



**Catarina da Silva
Ferreira**

**Estudo sobre metabolitos alvo de *Candida albicans*
com potencial aplicação na sua deteção: impacto
das condições de crescimento**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos académicos.

Catarina da Silva Ferreira



**Catarina da Silva
Ferreira**

**Estudo sobre metabolitos alvo de *Candida albicans*
com potencial aplicação na sua deteção: impacto
das condições de crescimento**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada - ramo de Microbiologia Clínica e Ambiental realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação da Professora Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão

o júri

presidente

Professor Doutor João António de Almeida Serôdio
professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria do Rosário Beja de Figueiredo Gonzaga Bronze
(Arguente)
professora associada do Departamento de Ciências Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida (Orientadora)
professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À minha orientadora Professora Doutora Adelaide Almeida e à minha co-orientadora Professora Doutora Sílvia M. Rocha por todo o apoio, motivação e disponibilidade, assim como por todos os conhecimentos transmitidos ao longo do meu percurso académico.

À Inês Baptista, por todo o apoio, motivação, assim como por todos os ensinamentos transmitidos durante a realização desta dissertação.

Ao Ângelo e Magda pela ajuda, apoio, disponibilidade e por todos os conhecimentos partilhados.

À Carina por toda a ajuda dada durante a realização deste trabalho, por todo o apoio, disponibilidade, pela amizade demonstrada e por toda a força transmitida ao longo destes anos.

À Márcia por toda a ajuda dada na realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ambiental pelo acolhimento, boa disposição e pelo apoio.

Ao Departamento de Biologia, ao CESAM, ao Departamento de Química e ao QOPNA da Universidade de Aveiro pelas condições proporcionadas, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de curso, em especial ao João, Fábio Loureiro, Fábio Alves, Catarina Luís e Mariana pela vossa amizade e por todos os bons momentos partilhados.

À Sara pela amizade, disponibilidade, pelo apoio incondicional e pela motivação dada ao longo do meu percurso académico. Agradeço por estar sempre presente nos bons e maus momentos, por ouvir os meus desabafos e por nunca me ter deixado sozinha nesta fase da minha vida que nem sempre foi fácil.

À minha prima Patrícia por toda a disponibilidade, paciência e apoio prestado nesta última fase do trabalho.

Aos meus pais e irmão pelo apoio incansável, pelo carinho, pela paciência demonstrada e pela força dada. Agradeço por terem acreditado sempre em mim e por me apoiarem nas minhas escolhas.

Obrigada!

palavras-chave

Candida albicans, Infecções fúngicas, Metabolitos, Microextração em fase sólida em modo espaço de cabeça (HS-SPME), Cromatografia de gás bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massa com analisador por tempo de voo de alta resolução (GC×GC-ToFMS)

resumo

Candida albicans é um dos principais fungos patogênicos causadores de infecções fúngicas oportunistas, as quais se manifestam particularmente em indivíduos imunocomprometidos. As infecções fúngicas invasivas estão associadas a uma elevada taxa de mortalidade, devido a um diagnóstico tardio e consequente atraso no início da terapêutica antifúngica. Este trabalho teve como principal objetivo avaliar o impacto das condições de crescimento (tempo e temperatura) no perfil metabolômico global da *C. albicans*, assim como em alguns metabolitos alvo. A microextração em fase sólida em modo espaço de cabeça combinada com a cromatografia de gás bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massa com analisador por tempo de voo de alta resolução (HS-SPME/GC×GC-ToFMS) foi a metodologia utilizada neste estudo. Foram selecionadas duas temperaturas (25 °C e 37 °C) e quatro tempos de crescimento (6 h, 12 h, 24 h e 48 h). Foi ainda realizado um estudo exploratório com vista a avaliar a aplicabilidade da metodologia desenvolvida de modo a distinguir *Candida albicans* de outras espécies de *Candida* não-*albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*.

Este estudo permitiu concluir que a temperatura e o tempo de crescimento influenciaram o metabolismo de *Candida albicans*, sendo produzido um maior teor global de metabolitos por UFC/mL às 6 h a 25 °C. Relativamente aos metabolitos alvo, verificou-se que os primeiros tempos de crescimento (6 h e 12 h) foram caracterizados pela presença de álcoois, aldeídos e 2-propanona e os tempos mais tardios (24 h e 48 h), pela presença de ésteres e sesquiterpenóides, sendo a abundância relativa destes metabolitos variável com a temperatura. Os metabolitos alvo selecionados, os quais incluem metabolitos reportados como estando associados ao *quorum sensing*, permitiram distinguir *C. albicans* das restantes leveduras num tempo de crescimento curto (6 h). Para o tempo de crescimento mais longo, estes metabolitos permitiram a distinção entre o fungo filamentosos e as leveduras. Usando o subconjunto de 5 metabolitos foi possível distinguir *C. albicans* das restantes leveduras. Em conclusão, este estudo revelou que o padrão de metabolitos alvo estudados caracteriza *C. albicans*, podendo este ser possivelmente usado no futuro na deteção de infecções fúngicas por esta espécie.

keywords

Candida albicans, Fungal infections, Metabolites, Headspace solid phase microextraction (HS-SPME), Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry with a high resolution time of flight analyser (GC×GC-ToFMS)

abstract

Candida albicans is a major fungal pathogen causing opportunist fungal infections, which manifest particularly in immunocompromised individuals. Invasive fungal infections are associated with high mortality rate due to a late diagnosis and subsequent delay in early antifungal therapy. This work aimed to assess the impact of growth conditions (time and temperature) on the global metabolomic profile of *C. albicans*, as well as on target metabolites. Headspace solid phase microextraction combined with comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry with a high resolution time of flight analyser (HS-SPME/GC×GC-ToFMS) was used. It was selected two temperatures (25 °C and 37 °C) and four growth times (6 h, 12 h, 24 h e 48 h). An exploratory study was performed in order to assess the applicability of the developed methodology to distinguish *C. albicans* from the other non-*albicans* *Candida* species, and *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*, as well.

This study allowed to conclude that the temperature and time of growth influence *Candida albicans* metabolism, producing a high global metabolite content per CFU/mL for 6 h at 25 °C. Concerning target metabolites, it was observed that the lower growth times (6 h and 12 h) are characterized by the presence of alcohols, aldehydes and 2-propanone and the later times (24 h and 48 h) are characterized by the presence of esters and sesquiterpenoids. The relative abundance of these metabolites is modulated by growth temperature. The target metabolites, which include metabolites reported as being associated to *quorum sensing*, allowed to distinguish *C. albicans* from the other yeasts in a short growth time (6 h). For longer times, these metabolites allowed the distinction between filamentous fungus and yeasts. Using the subset of 5 metabolites, it was possible to distinguish *C. albicans* from the other yeasts. In conclusion, this study revealed that the pattern of studied target metabolites characterizes *C. albicans* and, in the future, this pattern may be used in detection of fungal infections by this specie.

Índice

Índice	i
Lista de Abreviaturas e Acrónimos	iii
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Candida albicans</i>	3
1.2. Infeções fúngicas.....	5
1.3. Infeções fúngicas por <i>Candida albicans</i>	6
1.4. Diagnóstico de infeções fúngicas	7
1.4.1. Métodos de cultura e observação ao microscópio	9
1.4.2. Métodos imunológicos.....	9
1.4.3. Métodos moleculares.....	10
1.4.4. Novos métodos de diagnóstico	10
1.4.5. Detecção de ergosterol.....	11
1.5. Metabolómica microbiana	12
1.5.1. Perfil metabólico de <i>Candida albicans</i>	13
1.5.2. Metodologias de análise	17
1.6. Objetivos	24
2. Material e Métodos	25
2.1. Microrganismos estudados e condições de cultura.....	27
2.2. Determinação da concentração celular	27
2.3. Análise do exometaboloma volátil.....	28
2.3.1. Preparação das amostras	28
2.3.2. Extração dos metabolitos por HS-SPME.....	28
2.3.3. Análise por GC×GC-ToFMS	29

2.3.4. Tratamento estatístico de dados	30
3. Resultados e Discussão	33
3.1. Efeito das condições de cultura (temperatura e tempo de crescimento) no exometaboloma volátil global de <i>Candida albicans</i>	35
3.2. Efeito das condições de cultura (temperatura e tempo de crescimento) nos perfis de metabolitos alvo de <i>Candida albicans</i>	40
3.2.1. Cinco metabolitos alvo associados ao <i>quorum sensing</i>	44
3.2.2. Quinze metabolitos alvo normalmente detetados na <i>Candida albicans</i>	50
3.3. Distinção da <i>C. albicans</i> em relação a espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Aspergillus niger</i> a partir de um conjunto de metabolitos alvo	57
4. Conclusão	65
5. Bibliografia	69
6. Anexos	79

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

Abreviatura/Acrónimo	Designação em português	Designação em inglês
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
ANOVA	Análise de variância	Analysis of variance
1D-GC	Cromatografia de gás unidimensional	One-dimensional gas chromatography
DI	Imersão direta	Direct immersion
DMAPP	Dimetilalil difosfato	Dimethylallyl diphosphate
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzeno/Carboxeno/ Polidimetilsiloxano	Divinylbenzene/carboxen/ poly(dimethylsiloxane)
ECD	Detetor de captura de eletrões	Electron capture detector
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima	Enzyme-linked immunosorbent assay
FID	Detetor de ionização de chama	Flame ionization detector
FPP	Farnesil difosfato	Farnesyl diphosphate
GC×GC-ToFMS	Cromatografia de gás bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massa com analisador por tempo de voo de alta resolução	Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry with a high resolution time of flight analyser
GC-MS	Cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massa	Gas chromatography-mass spectrometry
GPP	Geranil difosfato	Geranyl diphosphate
h	horas	hours
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência	High-performance liquid chromatography
HS	Espaço de cabeça	Headspace
IFI	Infeções fúngicas invasivas	Invasive fungal infections
LLE	Extração líquido-líquido	Liquid-liquid extraction
MALDI-TOF MS	Ionização/Dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

Lista de Abreviaturas e Acrónimos (cont.)

Abreviatura/Acrónimo	Designação em português	Designação em inglês
min	minutos	minutes
<i>m/z</i>	Razão massa carga	Mass to charge ratio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina	Nicotinamide adenine dinucleotide
NCD	Detetor de quimioluminescência de azoto	Nitrogen chemiluminescence detector
NPD	Detetor de fósforo-azoto	Nitrogen phosphorus detector
PCA	Análise de Componentes Principais	Principal Component Analysis
PCR	Reação em cadeia da polimerase	Polymerase Chain Reaction
PNA-FISH	Hibridação <i>in situ</i> de fluorescência usando sondas de ácido nucleico peptídico	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization using peptide nucleic acid probes
RI	Índice de retenção	Retention index
rpm	rotações por minuto	rotations per minute
RSD	Desvio padrão relativo	Relative standard deviation
s	segundos	seconds
SIFT-MS	Tubo de fluxo de iões selecionados acoplado a espectrometria de massa	Selected ion flow tube mass spectrometry
SPE	Extração em fase sólida	Solid Phase Extraction
SPME	Microextração em fase sólida	Solid Phase Microextraction
TIC	Cromatograma de iões totais	Total ion chromatogram
t_R	Tempo de retenção	Retention time
u.a.	Unidades arbitrárias	Arbitrary units
UFC	Unidades formadoras de colónias	Colony-forming units
YGC	Agar Levedura Glucose Cloranfenicol	Yeast Glucose Chloramphenicol Agar

1. Introdução

1. Introdução

1.1. *Candida albicans*

Candida albicans é um fungo comensal do trato gastrointestinal e da mucosa oral e vaginal de indivíduos saudáveis. No entanto, é um patógeno oportunista para os indivíduos imunocomprometidos [1].

Tal como outros fungos patogênicos, *Candida albicans* é um fungo dimórfico, sendo capaz de crescer como levedura e pseudohifa (Figuras 1A e B)[2]. As células de levedura unicelulares crescem por gemulação. Nas células pseudohifais, o gomo alonga-se e, após a formação do septo, a célula-filha permanece ligada à célula-mãe, produzindo-se assim filamentos de células alongadas com constrições nas junções septadas. O alongamento dos gomos na pseudohifa pode ser extremo, fazendo com que os filamentos se assemelhem a hifas. Por isso, os termos pseudohifa e hifa são, por vezes, referidos em conjunto, usando-se o termo forma filamentosa [2].

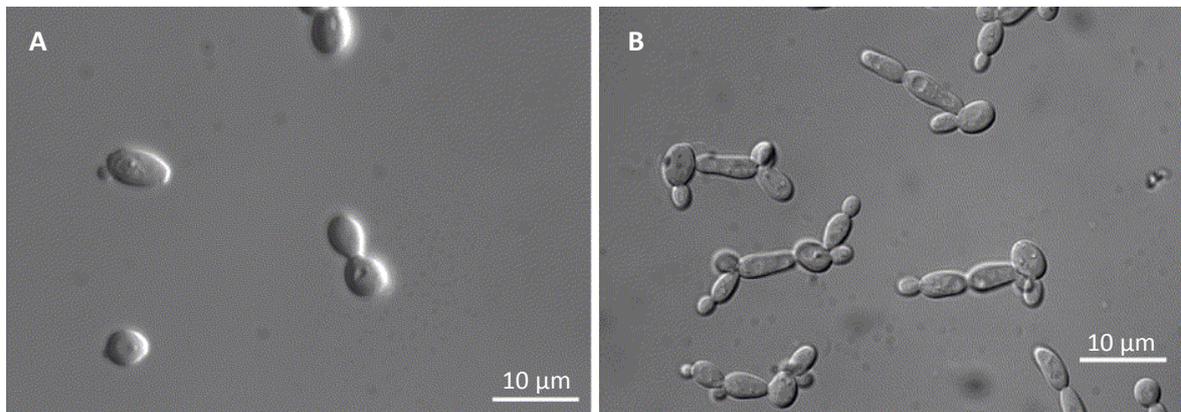


Figura 1- Diferentes formas morfológicas de *Candida albicans*. **A-**Levedura; **B-**Pseudohifa [2].

Vários parâmetros ambientais podem induzir a troca morfológica de levedura para forma filamentosa (morfogénese) de *Candida albicans*, nomeadamente a temperatura, pH, fonte de azoto, níveis de dióxido de carbono e densidade celular [3]. O crescimento da pseudohifa é favorecido à temperatura de 35 °C, pH de 6,0 e elevada quantidade de fosfato [2]. O crescimento em forma de levedura é promovido a uma temperatura inferior a 30 °C, pH de 4,0 e densidade celular $\geq 10^6$ células por mL [2,3].

A morfogénese de *Candida albicans* é também controlada por moléculas autorreguladoras através de mecanismos de *quorum sensing* [4]. As moléculas *quorum sensing* são sinais químicos extracelulares, produzidos continuamente em resposta a um aumento da densidade celular, de modo a coordenar a ação das células [5]. O triptofol e o álcool feniletílico, também designado como 2-feniletanol, foram as primeiras moléculas *quorum sensing*

1. Introdução

identificadas em *Candida albicans* [6]. Estas moléculas, quando produzidas, inibem a formação do tubo germinativo.

