



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e
Nutrição
Curso de Farmácia



VITÓRIA DOS SANTOS FERNANDES

**ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA (FTIR) DE CEPAS DE
REFERÊNCIA DE *LEISHMANIA SPP* CAUSADORAS DE
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

CAMPO GRANDE, MS

2024



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e
Nutrição
Curso de Farmácia



VITÓRIA DOS SANTOS FERNANDES

**ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA (FTIR) DE CEPAS DE
REFERÊNCIA DE *LEISHMANIA SPP* CAUSADORAS DE
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito final para
graduação no Curso de Farmácia da
UFMS.

Orientadora: Profa. Dra. Carla
Cardozo Pinto de Arruda

CAMPO GRANDE, MS
2024



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e
Nutrição
Curso de Farmácia



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doenças tropicais negligenciadas	1
1.2 Leishmaniose Tegumentar	2
1.3 Leishmaniose Visceral	4
1.4 Diagnóstico	5
1.5 Técnicas para identificação das espécies de <i>Leishmania</i>	7
1.6 Espectroscopia FTIR	8
1.7 Métodos de aprendizagem de máquina	9
1.7.1 Análise de Componentes Principais	10
1.7.2 Máquina de Suporte de Vetores	11
2 OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 METODOLOGIA	13
3.1 Amostras a serem analisadas	13
3.2 Preparo das amostras para espectroscopia FTIR e análise multivariada	13
3.3 Algoritmo de análise multivariada de dados	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5 CONCLUSÃO	17
6 REFERÊNCIAS	18



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
Curso de Farmácia



AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho representa mais do que um marco acadêmico; é a concretização de um sonho que foi possível graças ao apoio e à dedicação de pessoas muito especiais.

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder saúde, força e sabedoria ao longo de toda essa trajetória. Sem Sua luz e proteção, essa conquista não seria possível.

À minha mãe, pela sua incansável dedicação e amor incondicional. Obrigada por ser minha base, por acreditar em mim em todos os momentos e me apoiar em cada decisão. Sua força e coragem são inspirações que levarei comigo por toda a vida.

À minha irmã, companheira de todas as horas. Obrigada pelo carinho e pela amizade que sempre me proporcionaram conforto e segurança. Saber que posso contar com você torna todos os desafios mais leves.

Ao meu namorado, por todo o apoio, paciência e compreensão, especialmente nos momentos mais difíceis. Obrigada por me incentivar a seguir em frente e por estar ao meu lado nessa jornada. Seu amor e parceria foram essenciais para que eu pudesse dar o meu melhor.

Aos meus amigos da faculdade, muito obrigada por terem tornado o processo mais leve e agradável. O apoio constante, as conversas na cantina, as risadas que quebraram a tensão e parceria em todos os momentos foram fundamentais.

Obrigada por estarem comigo nessa jornada.



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
Curso de Farmácia



Tributo também à minha orientadora Profa. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda, que com sua orientação e sabedoria tornou este trabalho possível. Agradeço pela paciência, pelo compromisso e pelo olhar atento que foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto. Sua confiança e incentivo me motivaram a ir além e buscar sempre a excelência.

Também dedico esta pesquisa a Doutoranda Fernanda da Silva, que com muita dedicação me acompanhou desde o início nas pesquisas, compartilhou todos os seus conhecimentos sempre com muita paciência e alegria. Seus ensinamentos foram essenciais para caminhar até aqui.

Dedico esse trabalho também ao Laboratório de Parasitologia Humana (INBIO), que proporcionaram a estrutura e apoio necessário para realizar os ensaios. Além de todo acolhimento e simpatia de todos.

A todos vocês, meu mais profundo e sincero agradecimento. Esse trabalho é dedicado a cada um que, de alguma forma, contribuiu para que ele se tornasse realidade.



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
Curso de Farmácia



RESUMO

As leishmanioses são classificadas como doenças vetoriais emergentes e altamente negligenciadas, carentes de programas de controle que contenham sua incidência. São ocasionadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. Devido à ampla variedade de espécies causadoras e à resposta imunológica do hospedeiro, pode-se observar um largo espectro de manifestações clínicas, sendo classificadas em leishmaniose cutânea (LC), mucosa (LCM ou LM) e leishmaniose visceral (LV). As técnicas de espectroscopia óptica vêm se destacando na área de diagnóstico de doenças infecciosas, uma vez que elas facilitam, por meio da análise direta dos espectros obtidos de amostras biológicas, a obtenção de resultados precisos aliados a metodologias não invasivas, possibilitando um diagnóstico em tempo inferior ao de métodos tradicionais. O objetivo deste trabalho foi otimizar a metodologia para identificação de espécies de *Leishmania* causadoras de LC ou LM a partir da análise multivariada de espectros de absorção no infravermelho, bem como identificar as contribuições espectrais mais importantes e associá-las aos componentes biológicos das amostras. As amostras submetidas à análise por FTIR foram culturas axênicas de cepas que já haviam sido devidamente identificadas e caracterizadas por métodos convencionais: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904). A absorção das amostras de culturas de formas promastigotas na região do infravermelho médio foi avaliada (MID de 600 a 000 cm^{-1}) utilizando um acessório de reflectância atenuada para coleta dos dados - espectroscopia óptica vibracional e, em seguida, analisada com base em métodos estatísticos de análise multivariada, a fim de diferenciar as espécies/cepas de referência. Um total de 37 amostras das culturas de parasitos foram analisadas durante semanas diferentes, utilizando o software de programação MATLAB R2015b. Os resultados apresentaram distinções entre as amostras nas regiões espectrais entre 1200 e 900 cm^{-1} , além de uma região entre 1028 e 1120 que está associada a absorção de polissacarídeos. Na análise de agrupamento utilizando PCA, foi observada uma divisão clara entre as duas espécies de *Leishmania*. Os resultados indicam que a análise FTIR associada à aprendizagem de máquina pode ser um método viável para distinguir as espécies de *Leishmania*. Esta abordagem poderá facilitar um diagnóstico mais exato e um tratamento mais eficaz para os doentes.

