificação utilizados na análise foram aplicados de acordo com Paściak *et al.* (2015). Os espectros de massa foram calibrados externamente utilizando o padrão *Escherichia coli* DH5-alpha (Bruker Daltonics).

3. Resultados e Discussão

Um total de quatorze colônias bacterianas macroscopicamente distintas foi selecionado e purificado. Após serem submetidas à técnica de MALDI-TOF MS, foram identificadas como pertencentes às espécies *Citrobacter freundii* (n=4), *Bacillus cereus* (n=6), *Priestia megaterium* (n=2) e *Escherichia coli* (n=1). Quatro isolados não desenvolveram colônias e, portanto, não foram submetidos à identificação.

Entre os isolados identificados, destacam-se as espécies *Bacillus cereus* e *P. megaterium* (anteriormente classificada como *Bacillus megaterium*). Espécies de *Bacillus* isoladas de lodo ativado são frequentemente relatadas em estudos que descrevem sua capacidade de degradar microplásticos, assim como *P. megaterium*, citada em estudo recente que demonstrou sua capacidade de colonizar e degradar polietileno (PE) e poliestireno (PS). Análises por FT-IR e microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmaram alterações estruturais na superfície dos plásticos, indicando biodegradação efetiva do material. O processo ocorre após a adesão bacteriana ao microplástico, formação de biofilme e secreção de enzimas degradativas (Akash *et al.*, 2023).

Estudos de isolamento e cultivo demonstram que o LA abriga uma comunidade bacteriana diversa, e pesquisas sobre a diversidade bacteriana presente nesse ambiente representam uma estratégia inovadora e sustentável para enfrentar os desafios ambientais associados ao acúmulo de poluentes (Zheng *et al.*, 2024). A técnica MALDI-TOF MS oferece confiabilidade, rapidez, simplicidade e excelente relação custo-benefício, e sua aplicação na identificação de isolados ambientais poderia ser utilizada com maior frequência (Ashfaq *et al.*, 2022).

4. Conclusões e Impacto Social

O LA analisado neste estudo é composto por bactérias que, de acordo com a literatura, são funcionalmente especializadas na degradação de compostos orgânicos e poluentes. Dessa forma, existe a oportunidade de realizar investigações mais detalhadas sobre a biodegradação de MPs, além de contribuir para o desenvolvimento de futuras tecnologias destinadas a mitigar esse problema.

O impacto social pode ser analisado sob diferentes perspectivas: (1) ambiental: redução da carga de MPs liberados em rios e mares, protegendo ecossistemas e populações humanas que dependem desses recursos; (2) Econômica: geração de novas soluções industriais, como enzimas para a reciclagem biológica de polímeros, como o PET; (3) educacional: contribuição para a formação de recursos humanos qualificados e para o aumento da conscientização sobre a poluição plástica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Danielle Murici Brasiliense, pesquisadora em Saúde Pública e coordenadora do Laboratório de Resistência Bacteriana (LabREBAC) da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brasil, pela colaboração na técnica de MALDI-TOF. Manoella Andrade Candido agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento de sua bolsa de doutorado.

Referências

Ashfaq M.Y., Da'na D.A., Al-Ghouti M.A. Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: a review. Journal of Environmental Management 2022, 305, 114359.

Chudzik A., Jalkanen K., Täubel M., Szponar B., Paściak M. Identification of environmental *Actinobacteria* in buildings by means of chemotaxonomy, 16S rRNA sequencing, and MALDI-TOF MS. Microbiology Spectrum 2024, 12(3), e0359623.

Paściak M., Dacko W., Sikora J., Gurlaga D., Pawlik K., Miękisiak G., Gamian A. Creation of an in-house matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry Corynebacterineae database overcomes difficulties in identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates. Journal of Clinical Microbiology 2015, 53, 2611-2621

Schneier A., Melaugh, G., Sadler, J.C. Engineered plastic-associated bacteria for biodegradation and bioremediation. Biotechnology for the Environment 2024, 1, 7.

Akash K, Parthasarathi R, Elango R, Bragadeeswaran S. Characterization of *Priestia megaterium* S1, a polymer degrading gut microbe isolated from the gut of *Tenebrio molitor* larvae fed on styrofoam. Archives of Microbiology 2023, 206, 48.

Zheng Z, Liao C, Chen Y, Ming T, Jiao L, Kong F, Su X, Xu J. Revealing the functional potential of microbial community of activated sludge for treating tuna processing wastewater through metagenomic analysis. Frontiers in Microbiology 2024, 15, 1430199.

Caracterização polifásica da diversidade fúngica da salina de Lingua (Itália) CB5

Maria Francesca Sannino[1], Raquel A. Pereira[2,3], Domenico Palatucci[1], Célia Soares[2,3], Nelson Lima[2,3]*, Antonino Pollio[1], João Trovão[2,3]

[1]Departamento de Biologia, Universidade de Nápoles "Federico II", Nápoles, Itália
[2]MUM – Micoteca da Universidade do Minho, CEB – Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal
[3]LABBELS (Associate Laboratory, Braga/Guimarães), University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.Filiação

*E-mail: *nelson@ie.uminho.pt*

Resumo: Isolados fúngicos provenientes de um biofilme de uma salina com elevada salinidade revelaram uma comunidade halotolerante diversa, incluindo espécies de *Aspergillus*, *Parapyrensis* e *Penicillium*. Uma abordagem polifásica, integrando análises morfológicas, moleculares e MALDI-TOF MS, permitiu identificar uma linhagem distinta no género *Emericellopsis*, suportando a descrição de uma nova espécie. Estes resultados evidenciam as salinas como reservatórios de diversidade fúngica ainda inexplorada.

Palavras-chave: ambiente extremo hipersalino; fungos halófilos; salina

1. Introdução

As salinas solares são ambientes hipersalinos caracterizados por condições físico-químicas extremas, incluindo elevada e variável salinidade, baixa disponibilidade de oxigénio e intensa radiação solar (Chung *et al.*, 2019). Apesar destas condições, representam ecossistemas altamente seletivos que albergam comunidades microbianas diversas e especializadas, incluindo fungos halotolerantes e halófilos (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009). Os fungos são conhecidos pela sua notável capacidade de adaptação e pela habilidade de colonizar ambientes extremos, desenvolvendo estratégias morfológicas, fisiológicas e metabólicas que lhes permitem sobreviver a condições adversas (Gostinčar e Gunde-Cimerman, 2023). Nos últimos anos, as salinas têm sido cada vez mais reconhecidas como importantes reservatórios de biodiversidade microbiana, embora a diversidade fúngica nestes ambientes permaneça largamente subestimada (Wijayawardene *et al.*, 2021). Assim, a exploração de ambientes extremos é fundamental para compreender melhor a biodiversidade fúngica e os mecanismos de adaptação ecológica.

Os fungos isolados de ambientes hipersalinos têm também despertado crescente interesse devido ao seu potencial biotecnológico. De facto, muitos fungos halófilos e halotolerantes são capazes de produzir metabolitos secundários bioativos, incluindo

compostos antimicrobianos, enzimas e outras moléculas com relevância industrial e biomédica (Chung *et al.*, 2019). Como referido por Rawat *et al.* (2024), os fungos extremófilos representam uma fonte promissora de novos compostos com aplicações biotecnológicas. Entre os ambientes hipersalinos do Mediterrâneo, a salina Lingua, presentemente inativa, localizada na ilha de Salina (Itália), representa um ecossistema único e ainda pouco estudado, com elevada relevância ecológica e histórica. No entanto, apesar da sua importância, os estudos focados na diversidade fúngica desta área continuam escassos.

Tendo em conta o conhecimento ainda limitado sobre a diversidade fúngica em ambientes hipersalinos, o objetivo deste estudo foi investigar a comunidade fúngica associada a este habitat, com especial enfoque em isolados obtidos a partir de um biofilme hipersalino. Foi aplicada uma abordagem polifásica, integrando análises morfológicas, fenotípicas e moleculares, para avaliar a diversidade das estirpes isoladas e clarificar a sua posição taxonómica. Foi dada particular atenção à identificação de linhagens distintas, conduzindo ao reconhecimento de uma nova espécie no género *Emericellopsis*.

2. Materiais e Métodos

Os isolados fúngicos foram obtidos a partir de um biofilme microbiano flutuante recolhido em setembro de 2025 na salina da Lingua (ilha de Salina, Itália), caracterizada por pH alcalino (8,6), temperatura de 35,5 °C e elevada salinidade (aproximadamente 6%). As amostras foram inoculadas em quatro meios de cultura baseados em Potato Dextrose Agar (PDA) modificados, formulados para reproduzir parcialmente as condições físico-químicas *in situ*, com diferentes níveis de salinidade (6% e 12% de sais marinhos) e valores de pH (8,5 e 11). Culturas puras foram obtidas através de sucessivas subculturas. A caracterização morfológica foi realizada em PDA, Oatmeal Agar (OA) e Malt Extract Agar (MEA), através da avaliação das características das colónias e das estruturas micromorfológicas por microscopia ótica.

O DNA genómico foi extraído a partir de culturas puras seguindo um protocolo com CTAB 2%. A identificação molecular foi realizada através da sequenciação de múltiplos marcadores genéticos, incluindo os genes *ITS*, *β-tubulina*, *LSU*, *rpb2* e *tef1-α*. As sequências obtidas foram comparadas com dados de referência disponíveis em bases de dados públicas, incluindo BLAST e MycoBank. Adicionalmente, todos os isolados foram caracterizados por espectrometria de massa MALDI-TOF. Culturas frescas dos isolados foram cultivadas em Sabouraud Dextrose Agar com cloranfenicol (SDA) durante 48 h. Os espectros de MALDI-TOF MS foram obtidos num instrumento MALDI Biotyper® Sirius.

As análises filogenéticas foram realizadas com base em conjuntos de dados concatenados obtidos a partir de múltiplos loci. Os alinhamentos de sequências foram gerados utilizando MAFFT e editados manualmente com UGENE, enquanto a inferência filogenética foi conduzida com IQ-TREE sob um modelo de máxima verosimilhança.

3. Resultados e Discussão

Foi obtido um total de 7 isolados fúngicos a partir do biofilme hipersalino, revelando uma comunidade diversa adaptada a condições de elevada salinidade. A identificação molecular

permitiu reconhecer vários táxons, incluindo *Penicillium chrysogenum* (MUM 26.09), *Aspergillus montevidensis* (MUM 26.10), *A. terreus* (MUM 26.11), *A. tamarii* (MUM 26.12), *A. flavus* (MUM 26.08) e *Parapyrenis maritima* (MUM 26.07). A deteção de múltiplas espécies de *Aspergillus* juntamente com *P. chrysogenum* indica a presença de uma comunidade fúngica halotolerante associada ao ambiente hipersalino, em concordância com estudos anteriores sobre a adaptação de fungos a habitats salinos (Chung *et al.*, 2019). Entre os isolados, duas estirpes (MUM 26.05 e MUM 26.06), pertencentes ao género *Emericellopsis*, apresentaram elevada similaridade com espécies conhecidas, mas não puderam ser atribuídas a nenhuma espécie descrita. As análises filogenéticas baseadas em conjuntos de dados multilocus concatenados revelaram que estas estirpes formam uma linhagem distinta e bem suportada dentro do género, próxima de *E. minima* e *E. maritima*. A caracterização morfológica reforçou esta distinção, evidenciando diferenças na morfologia dos conídios, ausência de morfo sexual e presença de clamidósporos.

Adicionalmente, a análise por MALDI-TOF MS revelou-se particularmente relevante na caracterização dos isolados provenientes deste ambiente extremo, ao fornecer perfis proteicos reprodutíveis e discriminatórios, que complementaram de forma robusta a identificação baseada em dados morfológicos e moleculares. Ainda que provenientes de um ambiente extremo, a maioria dos isolados apresentou espectros de elevada qualidade, permitindo a sua identificação através das bases de dados da Bruker (Biotyper library) e da MSI-2 (Normand *et al.*, 2017). A exceção verificou-se no caso das estirpes de *Emericellopsis*, cujos perfis não evidenciaram correspondência com nenhuma espécie, reforçando a sua singularidade taxonómica. Importa salientar que, para além da identificação, os perfis MALDI-TOF MS obtidos permitiram gerar espectros de referência, contribuindo ativamente para a expansão e enriquecimento das bases de dados existentes.

4. Conclusões e Impacto Social

Este estudo evidencia a diversidade das comunidades fúngicas associadas a ambientes hipersalinos e confirma as salinas como importantes reservatórios de táxons microbianos ainda não descritos. A identificação de múltiplos fungos halotolerantes, juntamente com o reconhecimento de uma nova espécie no género *Emericellopsis*, reforça a relevância ecológica destes habitats extremos.

Para além da sua importância taxonómica, os fungos de ambientes hipersalinos representam uma fonte promissora de compostos bioativos e enzimas com potenciais aplicações em biotecnologia, indústria e biomedicina. Assim, a exploração destes ecossistemas contribui não só para o avanço do conhecimento sobre a biodiversidade fúngica, mas também para a descoberta de novos recursos com potencial impacto social e económico.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio do programa de investigação e inovação Horizon Europe da União Europeia, ao abrigo do acordo de subvenção n.º 101188201 (MALDIBANK); Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, com o apoio de

FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) através do projeto UID/04469/2025; Identificação Doi: https://doi.org/10.54499/UID/04469/2025; por LABBELS – Associate Laboratory in Biotechnology, Bioengineering and Microelectromechanical Systems (LA/P/0029/2020)

Agradecemos também o financiamento que nos proporcionaram "Projecto PE 0000020 CHANGES, - CUP [E53C22001650006], PNRR Missão 4 Componente 2 Investimento 1.3, financiado pela União Europeia – NextGenerationEU".