Posteriormente foram descobertas outras moléculas *quorum sensing*, nomeadamente *E,E*-farnesol, tirosol e ácido farnesóico. O farnesol é a molécula *quorum sensing* mais estudada, apresentando quatro isómeros mas apenas o isómero *E,E* tem atividade de *quorum sensing* [7]. Esta molécula bloqueia a transição de levedura para forma filamentosa, quando a densidade celular é elevada. No caso do tirosol, este acelera a formação do tubo germinativo a baixa densidade celular. O *E,E*-farnesol permite também a resistência ao *stress* oxidativo [6].

Cada morfologia adquirida por *Candida albicans* confere-lhe vantagens no decurso da infeção [6]. A forma de levedura é importante para a disseminação através da corrente sanguínea e permite a aderência a superfícies endoteliais. A forma filamentosa possibilita a invasão através do tecido epitelial do hospedeiro e confere maior resistência à fagocitose.

A parede celular tem um papel importante na biologia e patogenicidade de *Candida albicans*, uma vez que mantém a integridade da célula e medeia a interação entre o microrganismo e o ambiente, incluindo o hospedeiro [8]. A parede celular de *Candida albicans* contém 80-90% de hidratos de carbono, sendo constituída por duas camadas, a camada externa e a camada interna (Figura 2)[9].

A camada externa é constituída por polímeros de manose (mananas) associados covalentemente com proteínas, formando as manoproteínas. Estas representam 35-40% do peso seco da parede celular, sendo que as mananas representam cerca de 40% do conteúdo polissacarídico [10].

A camada interna é constituída por quitina e β -glucanos (β -1,3-glucano e β -1,6-glucano). A quitina e β -1,3-glucano formam uma malha à qual se ligam as proteínas da parede celular, que se encontram na camada externa, através dos resíduos de glicosilfosfatidilinositol, que se encontram ligados através do β -1,6-glucano [9].

Em células de levedura, a quitina representa cerca de 1-2% do peso seco da parede celular, sendo que na forma filamentosa, a quitina é mais abundante, contribuindo com 4-6% do peso seco da parede. O β -1,6-glucano representa 20% do peso seco da parede celular e está ligado covalentemente à quitina e ao β -1,3-glucano, funcionando como uma ponte molecular entre estes dois componentes da parede. O β -1,3-glucano é o componente mais abundante contribuindo com 40% do peso seco da parede, sendo que o seu conteúdo aumenta duas vezes na parede celular da forma filamentosa [10].

1. Introdução

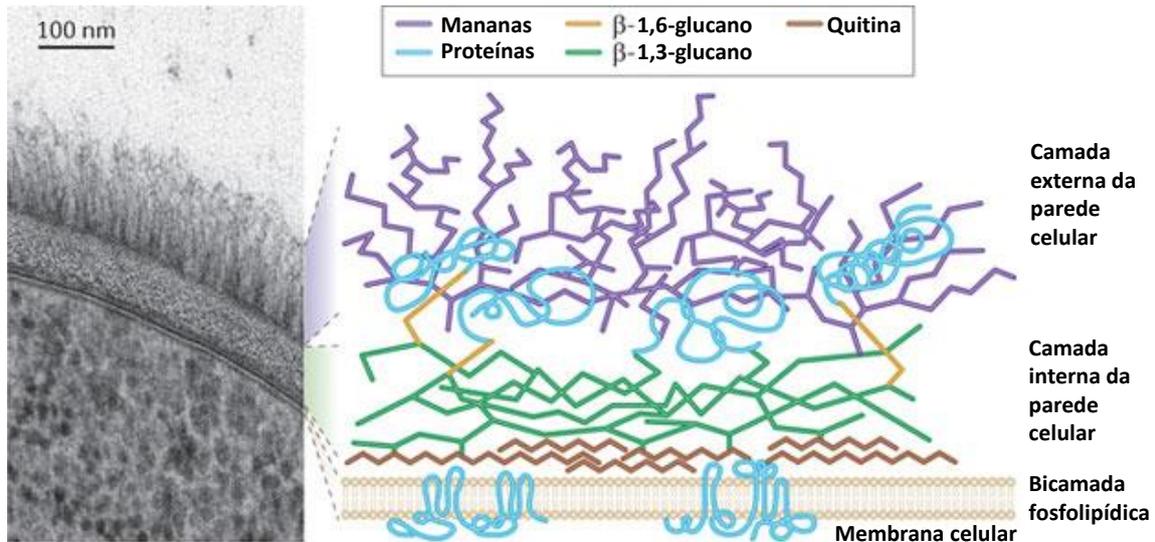


Figura 2- Estrutura da parede e membrana celulares de *Candida albicans*. A parede celular é constituída por duas camadas: a camada externa, composta por manoproteínas, e a camada interna, constituída por quitina, β -1,3-glucano e β -1,6-glucano. As proteínas da camada externa da parede celular ligam-se à malha de quitina e β -1,3-glucano predominantemente pelos resíduos de glicosilfosfatidilinositol, que se encontram ligados através do β -1,6-glucano. A membrana celular é constituída por uma bicamada fosfolipídica e proteínas (Adaptado de [9]).

A membrana celular de *Candida albicans* é uma estrutura essencial na interface entre as células e o meio externo (Figura 2)[11]. Esta estrutura é constituída por uma bicamada fosfolipídica, que contém proteínas que medeiam funções como a sinalização para o ambiente externo, captação e secreção de solutos através da membrana, endocitose, exocitose e síntese da parede celular. A membrana celular possui também ergosterol, que se encontra intercalado entre as cadeias acilo dos fosfolípidos. O ergosterol tem um papel importante na arquitetura e funcionalidade da membrana, uma vez que influencia a sua fluidez, permeabilidade aos catiões e crescimento celular [12].

1.2. Infecções fúngicas

As infecções fúngicas invasivas (IFI) são infecções da corrente sanguínea ou infecções disseminadas com envolvimento de um órgão profundo e representam a maior causa de morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos [13].

As infecções fúngicas afetam indivíduos imunocomprometidos, pacientes hospitalizados com doenças graves que requerem procedimentos cirúrgicos complexos e indivíduos que necessitam de suporte nas unidades de cuidados intensivos [14].

1. Introdução

A incidência de infecções provocadas por fungos tem aumentado devido a fatores como o internamento hospitalar prolongado, neutropenia (baixo número de neutrófilos), utilização de cateteres venosos centrais, administração de antibióticos de largo espectro, transplante de órgãos, nutrição parentérica total, insuficiência renal, diabetes mellitus, utilização de corticosteróides e imunossuppressores, ventilação mecânica e queimaduras extensas [13,15,16].

Os principais fungos patogênicos causadores de infecções fúngicas são as espécies de *Candida* e espécies de *Aspergillus*. No entanto, existem outros fungos causadores de infecção, como *Cryptococcus neoformans*, *Coccidiomyces immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., agentes causadores de mucormicose (gênero *Rhizopus*, *Absidia* e *Mucor*) e *Saccharomyces cerevisiae* [16,17].

Saccharomyces cerevisiae é um patógeno oportunista emergente, sendo que as infecções provocadas por este fungo em humanos têm aumentado nos últimos 20 anos [18]. Estas infecções ocorrem principalmente em indivíduos imunocomprometidos, sendo os principais fatores de risco, as terapêuticas imunossupressoras, administração de antibióticos e uso de cateterização intravascular. A ingestão de probióticos contendo *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* pode também causar infecção, principalmente em indivíduos com doenças inflamatórias intestinais e infecções gastrointestinais ou em indivíduos imunocomprometidos [18].

1.3. Infecções fúngicas por *Candida albicans*

As infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* são muito frequentes, sendo a candidíase invasiva, a quarta infecção da corrente sanguínea mais comum nos Estados Unidos da América e a sexta mais comum na Europa [13].

A incidência de candidemia e candidíase invasiva tem aumentado nas últimas décadas, particularmente nas unidades de cuidados intensivos [16].

A candidemia é uma infecção da corrente sanguínea provocada por espécies de *Candida*. Esta pode desenvolver-se em indivíduos que apresentam um baixo número de neutrófilos como resultado de uma terapia imunossupressora ou devido a fatores de risco adicionais como cirurgias gastrointestinais e uso de cateteres nas unidades de cuidados intensivos [1]. A candidemia tem uma taxa de mortalidade até 50%, estando associada a um aumento do internamento hospitalar e ventilação mecânica prolongada [13].

A candidíase invasiva envolve a infecção e disseminação de *Candida* através da corrente sanguínea para múltiplos órgãos, nomeadamente o cérebro, rins, coração, pulmões e fígado [19].

1. Introdução

C. albicans é a principal responsável pela maioria das infeções. No entanto, outras espécies de *Candida*, como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* são também responsáveis por candidíase invasiva nas unidades de cuidados intensivos, sendo os principais fatores de risco, o uso prévio de fluconazol e de antibióticos de largo espectro, cirurgias gastrointestinais e colocação de cateteres venosos centrais [16]. A adoção de profilaxias baseadas em azóis em muitas unidades de cuidados intensivos tem aumentado a ocorrência de candidemias causadas por *Candida glabrata* e *Candida krusei*, sendo que estas duas espécies surgem mais frequentemente em indivíduos com doenças hematológicas malignas [20]. *Candida parapsilosis* ocorre predominantemente em pacientes pediátricos, enquanto *Candida glabrata* é mais frequente em pacientes mais velhos.

A candidíase invasiva surge também em doentes queimados, com uma taxa de mortalidade de 30-90% [21]. O principal fator de risco são as queimaduras, uma vez que a perda da barreira protetora, a pele, faz com que os indivíduos queimados fiquem mais vulneráveis a infeções por *Candida* spp. O risco de infeção fúngica aumenta com o tamanho e a profundidade das queimaduras e com idade do paciente.

1.4. Diagnóstico de infeções fúngicas

As infeções fúngicas invasivas estão associadas a uma elevada taxa de mortalidade, devido ao facto do diagnóstico destas infeções ser por vezes demorado, atrasando assim o início da terapia antifúngica [22]. O diagnóstico de uma infeção assenta no reconhecimento de sintomas indicativos e sinais. Contudo, o diagnóstico inicial torna-se difícil pois, por vezes, os sintomas são poucos ou mesmo subtis e os sinais não são específicos [23].

Nas infeções da corrente sanguínea causadas por *Candida* spp., um atraso de 12 horas no início do tratamento antifúngico aumenta cerca de 20% o risco de mortalidade do paciente (Figura 3) [24].

1. Introdução

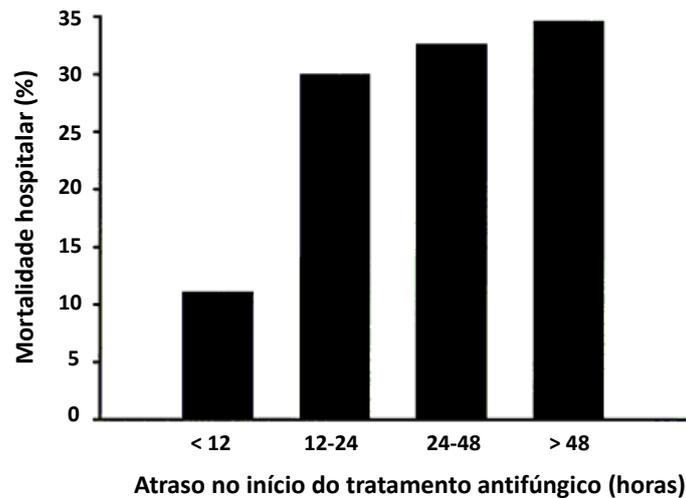


Figura 3- Relação entre a mortalidade hospitalar e o início do tratamento antifúngico. O tempo de atraso no início da terapia antifúngica foi determinado a partir do momento em que a primeira amostra de sangue (positiva para fungos) foi colhida para a realização da cultura até ao momento em que o tratamento foi administrado pela primeira vez no paciente (Adaptado de [24]).

Deste modo, é importante a realização de um diagnóstico precoce e o início imediato da terapia antifúngica, reduzindo assim a mortalidade associada às infeções fúngicas invasivas. O diagnóstico de infeções fúngicas pode ser feito com recurso a métodos convencionais, como métodos de cultura e observação ao microscópio. No entanto, estes métodos são demorados e possuem uma baixa sensibilidade, tornando assim urgente a criação de novos métodos, mais rápidos, com elevada sensibilidade e que permitam a identificação do agente causador ao nível da espécie [25].

Como alternativa aos métodos convencionais, existem os métodos imunológicos (deteção de antigénios fúngicos e/ou anticorpos) e moleculares (Reação em cadeia da polimerase (PCR)) [26,27], que permitem um diagnóstico mais rápido e com maior sensibilidade e especificidade. Além dos métodos mencionados anteriormente, têm sido desenvolvidos novos métodos para o diagnóstico de infeções fúngicas, como a técnica de Hibridação *in situ* de fluorescência usando sondas de ácido nucleico peptídico (PNA-FISH) e Ionização/Dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS) [28,29]. A análise do conteúdo em ergosterol pode também ser utilizada para determinar a presença de fungos [30].

1. Introdução

1.4.1. Métodos de cultura e observação ao microscópio

A cultura de microrganismos e a observação ao microscópio são métodos convencionais para o diagnóstico de infeções fúngicas.

A técnica de microscopia inclui um exame de amostras microbiológicas ou um exame histopatológico, que permite a identificação de estruturas fúngicas específicas, como pseudohifas ou células de levedura. No entanto, existem limitações à utilização da técnica de microscopia, nomeadamente a baixa sensibilidade, o facto de um exame microscópico negativo não excluir uma infeção e a microscopia não permitir uma identificação ao nível da espécie [13,22].

Os métodos de cultura consistem no cultivo de microrganismos em meios de cultura, podendo ser utilizados meios específicos para o crescimento de fungos, como o *Sabouraud glucose agar* [22] ou meios cromogénicos. Para a identificação de espécies de *Candida*, podem ser utilizados os meios cromogénicos Candida ID[®]2 (bioMérieux), CHROMagar[®] Candida (Becton-Dickinson) e CandiSelect[®]4 (Bio-Rad)[31].

A identificação de fungos pode ser complementada com a realização de testes bioquímicos, existindo, para isso, vários dispositivos miniaturizados disponíveis comercialmente. Para a identificação de leveduras estão disponíveis, o API[®]20C AUX (bioMérieux), Auxacolor[®]2 (Bio-Rad), Candifast[®] (ElitechGroup), Fungichrom[®] (ElitechGroup), Fungifast[®] (ElitechGroup) e ID[®]32C (bioMérieux) [31].

1.4.2. Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos baseiam-se na deteção de antigénios fúngicos e/ou anticorpos e permitem um diagnóstico precoce de infeções fúngicas. Vários ensaios para a deteção de antigénios circulantes de *Candida* spp. estão disponíveis comercialmente, nomeadamente o teste de aglutinação do latex e *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) [29]. Estes ensaios consistem na deteção de antigénios, como mananas e β -1,3-D-glucano [26,32,33]. As mananas podem ser detetadas com recurso a testes de aglutinação de latex, como o Pastorex[®] *Candida* (Bio-Rad) [31,34] ou através de um teste ELISA, o Platelia[®] *Candida* Antigen (Bio-Rad) [32].