Palavras-chave: Diagnóstico espectroscópico. Aprendizagem de máquina. Leishmaniose cutânea. Identificação de *Leishmania*.



ABSTRACT

Leishmaniasis are recognized as emerging and highly neglected diseases, for which there are currently no control programs in place to contain their incidence. The causative agents are protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*. The wide variety of causative species and the host's immunological response result in a broad spectrum of clinical manifestations, which are classified as cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis (MCL or ML) and visceral leishmaniasis (VL). Optical spectroscopy techniques are becoming increasingly prominent in the field of infectious disease diagnosis. They facilitate the direct analysis of spectra obtained from biological samples, combined with non-invasive methodologies, enabling diagnosis in less time than traditional methods. The objective of this study was to improve the methodology for the identification of *Leishmania* spp. species that cause CL or ML, employing multivariate analysis of infrared absorption spectra. Additionally, the most significant spectral contributions were identified and associated with the biological components of the samples. The samples submitted for FTIR analysis were promastigote cultures of strains that had already been properly identified and characterized by conventional methods: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) and *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904). The mid-infrared absorption of the samples was evaluated (wavelength range of 600 to 4000 cm^{-1}) using an attenuated reflectance accessory for data collection, namely vibrational optical spectroscopy. Subsequently, the data were subjected to statistical multivariate analysis to facilitate the differentiation of the species and reference cells. A total of 37 samples of the parasite cultures were analyzed at different times using MATLAB R2015b software. The results demonstrated distinctions between the samples in the spectral regions between 1200 and 900 cm^{-1} , as well as a region between 1028 and 1120 cm^{-1} , which is associated with polysaccharide absorption. The cluster analysis, conducted using principal component analysis (PCA), revealed a distinct separation between the *Leishmania* species. The results suggest that FTIR analysis may serve as a viable diagnostic method for distinguishing between *Leishmania* species. This approach may facilitate more accurate diagnoses and more effective treatments for patients.

Keywords: Spectroscopic diagnosis. Machine learning. Cutaneous leishmaniasis. Identification of *Leishmania*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças tropicais negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são doenças relacionadas a aspectos socioeconômicos da sociedade, já que ocorrem predominantemente na população mais vulnerável, sem acesso aos cuidados em saúde apropriados, em regiões remotas e rurais, ou em regiões onde há contato com animais e vetores das doenças.¹ A pobreza está diretamente relacionada com a permanência de DTNs. Os países que apresentam os índices de desenvolvimento humano (IDH) mais baixos e os maiores índices de DTN estão localizados nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Entre esses países está o Brasil, que ocupa a 70ª posição no IDH. Nove das dez DTNs estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) estão presentes no Brasil.²

As leishmanioses são conhecidas e classificadas como doenças emergentes e altamente negligenciadas (DTNs), carentes de programas de controle que contenham sua incidência. Devido à ampla variedade de espécies causadoras e à resposta imunológica do hospedeiro, pode-se observar um largo espectro de manifestações clínicas, sendo classificadas em leishmaniose cutânea (LC), mucosa (LCM ou LM) e leishmaniose visceral (LV)³. São doenças zoonóticas causadas por distintas espécies de protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, que são transmitidos a animais e humanos pela picada de insetos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em um ciclo complexo.^{3,4}

1.2 Leishmaniose Tegumentar

Leishmaniose Tegumentar (LT) é um grupo de doenças infecciosas, não contagiosas, onde são observadas úlceras na pele e mucosas. Recentemente, a OMS e a Organização Pan-Americana de Saúde no Brasil vêm apresentando nova classificação para as leishmanioses, sendo doravante classificadas em leishmaniose cutânea (LC), mucosa (LCM ou LM) e leishmaniose visceral (LV).³ Porém, muitas referências ainda mencionam a classificação antiga, onde as leishmanioses

polarizam-se basicamente em LT e na forma sistêmica mais grave, leishmaniose visceral (LV).

A LT constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela OMS como uma das seis mais importantes doenças infectoparasitárias, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades.⁵

No Brasil, a LT é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua relevância e risco de ocorrência de problemas que pode produzir no ser humano. Da mesma forma, pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras.⁵

O ciclo biológico de *Leishmania* se inicia quando um flebotomíneo fêmea se alimenta de sangue de um hospedeiro infectado, ingerindo macrófagos que contém formas amastigotas; assim, no tubo digestivo dos flebotomíneos, essas amastigotas se diferenciam em formas promastigotas, flageladas. Nesse viés, no próximo repasto sanguíneo, durante a picada, o inseto transmite as promastigotas para a pele do hospedeiro, as quais são fagocitadas pelos macrófagos e outras células do sistema imune. A Figura 1 ilustra o ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*.