Referências

Chung D.; Kim H.; Choi H.S. Fungi in salterns.Journal of Microbiology2019, 57,9, 717-724.

Gostinčar C.; Gunde-Cimerman N. Understanding fungi in glacial and hypersaline environments.Annual Review of Microbiology 2023, 77,1, 89-109.

Gunde-Cimerman N.; Ramos J.; Plemenitaš A. Halotolerant and halophilic fungi. Mycological Research 2009 113,11, 1231-1241

Normand, A.-C., Becker, P., Gabriel, F., Cassagne, C., Accoceberry, I., Gari-Toussaint, M., Hasseine, L., De Geyter, D., Pierard, D., Surmont, I., Djenad, F., Donnadieu, J.-L., Piarroux, R., Ranque, S. Validation of a new web application for identification of fungi by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. Journal of Clinical Microbiology 2017, 55, 9, 2661–2670.

Rawat M., Chauhan M., Pandey A. Extremophiles and their expanding biotechnological applications. Arch Microbiol, 2024, 206. https://doi.org/10.1007/s00203-024-03981-x

Wijayawardene N. N., Phillips A. J. L., Tibpromma S., Dai D. Q., Selbmann L., Monteiro J. S., Aptroot A., Flakus A., Rajeshkumar K. C., Coleine C., Pereira D. S., Fan X., Zhang L., Maharachchikumbura S. S. N., Souza M. F., Kukwa M., Suwannarach N., Rodriguez-Flakus P., Ashtekar N., Dauner L., Tang L. Z., Jin X. C., Karunarathna S. C. Looking for the undiscovered asexual taxa: case studies from lesser studied life modes and habitats. Mycosphere 2021, 12,1290–1333..

Identificação da espécie fúngica de um sistema de reator aeróbio sequencial contaminado com o pesticida atrazina

CB6

Bárbara Chaves Aguiar Barbosa[1,2]*, Célia Soares[3,4], Laura Lima Alves[2], Glória Maria Marinho Silva[2], Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa[2], Nelson Lima[3,4]

[1]*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, IFMA, São Luís (MA), Brasil*
[2]*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, IFCE, Fortaleza (CE), Brasil*
[3]*Micoteca da Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga*
[4]*LABBELS (Laboratório Associado, Braga/Guimarães), Universidade do Minho, Braga*

E-mail: barbara.barbosa@ifma.edu.br*

Resumo: Este estudo objetivou realizar a identificação da espécie fúngica presente em um reator que tratou água dopada com atrazina (ATZ). Para tal, realizou-se procedimento por abordagem morfológica e molecular da espécie. Constatou-se, através da amplificação e sequenciamento da região do Espaçador Transcrito Interno (ITS) do DNA ribossomal da espécie que o fungo que proporcionou a degradação da ATZ foi a espécie *Aspergillus niger* AN 400.

Palavras-chave: Atrazina, *Aspergillus niger*, Identificação molecular

1. Introdução

A contaminação dos mananciais apresenta-se cada vez mais preocupante, principalmente pelo nível de recalcitrância dos produtos que chegam até esses locais. Um exemplo desse grupo são os pesticidas, que podem chegar através dos efluentes das indústrias ou de carreamento superficial das atividades agrícolas próximas. A atrazina, herbicida utilizado amplamente no Brasil, mas já proibida em países da Europa e dos EUA, tem potencial de persistência ambiental que prejudica a biota e o solo onde está presente, sendo classificada como contaminante orgânico persistente (Zhang *et al.*, 2022).

Considerando a necessidade de alternativas para mitigar a capacidade tóxica desses poluentes, a utilização de fungos filamentosos em reatores biológicos mostra-se promissora, visto que esses microrganismos produzem enzimas oxidativas extracelulares capazes de degradar moléculas aromáticas complexas, conforme relatado por Houbraken *et al.* (2020). Nesse cenário, as espécies do gênero *Aspergillus* destacam-se pela versatilidade metabólica e adaptação a diferentes condições ambientais, estando associadas a processos de micorremediação de pesticidas. Uma etapa que não deve ser negligenciada no uso de microrganismos para aplicação na degradação de poluentes é a correta identificação da espécie que está sendo utilizada, pois esta etapa irá validar o estudo e a capacidade da espécie em questão. Como a análise visual macro- e micromorfológica é subjetiva e pode

gerar erros de classificação, a análise de DNA ribossomal pela região ITS (Internal Transcribed Spacer) tornou-se marcador padrão. Ela supera as limitações morfológicas e garante a precisão necessária para as pesquisas com fungos (Salem-Bango *et al.*, 2023).

A confirmação da identidade fúngica por meio de sequenciamento e comparação com bancos de dados internacionais, como o *GenBank*, utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool)*, permite determinar o percentual de similaridade genética. Valores iguais ou superiores a 99% são geralmente considerados indicativos de identificação confiável em nível específico (Salem-Bango *et al.*, 2023).

Diante disso, o presente estudo objetivou confirmar, por meio de abordagem integrada morfológica e molecular, a presença da espécie *Aspergillus niger* AN 400 em reator aeróbio sequencial empregado no tratamento de matriz aquosa sintética contaminada com atrazina.

2. Materiais e Métodos

O estudo para determinar a identificação fúngica foi realizado na Micoteca da Universidade do Minho – MUM, em Braga, Portugal.

2.1 Identificação morfológica

A biomassa fúngica proveniente do reator aeróbio sequencial foi repicada em meio Malte Extrato Ágar (MEA) e em meio Czapek Yeast Extract Agar (CYA), sendo incubada por sete dias em condições controladas. Após o crescimento, foram avaliadas as características macroscópicas das colônias, incluindo textura, coloração do anverso e reverso e padrão de crescimento radial.

Para análise microscópica, fragmentos da periferia da colônia cultivada em MEA foram montados em lâminas com azul de algodão em ácido lático. As estruturas reprodutivas foram observadas em microscópio óptico, sendo analisadas características como morfologia do conidióforo, presença de métulas, disposição das fiálides e morfologia dos conídios. A identificação preliminar foi realizada por comparação com atlas taxonômicos especializados.

2.2 Extração de DNA

A biomassa fúngica foi cultivada em meio líquido MEA por sete dias. Após crescimento, a biomassa foi coletada, lavada com água destilada estéril e submetida a protocolo de extração de DNA genômico adaptado de Santiago (2011). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5x, corado com *GreenSafe Premium* (Nzytech®), com visualização sob luz ultravioleta.

2.3 Amplificação e análise molecular

Para a caracterização molecular, a região ITS do DNA ribossomal foi amplificada em termociclador MJ Research TTC-100. A viabilidade dos produtos foi confirmada em gel de agarose 1% sob tensão de 120 V por uma hora. Sequencialmente, os fragmentos purificados foram sequenciados e confrontados com o banco de dados GenBank (BLAST), adotando-se o índice de 99% de similaridade como parâmetro para a confirmação da identidade.

3. Resultados e Discussão

A caracterização macroscópica evidenciou colônias com superfície de coloração preta e reverso amarelado tanto em meio CYA quanto em MEA, conforme Figura 1. Segundo Prakash e Jha (2014), *Aspergillus niger* apresenta tipicamente coloração preta na superfície e reverso variando de branco a amarelado, padrão compatível com o observado neste estudo.

Microscópicamente, observou-se vesícula subesférica, células conidiógenas bisseriadas e presença de métulas recobrindo toda a superfície da vesícula, sendo estas maiores que as fiálides. Essas características são condizentes com a morfologia descrita para espécies pertencentes à seção Nigri do gênero *Aspergillus* (Houbraken *et al.*, 2020). O diâmetro médio dos conídios foi de 4,41 µm, valor compatível com a faixa descrita para *A. niger* na literatura.

A amplificação da região ITS foi obtida com sucesso, evidenciada pela presença de banda única em gel de agarose após PCR. O sequenciamento das amostras seguido de análise por BLAST indicou alta similaridade com sequências depositadas como *Aspergillus niger* AN 400 no GenBank, confirmando a identidade da espécie isolada.

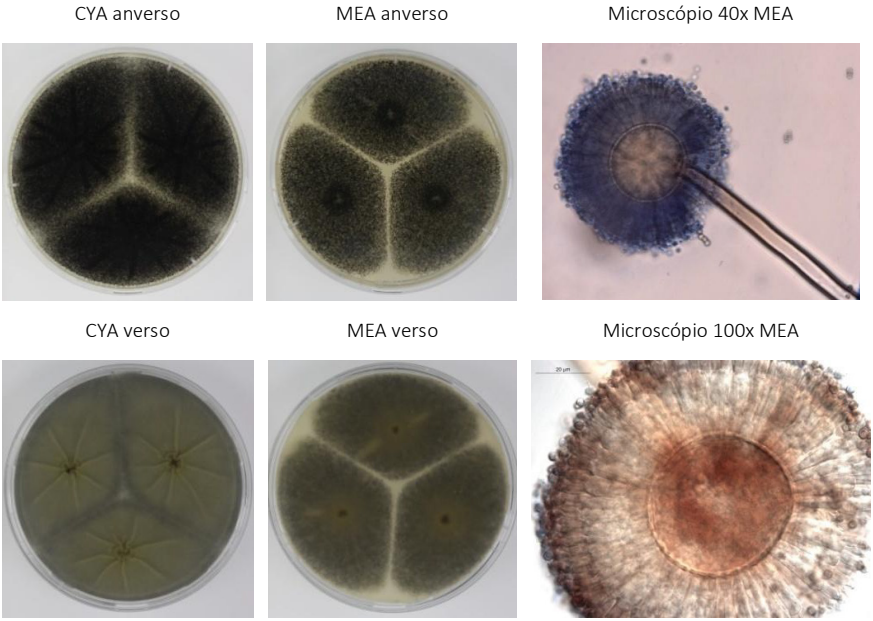


Figura 1 - Identificação morfológica macroscópica e microscópica da espécie predominante nas amostras. Fonte: Autores, 2026.

A análise filogenética demonstrou claro agrupamento da sequência obtida dentro da seção Nigri, reforçando a identificação molecular e corroborando os dados morfológicos observados. A utilização combinada de caracterização fenotípica e análise molecular

mostrou-se essencial para confirmação taxonômica, especialmente considerando a proximidade genética entre espécies do complexo *A. niger*, conforme Figura 2.

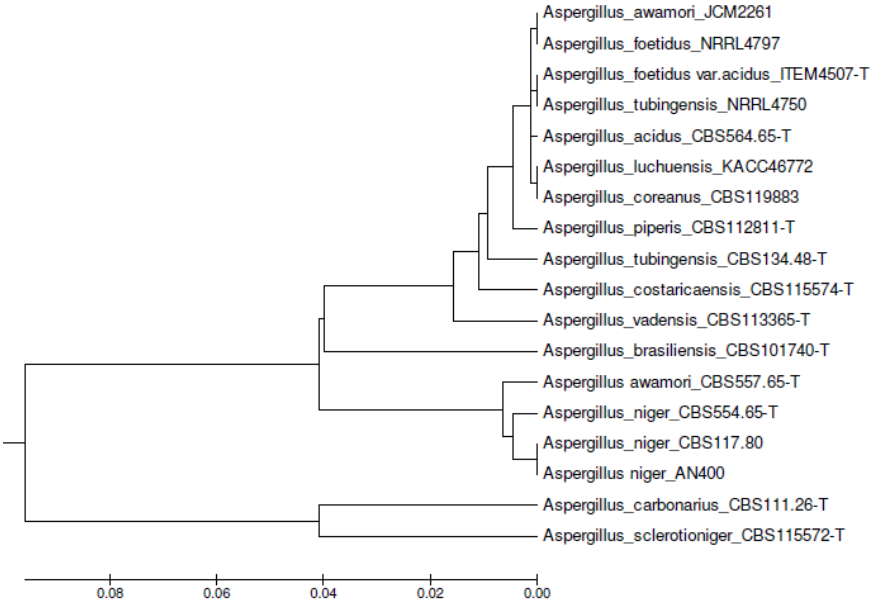


Figura 2 – Agrupamento da espécie encontrada. Fonte: Autores, 2026.

Esses resultados validam a presença da linhagem *A. niger* AN 400 no reator aeróbio sequencial e sustentam sua aplicação em processos de biodegradação de atrazina.

4. Conclusões e Impacto Social

A integração entre identificação morfológica e confirmação molecular por sequenciamento da região ITS permitiu a identificação confiável da espécie predominante no reator como *Aspergillus niger* AN 400. A caracterização filogenética confirmou o posicionamento da espécie na seção Nigri, evidenciando coerência entre dados fenotípicos e genotípicos. A confirmação taxonômica fortalece a confiabilidade do sistema biológico empregado e contribui para a consolidação do uso de fungos filamentosos em processos de remediação de contaminantes orgânicos recalcitrantes.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa, bem como ao Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto UID/04469/2025; Doi: https://doi.org/10.54499/UID/04469/2025; e pelo

LABBELS – Laboratório Associado de Biotecnologia, Bioengenharia e Sistemas Microelectromecânicos (LA/P/0029/2020).