No entanto, o uso simultâneo de testes para a deteção de antigénios e anticorpos anti-manana, como os testes Platelia[®] *Candida* Antigen e Platelia[®] *Candida* Antibody (Bio-Rad Laboratories), permite um diagnóstico com uma elevada especificidade e sensibilidade [32].

O β -1,3-D-glucano é também um componente da parede celular da maioria dos fungos, sendo excretado pelas células fúngicas durante a infeção [32]. A sua deteção pode ser feita com recurso a testes como Fungitell (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA) e Fungitec-G

(Seikagaku Biobusiness, Tokyo, Japan) [32]. No entanto, podem ocorrer falsos-positivos devido à presença de infecções bacterianas graves e uso de antibióticos como amoxicilina-clavulanato ou piperacilina-tazobactam [32,33].

1.4.3. Métodos moleculares

As técnicas de diagnóstico baseadas na amplificação de ácido nucleico permitem detectar infecções fúngicas invasivas com elevada sensibilidade e com maior rapidez do que as técnicas convencionais, permitindo assim um diagnóstico precoce e um início atempado da terapia antifúngica [33]. A técnica mais utilizada para a detecção de ADN é a técnica de PCR [27].

O LightCycler® SeptiFast test MGrade (Roche Molecular Systems, Mannheim, Germany) é um ensaio de PCR em tempo real disponível comercialmente, que deteta fungos, incluindo cinco espécies de *Candida* causadores de infecções da corrente sanguínea [27,32]. Este teste deteta e identifica o ADN fúngico diretamente de 1,5 mL de amostra de sangue total em menos de 6 horas [26,32]. Apesar das técnicas de PCR possuírem um elevado potencial, a detecção de ácido nucleico nos fluidos corporais é um desafio devido à parede celular robusta que impede uma lise eficiente e libertação do ADN, levando assim a falsos-negativos. Outras desvantagens incluem a dificuldade na distinção entre colonização fúngica e doença e a ocorrência de falsos-positivos devido a contaminação [27,33].

1.4.4. Novos métodos de diagnóstico

Para além dos métodos convencionais, imunológicos e moleculares, têm sido desenvolvidos novos métodos para o diagnóstico de infecções fúngicas, nomeadamente a técnica de Hibridação *in situ* de fluorescência usando sondas de ácido nucleico peptídico (PNA-FISH) e Ionização/Dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS) [28,29].

PNA-FISH é uma técnica de hibridação *in situ* de fluorescência que utiliza sondas de ácido nucleico peptídico. O Yeast Traffic Light PNA-FISH (AdvanDx, Woburn, MA) é um ensaio disponível comercialmente que permite distinguir cinco espécies de *Candida* diretamente de culturas de sangue em 90 minutos [35]. No entanto, o ensaio não permite distinguir entre *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* e entre *Candida glabrata* e *Candida krusei*.

MALDI-TOF MS é uma técnica que permite uma rápida identificação e classificação de microrganismos, incluindo fungos, com base em *fingerprints* resultantes da dessorção de proteínas específicas de patogénios [36]. Esta técnica permite uma identificação rápida e precisa de *Candida* spp., comparativamente com métodos convencionais não-automatizados,

melhorando assim o diagnóstico de infecções fúngicas e permitindo uma terapia antifúngica apropriada [37].

1.4.5. Detecção de ergosterol

O ergosterol é o principal esterol da membrana celular de fungos filamentosos e leveduras, sendo responsável pela manutenção da integridade da célula [12,38]. Este esterol tem sido usado para estimar a biomassa fúngica em solos e sistemas aquáticos, devido à existência de uma forte correlação entre o teor em ergosterol e a massa seca fúngica [39].

A quantidade de ergosterol não é constante. Esta depende das espécies de fungos, idade da cultura, fase de desenvolvimento (fase de crescimento, formação da hifa e esporulação) e condições de crescimento (meio de cultura, pH e temperatura) [40]. Em fungos, o conteúdo em ergosterol varia de 0,4 a 42 µg/mg de peso seco, sendo que em *Candida albicans* o teor em ergosterol é cerca de 3 µg/mg de peso seco [12,41].

A determinação do teor em ergosterol envolve as etapas de extração, posterior detecção e quantificação. Como o ergosterol pode ocorrer no estado livre ou ligado (esterificado com ácidos gordos), é necessária uma prévia hidrólise dos ácidos gordos (saponificação) com hidróxido de potássio, de modo a libertar as formas ligadas [42,43]. Posteriormente é efetuada a extração utilizando solventes orgânicos como o hexano e o heptano [38,43], sendo que esta pode ser combinada com ultrassons ou agitação com esferas de vidro, de modo a permitir a ruptura das células fúngicas e facilitar a libertação do ergosterol da membrana celular [42,44].

A detecção e quantificação de ergosterol podem ser feitas com recurso a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [43,45] e cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)[30,46,47].

1.5. Metabolómica microbiana

A metabolómica consiste na análise abrangente de todos os metabolitos presentes nas células, tecidos ou organismos em determinadas condições [48]. O metaboloma é definido como o conjunto de todas as moléculas de baixo peso molecular, os metabolitos, presentes numa célula, que participam em reações metabólicas, sendo estas moléculas necessárias para a manutenção, crescimento e funcionamento normal de uma célula [49]. O metaboloma compreende o endometaboloma (metabolitos intracelulares) e o exometaboloma (metabolitos libertados para o meio extracelular) [48].

A metabolómica microbiana constitui um componente integrante da biologia de sistemas, sendo essencial para compreender as interações microbianas e a dinâmica do metabolismo celular [48,50]. Esta pode analisar diferentes tipos de compostos, entre os quais, metabolitos primários, secundários e moléculas *quorum sensing* [48].

A metabolómica possui várias aplicabilidades, nomeadamente a descoberta de biomarcadores, identificação de alterações em vias devido a doença ou tratamento e o diagnóstico de doenças, e, por isso, a identificação e quantificação de metabolitos tem-se tornado importante na prática clínica [51].

Os microrganismos são ideais para estudos da biologia de sistemas, uma vez que são fáceis de manipular e têm um papel crucial na saúde humana [50]. Estes produzem compostos orgânicos voláteis, os quais são formados durante o metabolismo primário e secundário. Por conseguinte, a produção dos compostos orgânicos voláteis microbianos varia consoante a espécie, fase de crescimento e condições como o pH e a temperatura [52].

A Tabela A1 (em anexo) sumaria alguns dos metabolitos produzidos por várias espécies, nomeadamente *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Mucor* sp., *Penicillium* spp. e *Saccharomyces cerevisiae*. Analisando a Tabela A1, verifica-se que 50% das espécies produz 2-metil-1-butanol, mais de 30% das espécies produz etanol e mais de 40% produz 3-octanona e limoneno. Relativamente aos metabolitos 2-metil-1-propanol e 1-octeno-3-ol, mais de 50% das espécies produz estes álcoois, sendo que mais de 75% das espécies produz 3-metil-1-butanol.

1. Introdução

1.5.1. Perfil metabólico de *Candida albicans*

As espécies de *Candida* produzem vários metabolitos extracelulares que funcionam como reguladores da sua biologia, nomeadamente o 3-metil-1-butanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol [53,54]. Todos estes metabolitos possuem, em comum, um grupo funcional hidroxilo (OH), no entanto, quanto aos seus precursores biossintéticos, estes podem ser classificados como álcoois alifáticos (3-metil-1-butanol e 1-dodecanol) e aromáticos (2-feniletanol) e sesquiterpenóides (*E*-nerolidol e *E,E*-farnesol) [55].

Para além destes metabolitos, as espécies de *Candida* produzem outros álcoois, como o 1-propanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-1-butanol, acetaldeído e ésteres, nomeadamente o acetato de etilo, propanoato de etilo, butirato de etilo e acetato de isoamilo (Tabela 1)[56].

Tabela 1- Metabolitos voláteis produzidos por *Candida* spp. e métodos utilizados para a sua análise

Metabolito	<i>Candida</i> spp. ^a										Método de análise	Referência bibliográfica	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Álcoois Alifáticos													
1-propanol	+		+		+			+	+	+		DHS/GC-MS	[56]
2-metil-1-propanol	+		+	+	+	+	+	+	+	+		DHS/GC-MS	[56]
3-metil-1-butanol	+		+	+	+	+	+	+	+	+		DHS/GC-MS	[56]
												HS-SPME/GC-MS	[53,54]
2-metil-1-butanol	+		+	+	+	+	+	+	+	+		DHS/GC-MS	[56]
1-dodecanol	+	+						+		+		HS-SPME/GC-MS	[53,54]
1-pentanol								+				SDE/GC-MS	[57]
2-pentanol								+				SDE/GC-MS	[57]
1-octeno-3-ol								+				SDE/GC-MS	[57]
Aromáticos													
2-feniletanol	+	+						+	+		+	SDE/GC-MS	[57]
												HS-SPME/GC-MS	[53,54]
Aldeídos Alifáticos													
acetaldeído	+		+	+	+	+	+	+	+	+		DHS/GC-MS	[56]
												HS/SIFT-MS	[58]
2-butenal	+											HS/SIFT-MS	[58]
Cetonas													
2-propanona	+											HS/SIFT-MS	[58]

1. Introdução

Tabela 1- Continuação

Metabolito	<i>Candida spp.</i> ^a										Método de análise	Referência bibliográfica
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Ésteres												
<i>Alifáticos</i>												
acetato de etilo	+		+	+	+	+	+	+	+	+	DHS/GC-MS	[56]
propanoato de etilo	+			+	+	+	+	+	+	+	DHS/GC-MS	[56]
butirato de etilo	+			+	+	+	+	+	+	+	DHS/GC-MS	[56]
acetato de isoamilo	+		+	+	+	+	+	+	+	+	DHS/GC-MS	[56]
Sesquiterpenóides												
<i>E</i> -nerolidol	+	+					+				SDE/GC-MS	[57]
											HS-SPME/ GC-MS	[53,54]
<i>E,E</i> -farnesol	+	+		+		+	+	+		+	HPLC/ GC-MS	[59]
											HS-SPME/ GC-MS	[53,54]

^a1- *Candida albicans*; 2- *Candida dubliniensis*; 3- *Candida famata*; 4- *Candida glabrata*; 5- *Candida inconspicua*; 6- *Candida kefyr*; 7- *Candida krusei*; 8- *Candida parapsilosis*; 9- *Candida pelliculosa*; 10- *Candida tropicalis*

DHS- Espaço de cabeça dinâmico; GC-MS- Cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massa; HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência; HS-SPME- Microextração em fase sólida em modo espaço de cabeça; SDE- Destilação-extração simultânea; SIFT-MS- Tubo de fluxo de íões selecionados acoplado a espectrometria de massa

Candida albicans, para além de produzir os metabolitos 3-metil-1-butanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol, produz também 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, acetaldeído, 2-butenal, 2-propanona e ésteres (acetato de etilo, propanoato de etilo, butirato de etilo e acetato de isoamilo) (Tabela 2)[53,54,56,58].

Tabela 2- Metabolitos voláteis produzidos por *Candida albicans* e métodos utilizados para a sua análise

Metabolito	Método de análise	Referência bibliográfica
Álcoois		
<i>Alifáticos</i>		
1-propanol		
2-metil-1-propanol	DHS/GC-MS	[56]
3-metil-1-butanol	DHS/GC-MS	[56]
	HS-SPME/GC-MS	[53,54]
2-metil-1-butanol	DHS/GC-MS	[56]
1-dodecanol	HS-SPME/GC-MS	[53,54]

1. Introdução

Tabela 2- Continuação

Metabolito	Método de análise	Referência bibliográfica
Aromáticos		
2-feniletanol	SDE/GC-MS	[57]
	HS-SPME/GC-MS	[53,54]
Aldeídos		
Alifáticos		
acetaldeído	DHS/GC-MS	[56]
	HS/SIFT-MS	[58]
2-butenal	HS/SIFT-MS	[58]
Cetonas		
2-propanona	HS/SIFT-MS	[58]
Ésteres		
Alifáticos		
acetato de etilo	DHS/GC-MS	[56]
propanoato de etilo		
butirato de etilo		
acetato de isoamilo		
Sesquiterpenóides		
<i>E</i> -nerolidol	SDE/GC-MS	[57]
	HS-SPME/GC-MS	[53,54]
<i>E,E</i> -farnesol	HPLC/GC-MS	[59]
	HS-SPME/GC-MS	[53,54]

DHS- Espaço de cabeça dinâmico; **GC-MS-** Cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massa; **HPLC-** Cromatografia líquida de alta eficiência; **HS-SPME-** Microextração em fase sólida em modo espaço de cabeça; **SDE-** Destilação-extração simultânea; **SIFT-MS-** Tubo de fluxo de íões selecionados acoplado a espectrometria de massa

Os metabolitos produzidos por *C. albicans* podem estar envolvidos em várias vias metabólicas, nomeadamente na glicólise, ciclo do ácido tricarbóxico (ciclo TCA), via Ehrlich, metabolismo do butanoato e propanoato e na biossíntese de esteróis.

Na respiração aeróbia, o piruvato produzido pela glicólise é oxidativamente descarboxilado a acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase [6]. Acetil-CoA, por ação da enzima acetil-CoA hidrolase, dá origem ao acetato, que por sua vez, origina o acetaldeído, pela ação de enzimas aldeído hidrogenases.

O ciclo TCA é o ponto central do metabolismo do carbono. Em condições aeróbias, acetil-CoA é totalmente oxidado a dióxido de carbono, água e energia através deste ciclo. No ciclo do TCA ocorrem também reações de anabolismo, sendo que os compostos intermediários deste ciclo são usados como precursores para a biossíntese de aminoácidos e lípidos.

Acetil-CoA pode ainda dar origem à 2-propanona, pela ação de transferases e liases. A 2-propanona pode também ser originada a partir do 2-propanol, pela ação de oxirredutases [60].

1. Introdução

No caso do 1-propanol, a sua biossíntese está relacionada com o metabolismo do propanoato [60].

Os álcoois superiores são derivados do catabolismo de aminoácidos através da via Ehrlich (Figura 4). Esta via consiste em três passos enzimáticos: transaminação, pela ação da transaminase, codificada pelos genes *ARO8* e *ARO9*, a qual dá origem ao ácido α -ceto. Este é posteriormente descarboxilado, pela ação da descarboxilase (codificada pelo gene *ARO10*), originando-se um aldeído, sendo este reduzido a um álcool superior pela enzima álcool desidrogenase (codificada por *ADH*) [61].