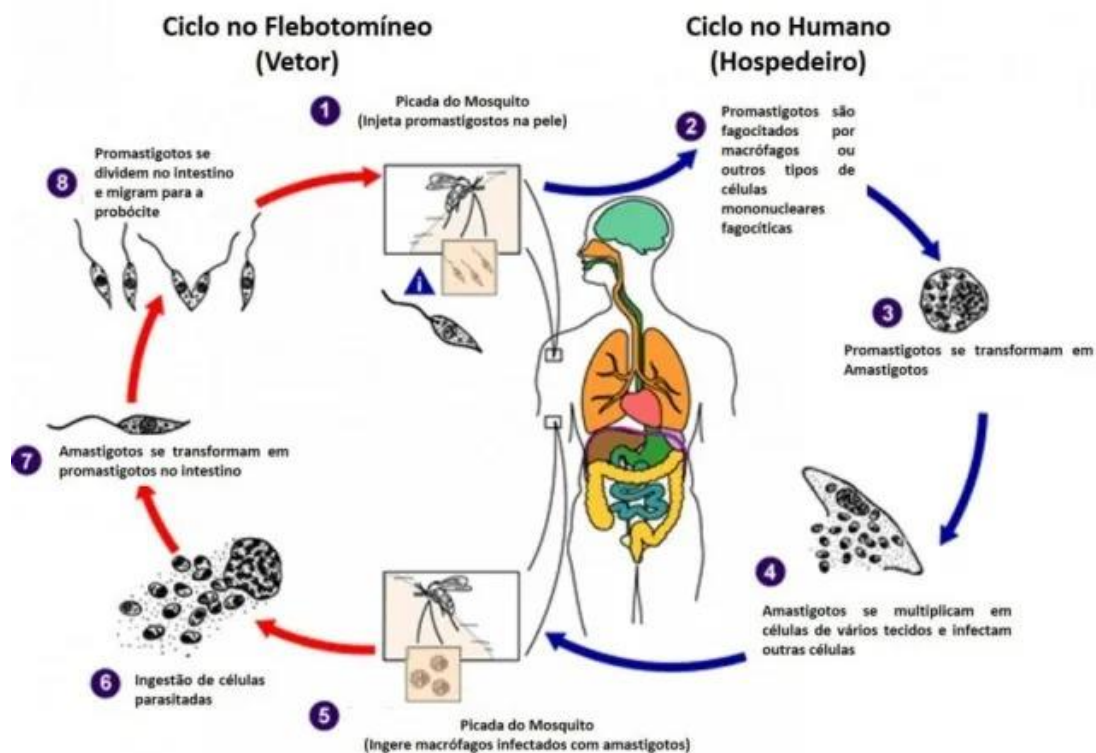


Figura 1. Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*. **Fonte:** Adaptado de CDC, <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.

A LT, no Brasil, tem como principais agentes etiológicos a *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*.⁴ A leishmaniose cutânea (LC) é a forma clínica mais frequente, com boa resposta ao tratamento, associando-se às três espécies mencionadas. *L. (L.) amazonensis* ocasiona lesões cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver o quadro de leishmaniose difusa (LCD). Em casos raros, as lesões podem se tornar numerosas, denominando-se leishmaniose cutânea disseminada.⁴

A LC manifesta-se por lesões restritas à pele, que geralmente são únicas ou em pequena quantidade e apresentam tendência à cicatrização espontânea. Em casos mais raros, ocorre uma forma disseminada, caracterizada por múltiplas lesões. A aparência das lesões pode variar, sendo que infecções bacterianas secundárias podem torná-las mais inflamadas, dolorosas e purulentas.⁵ O período de incubação normalmente varia de duas semanas a dois meses. A lesão ulcerada é precedida por uma mácula que surge logo após a picada do inseto, permanecendo por um a dois dias. Em seguida, a mácula evolui para uma pápula que aumenta gradualmente,

geralmente resultando em uma úlcera. A linfadenomegalia satélite pode surgir antes, durante ou após o desenvolvimento da lesão.⁵

As úlceras típicas de LC são, em geral, indolores, localizam-se em áreas expostas da pele, possuem formato oval ou arredondado, com diâmetro que varia de milímetros a centímetros. Apresentam uma base infiltrada, eritematosa e firme, com bordas elevadas e bem definidas, e fundo avermelhado com granulações grosseiras.⁵ A Figura 2 ilustra alguns exemplos de lesões causadas pela LC.



Figura 2. Lesões cutâneas associadas à leishmaniose cutânea. **Fonte:** Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Ministério da Saúde, 2017.

1.3 Leishmaniose Visceral (LV)

A Leishmaniose Visceral é considerada uma zoonose e apresenta distribuição mundial. As espécies causadoras fazem parte do complexo *L. donovani* e são classificadas em duas espécies: *L. infantum* e *L. donovani*. A *L. donovani* é encontrada no Subcontinente Indiano e no leste da África, enquanto *L. infantum* está distribuída na Ásia Central e Oriente Médio, bem como nas Américas, no Brasil. Os parasitos são transmitidos por meio da picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomíneos. No Brasil, a principal espécie transmissora é *Lutzomyia longipalpis*.⁶

No Brasil, a LV é endêmica e está presente nas cinco regiões, sendo a região Nordeste a de maior prevalência de casos, pois suas condições ambientais são favoráveis à proliferação dos vetores. O desenvolvimento de sintomas inespecíficos e, muitas vezes, tardios, contribui para a transmissão do parasita no ambiente doméstico.⁷

A LV apresenta manifestações clínicas graves caso o diagnóstico e tratamento ocorram de forma demorada. Os principais sintomas são: febre e dor abdominal e os principais sinais são: aumento do fígado e do baço e palidez (Figura 3) sendo esses sintomas fatores de risco para morte.⁷



Figura 3. Hepatoesplenomegalia, sinal observado na Leishmaniose visceral.

Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

1.4 Diagnóstico das leishmanioses

As técnicas de diagnóstico disponíveis atualmente para LT e LV apresentam desempenho variável, dependendo da forma clínica e do tempo de evolução da doença, espécie de *Leishmania* envolvida, carga parasitária, presença de infecções secundárias, forma de coleta e tipo de material biológico utilizado, além de estrutura laboratorial e corpo técnico disponível para análise. Além disso, todos os resultados dos exames deverão ainda ser interpretados pelo médico, que indicará a conduta correta para cada paciente.⁸

Em linhas gerais, os diagnósticos laboratoriais da LT e LV se baseiam na visualização do parasito por técnicas de exame direto ou isolamento do mesmo *in*

vitro, sendo considerados referência para a identificação da doença. O exame parasitológico direto é o mais usado, principalmente pelo baixo custo e facilidade de execução no laboratório. Assim, esse exame consiste na visualização ao microscópio de formas amastigotas a partir de material obtido de escarificação, aspirado ou biópsia da lesão (LT) ou aspirado de medula óssea (LV), sendo fixado em lâmina de microscopia e corado por corantes apropriados.⁸ Contudo, vale salientar que o exame parasitológico é invasivo e muitas vezes inviável em programas de saúde pública por conta de sua demora de operação.⁹

Para os métodos de cultivo *in vitro*, no caso da LT, o isolamento do parasito se dá a partir do maceramento do fragmento de lesão semeado em meios de cultura e permite a visualização de formas promastigotas após um período de crescimento no meio.⁸ Formas amastigotas de *Leishmania* podem ser visualizadas também em biópsias de lesão enviadas para avaliação histopatológica.