Referências

Houbraken, J.; Frisvad, J.C.; Samson, R.A. Taxonomy of *Aspergillus* section Nigri and related species. Studies in Mycology 2020, 95, 1–64.

Prakash, H.; Jha, A. Morphological and molecular characterization of *Aspergillus niger*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 2014, 3, 74–83.

Zhang, C.; Hu, X.; Luo, J. Ecotoxicological effects of atrazine and its metabolites: A review. Chemosphere 2022, 287, 132–145.

Salem-Bango, Z.; Price, T.K.; Chan, J.L.; Chandrasekaran, S.; Garner, O.B.; Yang, S. fungal whole-genome sequencing for species identification: from test development to clinical utilization. Journal of Fungi 2023, 9, 183.

Santiago, I.F. Bioprospecção de metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos associados a angiospermas presentes na Antártica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil, 2011, 76 p.

Identificação de linhagens do complexo *Acinetobacter baumannii* isoladas de um hospital no município do Rio de Janeiro por MALDI-TOF MS

CB7

Pâmalla Araujo[1]*, Paula Araujo de Souza[1], Rebeca Vitória da Silva Lage de Miranda[1], Talita Bernardo Valadão[1], Angela Maria Dantas[2], Debora Ribeiro de S. Santos[1], Marcelo Luiz Lima Brandão[1]

[1]*Fiocruz, Rio de Janeiro (RJ), Brasil*
[2]*Instituto Nacional de Cardiologia, Rio de Janeiro (RJ), Brasil*

*E-mail: *pamalla.pereira@fiocruz.br*

Resumo: O objetivo deste estudo foi analisar no MALDI Biotyper® linhagens bacterianas (n=61) de um hospital no município do Rio de Janeiro de 2023 a 2024, previamente identificadas como complexo de *Acinetobacter baumannii* pelo VITEK®2. Sessenta (98,4%) linhagens foram identificadas como *A. baumannii*, sendo 59 com alta confiança (score>2,00) e uma com baixa (score=1,70); e uma linhagem não foi identificada (score=1,52).

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; vigilância epidemiológica; MALDI-TOF MS

1. Introdução

Entre os principais desafios enfrentados pelos sistemas de saúde destacam-se as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), associadas ao aumento da morbidade, mortalidade e custos hospitalares. No entanto, 70% das IRAS podem ser prevenidas por meio da implementação adequada de medidas e controle de infecções. As infecções associadas à assistência à saúde (IAAS) correspondem às infecções adquiridas por pacientes durante o recebimento de cuidados para outras condições em ambientes de saúde como hospitais, clínicas, centros cirúrgicos ambulatoriais, unidades de diálise e instituições de longa permanência. A ocorrência dessas infecções está relacionada à complexidade dos procedimentos médicos, ao uso prolongado de dispositivos invasivos e à presença de microrganismos resistentes. Nesse cenário, a resistência aos antimicrobianos (RAM) tornou-se uma das principais ameaças à saúde pública global, favorecida pela pressão seletiva decorrente do uso extensivo de antibióticos e pela elevada capacidade adaptativa das bactérias (Assef *et al.*, 2025).

Entre os patógenos de maior relevância clínica destaca-se *Acinetobacter baumannii*, frequentemente associado a infecções hospitalares graves e à resistência a múltiplos antimicrobianos, especialmente aos carbapenêmicos. Essa espécie integra o complexo *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* (Acb), cujos membros apresentam elevada

similaridade fenotípica e genotípica, dificultando sua identificação por métodos microbiológicos convencionais. Dessa forma, a identificação precisa dessas bactérias e o monitoramento epidemiológico são fundamentais para fortalecer as ações de vigilância sanitária e o controle das IRAS.

A identificação de microrganismos em laboratórios clínicos tem sido, significativamente, aprimorada pelo uso da espectrometria de massa, como a técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS). Esse método tem se consolidado como uma alternativa eficiente aos métodos genotípicos tradicionais, devido à sua rapidez, alta precisão e menor custo operacional após a aquisição do equipamento. A técnica baseia-se na análise de perfis proteicos característicos dos microrganismos, permitindo a identificação em nível de gênero e espécie a partir da comparação com bancos de dados espectrais previamente estabelecidos (Welker *et al.*, 2019). Essa tecnologia tem demonstrado eficiência na identificação de bactérias do gênero *Acinetobacter*, incluindo espécies do complexo Acb. Contudo, devido à alta similaridade fenotípica e genotípica entre as espécies desse complexo, a acurácia da identificação depende diretamente da qualidade e atualização dos bancos de dados utilizados pelo sistema (De Souza *et al.*, 2025). Os sistemas de MALDI-TOF MS também permitem a inserção de espectros no banco de dados com cepas previamente não identificadas, mas posteriormente identificadas de forma acurada por técnicas moleculares (Welker *et al.*, 2019). Desta forma, esta técnica representa uma ferramenta importante para a identificação rápida de patógenos, como *A. baumannii*, contribuindo para o diagnóstico microbiológico e para a vigilância em saúde de infecções hospitalares.

O objetivo deste estudo foi identificar linhagens bacterianas isoladas de um hospital no município do Rio de Janeiro por MALDI-TOF MS.

2. Materiais e Métodos

Foram analisadas 61 linhagens isoladas de pacientes de diferentes fontes de isolamento, sendo: swab retal (n = 42); aspirado traqueal (n = 11); urina (n= 3); sangue (n= 2); líquido pleural (n= 1); lavado broncoalveolar (n= 1) previamente identificadas pelo sistema VITEK®2.

Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética nº: 71419623.8.0000.5248.

As linhagens foram cultivadas em ágar sangue de carneiro (BioCen do Brasil, São Paulo, Brasil) a 36,5 ºC por 24 h. Em seguida, uma porção da colônia foi suspensa em 300 µL de água estéril e este foi homogeneizado vigorosamente em agitador de tubos. Foram adicionados 900 µL de etanol absoluto (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), o microtubo (Eppendorf, Alemanha) foi homogeneizado e centrifugado a 13.000 a 15.000 rotações por minuto (rpm) por 2 min. O sobrenadante foi retirado e centrifugado a 13.000 a 15.000 rpm por 2 min. Em seguida, o microtubo foi mantido em repouso com a tampa aberta, por 3 a 5 min, em temperatura ambiente, até o pellet secar completamente. Após essa etapa, foram adicionados 25 µL de ácido fórmico a 70%, homogeneizado e em seguida adicionados 25 µL de acetonitrila. Foi ressuspendido todo conteúdo pipetado e centrifugado a 13.000 a 15.000 rpm por 2 min. Um µL da suspensão foi inoculado, em duplicata, nos poços de uma placa para MALDI (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Após a secagem, foi aplicado 1 µL da matriz ácido α- ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (Bruker HCCA, Bruker Corporation,

Billerica, MA, EUA). Em um dos poços da placa, foi adicionado 1 µL do padrão *Bacterial Test Standard* (BTS) e, após secagem, 1 µL da matriz HCCA foi adicionado ao poço. Em seguida, a placa foi inserida no equipamento MALDI-TOF, e foi realizada a calibração com o BTS no programa Flex Control v. 3.4. Os espectros de massa gerados foram analisados pelo programa MBT Compass HT v. 5.1.100 e comparados com as bibliotecas disponíveis no equipamento (MBT Compass Library Revision K, 2022). Os resultados são expressos em score e a interpretação foi realizada conforme orientações do fabricante, sendo: 0,00-1,69: nenhuma identificação de microrganismo possível; 1,70-1,99: baixa confiança para identificação de espécies; e 2,00-3,00: alta confiança para identificação de espécies. A consistência dos resultados foi classificada como A, B ou C, onde: A: *High consistency*; B: *Low consistency*; C: *No consitency*.

As linhagens não identificadas com alta confiança (score < 2.00) foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNa com uso do *Kit MicroSEQ™* 500pb 16S rRNA PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os fragmentos foram separados no Analisador Genético Série 3500 (Applied Biosystems, EUA). As sequências foram analisadas através do software DNA Star LaserGene SeqMan (v. 7.0.0) e as sequências consenso foram depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Os resultados de identificação foram obtidos por comparação com as sequências depositadas no banco de dados: EZBioCloud (última atualização em 21/04/2025) (https://www.ezbiocloud.net/). Foram considerados como possibilidade de espécie os resultados que apresentaram um percentual de identificação ≥ 98,7%. Os resultados que apresentaram mais de uma espécie como possibilidade de identificação dentro de um mesmo gênero foram considerados como identificados em nível de gênero.

3. Resultados e Discussão

O resultado da análise das 61 linhagens no MALDI Biotyper® está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação das linhagens (n=61) pelo MALDI Biotyper®.

Resultado	nº de linhagens (%)	Score	Consistência
Acinetobacter baumannii	59 (96,8)	≥2,00	A
Acinetobacter baumannii	1 (1,6)	1,70	C
Não identificado	1 (1,6)	1,52	C

A maioria das linhagens (n=59; 96,7%) foram identificadas como *A. baumannii* com alta confiança (score ≥ 2.00) e consistência (Tabela 1). Uma linhagem (P7701) foi identificada como *A. baumannii* mas com baixa confiança (score = 1,70) e uma linhagem (P7722) não foi identificada (score = 1,52).

O resultado da identificação das linhagens P7701 e P7722 está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Identificação das linhagens (n=2) pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Linhagem	nº acesso NCBI	n.º pares de base	Resultado (% de similaridade)
P7701	PZ144433	535	*Acinetobacter baumannii* (99,41)
P7722	PZ144434	441	*Acinetobacter baumannii* (98,36)

A linhagem P7701 foi identificada em nível de espécie como *A. baumannii*. Desta forma, a expansão da base de dados do MALDI Biotyper® com a inclusão do espectro dessa linhagem é necessária, uma vez que os espectros representantes da espécie *A. baumannii* disponíveis na biblioteca não foram suficientes para identificação desta linhagem com maior nível de confiança.

A linhagem P7722 foi identificada apenas em nível de gênero (*Acinetobacter* spp.) uma vez que apresentou percentual de similaridade menor que 98,7% (Tabela 2). Desta forma, o sequenciamento completo do gene com posterior nova análise é necessário para uma maior resolução e identificação desta linhagem.

Os resultados do presente estudo demonstraram alta congruência entre o MALDI Biotyper® e o sistema VITEK®2. Contudo, o MALDI Biotyper® permitiu uma identificação até o nível de espécie (*A. baumannii*) para a maioria das linhagens. O MALDI-TOF MS é uma técnica rápida, fácil de execução e de baixo custo (após a aquisição do equipamento), sendo uma alternativa para identificação de linhagens isoladas a partir de amostras de origem clínica.

4. Conclusões e Impacto Social

A taxa de identificação com alta confiança em nível de espécie de 96,8% observada no presente estudo reforça o potencial do MALDI-TOF como um sistema de identificação rápido e acurado para identificação de linhagens de *A. baumannii*, contribuindo para o diagnóstico laboratorial, para a vigilância em saúde e implementação de medidas adequadas de controle de infecções associadas à assistência à saúde.

Estes resultados também se relacionam com iniciativas globais e nacionais voltadas ao fortalecimento da saúde pública. Entre elas, destaca-se o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3 (Saúde e Bem-Estar), estabelecido pela Organização das Nações Unidas, que tem como meta reduzir a carga de doenças, fortalecer os sistemas de vigilância e ampliar a capacidade de resposta a riscos sanitários. Além disso, tais achados estão alinhados às estratégias propostas pelo Ministério da Saúde do Brasil para o enfrentamento da RAM, como as descritas no Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR). Esse plano enfatiza o fortalecimento da vigilância laboratorial, a identificação rápida e precisa de patógenos e a implementação de medidas efetivas de controle de infecções nos serviços de saúde. Dessa forma, a utilização de métodos diagnósticos rápidos e confiáveis contribui diretamente para a melhoria da vigilância epidemiológica, para a redução da disseminação de microrganismos multirresistentes e para o fortalecimento das políticas públicas de saúde (Brasil, 2022).

Agradecimentos

À Vice-Presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas da Fiocruz. Ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz. 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 à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro (Processo(s) E-26/204.245/2025-BOLSA N.º de Matrícula: 2005.03225.2 - Bolsa de Jovem Cientista do Nosso Estado. Marcelo L. L. Brandão agradece o apoio do CNPq pela sua Bolsa de Produtividade em Pesquisa (PQ-C) (Processo: 304877/2024-7).

Referências

Assef, A.D.C.; Santos, L.M.; Zahner, V. (org.). *Superbactérias resistentes a antimicrobianos*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2025. (BIO Collection). p. 1–10. ISBN 978-65-5708-202-7.

Brasil. Ministério da Saúde. *Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única (PAN-BR) 2018–2022*. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

Peleg, A.Y.; Seifert, H.; Paterson, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clinical Microbiology Reviews 2008, 21, 3, 538–582.

Costa, L.V. da *et al.* MALDI-TOF MS database expansion for identification of *Bacillus* and related genera isolated from a pharmaceutical facility. Journal of Microbiological Methods 2022, 203, 106625.