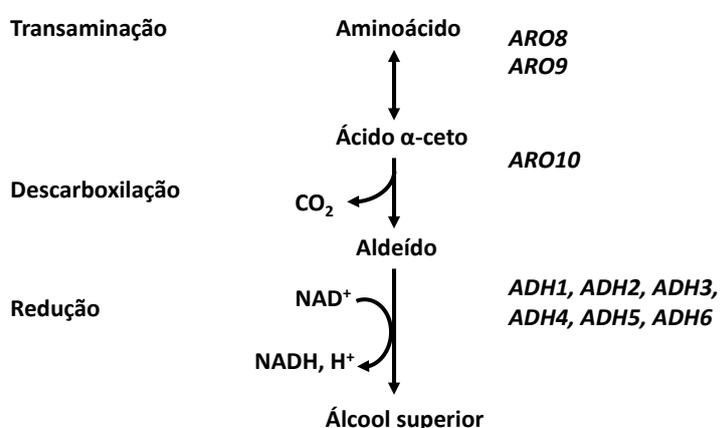


Figura 4- Via Ehrlich. O catabolismo de aminoácidos (leucina, valina e isoleucina) e aminoácidos aromáticos (fenilalanina) levam à formação de álcoois superiores. Este processo compreende três etapas: transaminação, pela ação da transaminase, dando origem a um ácido α -ceto, o qual é descarboxilado a um aldeído e posteriormente reduzido, pela ação da enzima álcool desidrogenase, a um álcool superior. Os genes que codificam as enzimas são indicados em cada passo (Adaptado de [62]).

A produção do álcool aromático 2-feniletanol é derivada do catabolismo de um aminoácido aromático, nomeadamente a fenilalanina [61]. O 3-metil-1-butanol é, tal como o 2-feniletanol, um álcool superior, sendo este derivado do aminoácido leucina. Os álcoois 2-metil-1-butanol e 2-metil-1-propanol podem ser produzidos através da via Ehrlich, sendo os seus precursores biossintéticos, a valina e a isoleucina, respetivamente [62].

Os ésteres podem ser formados pela condensação química enzimática de ácidos orgânicos e álcoois [63]. No caso do acetato de etilo e acetato de isoamilo, estes podem formar-se a partir da reação de condensação entre acetil-CoA e etanol e acetil-CoA e 3-metil-1-butanol, respetivamente. O propanoato de etilo pode ser formado por uma reação de condensação entre etanol e propanoil-CoA, estando este último relacionado com o metabolismo do propanoato. Por

1. Introdução

sua vez, o butirato de etilo pode formar-se a partir da reação de condensação entre o etanol e butanoil-CoA, estando este último relacionado com o metabolismo do butanoato [60]. Os sesquiterpenóides, como o *E*-nerolidol e o *E,E*-farnesol, são produzidos por uma via alternativa da biossíntese de esteróis, cujo intermediário é o farnesil difosfato (FPP) (Figura 5) [3].

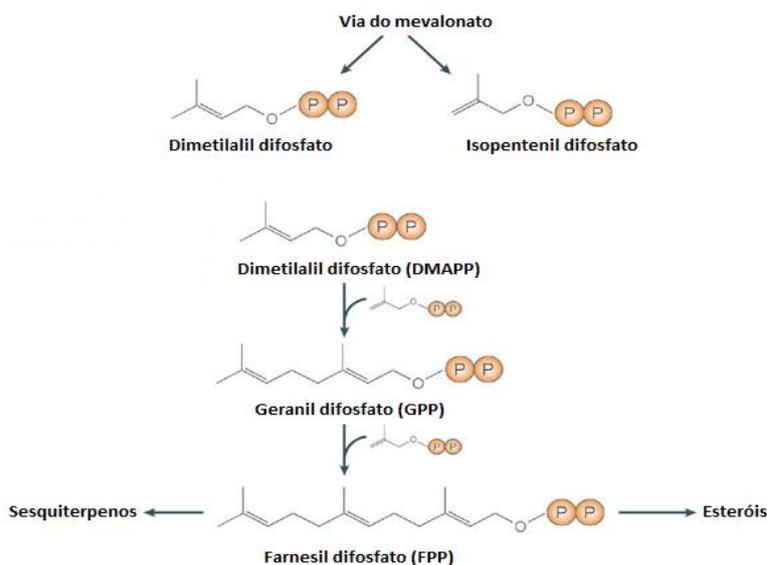


Figura 5- Via biossintética dos terpenos. O dimetilalil difosfato (DMAPP) e os intermediários isoprenóides são os pontos de partida para a síntese de vários metabolitos secundários, incluindo os sesquiterpenos. Os terpenos são produzidos pela ciclização dos isoprenóides, como é o caso do farnesil difosfato, que é ciclizado, pela enzima terpeno ciclase, para produzir uma variedade de sesquiterpenos (Adaptado de [64]).

1.5.2. Metodologias de análise

A detecção de metabolitos voláteis pode ser feita com recurso a diferentes metodologias. Em alguns estudos, têm sido utilizadas várias técnicas de extração, nomeadamente a técnica de espaço de cabeça dinâmico (DHS), destilação-extração simultânea (SDE) e microextração em fase sólida (SPME) [53,54,56,58]. Esta última é uma técnica que possui vantagens relativamente às restantes técnicas uma vez que é rápida e simples. Após a extração, os metabolitos voláteis podem ser analisados usando técnicas de cromatografia, designadamente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) ou ainda através da técnica SIFT-MS [53,54,56,58]. Em vários estudos metabolómicos tem sido utilizada a cromatografia de gás bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massa com analisador por tempo de voo de alta resolução (GC×GC-ToFMS). Comparativamente com a cromatografia de gás unidimensional (1D-GC), a cromatografia de gás bidimensional abrangente

(GC×GC) possui um elevado poder de resolução e maior sensibilidade [83]. Dadas as vantagens da utilização da metodologia de SPME/GC×GC-ToFMS em estudos de metabolómica microbiana, estas duas técnicas serão abordadas ao pormenor.

Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de preparação de amostras que permite a extração e concentração de compostos voláteis e semi-voláteis sem a utilização de solventes [65]. Desenvolvida no início dos anos 90 por Janusz Pawliszyn e colaboradores, a SPME teve como primeira aplicação a análise de poluentes em água [66]. Desde então, tem sido utilizada na área ambiental, higiene industrial, análises clínicas, forenses, alimentares e de produtos farmacêuticos [67].

SPME possui vantagens em relação a outras técnicas de preparação de amostras convencionais, como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). A técnica de SPME é simples, rápida e sensível [68,69]. Não é necessário promover uma extração exaustiva uma vez que pode ser atingido um equilíbrio entre a matriz da amostra e a fase estacionária que reveste a fibra [68].

A técnica de SPME envolve o uso de uma fibra de sílica fundida revestida com uma fase estacionária polimérica [70]. Para a sua proteção, esta fibra é incorporada numa seringa, constituída pelo suporte da fibra e pela agulha (Figura 6)[65]. O suporte contém o êmbolo, que permite a exposição e recolha da fibra na extração dos compostos e na dessorção térmica no injetor do cromatógrafo de gás. A agulha tem como função proteger a fibra e perfurar o septo do frasco que contém a amostra [67,70].

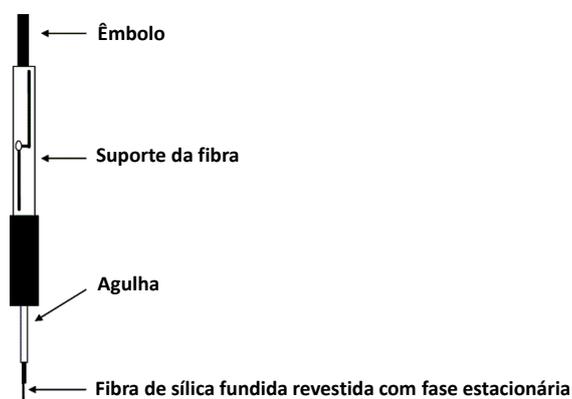


Figura 6- Seringa de SPME. A seringa tem como componentes, o suporte da fibra e a agulha. O suporte possui o êmbolo que permite expor e recolher a fibra de sílica fundida. Esta é revestida com uma fase estacionária que concentra os analitos até o sistema atingir o equilíbrio (Adaptado de [70]).

1. Introdução

A escolha do revestimento da fibra é um fator importante uma vez que o tipo e a quantidade de compostos que são extraídos da amostra dependem das características físicas e químicas da fase estacionária da fibra e da espessura do filme. Deste modo, o tipo de revestimento é escolhido de acordo com os compostos a analisar [71].

Para além dos revestimentos absorventes e adsorventes, existem os revestimentos mistos. Os revestimentos mistos contêm um polímero líquido e partículas sólidas, combinando as propriedades de absorção do polímero líquido com as propriedades de adsorção das partículas porosas [72]. O revestimento DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidemilsiloxano) é um revestimento misto, que possui três polímeros diferentes, ocorrendo assim um efeito sinérgico entre a absorção e a adsorção. Este efeito sinérgico mútuo de absorção e adsorção das fases estacionárias promove uma elevada capacidade de retenção e, conseqüentemente, uma elevada sensibilidade. Por isso, o revestimento DVB/CAR/PDMS tem sido amplamente usado, uma vez que apresenta uma vasta gama de capacidades de sorção de analitos com diferentes propriedades físico-químicas [73].

A microextração em fase sólida compreende duas etapas: extração e dessorção (Figuras 7A e B)[70]. Na primeira etapa, a amostra é colocada num frasco, sendo este selado com um septo e uma tampa de alumínio. A agulha da seringa perfura o septo e, em seguida, pela ação do êmbolo, a fibra é exposta à amostra e os analitos são sorvidos pela fase estacionária (Figura 7A).

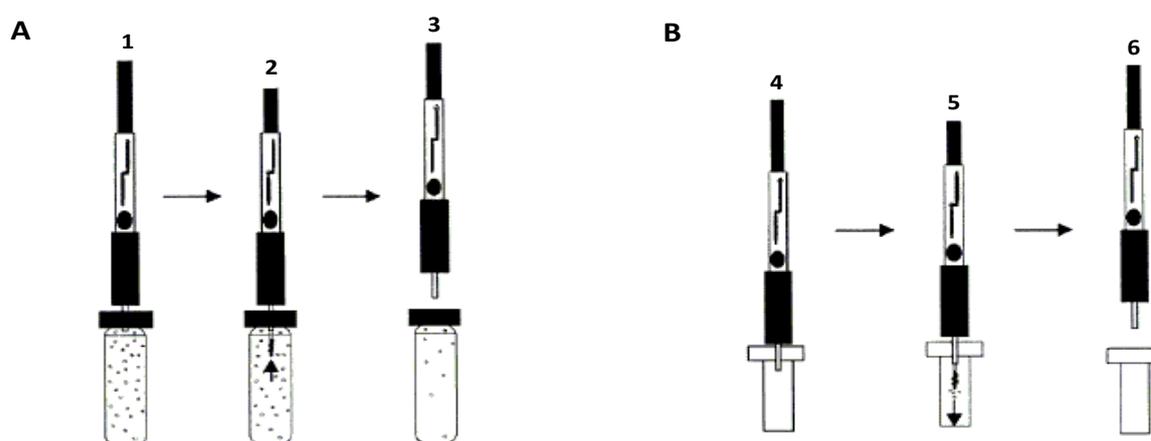


Figura 7- Procedimento de SPME. **A-** Extração; **B-** Dessorção. 1- Perfuração do septo pela agulha; 2- Exposição da fibra/ Extração dos analitos; 3- Recolha da fibra; 4- Inserção da agulha no injetor do cromatógrafo de gás; 5- Exposição da fibra/ Dessorção dos analitos; 6- Recolha da fibra [74].

1. Introdução

Após a extração, a fibra é recolhida para o interior da agulha e esta é removida do septo e inserida no injetor do cromatógrafo de gás, ocorrendo assim a dessorção térmica dos analitos (Figura 7B)[75].

A extração pode ser feita de dois modos: imersão direta (DI-SPME) ou em modo espaço de cabeça (HS-SPME) (Figuras 8A e B) [65,76]. Em DI-SPME, a fibra é inserida na amostra líquida e os analitos são transferidos diretamente da matriz da amostra para o revestimento da fibra. Em HS-SPME, a fibra é exposta na fase de vapor acima da amostra sólida, líquida ou gasosa, não havendo assim contacto entre a fibra e a amostra. Os analitos migram primeiro para o espaço de cabeça e posteriormente para o revestimento da fibra. Na etapa de extração, a amostra é, por vezes, agitada com um magnete para aumentar a taxa de extração e encurtar o tempo de equilíbrio [75].

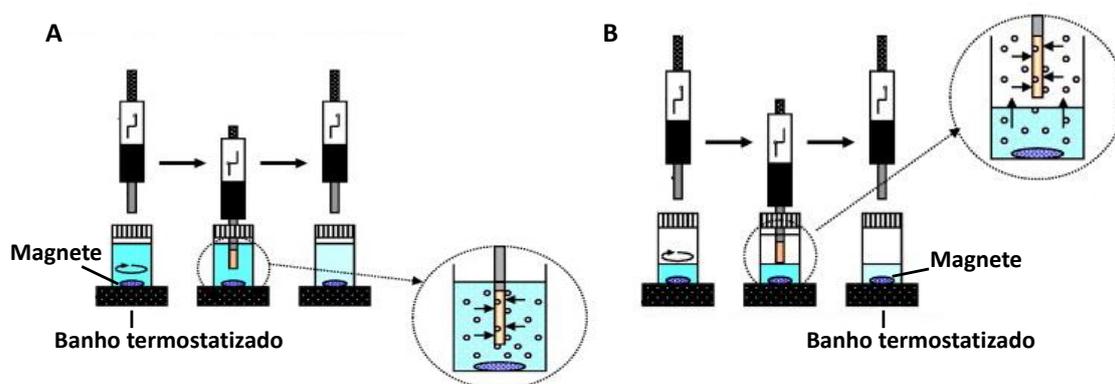


Figura 8- Processo de extração de analitos por imersão direta (DI-SPME)(A) ou em modo espaço de cabeça (HS-SPME)(B) (Adaptado de [75]).

A eficiência de extração e a reprodutibilidade da técnica de SPME são dependentes de vários parâmetros, nomeadamente do revestimento da fibra, temperatura e tempo de extração, volume da amostra, tipo e uniformidade da matriz, pH, agitação e efeito *salting out* [73,77]. A temperatura de extração influencia, de forma significativa, a eficiência do processo de SPME, uma vez que determina a pressão de vapor dos analitos e a sua solubilidade nas matrizes líquidas. Com o aumento da temperatura ocorre o aumento da pressão de vapor, o que acelera a transferência dos analitos da matriz da amostra para o espaço de cabeça [77].

O tempo de extração é também um parâmetro importante, sendo que para promover uma maior transferência dos analitos da amostra para o espaço de cabeça, a amostra deve ser termostaticada durante 5-60 min [73].

1. Introdução

A agitação da amostra facilita a libertação dos compostos voláteis pelo aumento da superfície de interface líquido-vapor, reduzindo assim o tempo necessário para atingir o equilíbrio [71,78].

A adição de um sal, como o cloreto de sódio, promove a transferência dos analitos da fase aquosa para o espaço de cabeça e posteriormente para o revestimento da fibra, aumentando a eficiência de extração. A adição de um sal diminui a solubilidade dos compostos na fase aquosa, sendo este fenómeno designado por efeito *salting out* [73].