Testes sorológicos detectam o nível de anticorpos nos pacientes e sua sensibilidade varia de acordo com a técnica utilizada. As reações de imunofluorescência indireta, ELISA e *Western blot* são normalmente as mais citadas em trabalhos sobre o assunto.⁸ A técnica de ELISA é uma ferramenta para o imunodiagnóstico na LV, pois é um teste sensível e permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, porém possui baixa precisão na detecção de casos e grande possibilidade de reações cruzadas.¹⁰ Os títulos de anticorpos específicos são mais elevados nas formas mais graves da doença, como na LCD e na LV. Os níveis de anticorpos encontrados na leishmaniose mucosa (LM) são superiores aos encontrados na LC e os níveis de anticorpos tendem a ser baixos na LC não complicada⁵.

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) avalia a resposta celular de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania* inoculados por via intradérmica, exame utilizado no diagnóstico da LT. A reação é caracterizada por endurecimento no local da inoculação, causada pela infiltração abundante de linfócitos e macrófagos. Em áreas endêmicas, a IDRM positiva pode ter diferentes interpretações, tais como doença ativa, exposição ao parasito sem doença ou doença pré-existente, bem como exposição anterior ao antígeno de IDRM, alergia ao diluente do teste ou reação

cruzada com outras doenças. Essa reação de hipersensibilidade tardia possui sensibilidade que varia entre 86% a 100%; contudo, a contaminação cruzada do coquetel de antígenos pode diminuir a especificidade da técnica. O teste é considerado positivo quando o diâmetro da placa na área endurecida for maior do que 5 mm. Atualmente o teste está indisponível no mercado nacional devido a limitações na produção do antígeno, e muitos profissionais da saúde aguardam pelo seu retorno.¹¹

Podemos também lançar mão de métodos moleculares de identificação, capazes de detectar o DNA do parasito, como a técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain reaction*, PCR). Essa técnica apresenta maior sensibilidade e especificidade que as técnicas citadas anteriormente, porém necessita de estrutura laboratorial complexa e profissionais qualificados para sua execução. A sensibilidade do ensaio depende principalmente da amostra biológica e dos *primers* usados para amplificação da sequência-alvo. Os alvos de amplificação mais utilizados são o DNA nuclear, assim como o gene de RNA ribossômico de subunidade pequena (SSU rRNA), DNA extracromossômico, como DNA cinetoplastidial repetitivo (kDNA), genes mini-éxon e a região do espaçador transcrito interno ribossômico.¹²

Uma das principais limitações da PCR baseada em DNA é a quantificação do DNA de parasitas mortos (visto que a meia vida do DNA é de 24 horas dentro da célula). Já a *nested* PCR utiliza o produto de uma PCR anterior com um par de *primers* internos ao par utilizado na primeira reação. Contudo, são propensos à contaminação e não são recomendados, exceto em laboratórios credenciados. Da mesma forma, a PCR multiplex envolve a amplificação de diferentes alvos de DNA ao mesmo tempo. Outrossim, embora tais ensaios sejam mais sensíveis que a PCR convencional, possuem altos custos, tornando-os inadequados para campo.¹²

1.5 Técnicas para identificação das espécies de *Leishmania*

Para as leishmanioses, por serem classificadas como protozooses de alta incidência no Brasil, é crucial que a identificação das espécies seja realizada, uma vez que a doença possui amplo espectro clínico, relacionado às espécies causadoras.

Além disso, esse diagnóstico é necessário para que se tenha um maior controle da enfermidade e possibilidade de um tratamento mais específico.

Técnicas moleculares como a PCR permitem o diagnóstico e a identificação da espécie causadora da infecção.¹³ Neste caso, a PCR se baseia na síntese enzimática *in vitro* de cópias de fragmentos de DNA, a qual imita a replicação natural do DNA, uma vez que a partir de uma molécula do ácido nucleico, gera-se bilhões de moléculas similares na reação.¹⁰ Dessa forma, é possível realizar a identificação e diferenciação de espécies de *Leishmania* através da utilização de iniciadores específicos e genes alvos, entre eles ITS (DNA espaçador não codificante), sequências repetitivas de DNA nuclear, genes do citocromo-b, mini-éxon, G6PD, cpb, gp63 e hsp70.¹⁴ Porém, o custo elevado e a necessidade de laboratórios bem equipados e mão-de-obra qualificada é uma desvantagem da técnica. Além disso, ela não é totalmente sensível, podendo ocorrer possíveis resultados falsos negativos.¹⁵

A análise isoenzimática de parasitas em cultura é a abordagem convencional para a identificação das espécies de *Leishmania*. O padrão-ouro é a eletroforese enzimática multilocus (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*, MLEE) que requer a cultura e o isolamento dos parasitas, cujo resultado pode levar semanas ou meses após o diagnóstico.¹⁶ A MLEE é de grande relevância para os estudos epidemiológicos sobre LT, mas não é suficientemente rápida para orientar as decisões terapêuticas de primeira linha. Assim, na maioria dos casos, os clínicos determinam o primeiro curso da terapia com base apenas em dados epidemiológicos.