De Souza, P.A. *et al.* Phenotypical and molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients during the COVID-19 pandemic in Brazil. Life, 2025, 15, 4, 623, 2025.

Welker, M.; Van Belkum, A.; Girard, V.; Charrier, J. P.; Pincus, D. An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. Expert Review of Proteomics, London, v. 16, n. 8, p. 695–710, 2019

Identificação por MALDI-TOF MS de linhagens de *Klebsiella* de origem clínica isoladas no Rio de Janeiro

CB8

Janaína Rodrigues de Souza[1], Paula Araujo de Souza[1], Rebeca Vitória da Silva Lage de Miranda[1], Talita Bernardo Valadão[1], Angela Maria Dantas[2], Marcelo Luiz Lima Brandão[1], Debora Ribeiro de S. Santos[1]*

[1]Bióloga, Fiocruz, Rio de Janeiro (RJ), Brasil
[2]Instituto Nacional de Cardiologia, Rio de Janeiro (RJ), Brasil

*E-mail: *debora.souza@fiocruz.br*

Resumo: A resistência antimicrobiana destaca *Klebsiella pneumoniae* como patógeno prioritário. Este estudo caracterizou, por MALDI-TOF MS, 160 linhagens clínicas previamente identificadas pelo Vitek®2. Observou-se 91% de concordância entre os métodos, e 9% das linhagens foram reclassificadas como *K. variicola* ou *K. oxytoca*. Os resultados reforçam a importância da abordagem polifásica e demonstram o potencial do MALDI- TOF MS para identificação microbiana rápida e confiável.

Palavras-chave: identificação microbiana; *Klebsiella*; MALDI-TOF MS

1. Introdução

Em 2024, a Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizou a lista de "agentes patogênicos prioritários" resistentes aos antibióticos, com o objetivo de promover a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos, como parte dos esforços para enfrentar a crescente resistência global aos antimicrobianos. Atualmente, 15 bactérias fazem parte dessa lista e estão classificadas em três categorias: prioridade crítica, alta ou média. O grupo mais crítico inclui membros da ordem Enterobacterales, resistentes aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de terceira geração. Essas bactérias são especialmente perigosas em hospitais, instituições de longa permanência e entre pacientes cujos cuidados exigem dispositivos como ventiladores e cateteres intravenosos (Denamur *et al*., 2021).

Dentre os microrganismos com prioridade crítica, destaca-se *Klebsiella pneumoniae*, que é uma bactéria Gram-negativa, encapsulada, imóvel e anaeróbia facultativa, pertencente à ordem Enterobacterales. (Rodríguez-Medina *et al.,* 2024). É encontrada em diferentes ambientes, como solo e água, e coloniza o trato gastrointestinal e a nasofaringe de humanos. Além disso, fazem parte do grupo de patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli*), que desempenham um papel crucial na patogênese e na disseminação da resistência aos antimicrobianos (RAM). São responsáveis

por infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade, incluindo pneumonia, infecções do trato urinário, septicemia, infecções de feridas e meningites. Segundo Verburg e colaboradores (2024), ao longo da última década, *K. pneumoniae* emergiu como uma grande ameaça clínica e de saúde pública, devido à prevalência crescente de infecções associadas aos cuidados de saúde causadas por cepas resistentes a múltiplos antimicrobianos, incluindo a classe dos carbapenêmicos. Paralelamente, observou-se o crescimento de infecções graves, causadas por *K. pneumoniae* 'hipervirulenta', adquiridas na comunidade, associadas a cepas que expressam fatores de virulência adquiridos.

A fim de melhorar o entendimento sobre esse microrganismo, vários estudos com a aplicação da genômica, vêm sendo desenvolvidos na pesquisa com *K. pneumoniae* e, com isso, identificou-se o complexo *Klebsiella pneumoniae*. As sete espécies que pertencem a esse complexo são *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. quasivariicola*, *K. africana*, *K. variicola* subsp. *tropica* e *K. variicola* subsp. *variicola* (Verburg *et al.*, 2024).

A identificação microbiana pode ser realizada por diferentes abordagens, desde a identificação baseada no perfil bioquímico dos microrganismos, identificação proteômica, através do *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS), até o sequenciamento genético. O MALDI-TOF MS é uma metodologia que vem sendo amplamente utilizada, e baseia-se no padrão proteico único apresentado por cada espécie microbiana, e possui uma combinação de velocidade, alta especificidade e sensibilidade. A análise rápida de bactérias e o baixo custo tornam essa técnica uma opção atraente para laboratórios de microbiologia clínica, farmacêutica e de alimentos (Tsuchida *et al*., 2020).

O objetivo deste estudo foi realizar a identificação proteômica, por MALDI-TOF MS, de cepas de origem clínica, isoladas de pacientes atendidos em um hospital no município do Rio de Janeiro, previamente identificadas como *K. pneumoniae*.

2. Materiais e Métodos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), sob a identificação CAAE 71419623.8.0000.5248.

Foram analisadas 160 cepas de *K. pneumoniae* de origem clínica, previamente identificadas pelo sistema Vitek®2 e que estão depositadas na Coleção de Bactérias Patogênicas (Fiocruz/CBP). Essas cepas são provenientes de diferentes sítios biológicos, como retal (n=133), sangue (n=9), aspirado traqueal (n=4), secreção cirúrgica (n=4), lavado broncoalveolar (n=3), urina (n=3), líquido pericárdico (n=1), líquido peritoneal (n=1), fragmento de tecido (n=1) e fragmento ósseo (n=1).

As 160 cepas foram identificadas por MALDI-TOF MS, utilizando o equipamento MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Após crescimento bacteriano em ágar *Tryptic Soy* (TSA) (BioCen do Brasil, São Paulo, Brasil) a 36,5 ºC ± 1,5ºC/24 h e com auxílio da ponta de uma alça bacteriológica estéril, foi transferida, em duplicata, uma pequena quantidade do microrganismo para os poços (*spots*) de uma placa para MALDI Biotyper®. Após a secagem, foi acrescentado 1 µL da matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA) sobre os *spots* na placa. Como

controle do teste, foi adicionado, em um dos poços da placa, 1 µL do padrão *Bacterial Test Standard* (BTS). A seguir, a placa foi inserida no equipamento e realizada a calibração com o BTS, através do programa Flex Control v. 3.4. Os espectros de massa gerados foram analisados pelo programa MBT Compass HT v. 5.1.100 e comparados com as bibliotecas disponíveis no equipamento (MBT Compass Library Revision K, 2022). Foram considerados apenas os resultados com *score* acima de 2.00, que indicam uma identificação de grande confiabilidade de gênero e espécie.

3. Resultados e Discussão

Todas as linhagens (n=160) foram identificadas pelo MALDI Biotyper® e pelo sistema Vitek®2. Após análise MALDI Biotyper®, verificou-se que 91% (n=146) das identificações foram concordantes, sendo identificadas como *K. pneumoniae*. Em 9% (n=14) dos resultados, foi verificada divergência nas identificações, uma vez que o Vitek®2 identificou as linhagens como *K. pneumoniae* e o MALDI Biotyper® como *Klebsiella variicola* (n=13) e *Klebsiella oxytoca* (n=1).

É importante ressaltar que o bionúmero referente à identificação compatível com *K. variicola* ainda não existe no banco de dados do Vitek®2. Já o MALDI Biotyper® possui um banco de dados mais atualizado, contendo quatro espécies do gênero (*K. aerogenes*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* e *K. variicola*). Desta forma, a análise destas linhagens por outras técnicas, como PCR para genes específicos (genes bla), sequenciamento do gene 16S rRNA e outros genes *housekeeping*, é necessária para confirmar a posição taxonômica destas linhagens divergentes.

As espécies de *K. pneumoniae*, *K. variicola* e *Klebsiella quasipneumoniae* são difíceis de diferenciar fenotipicamente, levando a uma interpretação equivocada da prevalência de infecção. Vários estudos já enfatizaram a necessidade de um sistema para identificar corretamente espécies do gênero *Klebsiella* em laboratórios de microbiologia clínica. A estratégia de PCR direcionada para os genes cromossômicos de β-lactamase da classe A, que distinguem adequadamente *K. pneumoniae*, *K variicola* e *K. quasipneumoniae* de forma rápida e confiável, poderia ser aplicada na rotina de identificação.

O estudo de Garza-González e colaboradores (2020), comparou a concordância e correlação dos resultados obtidos pelo sistema Vitek®2 com resultados de identificação de bactérias e leveduras por MALDI-TOF MS. Foram analisadas 4.238 cepas clínicas, sendo 2.669 bactérias Gram-negativas, 1.479 bactérias Gram-positivas e 90 leveduras. Observou-se uma excelente correlação (99%) espécie-dependente entre as duas metodologias utilizadas, para as bactérias Gram-negativas, sendo o complexo *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* as espécies mais encontradas.

Devido, principalmente, à ameaça global da RAM, existe uma grande necessidade de utilização de metodologias de identificação rápida de microrganismos. Medidas direcionadas, como MALDI-TOF MS combinada com separação cromatográfica, mostram grande potencial para a identificação de assinaturas moleculares e o desenvolvimento de um ensaio diagnóstico rápido para a detecção da resistência aos carbapenêmicos.

MALDI-TOF MS foi utilizado noutro estudo para detectar rapidamente 235 linhagens de *K. pneumoniae* do *Sequence Type* (ST)-11 produtoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae*

carbapenemase), por meio da detecção automatizada de um pico específico de KPC através de um algoritmo genético, utilizando *o software ClinProTools*. Essa metodologia foi introduzida no processo de identificação bacteriana de rotina, sem aumentar os custos ou exigir conhecimento adicional, o que representa amplas perspectivas de aplicação na análise de resistência a medicamentos e no controle de infecções. Noutro estudo foram avaliadas 484 linhagens de *K. pneumoniae* de origem clínica para a identificação precoce de fenótipos resistentes aos medicamentos. Após a análise dos dados do MALDI-TOF MS com modelos de aprendizado de máquina, concluiu-se que é possível prever rapidamente a suscetibilidade aos antimicrobianos de *K. pneumoniae*, reduzindo o tempo de detecção da resistência para 1-2 h. Essa informação pode ser essencial para uma intervenção clínica eficaz, para o manejo da infecção e para a prevenção do desenvolvimento e da propagação da resistência.

Em suma, o MALDI-TOF/MS é uma metodologia eficiente, rápida e barata (após a aquisição do equipamento), que vem sendo cada vez mais utilizada em laboratórios de microbiologia para a identificação de microrganismos (Garza-González *et al.*, 2020). A compreensão mais aprofundada da estrutura e diversidade populacional de linhagens de *K. pneumoniae* é de extrema relevância para a correta interpretação de estudos experimentais, dados de vigilância clínica e de saúde pública, e para a implementação de novas estratégias de controle contra este importante patógeno.

4. Conclusões e Impacto Social

A utilização do MALDI Biotyper® para a identificação das linhagens em laboratórios de microbiologia tem, como principal vantagem, a rapidez dos resultados e bases de dados mais atualizadas quando comparada a sistemas como o Vitek®2. No entanto, os resultados do presente estudo reforçam a necessidade da caracterização polifásica, com uso de técnicas acuradas para a identificação de microrganismos, uma vez que algumas metodologias disponíveis podem apresentar resultados divergentes e necessitam de confirmação por técnicas moleculares.

Além disso, a identificação proteômica de cepas do gênero *Klebsiella*, depositadas na Coleção de Bactérias Patogênicas (Fiocruz/CBP), faz parte do objetivo de uma caracterização polifásica do acervo da coleção, a fim de possibilitar o fornecimento de linhagens devidamente caracterizadas para instituições públicas e privadas, em apoio ao desenvolvimento de novas pesquisas científicas.

Agradecimentos

À Vice-Presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas (VPPCB) da Fiocruz. Debora Ribeiro de S. Santos agradece ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/FIOCRUZ (Processo 25385.000177/2025-26 - AEPI: INCQS Nº 20/2025 – Financiado pelo Programa PD&I do INCQS). Projeto Fiotec: INCQS-009-AEP-25. 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 à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro (Processo(s) E-26/204.245/2025-BOLSA N.º de Matrícula: 2005.03225.2 - Bolsa de

Jovem Cientista do Nosso Estado. Marcelo L. L. Brandão agradece ao apoio do CNPq pela sua Bolsa de Produtividade em Pesquisa (PQ-C) (Processo: 304877/2024-7).

Referências

Denamur, E. *et al*. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2021, 19, 37-54.

Garza-González, E., *et al*. Comparison of Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of- flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and the Vitek 2 System for routine identification of clinically relevant bacteria and yeast. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2020, 50,119-127.

Rodríguez-Medina, N. *et al*. Comprehensive study reveals phenotypic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* species complex isolates. *Scientific Reports* 2024, 14, 5876.

Tsuchida, S.; Umemura, H.; Nakayama, T. Current status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules* 2020, 17, 25, 4775.

Verburg, I *et al*. *Klebsiella pneumoniae* species complex: from wastewater to the environment. One Health 2024, 19, 100880.