Cromatografia de gás bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massa com analisador por tempo de voo de alta resolução (GC×GC-ToFMS)

A cromatografia de gás bidimensional abrangente (GC×GC) é uma técnica de separação que permite a análise de amostras complexas ou analitos alvo em quantidades vestigiais [79].

GC×GC utiliza dois mecanismos ortogonais para separar os constituintes da amostra numa única análise [80]. A técnica é baseada na aplicação de duas colunas cromatográficas revestidas com diferentes fases estacionárias, por exemplo, pode ser usada uma coluna apolar e outra polar. A composição da fase estacionária da primeira coluna é geralmente menos polar do que a da segunda coluna, de modo que a separação é regulada pelos pontos de ebulição dos analitos (volatilidade) na primeira dimensão (¹D) e pela polaridade na segunda dimensão (²D) [81].

As duas colunas cromatográficas estão conectadas em série através de uma interface especial, o modulador (Figura 9). A interface corta pequenas porções (alguns segundos) da substância eluída pela primeira coluna, através da criofocagem e reinjeta-as na segunda coluna. Cada pico da ¹D é modulado várias vezes, permitindo assim que a separação da ¹D seja preservada. A segunda coluna é muito curta e estreita, sendo que cada porção modulada é instantaneamente separada, antes da próxima modulação. Deste modo, os compostos co-eluídos da primeira coluna sofrem uma separação adicional na segunda coluna [80].

1. Introdução

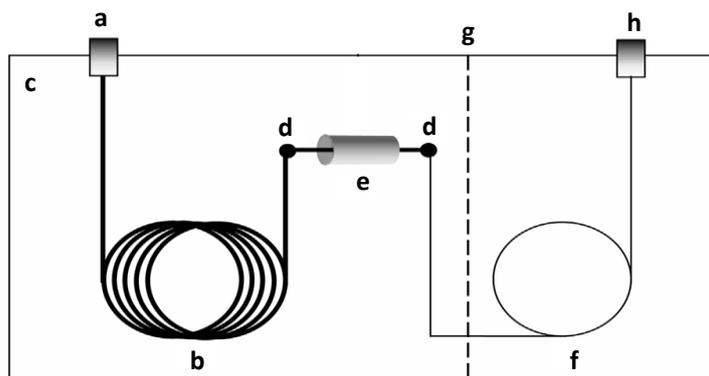


Figura 9- Diagrama de um sistema GCxGC. **a-** Injetor; **b-** Coluna da primeira dimensão; **c-** Forno primário; **d-** Conector da coluna; **e-** Interface GCxGC (modulador); **f-** Coluna da segunda dimensão; **g-** Forno secundário; **h-** detector [82].

Comparativamente com a cromatografia de gás unidimensional (1D-GC), o potencial de separação é muito maior em GCxGC. A sensibilidade e os limites de detecção são melhorados devido à focagem do pico no modulador [83].

Como a segunda coluna do GCxGC produz picos tão estreitos como 0,1 s, é necessário a utilização de uma técnica de detecção suficientemente rápida para descrever os picos adequadamente. Isto representa um problema para os espectrômetros de massa clássicos que apenas conseguem uma velocidade de 50 espectros s^{-1} [81]. Inicialmente foram utilizados os detetores de ionização de chama (FID), captura de eletrões (ECD), quimioluminescência de azoto (NCD) e azoto-fósforo (NPD). Os espectrômetros de massa quádruplos e magnéticos também foram acoplados a GCxGC, no entanto, o seu funcionamento é lento [84].

Como alternativa, surgiu a espectrometria de massa com analisador por tempo de voo de alta resolução (ToFMS), com taxas de aquisição máxima de 500 espectros s^{-1} . ToFMS possui vantagens, sendo uma delas, a aquisição de espectros de massa total ao nível de sensibilidade de analitos vestigiais, o que permite desconvulsionar os espectros com picos co-eluídos [81,85].

Num sistema GCxGC, o registo do sinal do detetor em função do tempo é uma sequência contínua de cromatogramas obtidos para cada fração eluída na 2D . Os gráficos obtidos são tridimensionais e representam o sinal do detetor, o tempo de retenção da primeira coluna (1t_R) e o tempo de retenção na segunda coluna (2t_R).

A Figura 10 ilustra um exemplo de três analitos co-eluídos numa banda cromatográfica larga na 1D (A), sendo que esta banda é posteriormente fracionada e eluída na 2D , gerando um cromatograma bruto (B). Os cromatogramas individuais (C) são tratados para gerar gráficos

1. Introdução

tridimensionais que representam o sinal em ${}^1t_R \times {}^2t_R$ (D) ou uma série de curvas de nível monocromáticas (diagrama de contornos) (E) ou escalas cromáticas de intensidade de sinal (diagrama de cores) (F) [86].

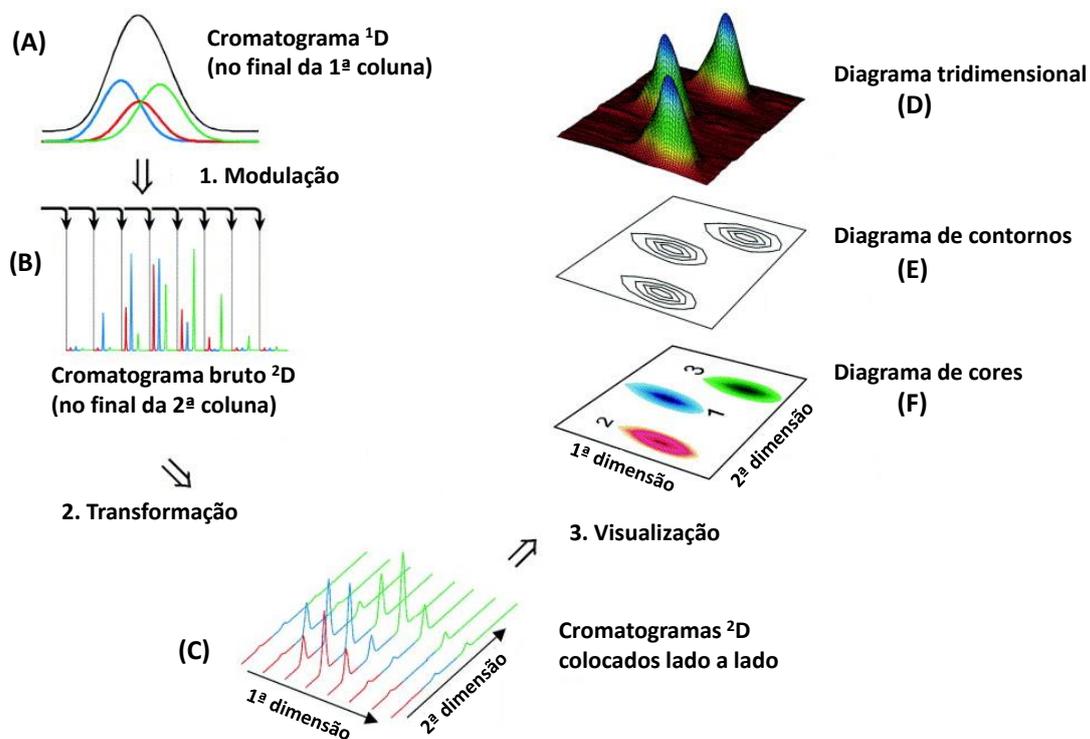


Figura 10- Construção de diagramas tridimensionais em GCxGC (Adaptado de [86]).

A cromatografia de gás bidimensional abrangente (GCxGC) possui várias vantagens, quando comparada com a cromatografia de gás unidimensional (1D-GC). GCxGC proporciona tempos de corrida mais rápidos, melhor resolução, maior sensibilidade e elevada capacidade de pico [81,84]. Capacidade de pico (n) é definida como o número máximo de picos que podem ser separados numa mesma análise, com uma determinada resolução [87]. Em GCxGC, a capacidade de pico máxima é o produto das capacidades de pico das duas dimensões, o que faz com que a capacidade de pico seja mais elevada do que em 1D-GC.

1.6. Objetivos

Candida albicans é a quarta principal causa de infeções nosocomiais (adquiridas em ambiente hospitalar), com uma elevada taxa de mortalidade em indivíduos imunocomprometidos, resultante do facto do diagnóstico ser, por vezes, demorado, levando a um atraso no início do tratamento.

Na literatura, existem estudos reportados acerca de alguns dos metabolitos produzidos por *Candida albicans*, sendo que determinados metabolitos desempenham um papel importante na morfogénese deste microrganismo. No entanto, não existe informação disponível sobre o impacto das condições de cultura no perfil destes metabolitos, os quais podem ser usados para extrair informação relevante sobre o metabolismo da *Candida albicans*. Assim, este trabalho tem como principal objetivo o estudo sobre metabolitos alvo de *Candida albicans* com potencial aplicação na sua deteção e o impacto das condições de crescimento no perfil destes metabolitos.

Com vista a atingir este objetivo, foram definidos objetivos mais específicos, nomeadamente:

- a) Avaliar as variações no padrão metabolómico global da *C. albicans* em função das condições de cultura: tempo e temperatura de crescimento;
- b) Avaliar as variações em metabolitos alvo da *C. albicans* (5 metabolitos *do quorum sensing*) em função das condições de cultura: tempo e temperatura de crescimento;
- c) Avaliar as variações em metabolitos alvo da *C. albicans* (15 metabolitos normalmente detetados nesta espécie) em função das condições de cultura: tempo e temperatura de crescimento;
- d) Explorar a aplicabilidade do uso dos metabolitos alvo estudados na *C. albicans* para a sua distinção em relação a espécies de *Candida* não-*albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* em condições de crescimento definidas.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismos estudados e condições de cultura

Neste estudo foi utilizada a estirpe *Candida albicans* SC5314, cedida pelo Laboratório de Biologia do RNA do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. As culturas foram preparadas em meio *Yeast Glucose Chloramphenicol Agar* (YGC) (Liofilchem) a partir de uma cultura pura, incubadas a 37 °C durante 48 horas e conservadas a 4 °C. Antes de cada ensaio experimental, a cultura de *C. albicans* foi repicada três vezes em meio líquido YGC (10 g de D-glucose e 5 g de extrato de levedura para 1 L), a partir de uma colónia bem isolada no meio sólido e incubada a 25 °C e a 37 °C durante 48 horas.

O ensaio experimental foi realizado em diferentes tempos de crescimento, nomeadamente 6 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas e a duas temperaturas, 25 °C e 37 °C. Para cada tempo de crescimento e temperatura foram utilizadas três amostras independentes (A, B e C).

De modo a comparar o perfil metabólico de *C. albicans* com outras leveduras e com um fungo filamentoso, foram utilizadas as espécies *Candida tropicalis* 525006, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*, cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ambiental do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

As culturas das leveduras foram preparadas como descrito anteriormente. Antes de cada ensaio, as culturas foram repicadas três vezes em meio líquido YGC, a partir de uma colónia bem isolada no meio sólido e incubadas a 25 °C, durante 48 horas. O ensaio experimental foi realizado em dois tempos de crescimento, 6 horas e 72 horas à temperatura de 25 °C, sendo utilizadas três amostras independentes (A, B e C) para cada levedura.

No caso de *Aspergillus niger*, as culturas foram preparadas em meio sólido YGC a partir de uma cultura pura, incubadas a 25 °C durante 7 dias e conservadas a 4 °C. Antes do ensaio, a cultura foi repicada em meio sólido YGC e incubada a 25 °C durante 7 dias. Após este tempo de incubação, uma colónia bem isolada foi colocada em meio líquido YGC e a cultura foi incubada durante 72 h à temperatura de 25 °C. Foram usadas três amostras independentes (A, B e C).

2.2. Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular foi feita através da contagem do número de colónias, sendo esta expressa em Unidades Formadoras de Colónias por mL (UFC/mL). Para isso, foi utilizado 1 mL de cultura de *C. albicans* e foram efetuadas diluições até 10⁻⁶ em Solutio de Ringer (Merck Millipore) esterilizado, seguido de sementeira à superfície (pelo método do espalhamento em placa) em meio sólido YGC (Liofilchem). Para os tempos de crescimento 6 h, 12

2. Material e Métodos

h e 24 h, foram utilizadas as diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , sendo que para o tempo de crescimento 48 h foram utilizadas as diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Para os quatro tempos de crescimento foram feitas cinco réplicas por diluição, sendo semeados 100 μ L em cada uma delas. Após a incubação das placas a 25 °C e a 37 °C durante 48 h, foi contado o número de colónias, sendo a concentração celular expressa em UFC/mL. Relativamente às restantes espécies estudadas, foram utilizadas as diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} para as leveduras e 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} para o fungo filamentososo. Foram utilizadas cinco réplicas por diluição sendo semeados 100 μ L em cada uma delas. Após a incubação das placas a 25 °C durante 48 h e 7 dias (para o fungo filamentososo), foi contado o número de colónias.

2.3. Análise do exometaboloma volátil

2.3.1. Preparação das amostras

Após 6 h, 12 h, 24 h, 48 h de crescimento (a 25 °C e a 37 °C) e 72 h (a 25 °C) foram recolhidos 25 mL de cada uma das amostras em estudo. Posteriormente, este volume de amostra foi centrifugado a 10 000 rpm, 4 °C durante 15 min (Centrífuga Beckman AVANTI). Foram filtrados 20 mL do sobrenadante, através de um filtro de seringa com poro de 0,20 μ m de diâmetro, para um frasco de 60 mL. A cada um dos frascos contendo o sobrenadante foi adicionado 4 g de NaCl ($\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich), um agitador magnético (20x5 mm) e foram selados com um septo de politetrafluoroetileno e uma tampa de alumínio (Chromacol Ltd., Herts, UK). As amostras foram depois congeladas a -80 °C até serem analisadas.

2.3.2. Extração dos metabolitos por HS-SPME

Os metabolitos voláteis foram extraídos usando a microextração em fase sólida em modo espaço de cabeça (HS-SPME). Foi utilizado o suporte de SPME para amostragem manual e uma fibra de sílica fundida, ambos da Supelco (Aldrich, Bellefonte, PA, USA). O revestimento da fibra utilizado foi Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 30/50 μ m de espessura do filme). A seleção deste revestimento foi baseada num estudo metabolómico prévio realizado por Salvador *et al.* [88]. Este revestimento apresenta elevada capacidade de sorção de compostos com diferentes propriedades físico-químicas.

Antes do procedimento de HS-SPME, as amostras foram descongeladas, de modo a ficarem à temperatura ambiente. Posteriormente o frasco foi colocado num banho de água termostaticado a 50 °C \pm 0,1 °C com uma agitação de 350 rpm e a fibra de SPME foi inserida no

2. Material e Métodos

espaço de cabeça durante 30 min, para extração dos compostos voláteis. Foram analisadas 3 réplicas independentes para cada condição em estudo.