17

Já o sequenciamento genético abrange muitas abordagens de software para a identificação dos genes codificadores de proteínas e RNA. Esses genes codificadores são organizados em aglomerados com milhares de genes adjacentes na mesma fita de DNA. Em *Leishmania*, mRNAs maduros resultam de poliadenilação coordenada e *trans-splicing* de um RNA precursor policistrônico. Esse processo acrescenta uma sequência líder de *splicing* (SL) de 39 nucleotídeos para o 5' final do mRNA. Assim, os tratos de polipirimidina (PPT) fornecem os sinais para o processo.¹⁸ Apesar da especificidade, o custo elevado e a necessidade de equipamentos e mão-de-obra qualificada constituem limitações da metodologia.

Diante disso, nota-se a relevância de se estudar e utilizar novas técnicas para a identificação de espécies de *Leishmania*, dada a sua ligação com a conduta terapêutica e direcionamento de medidas de saúde pública com base em dados epidemiológicos.

1.6 Espectroscopia FTIR

A espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que utiliza energia infravermelha média para analisar a estrutura molecular e a composição de substâncias, medindo a absorção de frequências específicas de luz infravermelha, fornecendo uma impressão digital única para identificação e análise das amostras.¹⁹ A radiação infravermelha interage quando atinge frequências de energia vibracionais específicas das ligações de grupos funcionais presentes na molécula, revelando assim características específicas na composição da amostra analisada. Esse método oferece uma abordagem rápida, precisa, minimamente invasiva e econômica para identificar as espécies de microrganismos^{27,28}. Essa tecnologia tem se mostrado muito promissora, pois é necessário um manuseio mínimo de amostras para obtenção de resultados. Tem o potencial de beneficiar os pacientes, pois permite a seleção de um tratamento adequado, além de contribuir significativamente para a coleta de dados epidemiológicos^{27,28}.

Os métodos de diagnóstico disponíveis no mercado para as DTNs possuem desvantagens em seu uso: falso-negativos, procedimentos que exigem profissionais qualificados e baixa sensibilidade são algumas delas, além de serem invasivos em alguns casos.²⁰ Para superar essas desvantagens, novas alternativas utilizam técnicas de espectroscopia óptica. A FTIR associada à análise multivariada vem demonstrando grande potencial diagnóstico, visto que é um método rápido, não invasivo com alta sensibilidade e de baixo custo. Em particular, a região do infravermelho compreende modos vibracionais que estão associados a importantes componentes bioquímicos, os quais podem ser analisados como marcadores para identificar alterações metabólicas. A espectroscopia FTIR associada ao aprendizado de máquina (ML) foi capaz de diagnosticar várias doenças infecciosas com alta precisão, como por exemplo a análise do espectro da saliva, que obteve 100% de

precisão para o diagnóstico de COVID – 19²¹ e para a dengue, amostras de soro de humanos infectados forneceram 89% de precisão.²²

1.7 Métodos de Aprendizagem de Máquina

A FTIR vem sendo combinada com algoritmos de aprendizagem de máquina (*machine learning*, ML) para fornecer resultados rápidos e precisos para muitos diagnósticos.^{23,24} A análise de componentes principais (PCA) é uma técnica multivariada usada para gerar índices e agrupar indivíduos de acordo com a variação em suas características, facilitando a análise de padrões entre eles para melhor visualizar as variáveis que contribuem para a separação entre grupos.²⁵ O *Support Vector Machine* (SVM), por outro lado, é um algoritmo matemático que consiste em reconhecer padrões, separar os dados em regiões e determinar os riscos juntamente com os intervalos de confiança para sua separação. O SVM cria um plano usando diferentes funções para separar dois grupos; o SVM linear calcula a média dos dois grupos para a tomada de decisão.²⁶

1.7.1 Análise de Componentes Principais

A PCA é uma técnica multivariada utilizada para a redução do volume dos dados com a menor perda possível de informações, promovendo a observação do comportamento do sistema em coordenadas reduzidas, ou seja, é relacionada à ideia de redução de massa de dados.^{9,23}

Esta técnica pode ser utilizada para geração de índices e agrupamento de indivíduos. A análise agrupa os indivíduos de acordo com a variação de suas características, facilitando o comportamento dos padrões entre essas variáveis (Figura 4).²³

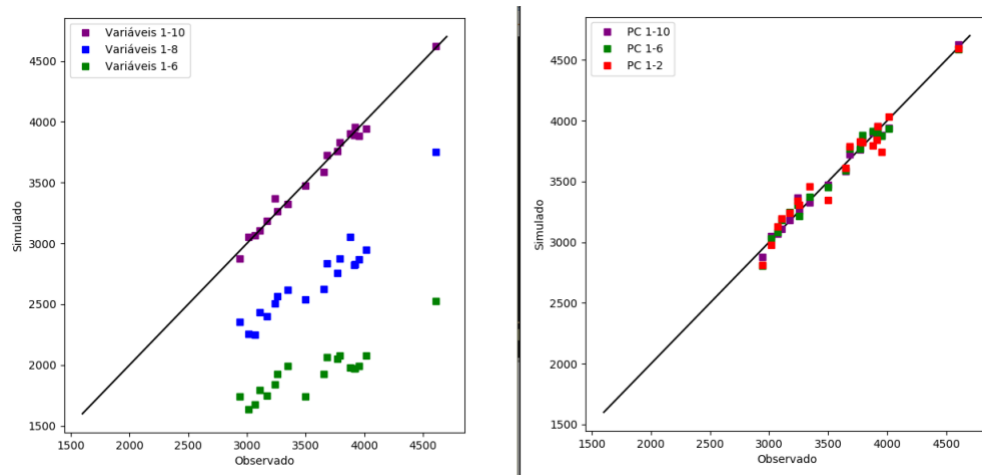


Figura 4. Agrupamento de classes de acordo com a variância.

Dessa forma, o PCA é uma transformação para redução de dimensionalidade. Quando se tem alta dimensão, essa transformação será responsável por encontrar um novo espaço para reduzi-la, e assim tornar possível melhor visualização das variáveis que contribuem para a separação.