Detecção de *Listeria monocytogenes* em sushi e sashimi pelos métodos ISO 11290-1, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e pelo Sistema de Detecção Molecular 3M™ diretamente a partir do caldo Fraser de enriquecimento CB9

Rodrigo de Castro Lisbôa Pereira[1], Camilla Pires de Souza[2], João Paulo Ustritto Pontes[2], Vanessa de Souza Rodrigues[1], Karen Signori Pereira[2], Deyse Christina Vallim[1]*

[1]Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Coleção de Listeria, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (RJ), Brasil
[2]Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro (RJ), Brasil

E-mail: vallim@ioc.fiocruz.br*

Resumo: Este estudo colaborativo avaliou três métodos de detecção de *L. monocytogenes*: o 3M™ Molecular Detection Assay (MDA-LM), o método microbiológico convencional (ISO 11290-1) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), aplicados a 40 amostras de sushi e 40 de sashimi. *L. monocytogenes* foi identificada em 12,5% (10/80) das amostras pelos três métodos. Já a combinação ISO 11290-1 e PCR detectou *L. innocua* em três amostras de sushi e uma de sashimi, além de *L. seeligeri* em uma amostra de sushi. A taxa de detecção do MDA-LM para *L. monocytogenes* foi equivalente à dos outros métodos, porém com menor tempo de análise. Como a presença de outras espécies de *Listeria* pode indicar contaminação por *L. monocytogenes*, recomenda-se o uso do MDA-LM aliado a um método complementar de detecção.

Palavras-chave: comida japonesa; ISO-11290; *Listeria monocytogenes*; 3M™ Molecular Detection Assay; PCR

1. Introdução

Listeria monocytogenes é um importante patógeno emergente de origem alimentar que pode causar listeriose, uma doença grave que resulta em aborto espontâneo, septicemia, meningite e/ou meningoencefalite. Apesar da baixa incidência, a taxa de mortalidade é elevada (20–30%) e pode chegar a 75% em grupos de risco, como gestantes, neonatos, idosos e indivíduos imunossuprimidos. Como *L. monocytogenes* é amplamente distribuída no ambiente, pode se multiplicar a temperaturas de refrigeração e sobreviver a condições adversas, incluindo alta concentração de sal, baixo pH e atividade de água. Esta bactéria é capaz de contaminar e persistir em ambientes de processamento de alimentos e estabelecimentos comerciais, além de estar associada principalmente a alimentos prontos para consumo e crus ou mal-cozidos, como sushi e sashimi (CDC 2025).

Os métodos convencionais recomendados por agências reguladoras, como o Food and Drug Administration – Bacteriological and Analytical Manual (FDA-BAM), o US Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) e a International Organization for Standardization (ISO), para a detecção de *L. monocytogenes* em matrizes alimentares, baseiam-se em duas etapas de enriquecimento para recuperação das células bacterianas, seguidas de plaqueamento em meios seletivos e diferenciais e confirmação por testes bioquímicos adicionais. Esses métodos de referência são trabalhosos, demorados e de alto custo. Com isso, métodos alternativos são constantemente desenvolvidos para oferecer uma resposta rápida, precisa para detecção rápida de *L. monocytogenes* e outras espécies de *Listeria*, de forma a superar as limitações dos métodos convencionais. O sistema 3M™ Molecular Detection Assay (MDA), proposto pela 3M, baseia-se no método LAMP (amplificação isotérmica mediada por alça) para detectar o DNA alvo de *L. monocytogenes* em diversos alimentos com alta especificidade e sensibilidade, combinado à bioluminescência para identificar a amplificação (Bird *et al.*, 2015).

O objetivo deste estudo foi investigar a presença de *L. monocytogenes* em sushi e sashimi, a partir dos caldos de enriquecimento comparando os métodos 3M™ MDA-LM, o método microbiológico ISO 11290 e a PCR convencional.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta das amostras

Um total de 80 amostras de sushi (n = 40) e sashimi (n = 40) foi coletado em quatro restaurantes diferentes localizados na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, e foi realizado ao longo de 2 meses, sendo obtidas cinco amostras de sushi e cinco de sashimi em cada restaurante, por mês. As amostras foram transportadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Escola de Química da UFRJ, em caixas isotérmicas com gelo reciclável e processadas logo após a chegada. Todas as amostras foram analisadas quanto à presença de *L. monocytogenes* pelos métodos microbiológico, PCR convencional e o método 3M™ MDA-LM.

2.2. Detecção de L. monocytogenes pelo método 3M™ MDA-LM

Todas as amostras foram enriquecidas de acordo com os protocolos do 3M™ MDA-LM. Para o enriquecimento primário, cada amostra foi pesada separadamente e homogeneizada com caldo Demi-Fraser (3M, St. Paul, Minnesota, EUA) na proporção 1:10 utilizando um *stomacher* por 60 s e, em seguida, incubada a 37 °C por 24 h. Para o enriquecimento secundário, 0,1 mL do caldo de enriquecimento primário foi transferido para 10 mL de caldo Fraser (3M, St. Paul, Minnesota, EUA) e incubado a 37 °C por mais 48 h. Após 24 h, alíquotas de 20 µL foram utilizadas para preparar o lisado para análise no sistema 3M™ MDA-LM. Resultados presuntivamente positivos foram reportados em tempo real, e resultados negativos foram exibidos ao final do ciclo de 75 min. Após 48 h, os caldos Fraser foram enviados ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), para isolamento e identificação de *Listeria* spp. pelos métodos ISO-11290-1 e PCR descritos a seguir.

2.3. Detecção de L. monocytogenes pelo método microbiológico ISO11290-1

Os caldos de enriquecimento Fraser foram examinados de acordo com os procedimentos padrão da ISO 11290, com pequenas modificações. Resumidamente, cada amostra em caldo Fraser foi semeada em ágar PALCAM (Oxoid), ALOA (Merck) e Agar Sangue de carneiro 5%, incubados a 37 °C por 24 a 48 h. Colônias características de *Listeria* spp. foram isoladas, coradas pelo método de Gram, e submetidas à identificação bioquímica, incluindo β-hemólise, catalase, motilidade a 28 ºC e produção de ácido a partir de D-glicose, D-xilose, D-manitol, L-ramnose e α-metil-D-mmanosídeo (Rocourt *et al.*, 1985).

2.4. Detecção de L. monocytogenes no caldo de enriquecimento por PCR

Alíquotas de 2 mL dos caldos Fraser foram centrifugadas a 8.000 rpm por 5 min; o sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano foi lavado 2 vezes e ressuspenso em 300 µL de tampão TE 1X para ser usado na PCR. Os *primers* para os genes *hly* e *23S rRNA* foram utilizados para detectar *L. monocytogenes* e *Listeria* sp., respectivamente, conforme descrito por Hudson *et al.* (2001). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), a 100 V por 1 h em tampão TBE 0,5X. A cepa de referência *L. monocytogenes* CDC F4555 (4b) foi usada como controle positivo. A mistura de PCR sem suspensão bacteriana foi usada como controle negativo.

3. Resultados e Discussão

Das 80 amostras analisadas, *L. monocytogenes* foi detectada em 10 amostras provenientes do mesmo restaurante (12,5%) pelos métodos 3M MDA-LM, ISO-11290 e PCR (Figura 1). Entre os resultados positivos, 6,25% (5) eram de sushi e 6,25% (5) de sashimi. Todos os métodos de detecção testados — MDA-LM, ISO-11290 e PCR — produziram os mesmos resultados para *L. monocytogenes* (Figura 1). No entanto, a combinação dos métodos ISO-11290 e PCR também detectou *L. innocua* em quatro amostras de sushi e *L. seeligeri* em uma amostra de sashimi (Figura 2).

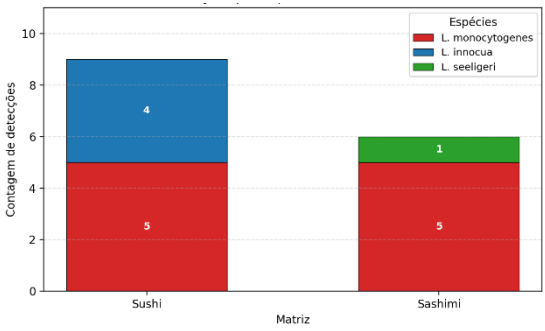


Figura 1 – Detecções por espécie e matriz (n=80).

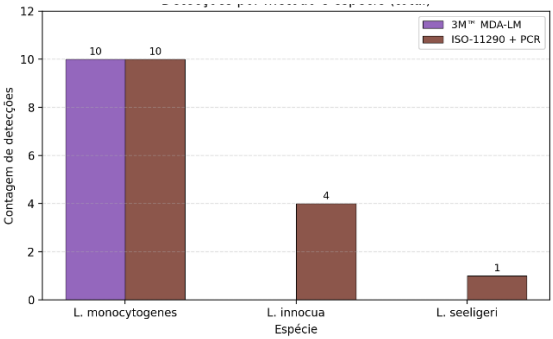


Figura 2 – Detecções por método e espécie (total).

As metodologias convencionais para a detecção de *Listeria* spp. são baseadas em enriquecimento seletivo e meios seletivos para isolamento e envolvem várias etapas, o que as torna mais onerosas, além de exigirem pessoal treinado e um longo período para liberação do resultado. Em nosso estudo, todos os métodos testados mostraram-se eficazes na detecção de *Listeria monocytogenes*. As análises foram realizadas a partir da mesma matriz alimentar, e o 3M™ Molecular Detection Assay e a PCR demonstraram ser rápidos e precisos para o propósito proposto. A metodologia de PCR utilizando os primers descritos por Hudson *et al.* (2021) apresentou vantagem na detecção simultânea do gênero e da espécie. Vale destacar que o uso do crescimento bacteriano no caldo Fraser como fonte de DNA para a PCR—sem a necessidade de isolar o microrganismo ou extrair o DNA com kits comerciais—reduziu o custo e o tempo necessários para essa análise.

4. Conclusões e Impacto Social

O método 3M™ MDA-LM mostrou-se rápido e preciso para a detecção de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos; contudo, recomendamos o uso de outro método de detecção, como a PCR ou o MDA-LIS, como análise complementar, uma vez que a presença de outras espécies de *Listeria* pode indicar contaminação por L. *monocytogenes*. Este estudo também destaca o fato de que esse patógeno foi isolado de alimentos japoneses no Brasil, evidenciando a necessidade de maior atenção a esse setor.

Agradecimentos

Os autores agradecem à 3M Food Safety Brasil e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

Bird, P.; Flannery, J.; Crowley, E.; Agin, J.; Goins, D.; Monteroso, L.; Benesh, D. Evaluation of 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Listeria monocytogenes* for the detection of

Listeria monocytogenes in selected foods and environmental surfaces: collaborative study, first action 2014.06. *Journal of AOAC International* 2015, 98, 980-992.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention Clinical Overview of Listeriosis – Listeria Infection. Atualizado em 24 de setembro de 2025. Disponível em: https://www.cdc.gov/listeria/hcp/clinical-overview/index.html.

Hudson, J.A.; Lake, R.J.; Savill, M.G.; Scholes, P.; McCormick, R.E. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 2001, 90, 614–621.

ISO - International Organization for Standardization. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* – Detection Method, PartI. Geneva:2004. EN ISO11290-1:1996/Amd1:2004.

Rocourt, J.; Schrettenbrunner, A.; Seeliger, H.P.R. Biochemical differentiation of the *Listeria monocytogenes* (sensu lato). Annales de Microbiologie 1983,134A(1), 65-71.

Taxonomia genômica de isolados de *Leptospira* associados a casos humanos de leptospirose no Brasil

CB10

Jeniffer E. Fonseca[1], Jéssica A. S. Santana[1], Tatiane M.V.R.[1], Luiza Aymée P. S. Virgilio[1,2], Keila C. F. A. Silva[1], Kayo C. B. Fernandes[3], Maysa B. M. Clementino[3], Myllena S. Pereira[1], Claudia S. Silva[1], Mariana C. Silva[1], Mariana S. Batista[1], Kátia E. S. Avelar[1], Ilana T. Balassiano[1]*

[1]Coleção de Leptospira/Laboratório de Referência Nacional para Leptospirose/Laboratório de Zoonoses Bacterianas - Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro (RJ), Brasil
[2]Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas/ Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ, Rio de Janeiro (RJ), Brasil
[3]Laboratório de Microrganismos de Referência/Departamento de Microbiologia - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz Rio de Janeiro (RJ), Brasil

E-mail: *ilana@ioc.fiocruz.br*

Resumo: A leptospirose é uma zoonose relevante para a saúde pública, cuja diversidade genética de *Leptospira* spp. dificulta a classificação taxonômica de isolados clínicos. Apesar da importância do isolamento bacteriano para estudos microbiológicos, a baixa sensibilidade do cultivo limita a obtenção de estirpes humanas. Este estudo utiliza sequenciamento de genoma completo para caracterização genômica e análise filogenômica de isolados humanos brasileiros.

Palavras-chave: coleção biológica; isolamento; *Leptospira* spp.; taxonomia

1. Introdução

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial e de elevada relevância em saúde pública, especialmente em países tropicais como o Brasil. A doença é causada por bactérias do gênero *Leptospira* e pode manifestar-se em humanos como um quadro febril agudo que, em casos graves, evolui para a síndrome de Weil, caracterizada por icterícia, insuficiência renal e hemorragias.