2.3.3. Análise por GC×GC-ToFMS

Após o passo de extração, a fibra de SPME foi introduzida manualmente no injetor do GC×GC-ToFMS e mantida a 250 °C durante 30 s de modo a ocorrer a dessorção dos compostos. O injetor do cromatógrafo estava equipado com um *liner* de 0,75 mm de diâmetro interno, tendo a análise decorrido em modo *splitless* (30 s). O sistema GC×GC-ToFMS LECO Pegasus 4D (LECO, St. Joseph, MI, USA) consiste num cromatógrafo de gás Agilent GC 7890A (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE) com um modulador criogénico de dois jatos (licenciado pela Zoex) e um forno secundário, e um espectrómetro de massa equipado com analisador ToF de alta resolução. Como coluna da ¹D foi utilizada uma coluna Equity-5 (30 m × 0,32 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura do filme, Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA) e da ²D foi usada uma coluna DB-FFAP (0,79 m × 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura do filme, J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA). O gás de arraste foi o hélio, com um fluxo constante de 2,50 mL min⁻¹. A temperatura do forno primário foi programada de 40 °C (1 minuto) a 140 °C a 10 °C min⁻¹ e depois de 140 °C a 200 °C (1 minuto) a 7 °C min⁻¹. A temperatura do forno secundário foi programada de 55 °C (1 minuto) a 155 °C a 10 °C min⁻¹ e depois de 155 °C a 215 °C (2 minutos) a 7 °C min⁻¹. A temperatura da linha de transferência e a temperatura da fonte do MS foi de 250 °C. O tempo de modulação foi 5 s; a temperatura do modulador foi colocada a 20 °C acima da temperatura do forno primário. O tempo de duração do pulso quente foi de 0,80 s e do pulso frio, de 1,70 s. O ToFMS foi operado a uma taxa de armazenamento de 100 espectros/s. O espectrómetro de massa foi operado no modo de impacto eletrónico (EI) a 70 eV usando uma gama de *m/z* de 33-350 e a voltagem do detetor foi de -1480 V. Os cromatogramas de iões totais (TIC) foram processados usando o *software* de processamento de dados automatizado ChromaTOF (LECO) com um limite de sinal/ruído (S/N) de 100. Os diagramas de contornos foram usados para avaliar a qualidade geral de separação e a identificação manual dos picos. Para identificação dos compostos, foi feita a análise do espectro de massa de cada composto detetado e posteriormente comparado com os espectros de massa existentes em duas bases de dados comerciais (Wiley 275 e US National Institute of Science and Technology (NIST) V. 2.0-Mainlib and Replib). A identificação foi também suportada pela determinação dos valores de índices de retenção (RI) que foram comparados com valores reportados na literatura para colunas cromatográficas

2. Material e Métodos

similares à coluna 1D utilizada. Os valores de RI foram determinados usando uma série de n -alcanos C_8 - C_{20} e calculados de acordo com a equação de van den Dool e Kratz [89].

$$RI = \left[\left(\frac{TR_p - TR_{ant}}{TR_{post} - TR_{ant}} \right) + Cn_{ant} \right] \times 100$$

RI - Índice de retenção

TR_p - Tempo de retenção do pico de interesse

TR_{ant} - Tempo de retenção do alcano anterior

TR_{post} - Tempo de retenção do alcano posterior

Cn_{ant} - Número de carbonos do alcano anterior

A área cromatográfica de cada composto foi usada como estimativa para avaliar o seu teor relativo.

2.3.4. Tratamento estatístico de dados

Para avaliar o efeito da temperatura e do tempo de crescimento na produção de metabolitos voláteis, foram utilizados dois critérios: o número total de metabolitos voláteis e a área cromatográfica total. A significância das diferenças observadas foi avaliada pela *One-Way* ANOVA. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Foram feitas comparações múltiplas usando o teste *post-hoc* Tukey. Quando a homogeneidade de variâncias não se verificou, foi usado o teste *post-hoc* Games-Howell. Quando a normalidade não foi observada, a significância das diferenças foi avaliada pelo teste de Kruskal -Wallis. O nível de significância foi de 0,05. Esta análise foi feita com recurso ao *software* IBM SPSS Statistics 20.

Para a avaliação da variação de um conjunto de 15 metabolitos voláteis com as condições de cultura e para o estudo comparativo do padrão de 15 metabolitos de *C. albicans* com outras espécies, foram feitos *heatmaps*, os quais permitem uma rápida interpretação da abundância relativa de cada metabolito presente em cada amostra. As matrizes de dados consistiram em 12 observações (3 amostras por tempo de crescimento) para cada uma das temperaturas e 5/15 variáveis (áreas cromatográficas dos metabolitos selecionados); 12 observações (3 amostras por espécie) e 5/15 variáveis (áreas cromatográficas dos metabolitos selecionados); 15 observações (3 amostras por espécie) e 5/15 variáveis (áreas cromatográficas dos metabolitos selecionados). Nas duas últimas matrizes acima referidas foram consideradas as seguintes espécies: *C. albicans*, *C.*

2. Material e Métodos

tropicalis, *C. glabrata* e *S. cerevisiae*, sendo que na última matriz foi ainda considerado *Aspergillus niger*. As áreas cromatográficas, inicialmente normalizadas por UFC/mL, foram normalizadas pelo máximo (máximo para cada composto em todas as amostras). Os *heatmaps* foram feitos com recurso ao *software* The Unscrambler X 9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway).

A título exploratório foi também realizada uma análise multivariada não supervisionada (Análise de Componentes Principais - PCA), tendo sido utilizadas as matrizes acima referidas. Depois das áreas cromatográficas serem normalizadas pela área total e *Autoscaling*, a análise de componentes principais (PCA) foi feita com recurso ao *software* MetaboAnalyst 2.0, disponível *online* [90].

3. Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1. Efeito das condições de cultura (temperatura e tempo de crescimento) no exometaboloma volátil global de *Candida albicans*

Numa primeira abordagem, foi avaliado o efeito da temperatura e do tempo de crescimento no exometaboloma volátil global de *Candida albicans*, tendo em conta dois critérios: o número total de metabolitos e a área cromatográfica total. Deste modo, foram testadas duas temperaturas, 25 °C e 37 °C e quatro tempos de crescimento 6 h, 12 h, 24 h e 48 h. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 11A e B.

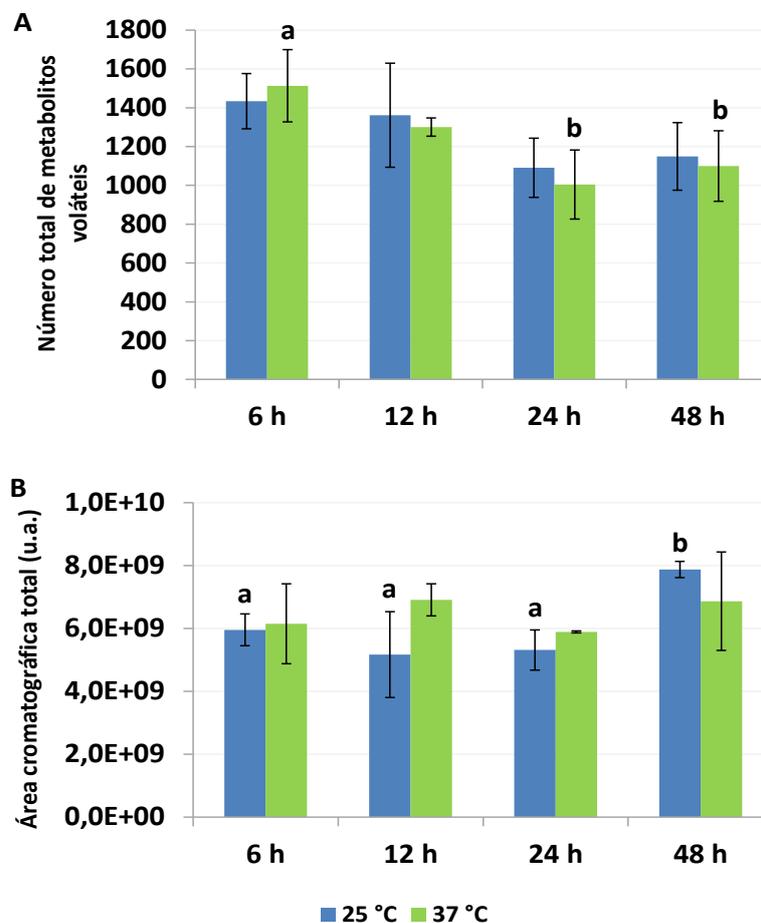


Figura 11- Número (A) e área cromatográfica totais (B) dos metabolitos produzidos por *Candida albicans* durante 6 h, 12 h, 24 h e 48 h de crescimento em meio líquido YGC a 25 °C e 37 °C. u.a.- unidades arbitrárias. As diferentes letras (a e b) representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos de crescimento.

Pela análise da Figura 11A, verifica-se que a 25 °C, o número total de metabolitos não variou significativamente ao longo do tempo de crescimento ($p > 0,05$). A 37 °C, o número total de metabolitos voláteis foi superior às 6 h de crescimento comparativamente com as 24 h e as 48 h

3. Resultados e Discussão

($p < 0,05$), não existindo diferenças significativas entre as 6 h e as 12 h de crescimento ($p > 0,05$). Em cada tempo de crescimento, não se observam diferenças significativas no número total de metabolitos entre as temperaturas ($p > 0,05$).

Relativamente à área cromatográfica total dos metabolitos (Figura 11B), observam-se diferenças significativas entre os tempos de crescimento 6 h, 12 h e 24 h e o tempo mais tardio (48 h) a 25 °C ($p < 0,05$). A 25 °C, a área cromatográfica total foi superior às 48 h de crescimento comparativamente com os restantes tempos ($p < 0,05$), sendo que não se verificam diferenças significativas entre as 6 h, 12 h e 24 h ($p > 0,05$). A 37 °C, as áreas cromatográficas totais foram semelhantes entre os diferentes tempos de crescimento ($p > 0,05$). Em cada tempo de crescimento, a área cromatográfica total não variou significativamente entre as temperaturas estudadas ($p > 0,05$).

As diferenças observadas no número e área cromatográfica totais dos metabolitos produzidos nos diferentes tempos de crescimento e nas duas temperaturas em estudo são também verificadas pela visualização dos diagramas de contornos de GC×GC (Figuras 12A-D e 13A-D).

As figuras seguintes são apresentadas como exemplos de diagramas de contornos 2D que resultam das diferenças na volatilidade, inerente à primeira dimensão (1D) e polaridade, na segunda dimensão (2D). Por conseguinte, a diminuição na volatilidade (elevado 1t_R) está relacionada principalmente com o aumento do número de carbonos através da 1D . Por outro lado, um aumento no 2t_R corresponde a um aumento na polaridade.

Pela observação das Figuras 12A-D, verifica-se que, apesar de não existirem diferenças significativas no número total de metabolitos produzidos ao longo do tempo de crescimento, a 25 °C, a área cromatográfica total foi maior às 48 h, comparativamente com os restantes tempos de crescimento. Esta diferença é notória pela elevada intensidade dos picos no diagrama de contornos para o tempo de crescimento 48 h (Figura 12D).

Analisando as Figuras 13A-D, observam-se diferenças significativas no número de metabolitos produzidos a 37 °C, sendo este superior às 6 h comparativamente com as 24 h de crescimento. No entanto, a área cromatográfica total não variou significativamente ao longo do tempo de crescimento.

3. Resultados e Discussão

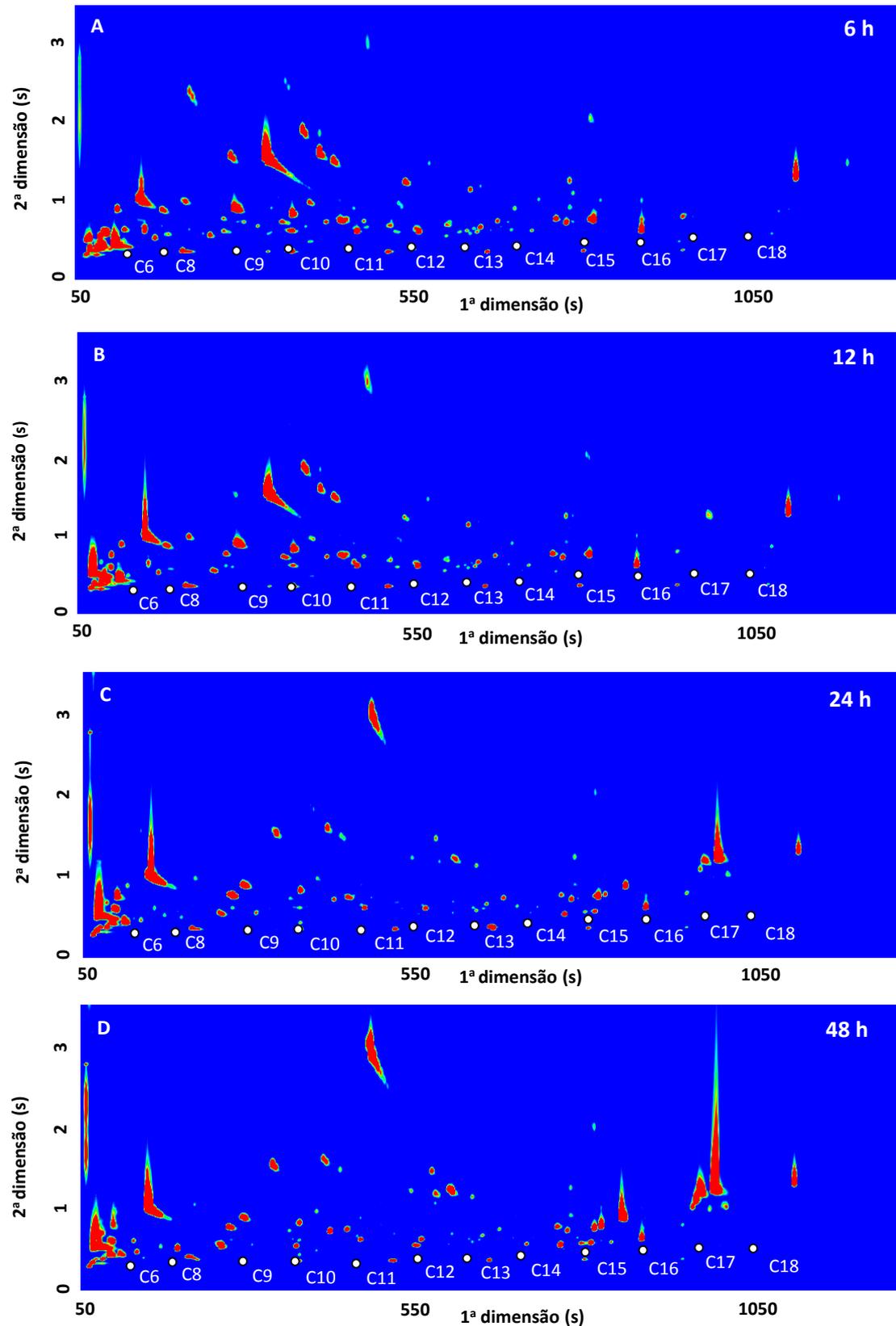


Figura 12- Diagrama de contornos de GCxGC dos metabólitos de *Candida albicans* presentes no meio de cultura YGC a 25 °C em diferentes tempos de crescimento. A- 6 h; B- 12 h; C- 24 h; D- 48 h. A série de *n*-alcanos (C₆-C₁₈) foi sobreposta na figura.