1.7.2 Máquina de Suporte de Vetores (*Support Vector Machine, SVM*)

O SVM é um algoritmo matemático que consiste no reconhecimento de padrões, segregando os dados em regiões e determinando riscos juntamente com intervalos de confiança para sua separação.

Para que isso seja feito, o SVM utiliza vetores de peso, margens de risco e funções para diminuir o *overfitting* do sistema, situação a qual se obtêm erros elevados no conjunto de previsão.^{9,26}

O SVM constrói um plano utilizando diferentes funções para separar dois grupos (Figura 5). No exemplo do SVM linear, ele calcula a média dos dois grupos para tomada de decisão.

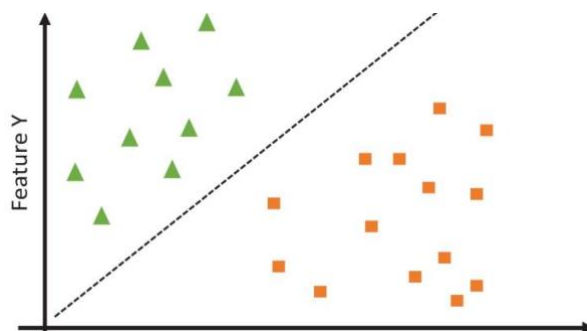


Figura 5. Plano linear para separação de grupos.

A FTIR tem sido usada em estudos para identificar espécies de *Leishmania*. Aguiar et al.²⁷ diferenciaram as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* (sin. *L. (L.) infantum*) e *L. major* por meio da deconvolução das bandas por ajuste de curvas nessas regiões, diferenciando quantitativamente polissacarídeos, amida III, fosfolipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Desta forma, as espécies apresentaram variações significativas, que contribuíram para sua diferenciação. Hornemann et al. diferenciaram espécies de *Leishmania* do Velho Mundo (*L. major*, *L. tropica*, *L. infantum* e *L. donovani*) e híbridos de espécies diferentes usando impressões digitais espectroscópicas vibracionais.²⁸

Estudo realizado em 2018 para tentar separar e identificar espécies de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* e *Leishmania infantum* apresentou resultados bastante promissores, onde a análise multivariada e da curva de ajuste gaussiana foram suficientes para distinguir as espécies.³¹

Nesse sentido, Barbosa et al.³² também conseguiu diferenciar fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* utilizando a técnica do FTIR.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi diferenciar espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose cutânea e mucocutânea, provenientes do cultivo axênico, a partir da análise multivariada de espectros de absorção no infravermelho das culturas dos parasitos (formas promastigotas), identificando as contribuições espectrais mais importantes para a identificação e associando-as aos componentes biológicos das amostras.

2.2 Objetivos específicos

- Discriminar espécies de *Leishmania* de cepas de referência a partir das culturas dos parasitos mantidas no Laboratório de Parasitologia Humana/INBIO/UFMS por meio da análise multivariada de espectros de absorção no infravermelho das culturas dos parasitos;
- Identificar as contribuições espectrais mais importantes para a identificação das espécies e associá-las aos componentes biológicos das amostras.

3 METODOLOGIA

3.1. Amostras analisadas

As amostras submetidas à análise por FTIR foram cepas de referência que já haviam sido devidamente identificadas e caracterizadas por métodos convencionais: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904). Os parasitos foram cultivados em meio de cultivo ágar sangue modificado – Neal, Novy e Nicolle (NNN), com fase líquida de Schneider's Insect Medium suplementado com soro fetal bovino a 20% (Sigma-Aldrich®, SP/Brazil), penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10 mg/mL (Sigma-Aldrich®, SP/Brazil). As culturas foram incubadas entre 24°C e 26°C.

As culturas foram expandidas na fase estacionária de crescimento e analisadas entre o sexto e sétimos dias de cultivo. Para o preparo das amostras, ambas as culturas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos e posteriormente o sobrenadante foi descartado. O concentrado de parasitas foi então ressuspense em 500 µL de meio e submetido à análise FTIR. Um total de 37 amostras das mesmas culturas de parasitas foram analisadas durante semanas diferentes, utilizando o mesmo protocolo de análise.

3.2. Preparo das amostras para espectroscopia FTIR e análise multivariada

Para a aquisição dos espectros no infravermelho, 20 µL das amostras de cultura ressuspensa foram depositados sobre substrato sólido de silício, utilizando duas técnicas distintas: "casting" e "spin-coating". BAKER et al.^{29,30} aponta a influência da secagem das amostras e da espessura das mesmas sobre os resultados finais. Assim, para estudar as melhores condições de preparo, observando facilidade e custo, estes dois métodos foram avaliados. Após deposição, a absorção das amostras na região do infravermelho médio foi avaliada (MID de 600 a 000 cm⁻¹), utilizando um acessório de reflectância atenuada para coleta dos dados - espectroscopia óptica vibracional (FTIR, Perkin-Elmer, modelo Spectrum 100). Os dados obtidos foram

analisados com base em métodos estatísticos de análise multivariada, a fim de diferenciar as amostras dos isolados das espécies/cepas de referência. Para isso, foi utilizado o software de programação MATLAB R2015b, no qual desenvolvemos uma rotina onde foi feita a leitura dos pontos obtidos nos espectros, transformação dos dados em matrizes e assim, execução das funções referentes a análise multivariada. O princípio fundamental da análise multivariada é a redução da dimensionalidade dos dados, possibilitando reduzir uma quantidade grande de informações, em um pequeno conjunto de dados que expressem a maior variação do sistema. Esta técnica computacional executou uma análise estatística que compara cada informação fornecida, identificando os pontos que apresentam maior “discriminância” entre os dados e os compara entre si, visando a diferenciação entre os grupos baseados no conjunto de variáveis fornecidas.