O gênero *Leptospira* apresenta dois principais sistemas de classificação. O primeiro é o genético, que atualmente reconhece 74 espécies distribuídas em quatro clados (P1, P2, S1 e S2), frequentemente discriminadas por genes como o *secY*, considerado importante marcador em análises taxonômicas (Victoria *et al.*, 2008). O segundo é o sorológico, baseado nas diferenças antigênicas dos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa bacteriana, que divide o gênero em mais de 300 sorovares agrupados em 26 sorogrupos (Bilung *et al.*, 2026). Como esses sistemas classificatórios não são necessariamente concordantes, recomenda-se seu uso conjunto para uma caracterização mais precisa dos isolados.

A elevada variabilidade genética e sorológica de *Leptospira* spp. reflete sua ampla distribuição em diferentes ecossistemas e reservatórios animais, conferindo complexidade ao ciclo epidemiológico da leptospirose. Nesse contexto, a caracterização do agente é fundamental para compreender a dinâmica de transmissão e fortalecer estratégias de vigilância em saúde. O isolamento de *Leptospira* spp. constitui o padrão-ouro para essa caracterização, pois permite inferência genotípica por análises moleculares e determinação sorológica de sorogrupos. Entretanto, o cultivo do agente é laborioso devido ao crescimento fastidioso da bactéria, resultando em baixa sensibilidade e limitando seu uso diagnóstico rotineiro, o que contribui para a escassez de estirpes isoladas, especialmente de origem humana no Brasil.

Nesse contexto, a Coleção de Leptospira (CLEP/Fiocruz) constitui uma infraestrutura estratégica para o monitoramento da leptospirose, viabilizando a vigilância de sorovares circulantes, a caracterização de cepas associadas a surtos, a comparação entre isolados humanos, animais e ambientais, além do rastreamento de fontes de infecção e do monitoramento de mudanças temporais e geográficas na distribuição do agente.

O isolamento bacteriano também fornece material genético de alta qualidade para o sequenciamento de genoma completo, permitindo investigação genômica aprofundada e fornecendo informações sobre fatores de virulência, relações filogenéticas e evolução do patógeno (Bilung *et al.*, 2026). Contudo, persistem lacunas importantes, evidenciadas pelo reduzido número de estirpes de *Leptospira* spp. isoladas de casos humanos no Brasil, o que limita a compreensão da diversidade genética das estirpes circulantes e sua possível associação com os desfechos clínicos da doença.

Diante desse cenário, o presente estudo tem como objetivo caracterizar filogeneticamente, por meio do sequenciamento de genoma completo, isolados de *Leptospira* spp. provenientes de pacientes com leptospirose no Brasil e mantidos no acervo da CLEP/Fiocruz.

2. Materiais e Métodos

Culturas de *Leptospira* spp.

Cepas de *Leptospira* previamente depositadas na CLEP/Fiocruz e isoladas de casos humanos de leptospirose entre os anos de 1998 a 2019 nos estados do Rio de Janeiro, Acre e Paraná foram selecionadas para este estudo. No momento do depósito na coleção, os sorogrupos foram identificados utilizando anticorpos policlonais de referência por meio da técnica de aglutinação microscópica (*Microscopic Agglutination Test* – MAT) (OMS, 2003). As linhagens são mantidas no acervo criopreservadas em temperaturas ultrabaixas. A reativação e manutenção das linhagens foram feitas de acordo com o protocolo preconizado no manual da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2003).

Sequenciamento de genoma completo

O DNA das linhagens foi extraído utilizando o kit comercial QIAamp DNA Mini (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. As bibliotecas genômicas foram preparadas com o kit Illumina DNA Prep Library (Illumina) e os fragmentos, com tamanho médio aproximado

de 250 bp, foram sequenciados na plataforma MiSeq (Illumina) utilizando o kit MiSeq Reagent v3 (600 cycles) no Laboratório de Microrganismos de Referência (INCQS/Fiocruz). A montagem de novo e a anotação automática dos genomas foram realizadas por meio do *pipeline* nf-core/bacass v2.5.0. O controle de qualidade das leituras brutas incluiu a remoção de adaptadores, de sequências duplicadas e corte das 15 primeiras bases, além da exclusão de bases com escore de qualidade Phred inferior a 30.

Identidade média de nucleótidos (ANI) e hibridização DNA-DNA (isDDH) *in silico*

A identidade média de nucleotídeos (Average Nucleotide Identity – ANI) entre os genomas analisados foi calculada utilizando o *software* JSpeciesWS, baseado em BLAST+, disponível em: https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#home. Para a estimativa de hibridização DNA-DNA *in silico* (digital DNA–DNA hybridization – dDDH), foi utilizado o Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC 3.0) (Meier-Kolthoff *et al.*, 2022), disponível em: https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php.

Análise filogenética baseada no gene *secY*

Sequências do gene *secY* foram extraídas dos genomas das amostras sequenciadas e de cepas tipo ou de referência disponíveis na base de dados NCBI Reference Sequence (RefSeq) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=171), utilizando um script desenvolvido *in-house* em linguagem Python. Foram encontrados 69 genomas de espécies representantes do gênero *Leptospira,* classificados como Tipo ou Referência (dados RefSeq entre janeiro e fevereiro/2026). As sequências foram alinhadas no *software* MAFFT v7 utilizando parâmetros padrão. O alinhamento em formato FASTA foi utilizado para a reconstrução da árvore filogenética pelo método de máxima verossimilhança no *software* IQ-TREE v3.0.1 (https://iqtree.github.io/), executado no servidor *online* do Los Alamos National Laboratory (USA). O melhor modelo evolutivo (TIM+F+I+G4) foi selecionado pelo ModelFinder. A análise filogenética foi realizada considerando heterogeneidade de taxas entre sítios pelo modelo FreeRate, com *bootstrap* ultrarrápido de 1000 réplicas, intensidade de perturbação de 0,5 e suporte adicional pelo teste Bayesiano de aproximação. A árvore foi enraizada utilizando *Leptonema illini* (GCF_000243335.1) como grupo externo.

Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, sob o registro CAAE 74156723.2.0000.5248.

3. Resultados e Discussão

Análise filogenética baseada no gene *secY* de *Leptospira* spp.

As sequências do gene *secY* variaram entre 1380 e 1383 bp, enquanto a sequência utilizada como grupo externo (GCF_000243335.1) apresentou comprimento de 1374 bp. Com base nas análises, os isolados foram agrupados nas espécies *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. santarosai* conforme descrito na Tabela 1. Os valores de suporte dos ramos variaram entre 80% e 100%.

Tabela 1: Características das cepas de *Leptospira* spp. selecionadas para o estudo e resultados obtidos

Nº de depósito	Sorogrupo[1]	Resultado filogenia *secY*	Hibridização de DNA %	ANI %[2]
CLEP[3] 00047	Icterohaemorrhagiae	*L. interrogans*	99,70%	98,5 - 100% (entre isolados *L. interrogans*)
CLEP 00058	Pyrogenes	*L. interrogans*	97,00%	98,3 - 99,0% (entre isolados *L. interrogans*)
CLEP 00145	Icterohaemorrhagiae	*L. interrogans*	99,80%	98,5 - 100% (entre isolados *L. interrogans*)
CLEP 00147	Ballum	*L. borgpetersenii*	96,40%	100% (entre isolados *L. borgpetersenii*)
CLEP 00152	Icterohaemorrhagiae	*L. interrogans*	99,70%	98,5 - 100% (entre isolados *L. interrogans*)
CLEP 00153	Bataviae	*L. santarosai*	70,30%	98,6 - 98,8% (entre isolados *L. santarosai*)
CLEP 00168	Icterohaemorrhagiae	*L. interrogans*	99,80%	98,5 - 100% (entre isolados *L. interrogans*)
CLEP 00172	Icterohaemorrhagiae	*L. interrogans*	99,70%	98,5 - 100% (entre isolados *L. interrogans*)
CLEP 00179	Icterohaemorrhagiae	*L. interrogans*	99,70%	98,5 - 100% (entre isolados *L. interrogans*)
CLEP 00188	Ballum	*L. borgpetersenii*	96,40%	100% (entre isolado *L. borgpetersenii*)
CLEP 00234	Canicola	*L. interrogans*	87,30%	98,4 - 98,5% (entre isolados *L. interrogans*)
CLEP 00310	ND[4]	*L. santarosai*	69,70%	98,8% (entre isolados *L. santarosai*)
CLEP 00347	ND	*L. santarosai*	70,40%	98,9 - 100% (entre isolados *L. santarosai*)
CLEP 00348	ND	*L. santarosai*	70,40%	98,9 - 100% (entre isolados *L. santarosai*)

[1]Sorogrupagem baseada em MAT com anticorpos policlonais de referência. [2]ANI - Identidade Média de Nucleotídeos. [3]CLEP - Coleção de Leptospira/Fiocruz. [4]ND - não determinado, significando reação inconclusiva na MAT.

Comparação genômica dos isolados

Os resultados dos cálculos de distância genoma-genoma (digital DNA–DNA hybridization, dDDH) foram obtidos por comparação entre todos os genomas analisados (all-versus-all), utilizando a fórmula d2, recomendada pelo GGDC. Os isolados apresentaram valores de dDDH superiores a 70% de similaridade com as cepas tipo *L. interrogans* ATCC43642 (GCF_900156205.1) e *L. borgpetersenii* DSM21538 (GCF_003046425.1). Por outro lado, os isolados identificados como *L. santarosai* apresentaram valores iguais ou inferiores a 70% de similaridade quando comparados com a cepa tipo *L. santarosai* LT821 (GCF_000313175.2). Esses resultados indicam a necessidade de comparações adicionais com outras estirpes tipo ou de referência dessa espécie, uma vez que podem existir diferenças genômicas associadas a distintos sorogrupos e sorovares dentro da mesma espécie.

A identidade média de nucleotídeos (Average Nucleotide Identity, ANI), calculada por comparação entre todos os genomas analisados, apresentou valores superiores a 95% (98–100%) entre genomas pertencentes à mesma espécie, formando três agrupamentos distintos. Esses resultados corroboram os agrupamentos observados na análise filogenética,

evidenciando elevada similaridade genômica entre as estirpes mais proximamente relacionadas.

4. Conclusões e Impacto Social

O sequenciamento de genoma completo demonstrou ser uma ferramenta robusta para a identificação taxonômica e caracterização genômica de isolados de *Leptospira* spp., permitindo análises comparativas e filogenômicas de alta resolução. Os resultados obtidos corroboram a classificação dos isolados em *L. interrogans, L. borgpetersenii e L. santarosai,* evidenciando a utilidade de abordagens genômicas associadas a marcadores moleculares na elucidação da diversidade do gênero. Nesse contexto, a CLEP/Fiocruz desempenha papel estratégico ao manter um acervo de cepas devidamente identificadas e preservadas, contribuindo para o fortalecimento das atividades de pesquisa, diagnóstico e vigilância epidemiológica da leptospirose no Brasil.

Agradecimentos

Agradecemos à Fiocruz e Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde pelo suporte financeiro à pesquisa realizada.

Referências

Bilung, L.M.; Tahar, A.S.; Pui, C.F.; Bakeri, M.K.S., Su'ut, L.; Ngui, R.; Kira, R.; Apun, K. Leptospira and leptospirosis: a review of species classifications, genomes, morphological structures, antimicrobial resistances, transmissions, and clinical manifestations. *Current Microbiology* 2026, 83, 122.

Meier-Kolthoff, J.P.; Carbasse, J.S.; Peinado-Olarte, R.L.; Göker, M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research* 2022, 50, D1, D801–D807,

Nguyen, L.-T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. Molecular Biology and Evolution, 2015, Volume 3, 268–274

OMS - World Health Organization. H*uman leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.* World Health Organization. Jointly published with the International Leptospirosis Society. WHO/CDS/CSR/EPH 2002.23. 2003, 109.

Victoria, B.; Ahmed, A.; Zuerner, R.L.; Ahmed, N.; Bulach, D.M. *et al*. Conservation of the S10-spc-α Locus within Otherwise Highly Plastic Genomes Provides Phylogenetic Insight into the Genus Leptospira. PLOS ONE (2008) 3(7), e2752.

Avaliação retrospectiva da classificação taxonômica de isolados clínicos em uma coleção microbiológica

CB11

Irys Hany Lima Gonzalez[1,2]*, Stefany Mendes Dimas[1,2], Gabriela Alves da Silva[1,2], Bruno Rocha Pribul[1], Bruna Ribeiro Sued-Karam[1], Daiana Cristina Silva Rodrigues[1], Melise Chaves Silveira[3], Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef[1], Cláudio Marcos Rocha-de-Souza[1,2]

[1]Laboratório de Bacteriologia Aplicada à Saúde Única e Resistência Antimicrobiana (LabSUR). Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brasil
[2]Coleção de Culturas de bactérias de origem Hospitalar (CCBH). Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brasil
[3]Laboratório de Bioinformática. Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC/MCTIC), Rio de Janeiro (RJ), Brasil

*E-mail: *irys.gonzalez@fiocruz.br*

Resumo: Análise retrospectiva dos dados de classificação taxonômica do acervo da Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar através da comparação a identificação de origem, resultados de MALDI-TOF MS e sequenciamento genômico. Foram analisadas 637 linhagens, com 90,0% de concordância com MALDI-TOF MS e 95,6% com sequenciamento, identificando grupos com maior propensão à reclassificação, reforçando a importância de estratégias contemporâneas.