3. Resultados e Discussão

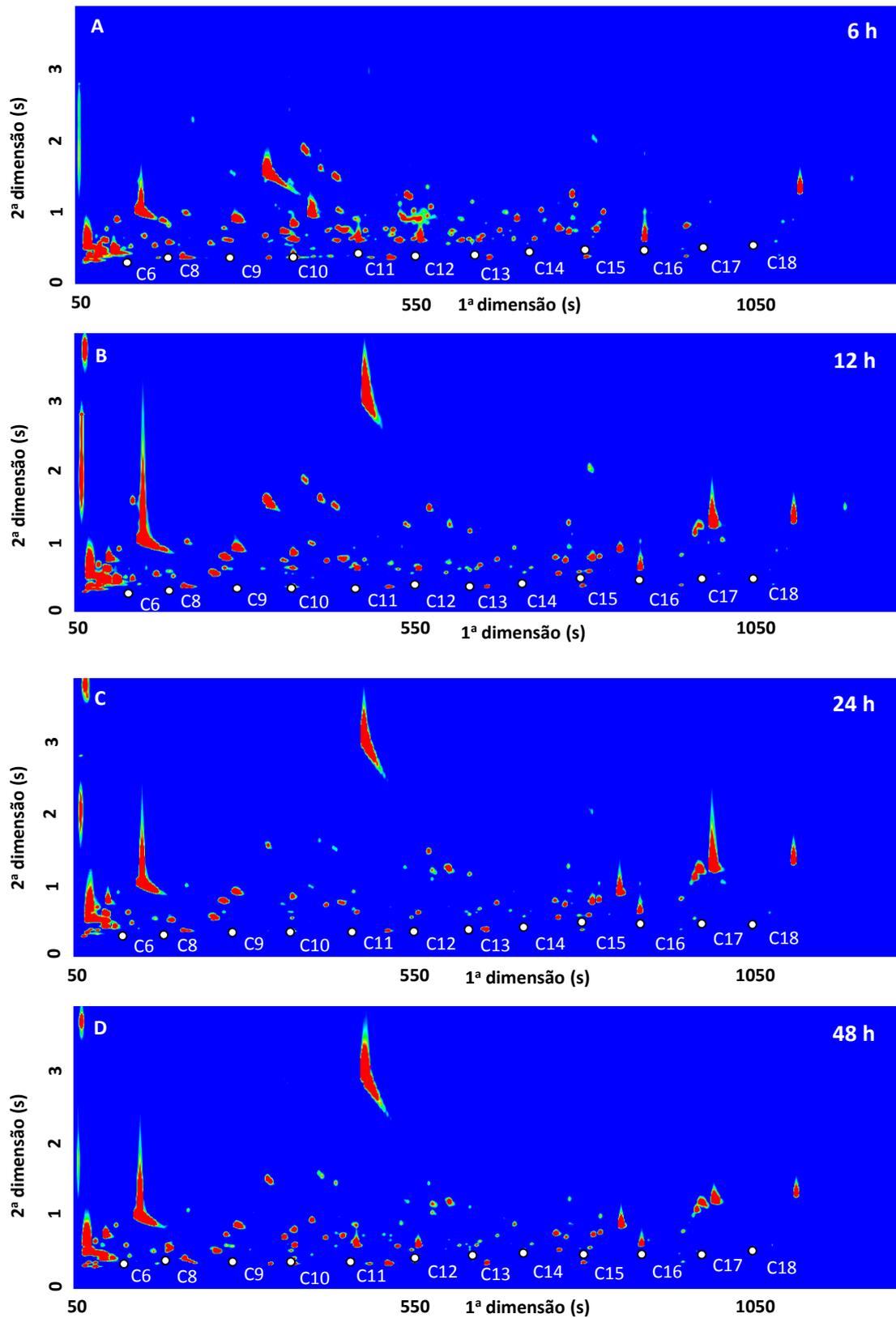


Figura 13- Diagrama de contornos de GCxGC dos metabolitos de *Candida albicans* presentes no meio de cultura YGC a 37 °C em diferentes tempos de crescimento. A- 6 h; B- 12 h; C- 24 h; D- 48 h. A série de *n*-alcanos (C₆-C₁₈) foi sobreposta na figura.

3. Resultados e Discussão

A área cromatográfica total normalizada por UFC/mL também diferiu entre tempos de crescimento e temperaturas (Figura 14B).

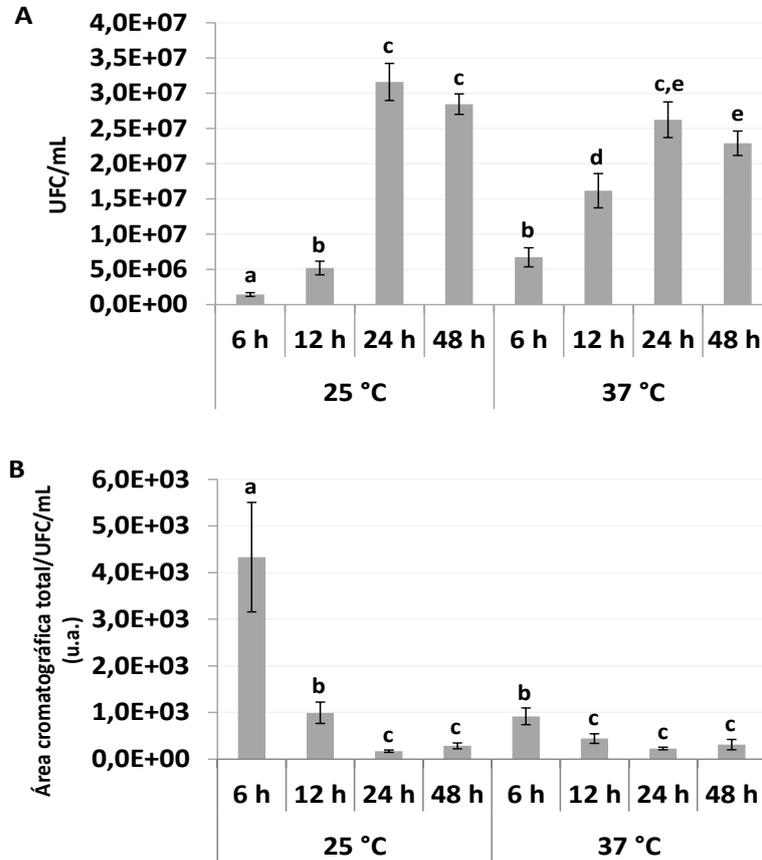


Figura 14- A- Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL) de *C. albicans* presentes às 6 h, 12 h, 24 h e 48 h de crescimento a 25 °C e 37 °C. Cada coluna representa a média das três amostras. **B-** Área cromatográfica total normalizada por UFC/mL dos metabolitos produzidos por *Candida albicans* durante 6 h, 12 h, 24 h e 48 h de crescimento em meio líquido YGC a 25 °C e 37 °C. u.a.- unidades arbitrárias. As diferentes letras (a-e) representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tempos de crescimento e temperaturas.

Analisando a Figura 14B, observa-se um maior valor de área cromatográfica às 6 h a 25 °C ($p < 0,05$). Em ambas as temperaturas, a área cromatográfica não variou significativamente entre as 24 h e 48 h ($p > 0,05$). Às 48 h de crescimento a 25 °C, a área cromatográfica total e o número de UFC/mL foi superior comparativamente com as 6 h de crescimento (Figuras 11B e 14A). Por conseguinte, a área cromatográfica normalizada por UFC/mL foi menor às 48 h relativamente às 6 h ($p < 0,05$) (Figura 14B). O mesmo se verificou a 37 °C, sendo que, apesar da área cromatográfica total não variar significativamente ao longo do tempo de crescimento, o número de UFC/mL foi

menor às 6 h comparativamente com os restantes tempos, daí a área cromatográfica total normalizada ser superior às 6 h ($p < 0,05$).

Estes resultados sugerem que as condições de cultura de 6 h a 25 °C parecem ser as que promovem a produção de um teor total mais elevado de metabolitos por UFC/mL.

3.2. Efeito das condições de cultura (temperatura e tempo de crescimento) nos perfis de metabolitos alvo de *Candida albicans*

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar as variações em metabolitos alvo de *Candida albicans* em função das condições de cultura (temperatura e tempo de crescimento). Para isso, foram testadas duas temperaturas - 25 °C e 37 °C e quatro tempos de crescimento - 6 h, 12 h, 24 h e 48 h.

Do total de metabolitos detetados, foi selecionado um conjunto de 15 metabolitos reportados na literatura para *Candida albicans*: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, acetaldeído, 2-butenal, 2-propanona, acetato de etilo, propanoato de etilo, butirato de etilo, acetato de isoamilo, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol [53,54,56,58,59]. Nas Tabelas 3 e 4 encontra-se informação cromatográfica relativa aos metabolitos acima referidos, nomeadamente os tempos de retenção para a primeira (1t_R) e segunda dimensão (2t_R) e os índices de retenção (Tabela 3) e a área cromatográfica em cada tempo de crescimento e temperatura e respetivo desvio padrão relativo (RSD) (Tabela 4).

A identificação dos metabolitos foi realizada pela comparação dos espectros de massa dos metabolitos detetados com os espectros de massa existentes em bases de dados (NIST e Wiley). A identificação foi também suportada pelo cálculo dos índices de retenção com base na equação descrita na secção de Material e Métodos, recorrendo a uma série de *n*-alcanos (C₈-C₂₀). Posteriormente foi feita a comparação destes RI calculados com os RI reportados na literatura para a coluna da ¹D ou equivalentes.

A avaliação da variação dos metabolitos alvo foi feita de um modo separado, sendo inicialmente avaliada a variação de 5 metabolitos associados ao *quorum sensing* (3-metil-1-butanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol) e posteriormente de 15 metabolitos normalmente detetados para *C. albicans*.

3. Resultados e Discussão

Tabela 3- Conjunto de 15 metabolitos detetados por GC×GC-ToFMS em *C. albicans*.

¹ t _R ^a (s)	² t _R ^a (s)	Composto	CAS	Fórmula química	RI _{calc} ^b	RI _{lit} ^c GC-MS	RI _{lit} ^d GC×GC	Referência
Álcoois Alifáticos								
85	0,680	1-propanol	71-23-8	C3H8O	580	574		[91]
100	0,770	2-metil-1-propanol	78-83-1	C4H10O	612		615	[83]
145	1,080	3-metil-1-butanol	123-51-3	C5H12O	708		706	[83]
150	1,060	2-metil-1-butanol	137-32-6	C5H12O	718	743		[91]
775	0,930	1-dodecanol	112-53-8	C12H26O	1476		1480	[80]
Aromáticos								
480	2,990	2-feniletanol	60-12-8	C8H10O	1126	1110		[92]
Aldeídos Alifáticos								
70	0,350	acetaldeído	75-07-0	C2H4O	548	500		[93]
110	0,660	2-butenal	4170-30-3	C4H6O	633		657	[94]
Cetonas								
75	0,390	2-propanona	67-64-1	C3H6O	559	503		[91]
Ésteres alifáticos								
95	0,440	acetato de etilo	141-78-6	C4H8O2	601	608		[95]
135	0,480	propanoato de etilo	105-37-3	C5H10O2	685	706		[96]
195	0,510	butirato de etilo	105-54-4	C6H12O2	806	800		[92]
255	0,560	acetato de isoamilo	123-92-2	C7H14O2	877	876		[97]
Sesquiterpenóides								
850	0,900	E-nerolidol	40716-66-3	C15H26O	1566	1565		[98]
990	1,250	E,E-farnesol	106-28-5	C15H26O	1731	1730		[99]

^a Tempos de retenção para a primeira (¹t_R) e segunda (²t_R) dimensão em segundos (s)

^b RI: Índice de retenção obtido através do cromatograma modulado

^c RI: Índice de retenção reportado na literatura para 1D-GC com uma coluna GC 5%-fenil-metilpolisiloxano ou equivalente

^d RI: Índice de retenção reportado na literatura para sistemas GC×GC com uma coluna de ¹D Equity-5 ou equivalente

3. Resultados e Discussão

Tabela 4- Áreas cromatográficas/UFC/mL relativas aos metabolitos voláteis detetados por GC×GC-ToFMS em *C. albicans*, em diferentes tempos de crescimento e temperaturas.

Composto	25 °C				37 °C			
	6 h	12 h	24 h	48 h	6 h	12 h	24 h	48 h
	Área cromatográfica/UFC/mL ^a (RSD %) ^b							
Álcoois Alifáticos								
1-propanol	0,47 (26)	0,92 (7)	0,31(9)	0,36 (30)	0,67 (34)	0,98 (15)	0,60 (39)	0,63 (17)
2-metil-1-propanol	2,60 (23)	4,90 (10)	2,73 (4)	3,16 (23)	1,89 (17)	6,87 (18)	3,42 (21)	4,15 (14)
3-metil-1-butanol	1,73 (61)	0,64 (32)	6,40 (64)	4,07 (79)	9,78 (77)	11,48 (17)	5,23 (49)	9,88 (52)
2-metil-1-butanol	224,71 (6)	71,07 (17)	15,07 (79)	24,85 (30)	52,12 (17)	26,39 (36)	21,21 (26)	25,70 (47)
1-dodecanol	10,39 (14)	2,43 (27)	0,33 (6)	0,50 (12)	2,56 (43)	0,90 (38)	0,43 (19)	0,45 (22)
Subtotal (área cromatográfica)	239,90	79,96	24,84	32,94	67,02	46,62	30,89	40,81
Subtotal (%)	69,26	63,27	48,87	38,78	75,90	38,91	37,07	39,33
Aromáticos								
2-feniletanol	52,43 (14)	27,40 (13)	9,44 (20)	18,97 (27)	9,04 (26)	40,08 (39)	26,98 (28)	40,46 (32)
Subtotal (área cromatográfica)	52,43	27,40	9,44	18,97	9,04	40,08	26,98	40,46
Subtotal (%)	15,14	21,68	18,57	22,34	10,24	33,45	32,38	38,99
Aldeídos Alifáticos								
acetaldeído	8,84(14)	5,57 (7)	1,24 (13)	0,85 (28)	4,06 (20)	3,88 (27)	0,81 (9)	0,86 (28)
2-butenal	4,07 (7)	0,64 (27)	0,05 (20)	0,04 (53)	0,44 (16)	0,15 (22)	0,02 (10)	0,04 (25)
Subtotal (área cromatográfica)	12,91	6,21	1,29	0,89	4,50	4,03	0,83	0,90
Subtotal (%)	3,73	4,91	2,54	1,05	5,10	3,36	1,00	0,87