3.3. Algoritmo de análise multivariada de dados

Inicialmente, os espectros foram pré-tratados através do método SNV (*Standart Normal Deviation*) para reduzir possíveis discrepâncias experimentais entre os dados, seguido por análise de aprendizagem supervisionada e não supervisionada, com a seleção de intervalos espectrais com melhor potencial para separação dos grupos. A região do MID (4000 a 350 cm^{-1}) possuía o maior número de informações relacionadas às proteínas e aos compostos orgânicos. A análise não supervisionada foi realizada pelo método de PCA (*Principal Component Analysis*), utilizando os comandos padrões do Matlab, e a análise supervisionada foi realizada utilizando a caixa de ferramentas *Classification Learner* versão 10.1, por meio dos métodos: Análise de Discriminante (com funções Lineares, Quadráticas e Sub-espaciais), SVM (com funções Linear, Quadratic, Cubic, Fine Gaussian, Medium Gaussian e Coarse Gaussian) e KNN (com funções Fine Gaussian, Medium Gaussian, Coarse Gaussian, Cosine, Cubic e Weighted). Testes de validação cruzada foram realizados utilizando o método de *leave-one-out cross-validation*, e 30% das amostras foram reservadas para validação externa. O número de PCs empregado na análise foi avaliado de forma a evitar a ocorrência de “*overfitting*” ou “*underfitting*” nos modelos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desempenho do modelo foi avaliado através da precisão da classificação no teste de validação cruzada Leave-One-Out (LOOCV), em que uma amostra é selecionada para teste. Em contrapartida, as amostras restantes são utilizadas para a formação do modelo. Para melhorar a precisão global, foi efetuado um exame do desempenho do modelo de previsão em vários números de componentes principais (PCA).

Foram observadas precisões ótimas quando foram incorporados PCAs adicionais de ordem superior com menor variância de dados. Foi selecionado o número de PCAs que conduziu ao primeiro pico na precisão global durante os testes LOOCV e de validação, atenuando o sobreajuste ^{9,25-26}.

Os espectros FTIR médios e o desvio padrão para os grupos *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* estão resumidos na Figura 6. Este gráfico permitiu a identificação de distinções entre as amostras, particularmente na forma do espectro na região espectral entre 1200 e 900 cm^{-1} , e entre 1600 - 1550 cm^{-1} .

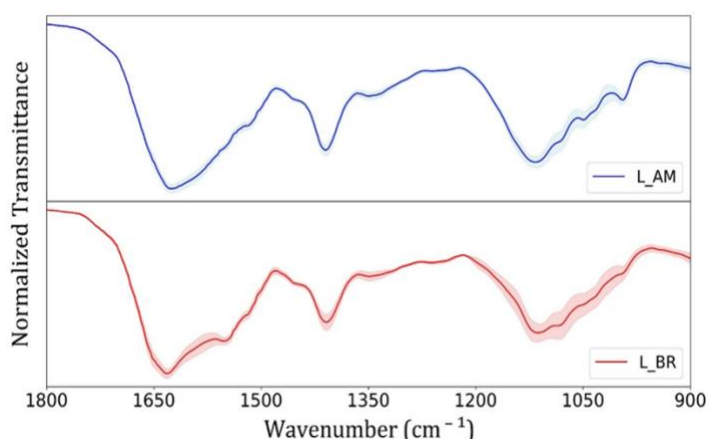


Figura 6. Espectro FTIR médio para *L. amazonensis* (L_AM) e *L. braziliensis* (L_BR).

A região entre 1028 e 1120 cm^{-1} no espectro está associada à absorção por polissacarídeos, principalmente a 1086 cm^{-1} , que corresponde a P=O (estiramento

simétrico de $>PO_2$ em ácidos nucleicos). Esta distinção entre grupos funcionais fosfodiésteres na estrutura do DNA/RNA pode estar relacionada com a diferenciação entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Essa diferença também foi observada por Aguiar et al. analisando as espécies *L. amazonensis*, *L. major* e *L. chagasi*.²⁷

Na análise de agrupamento utilizando PCA, foi observada uma divisão clara entre as espécies de *Leishmania*. A Figura 7 indica a heterogeneidade bioquímica entre as espécies ao longo dos eixos PC1 e PC2 e a contribuição espectral para o agrupamento. Isto demonstra que a análise FTIR foi capaz de discriminar entre as espécies de *Leishmania* analisadas. A aplicação da aprendizagem de máquina permitirá que o protótipo metodológico para a diferenciação entre espécies evolua para um programa capaz de fazer esta distinção em amostras de pacientes, tornando o tratamento mais rápido e eficiente.

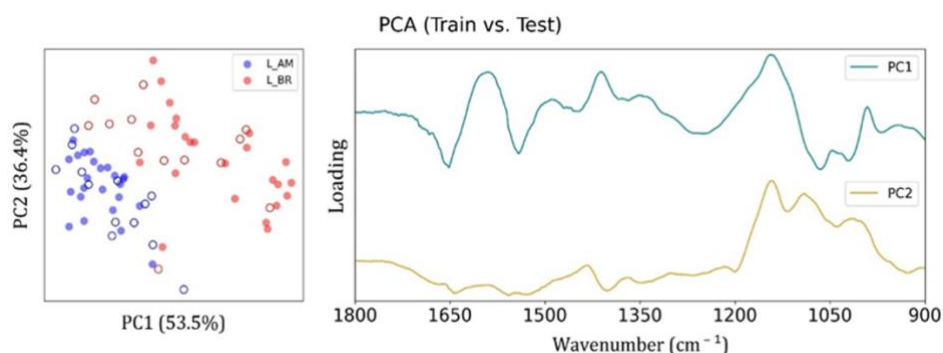


Figura 7. Análise de componentes principais de espectros normalizados de FTIR. (A) gráfico de pontuação e (B) gráfico de carga. O círculo vazio representa as amostras usadas no teste de validação. Espectros médios de FTIR para *L. (L.) amazonensis* (L_AM) e *L. (V.) braziliensis* (L_BR).