Palavras-chave: coleções microbiológicas; MALDI-TOF MS; sequenciamento genômico; taxonomia bacteriana

1. Introdução

As coleções microbiológicas são ferramentas fundamentais para a conservação da diversidade biológica e para o avanço científico e tecnológico. No contexto da saúde pública e vigilância epidemiológica, a Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH), vinculada ao Laboratório de Bacteriologia Aplicada à Saúde Única e Resistência Antimicrobiana (LABSUR), atua desde 2007 na preservação de linhagens bacterianas associadas a surtos hospitalares provenientes de diferentes regiões do Brasil. Historicamente, grande parte dos acervos microbiológicos foi classificada por meio de métodos fenotípicos, entretanto os avanços das abordagens polifásicas e das tecnologias como a espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) e o sequenciamento genômico tem promovido revisões taxonômicas frequentes evidenciando possíveis inconsistências em identificações (Rosselló-Móra e Amann, 2015). Diante deste cenário, este estudo teve como objetivo realizar uma análise no banco de dados da CCBH, comparando a identificação de

origem com métodos contemporâneos de identificação taxonômica, com a finalidade de avaliar e fortalecer a autenticidade e a qualidade do acervo.

2. Materiais e Métodos

Foi realizado um estudo retrospectivo utilizando o banco de dados da CCBH. As identificações por MALDI-TOF MS foram obtidas a partir de análises retrospectivas, realizadas durante a validação das linhagens para a etapa de liofilização, enquanto os dados de sequenciamento de genoma completo foram provenientes de projetos de pesquisa conduzidos pelo LABSUR. A análise comparativa foi conduzida em etapas envolvendo a comparação entre a identificação de origem, os resultados de MALDI-TOF MS e, para um subconjunto de isolados, os dados de sequenciamento genômico, permitindo avaliar a concordância entre os diferentes métodos. As análises estatísticas e os gráficos foram gerados no ambiente RStudio (versão 4.5.2), utilizando os pacotes ggplot2, dplyr e viridis.

3. Resultados e Discussão

Foram analisadas 637 linhagens mantidas no acervo da CCBH, cuja comparação da identificação de origem, ou seja, o táxon informado no momento do depósito na coleção, e dos resultados obtidos por espectrometria de massas revelou uma concordância de 90,9% (Figura 1). Entre os resultados discordantes, foi calculada a taxa de reclassificação taxonômica, destacando os táxons que apresentam os maiores índices de divergência entre a identificação inicial e o resultado obtido pelo método de MALDI-TOF MS. As espécies *Klebsiella ozaenae*, *K. aerogenes*, *Enterobacter* sp., Complexo *Enterobacter cloacae* e *Acinetobacter* sp. apresentaram taxa de 100% de reclassificação.

A análise do subconjunto de dados contendo informações de 135 linhagens com dados de MALDI-TOF MS e sequenciamento genômico revelou uma alta resolução taxonômica, com 95,6% de concordância e 4,4% de discordância entre os métodos. Entre os resultados divergentes destaca-se *Enterobacter* spp. (Tabela 1).

A espectrometria de massas tem revolucionado a taxonomia bacteriana, proporcionando elevada acurácia nos resultados ao mesmo tempo que reduz custo e tempo empregados na rotina de identificação bacteriana (Seng *et al.*, 2009). O complexo *Enterobacter cloacae* é particularmente desafiador do ponto de vista taxonômico, uma vez que as espécies deste grupo são indistinguíveis por testes fenotípicos ou pela análise do gene 16S rRNA. Recentemente, técnica baseada em espectroscopia por infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) tem demonstrado resultados comparáveis aos obtidos por sequenciamento de genoma completo, entretanto, ainda não é uma abordagem aplicável e difundida na rotina de muitos laboratórios (Kaplan *et al.*, 2025). Neste contexto, estratégias genotípicas direcionadas como a análise do gene *hsp60* (Santos da Costa *et al.*, 2024) são fundamentais para a adequada caracterização das espécies pertencentes a este complexo. Desta forma, considerando que o sequenciamento de genoma completo nem sempre está disponível para as coleções, e até que as novas tecnologias se tornem acessíveis e amplamente disseminadas, as abordagens baseadas em taxonomia polifásica permanecem fundamentais

para a autenticação de isolados e para a manutenção da qualidade taxonômica em coleções microbiológicas.

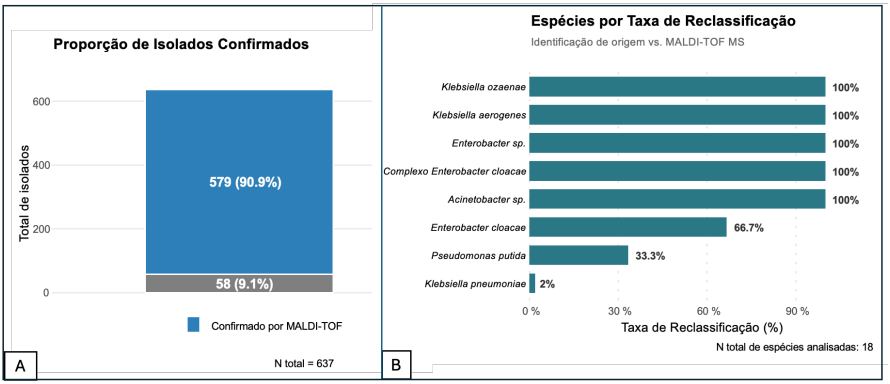


Figura 1 - Proporção de concordância taxonômica entre a identificação de origem e a metodologia de MALDI-TOF MS (A). Taxa de reclassificação taxonômica pela metodologia de MALDI-TOF MS estratificada por espécie (B).

Tabela 1 - Reclassificação taxonômica dos isolados analisados, comparando a identificação por MALDI-TOF MS e sequenciamento genômico.

Identificação por MALDI-TOF MS	Reclassificação por sequenciamento genômico
Enterobacter cloacae	*Enterobacter hormaechei*
Enterobacter cloacae	*Enterobacter chengduensis*
Enterobacter kobei	*Enterobacter roggenkampii*
Klebsiella oxytoca	*Klebsiella michiganensis*
Pseudomonas putida	*Pseudomonas juntendi*

4. Conclusões e Impacto Social

Os resultados demonstram alta concordância entre as identificações de origem e os métodos utilizados, reforçando a confiabilidade do acervo. Ao mesmo tempo, a análise permitiu identificar grupos taxonômicos com maior propensão à reclassificação, evidenciando a importância de avaliações periódicas para o conhecimento aprofundado sobre a composição e a consistência taxonômica de seu acervo. A manutenção de coleções taxonomicamente atualizadas contribui diretamente para a qualidade das pesquisas científicas, para a vigilância de patógenos de relevância clínica e para o avanço de aplicações em saúde pública e biotecnologia.

Agradecimentos

Os resultados de sequenciamento consultados neste estudo foram obtidos durante a execução de projetos de pesquisa financiados pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 408702/2022-2 e 402524/2018-7).

Referências

Kaplan, E.; Lurie-Weinberger, M.N.; Kastel, O.; Cohen, A.; Schwartz, D.; Keren-Paz, A.; Carmeli, Y. *Enterobacter cloacae* complex taxonomic incongruence may lead to misidentification of outbreaks and hinder infection control in real time. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2025, *44*, 3097–3101.

Marinoni, L.; Silva Basílio, D.; De Gasper, A.L. *Coleções biológicas científicas brasileiras: diagnóstico, prioridades e recomendações*. Sociedade Brasileira de Zoologia, 2024.

Rosselló-Móra, R.; Amann, R. Past and future species definitions for *bacteria* and *archaea*. Systematic and Applied Microbiology 2015, *38*, 209–216.

Seng, P.; Drancourt, M.; Gouriet, F.; La Scola, B.; Fournier, P.-E.; Rolain, J. M.; Raoult, D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases* 2009, *49*, 543–551.

Santos da Costa, B.; Peixoto, R.S.; da Conceição Neto, O. C.; da Silva Pontes, L.; Tavares e Oliveira, T.R.; Tavares Teixeira, C.B.; de Oliveira Santos, I.C.; Silveira, M.C.; Silva Rodrigues, D.C.; Pribul, B.R.; Rocha-de-Souza, C.M.; D.'Alincourt Carvalho-Assef, A.P. Polymyxin resistance in *Enterobacter Cloacae* complex in Brazil: phenotypic and molecular characterization. *Brazilian Journal of Microbiology* 2024, *55*, 3541–3550.

Screening da Microbiota Fúngica em Pacientes com Doença de Crohn Utilizando o MALDI-TOF MS

CB12

Gisela Lara da Costa[1]*, Eduarda Borges Santos[1], Fernanda Brito[2], Flavia Martinez de Carvalho[3,4], Geraldo Oliveira Silva Junior[2], Cyrla Zaltman[5], Manoel Marques Evangelista de Oliveira[1]

[1]Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brasil
[2]Departamento de Periodontologia e Diagnóstico e Terapêutica, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro (RJ), Brasil
[3]Laboratório de Epidemiologia de Malformações Congênitas, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brasil
[4]Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ), Brasil
[5]Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ), Brasil

*E-mail: *gisela.costa@fiocruz.br*

Resumo: Fungos emergentes na microbiota oral podem agravar os aspectos clínicos em pacientes com DII. O objetivo deste estudo foi rastrear microbiota fúngica através da coleta de swabs orais de 21 pacientes com RCUI ou DC, pelo MALDI-TOF MS. O perfil de leveduras demonstrou variabilidade com o tipo de DII, destacando a necessidade de identificar patógenos emergentes que podem contribuir para infecções oportunistas.

Palavras-chave: doença intestinal inflamatória; doença de crohn; fungos emergentes; microbiota oral; screening

1. Introdução

Doenças Intestinais Inflamatórias (DII), representadas pela Retocolite Ulcerativa (RCU) e pela Doença de Crohn (DC), são distúrbios de etiologia multifatorial caracterizados pela ocorrência de inflamação crônica que acomete diferentes sítios do trato gastrointestinal. Alterações imunológicas, disbiose, tratamento baseado em imunossupressores e barreiras mucosas comprometidas tornam esses pacientes mais suscetíveis a infecções oportunistas, incluindo as de origem fúngica. (Alatab *et al.* 2020).

Em pacientes com DII, alterações na microbiota oral, especialmente a presença de fungos emergentes, podem estar relacionadas à progressão da condição clínica desses indivíduos. (Hu *et al.* 2022). De acordo com Underhill *et al.* (2022), estudos relataram uma

alteração significativa na microbiota fúngica de pacientes com RCUI ou DC em comparação a indivíduos saudáveis.

Embora a importância da disbiose do microbioma intestinal fúngico para DII tenha sido descrita, as alterações na microbiota oral e seus impactos são pouco relatados. Dessa forma, o principal objetivo deste estudo é investigar e avaliar a presença de leveduras, a partir da taxonomia polifásica, na microbiota oral de pacientes com Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI) e Doença de Crohn (DC), atendidos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ (Brasil), para identificar potenciais fatores de risco associados à progressão dessas doenças.

2. Materiais e Métodos

As amostras foram coletadas de 21 pacientes em tratamento para DII atendidos no ambulatório do HUCFF-UFRJ, com o uso de swab em dois diferentes sítios de cada indivíduo: cavidade oral e mucosa jugal. Os swabs orais foram armazenados em solução salina e encaminhados para o LTBBF/IOC/FIOCRUZ para processamento inicial em meio Sabouraud Dextrose Agar acrescido de cloranfenicol (SDACs), incubados à temperatura de 35 °C por 48 h. Após esse período, realizou-se a análise e contagem das unidades formadoras de colônias.

Colônias sugestivas de leveduras foram semeadas para o meio cromogênico CHROMagar Candida Difco e incubadas à temperatura de 37 °C por 48 h, para visualização e interpretação de características macromorfológicas como coloração e aspecto indicativo de cada microrganismo de acordo com a orientação do fabricante.

Após a análise das características micromorfológicas, os isolados fúngicos obtidos são identificados a nível de espécie pela técnica de MALDI-TOF MS (Bruker Microflex/software Biotyper), conforme descrito por Pinto *et al.* (2022).

3. Resultados e Discussão

Do total de 42 swabs recebidos dos sítios orais e da mucosa jugal de pacientes com DII, as amostras provenientes de 13 pacientes apresentaram crescimento fúngico em SDAc, as quais deram origem ao isolamento final de 15 leveduras, que foram encaminhadas às etapas seguintes de identificação através da espectrometria de massas de MALDI-TOF MS.

A análise inicial desses isolados demonstrou a presença dos gêneros *Kodamaea*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Candida*, que variou de acordo com o tipo de DII dos pacientes, como detalhado na Tabela 1.

A partir destas análises é possível destacar a identificação das leveduras da espécie *R. mucilaginosa*, um importante patógeno relacionado a infecções oportunistas, além de *K. ohmeri* - espécie de levedura que não apresenta a descrição bem estabelecida acerca de seus possíveis impactos na saúde humana - encontradas em pacientes com DC.

Em indivíduos com RCUI foram encontrados isolados de *Trichosporon japonicum e C. lusitanea*. A identificação desses isolados que são relacionados a tipos de infecções oportunistas que possam se apresentar como fatores de risco para o agravamento de doenças como DC e RCUI evidencia a importância da vigilância da microbiota de pacientes diagnosticados com DII.