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que a análise FTIR pode ser um método de diagnóstico viável para distinguir entre espécies de *Leishmania*. Esta abordagem poderá facilitar um diagnóstico mais rápido e fidedigno e, consequentemente, um tratamento mais eficaz para os pacientes. Além disso, a pronta identificação das espécies circulantes poderá contribuir para o direcionamento de medidas de saúde pública para as leishmanioses com base em dados epidemiológicos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ENGELS, Dirk; ZHOU, Xiao-Nong. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious diseases of poverty**, v. 9, n. 01, p. 9-17, 2020.
- [2] LINDOSO, JAL; LINDOSO, AAB Doenças tropicais negligenciadas no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** , [S. l.] , v. 5, pág. 247-253, 2009.
- [3] WHO, 2022. **Informe de Leishmanioses** Nº 11 - Dezembro, 2022.
- [4] VASCONCELOS, Jairla Maria et al. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 221-7, 2018.
- [5] Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. - Brasília: **Ministério da Saúde**, 2017.
- [6] BATISTA, Francisca Miriane de Araújo et al. Perfil epidemiológico e tendência temporal da leishmaniose visceral: Piauí, Brasil, 2008 a 2018. **Cadernos de saúde publica**, v. 37, p. e00340320, 2021.
- [7] OLIVEIRA, Janaina Michelle de et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 188-193, 2010.
- [8] MARCELINO, Andreza Pain; DA SILVA, Aline Fagundes. Leishmaniose Tegumentar – Diagnóstico. **Fiocruz**,
- [9] M. da S. (MS), *Guia de vigilância em saúde*, 1st ed., vol. 3. Brasília, DF, 2017.
- [10] DE SOUZA, Marcos Antônio et al. Leishmaniose visceral humana: do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 10, n. 2, p. 62-70, 2012.
- [11] CERUTTI, Pedro Henrique Pietrzaki et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 55-59, 2017.
- [12] SUNDAR, Shyam; SINGH, Om Prakash. Molecular diagnosis of visceral leishmaniasis. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 22, n. 4, p. 443-457, 2018.

- [13] PAIVA, Byanca Regina de. **Utilização da PCR na identificação de espécies de leishmânias e do hábito alimentar em flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) de regiões do Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [14] DA SILVA, Maria Almerice Lopes et al. ALVOS MOLECULARES UTILIZADOS EM PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 3, p. 15-15, 2010.
- [15] COSTA, Graciele Pereira et al. Métodos de diagnóstico da leishmaniose canina. **Saber Científico (1982-792X)**, v. 9, n. 2, p. 95-104, 2021.
- [16] RIOUX, J. A. et al. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 65, n. 3, p. 111-125, 1990.
- [17] FOULET, Françoise et al. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome B gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 7, p. 2110-2115, 2007.
- [18] MYLER, Peter J.; STUART, Kenneth D. Recent developments from the *Leishmania* genome project. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 4, p. 412-416, 2000.
- [19] SOUZA, Ana Kely Rufino; DE LIMA, Dinorah Machado Vaz; OLIVEIRA, Simone Laila Andrade. Técnica FTIR e suas aplicações em amostras orgânicas. **ANAIS DO ENIC**, n. 6, 2014.
- [20] FARIA, Angélica Rosa; DE ANDRADE, Hélida Monteiro. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 11-11, 2012.
- [21] Martinez-Cuazitl, A.; Vazquez-Zapien, G. J.; Sanchez-Brito, M.; Limon-Pacheco, J. H.; Guerrero-Ruiz, M.; Garibay-Gonzalez, F.; Delgado-Macuil, R. J.; de Jesus, M. G. G.; Corona-Perezgrovas, M. A.; Pereyra-Talamantes, A.; Mata-Miranda, M. M. ATR-FTIR spectrum analysis of saliva samples from COVID-19 positive patients. *Sci. Rep.* 2021, 11, 19980.
- [22] Naseer, K.; Ali, S.; Mubarik, S.; Hussain, I.; Mirza, B.; Qazi, J. FTIR spectroscopy of freeze-dried human sera as a novel approach for dengue diagnosis. *Infrared Phys. Technol.* 2019, 102, 102998.

- [23] MARANGONI-GHOREYSHI, Y. G. et al. Multi-resistant diarrheagenic *Escherichia coli* identified by FTIR and machine learning: a feasible strategy to improve the group classification. **RSC Adv.**, 2023, 13.
- [24] PACHER G. et al. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis Using FTIR Spectroscopy and Machine Learning: An Animal Model Study. **ACS Infect Dis.** 2024; 9;10(2):467-474.
- [25] HONGYU, Kuang; SANDANIELO, Vera Lúcia Martins; DE OLIVEIRA JUNIOR, Gilmar Jorge. Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **E&S Engineering and science**, v. 5, n. 1, p. 83-90, 2016.
- [26] FERRÃO, Marco F. et al. LS-SVM: uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada. Comparação de modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR. **Química Nova**, v. 30, p. 852-859, 2007.
- [27] AGUIAR, Josafá C. et al. Differentiation of *Leishmania* species by FT-IR spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 142, p. 80-85, 2015.
- [28] HORNE MANN et al. A pilot study on fingerprinting *Leishmania* species from the Old World using Fourier transform infrared spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 29, p. 6907-6923, 2017.
- [29] BAKER, Matthew J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature protocols**, v. 9, n. 8, p. 1771-1791, 2014.
- [30] BAKER, M. J., et al. Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. **Chem. Soc. Rev.** 2016, 45, 1803–1818.
- [31] AGUIAR, J. C. et al. Using FT-IR spectroscopy for the identification of the *T. cruzi*, *T. rangeli*, and the *L. chagasi* species. **Exp Parasitol.** 2018;192:46-51. doi: 10.1016/j.exppara.2018.07.008.
- [32] BARBOSA, MATHEUS EUGÊNIO PORTO. DIFERENCIAÇÃO DE FÊMEAS DE LUTZOMYIA CRUZI E LUTZOMYIA LONGIPALPIS (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO. 2024.