Tabela 1 - Detecção e caracterização de fungos de acordo com o tipo de Doença Intestinal Inflamatória

Isolado	Tipo de DII	MALDI-TOF MS	Score
LS01 - 2	RCUI	*Trichosporon japonicum*	2.17
MS02 -2	DC	*Candida albicans*	2.17
LS03 - 1	DC	*Rhodotorula mucilaginosa*	2.04
LE04	DC	*Candida albicans*	2.22
MS05	DC	*Candida albicans*	1.98
LS06	DC	*Candida albicans*	2.07
LS07	RCUI	*Candida glabrata*	1.98
LS08	DC	*Candida dubliniensis*	2.11
LS09	DC	*Candida albicans*	2.20
LS11-2	DC	*Candida orthopsilosis*	2.10
LS 13	RCUI	*Clavispora lusitaniae*	2.16
LE17 D1	DC	*Kodamaea ohmeri*	2.15
LS17 D3		*Candida orthopsilosis*	1.83
ME 20	RCUI	*Candida tropicalis*	2.28

DII: Doença Intestinal Inflamatória; RCUI: Retocolite Ulcerativa Idiopática; DC: Doença de Chron

As leveduras mais comuns encontradas na microbiota oral são do gênero *Candida* e podem mudar de comensais para patogênicas dependendo do estado de homeostase do hospedeiro. (Kumamoto *et al.*, 2011). Em nosso estudo, o isolado de *C. orthopsilosis* foi encontrado em um paciente com DC e C. *glabrata*, *C. lusitanea* e *C. tropicalis* em indivíduos com RCUI.

4. Conclusões e Impacto Social

Essas descobertas ressaltam a importância de identificar patógenos emergentes na microbiota oral e potenciais infecções oportunistas em indivíduos com inflamação intestinal crônica. Nesse sentido, a presença desses patógenos pode influenciar os processos inflamatórios e, consequentemente, o prognóstico desses pacientes, destacando a necessidade de pesquisas contínuas sobre o papel da microbiota no desenvolvimento, progressão e manejo da DII.

A identificação desses isolados que são relacionados a tipos de infecções oportunistas que possam se apresentar como fatores de risco para o agravamento de doenças como DC e RCUI, evidencia a importância da vigilância da microbiota de pacientes diagnosticados com DII.

A espectrometria de massas apresentou resultados promissores para sua utilização no screening da microbiota oral de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fiocruz, Agência Estadual de Financiamento Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ - Bolsa: JCNE E-26/201.433/2021 e JCNE E-26/204.581/2024), e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Processo de Outorga 307007/2022-7).

Referências

Alatab, S.; Sepanlou, S.; Ikuta, K. *et al*. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 2019; 5, 17-30.

Underhill, D.M.; Braun, J. Fungal microbiome in inflammatory bowel disease: a critical assessment. The Journal of Clinical Investigation 2022, 132(5), e155786.

Hu, S.; Mok, J., Gowans, M.; Ong, D.E.H.; Hartono, J.L.; Lee, J.W.J. Oral Microbiome of Crohn's disease patients with and without oral manifestations. Journal of Crohn's and Colitis, 2022, 16, 1628–1636.

Kumamoto, C.A. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization, Current Opinion in Microbiology 2011, 14, P386-391.

Pinto, T.N.; Kohn, A.; da Costa, G.L.; Oliveira, L.M.A.; Pinto, T.C.A.; Oliveira, M.M.E. *Candida guilliermondii* as an agent of postpartum subacute mastitis in Rio de Janeiro, Brazil: Case report. Frontiers in Microbiology 2022, *13*, 964685.

Diversidade microbiana do sourdough de trigo sob diferentes ambientes CB13

Nádia Nara Batista[2]*, Sthefânia Ferreira Vilela[1], Silvia Juliana Martinez[2], Dirceu Melo[2], Ana Paula Pereira Bressani[1], Rosane Freitas Schwan[2]

[1]*Departamento de Ciência dos Alimentos/ESAL – Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras (MG), Brasil*
[2]*Departamento de Biologia/ICN – Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras (MG), Brasil*

E-mail: ndianara.batista@gmail.com*

Resumo: Este estudo caracterizou grupos microbianos presentes em *sourdough* de trigo produzido em ambientes domésticos e de mata. As fermentações foram amostradas a cada 96 horas. Bactérias e leveduras foram quantificadas. Inicialmente as bactérias predominaram, seguidas por leveduras. A maior população foi obtida no *sourdough* mata. *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae* destacaram-se como as principais espécies associadas ao processo fermentativo.

Palavras-chave: bactérias ácido-láticas; fermentação espontânea, leveduras; microbiota

1. Introdução

A fermentação é uma etapa fundamental na produção de pães, pois contribui para a melhoria da textura, do sabor e da digestibilidade do produto (Baev *et al.*, 2023). A fermentação espontânea tem início com o desenvolvimento de uma matriz fermentativa denominada *sourdough*, que consiste em um ecossistema microbiológico complexo formado por leveduras e bactérias ácido-láticas (LAB) naturalmente presentes na farinha e no ambiente de processamento (Das *et al.*, 2023).

A estabilidade e o potencial fermentativo da massa de *sourdough* são fortemente influenciados por fatores ambientais, como temperatura, umidade e biodiversidade local. Esses fatores modulam a composição microbiana, impactando diretamente o processo fermentativo e a qualidade do produto.

Durante a produção do *sourdough*, as bactérias ácido-láticas contribuem para a retenção de água, aumento do volume e retardo do endurecimento, prolongando a vida útil do pão (Mūrniece e Klava, 2022), enquanto as leveduras enriquecem o perfil sensorial ao produzirem aminoácidos essenciais, vitaminas e compostos aromáticos. Além disso, o processo fermentativo promove a degradação de compostos antinutricionais, a formação de metabólitos bioativos e o aumento da biodisponibilidade de nutrientes, melhorando a solubilidade e a estabilidade do produto (Sanmartín *et al.*, 2023). Portanto, a composição

microbiana do *sourdough* é determinante para as propriedades nutricionais e tecnológicas do pão.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os grupos microbianos presentes no *sourdough* elaborado com farinhas de trigo, produzido em dois ambientes distintos, doméstico e de mata.

2. Materiais e Métodos

2.1 Processo de fermentação

A produção de *sourdough* tipo I foi elaborado de acordo com Abdelmegiud *et al.* (2024), com modificações. A fermentação inicial foi realizada homogeneizando a farinha de trigo com água na proporção de 1:1, mantida em temperatura ambiente por um período de 24 h. Após esse período, foram retirados 50 g da mistura inicial, e o restante foi alimentado com farinha e água (1:1). Esse procedimento foi repetido diariamente ao longo de 7 dias. Amostras (50 g) foram coletadas a cada 96 h para análises microbiológicas.

2.2 Isolamento de microrganismos

Os microrganismos foram obtidos de 10 g amostras de *sourdough* que foram homogeneizadas com 90 mL de água peptonada estéril a 0,1% (v/w) e diluídas seriadas foram realizadas. A população bacteriana foi obtida em ágar MRS (De Man Rogosa Sharpe, Merck, Darmstadt, Alemanha), e ágar nutriente (Merck) suplementado com 0,4% (v/v) de nistatina (Sigma) para inibir o crescimento de leveduras, sendo incubadas a 35 °C por 3 a 4 dias, A população de leveduras foi obtida em ágar YEPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar), ajustado para pH 3,5, contendo 100 mg/L de cloranfenicol (Sigma) para inibição do crescimento bacteriano, sendo incubadas 28 °C por 3 a 4 dias. A população microbiana foi estimada em Log de unidades formadoras de colônias por grama (Log UFC/g), seguida da caracterização morfológica e da contagem de cada tipo de colônia obtida. As colônias foram selecionadas aleatoriamente em número igual à raiz quadrada do número total de colônias e purificadas. Posteriormente, as colônias foram identificadas por MALDI-TOF-MS.

2.3 Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF-MS

Os isolados foram cultivados durante 18 h em placas de YEPG (leveduras), ágar nutriente (bactérias) e MRS (bactérias láticas). A extração de proteínas foi de acordo com o protocolo estabelecido pela Bruker, utilizando ácido fórmico e acetonitrila (Bruker Daltonics: Bremen, Germany). Um microlitro de extração foi colocado em cada spot da placa (triplicata), após a secagem foi coberto com um microlitro da solução matriz alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) previamente preparada em uma concentração final de 10 miligramas de CHCA/mL de solução orgânica [etanol:acetonitrila:ácido trifluoracético (10%) 1:1:1]. As placas foram secas em temperatura ambiente e analisadas por MALDI-TOF MS (UltrafleXtreme MALDI-TOF MS—Bruker Daltonics; Bremen, Germany).

3. Resultados e Discussão

Leveduras e bactérias foram detectadas em diferentes populações ao longo do desenvolvimento do *sourdough*. A dinâmica microbiana iniciou-se com a predominância de bactérias, seguida pelo crescimento de leveduras em ambos os ambientes avaliados. A população máxima de bactérias totais foi observada após 96 h de fermentação, atingindo 7,31 Log UFC/g no ambiente de mata e 6,58 Log UFC/g no ambiente doméstico, incluindo *Micrococcus luteus, Enterobacter asburiae* e *Staphylococcus sciuri*. As bactérias ácido-láticas (BAL) apresentaram maior crescimento após 192 horas de fermentação, com 7,55 Log UFC/g no ambiente doméstico e 9,02 Log UFC/g na mata. *Lactobacillus fermentum* foi a única espécie detectada no processo fermentativo. *Weissella confusa, Bacillus cereus* e *Bacillus amyloliquefaciens* foram isolados do meio MRS.

As leveduras tornaram-se predominantes após 96 h de fermentação, alcançando 7,60 Log UFC/g no ambiente doméstico e 9,80 Log UFC/g na mata. Após 192 h, observou-se uma redução populacional, atingindo 7,14 Log UFC/g e 9,06 Log UFC/g, respectivamente. *Saccharomyces cerevisiae* foi a única espécie identificada.

A diversidade microbiana, avaliada pela contagem de morfotipos, variou conforme o ambiente. As leveduras apresentaram dois morfotipos em ambos os *sourdoughs*. As bactérias totais exibiram quatro morfotipos no ambiente doméstico e cinco no ambiente de mata, enquanto as BAL apresentaram três morfotipos no ambiente doméstico e quatro no ambiente de mata. *Weissella confusa, Lactobacillus fermentum, Bacillus cereus, Bacillus amyloliquefaciens, Micrococcus luteus, Enterobacter asburiae, Staphylococcus sciuri* e *S. cerevisiae* foram identificados com score > 2.

4. Conclusões e Impacto Social

A variação entre os ambientes indica que a biodiversidade local exerce influência direta sobre a composição e o desenvolvimento da microbiota do *sourdough*. O ambiente de mata apresentou maiores populações microbianas e maior diversidade morfológica bacteriana, sugerindo condições mais favoráveis ao crescimento microbiano. Tanto as leveduras quanto as bactérias acido-láticas atingiram suas maiores populações com 192 h de fermentação. *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae* destacaram-se como as principais espécies associadas ao processo fermentativo. Esses resultados reforçam que a compreensão da dinâmica microbiana é essencial para otimizar fermentações espontâneas, contribuindo para a melhoria da qualidade nutricional, tecnológica e sensorial dos produtos à base de *sourdough*, além de incentivar o desenvolvimento de processos fermentativos mais sustentáveis, a produção artesanal de alimentos e a valorização da biodiversidade microbiana associada aos sistemas alimentares.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências CAPES, CNPq, FAPEMIG, e ao Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Fermentação (LaMFe) da Universidade Federal de Lavras pelo apoio técnico.

Referências

Abdelmegiud, M.H.; El-Soukkary, F.A.H.; El-Naggar, E.A.; Abdelsalam, R.R. Chemical composition and rheological properties of some gluten-free flour formulations. *Archives of Agriculture Sciences Journal/Archives of Agriculture Sciences Journal* 2024, *7*, 172–186.

Baev, V.; Apostolova, E.; Gotcheva, V.; Koprinarova, M.; Papageorgiou, M.; Rocha, J. M.; Yahubyan, G.; Angelov, A. 16S-RRNA-Based metagenomic profiling of the bacterial communities in traditional Bulgarian sourdoughs. *Microorganisms* 2023,*11*, 803.

Das, R.S.; Tiwari, B.K.; Garcia-Vaquero, M. The fundamentals of bread making: the science of bread. In: *Springer eBooks*, 1ª ed. Garcia-Vaquero, M., Pastor, K., Orhun, G.E., McElhatton, A., Rocha, J.M.F. Eds.; Springer, Cham, Switzerland, 2023, pp. 1–40.

Mūrniece, R.; Kļava, D. Impact of Long-Fermented sourdough on the technological and prebiotical properties of rye bread. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Section B Natural Exact and Applied Sciences* 2022, 76, 1–8.

Sanmartín, G.; Sánchez-Adriá, I. E.; Prieto, J. A.; Estruch, F.; Randez-Gil, F. Bioprospecting of sourdough microbial species from artisan bakeries in the city of Valencia. *Food Microbiology* 2024, 120, 104474.

Micoteca da Universidade do Minho
Centro de Engenharia Biológica
Campus de Gualtar
4710-057 BRAGA - PORTUGAL
www.micoteca.deb.uminho.pt