3. Resultados e Discussão

Tabela 4- Continuação

Composto	25 °C				37 °C			
	6 h	12 h	24 h	48 h	6 h	12 h	24 h	48 h
	Área cromatográfica/UFC/mL ^a (RSD %) ^b							
Cetonas								
2-propanona	38,79 (23)	7,41 (10)	0,58 (12)	0,28 (13)	7,49 (19)	1,64 (26)	0,33 (34)	0,43 (34)
Subtotal (área cromatográfica)	38,79	7,41	0,58	0,28	7,49	1,64	0,33	0,43
Subtotal (%)	11,20	5,86	1,14	0,33	8,48	1,37	0,40	0,41
Ésteres alifáticos								
acetato de etilo	-	-	1,22 (17)	2,34 (63)	-	4,12 (39)	3,16 (20)	3,77 (21)
propanoato de etilo	-	-	0,31 (14)	0,64 (4)	-	1,15 (20)	0,49 (22)	0,34 (22)
butirato de etilo	0,67 (41)	0,14 (52)	0,23 (20)	1,94 (11)	0,11 (40)	0,67 (14)	1,41 (21)	2,09 (23)
acetato de isoamilo	-	-	1,28 (12)	2,95 (18)	-	4,20 (22)	2,57 (17)	2,58 (31)
Subtotal (área cromatográfica)	0,67	0,14	3,04	7,87	0,11	10,14	7,63	8,78
Subtotal (%)	0,19	0,11	5,98	9,27	0,12	8,46	9,16	8,46
Sesquiterpenóides								
<i>E</i>-nerolidol	0,51 (21)	0,41 (26)	1,41 (19)	7,17 (22)	0,16 (43)	3,60 (35)	4,42 (18)	6,16 (65)
<i>E,E</i>-farnesol	1,15 (89)	4,86 (80)	10,24 (120)	16,80 (66)	-	13,70 (85)	12,24 (89)	6,23 (92)
Subtotal (área cromatográfica)	1,66	5,27	11,65	23,97	0,16	17,30	16,66	12,39
Subtotal (%)	0,48	4,17	22,92	28,22	0,18	14,44	19,99	11,94
Área cromatográfica total	346,36	126,39	50,84	84,92	88,32	119,81	83,32	103,77

^aÁrea cromatográfica normalizada por UFC/mL (média de três amostras)

^bDesvio padrão relativo, expresso em percentagem

3. Resultados e Discussão

3.2.1. Cinco metabolitos alvo associados ao *quorum sensing*

Na segunda fase deste estudo foi avaliada a variação de 5 metabolitos, nomeadamente o 3-metil-1-butanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol com as condições de cultura (temperatura e tempo de crescimento). Para isso, foi feito um *heatmap*, o qual permite uma rápida interpretação visual da abundância relativa de cada metabolito nas diferentes condições estudadas. A título exploratório, foi também realizada uma análise de componentes principais (PCA) para extrair as principais fontes de variabilidade e, deste modo, caracterizar as condições de cultura em função dos metabolitos detetados. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 15 e 16 (temperatura - 25 °C), 17 e 18 (temperatura - 37 °C), 19 e 20 (25 °C e 37 °C).

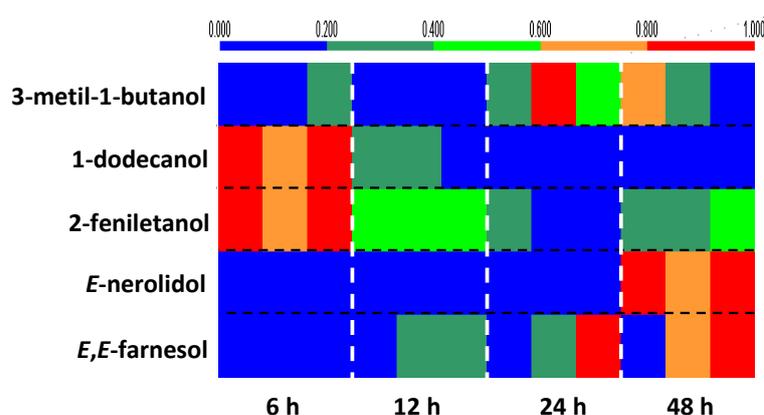


Figura 15- *Heatmap* dos 5 metabolitos de *C. albicans* produzidos a 25 °C em diferentes tempos de crescimento (6 h, 12 h, 24 h e 48 h). As diferentes intensidades correspondem às áreas cromatográficas normalizadas pelo máximo de cada metabolito em todas as amostras.

A análise da Figura 15 indica que o metabolito 1-dodecanol apresentou maior abundância relativa (> 0,8) às 6 h de crescimento a 25 °C, sendo que esta diminuiu ao longo do tempo de crescimento. O mesmo se verifica para o 2-feniletanol, que apresentou maior abundância relativa às 6 h. Os metabolitos *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol apresentaram maior abundância relativa (> 0,8) às 48 h de crescimento. Relativamente ao metabolito 3-metil-1-butanol, este apresentou uma menor abundância relativa nos primeiros tempos de crescimento (6 h e 12 h) comparativamente com 24 h e 48 h.

A Figura 16 apresenta os resultados da aplicação da análise multivariada ao subconjunto de 5 metabolitos selecionados. As coordenadas fatoriais dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicam 83,2% da variabilidade total do conjunto de dados.

3. Resultados e Discussão

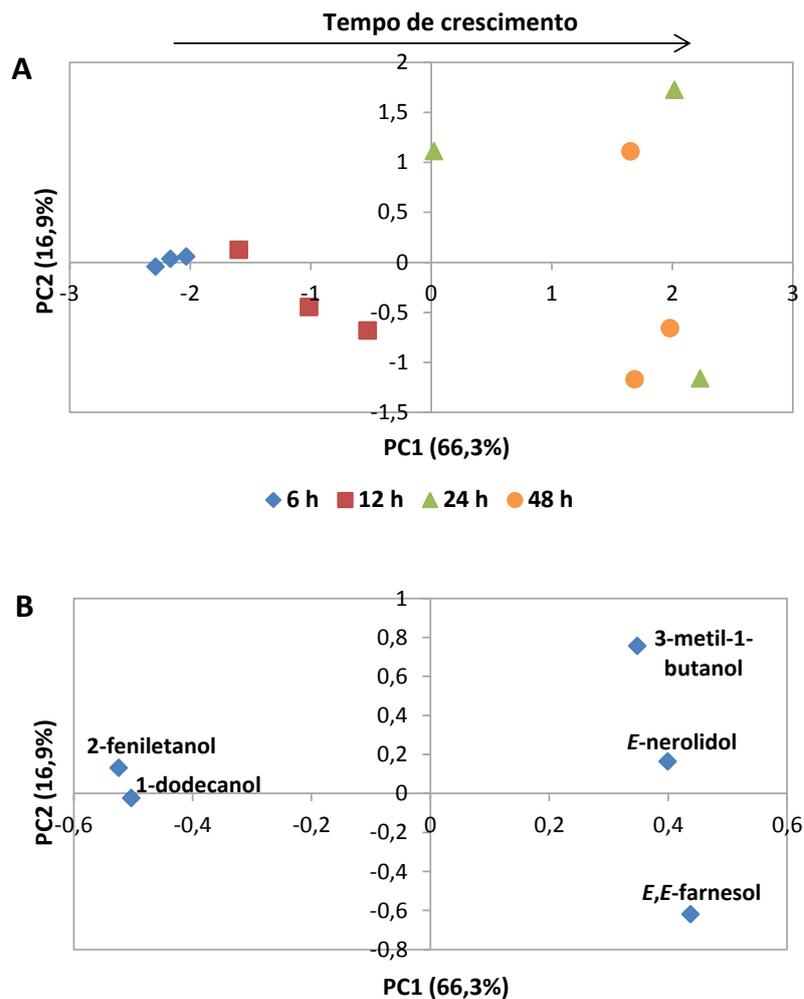


Figura 16- (A) Diagrama de coordenadas fatoriais de PCA baseado na área de 5 metabolitos voláteis selecionados (3-metil-1-butanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol) de *Candida albicans* produzidos a 25 °C em diferentes tempos de crescimento. (B) Diagrama de contribuições fatoriais que explicam a separação observada no diagrama de coordenadas fatoriais.

O PC1 explica 66,3% da variabilidade e está relacionado com o tempo de crescimento, sendo que as amostras correspondentes aos primeiros tempos de crescimento (6 h e 12 h) encontram-se no PC1 negativo e as correspondentes a tempos de crescimento mais tardios, no PC1 positivo (Figura 16A). Os primeiros tempos de crescimento são caracterizados pelo 1-dodecanol e 2-feniletanol (Figura 16B) e os tempos de crescimento mais tardios (24 h e 48 h) são caracterizados pelo 3-metil-1-butanol, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol.

A 37 °C também se verificam diferenças na abundância relativa dos metabolitos ao longo do tempo de crescimento (Figura 17).

3. Resultados e Discussão

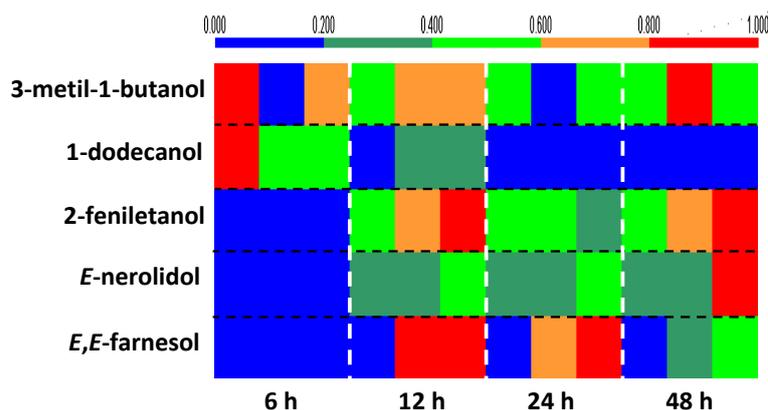


Figura 17- Heatmap dos 5 metabolitos de *C. albicans* produzidos a 37 °C em diferentes tempos de crescimento (6 h, 12 h, 24 h e 48 h). As diferentes intensidades correspondem às áreas cromatográficas normalizadas pelo máximo de cada metabolito em todas as amostras.

Analisando a Figura 17, verifica-se que os metabolitos 3-metil-1-butanol e 1-dodecanol apresentaram uma abundância relativa elevada às 6 h de crescimento, sendo que a abundância relativa de 3-metil-1-butanol manteve-se semelhante ao longo do tempo de crescimento. Os restantes três metabolitos apresentaram maior abundância relativa às 12 h, 24 h e 48 h.

Estes resultados estão de acordo com os reportados por Martins *et al.* [53], que revelam que estes metabolitos são produzidos continuamente pelas células. A quantidade de 3-metil-1-butanol foi semelhante entre as 24 h e as 48 h de crescimento, sendo que o teor em 2-feniletanol aumentou durante a transição das 24 h para as 48 h. Relativamente ao metabolito *E*-nerolidol, este foi produzido em maior quantidade no tempo de crescimento mais tardio (48 h). A produção de *E,E*-farnesol foi elevada durante as 24 h e 48 h de crescimento.

Aplicando a análise multivariada ao conjunto de dados relativos à temperatura de 37 °C, verifica-se uma distinção entre os tempos de crescimento (Figura 18). As coordenadas fatoriais dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicam 82,1% da variabilidade total do conjunto de dados. Os tempos de crescimento foram dispersos ao longo do PC1 (54,4% da variabilidade) (Figura 18A). A condição 6 h encontra-se no PC1 negativo, enquanto os restantes tempos de crescimento encontram-se no PC1 positivo. As 6 h de crescimento são caracterizadas pelos metabolitos 3-metil-1-butanol e 1-dodecanol e os restantes tempos (12 h, 24 h e 48 h) são caracterizados pelo 2-feniletanol, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol (Figura 18B).

3. Resultados e Discussão

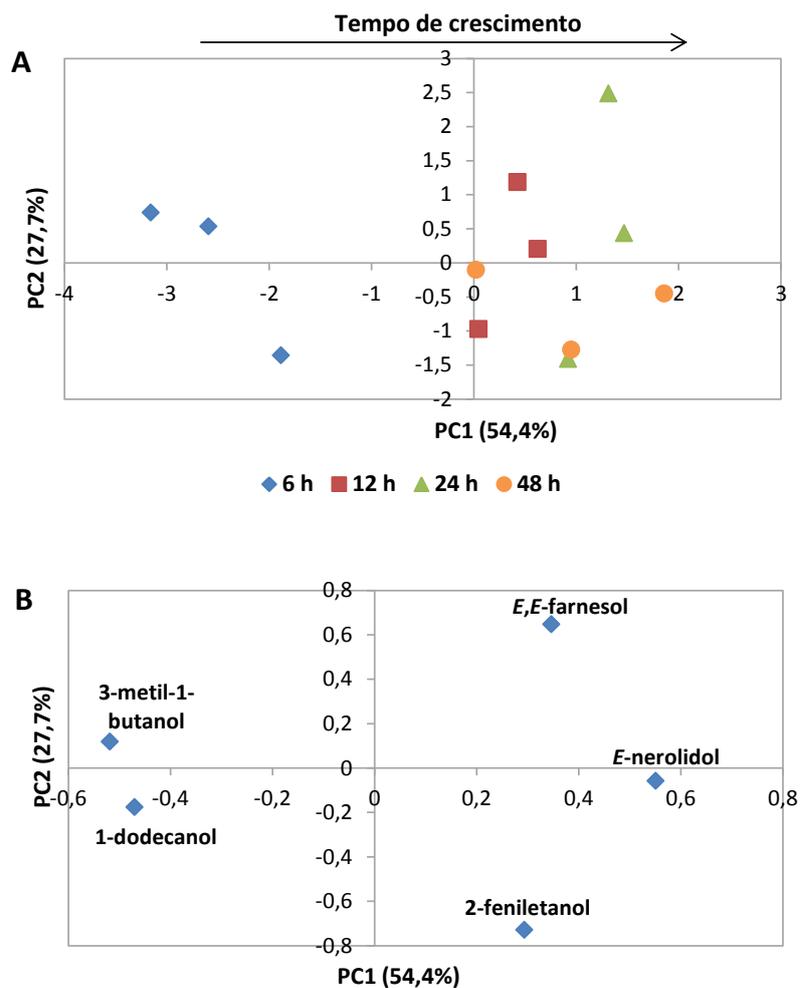


Figura 18- (A) Diagrama de coordenadas fatoriais de PCA baseado na área de 5 metabolitos voláteis selecionados (3-metil-1-butanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol) de *Candida albicans* produzidos a 37 °C em diferentes tempos de crescimento. (B) Diagrama de contribuições fatoriais que explicam a separação observada no diagrama de coordenadas fatoriais.

Analisando as duas temperaturas em simultâneo, observam-se diferenças na abundância relativa dos metabolitos ao longo do tempo de crescimento entre temperaturas (Figura 19). O metabolito 3-metil-1-butanol apresentou abundância relativa elevada ao longo do tempo de crescimento a 37 °C, sendo que a 25 °C, este apresentou abundância relativa inferior a 0,2 às 6 h e 12 h. O metabolito 2-feniletanol apresentou uma menor abundância relativa às 6 h a 37 °C, contrariamente ao verificado para 25 °C, onde a abundância relativa foi superior a 0,8. No caso do *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol, estes apresentaram maior abundância relativa às 48 h, em ambas as temperaturas, sendo que às 12 h a abundância relativa foi mais elevada a 37 °C comparativamente com 25 °C.

3. Resultados e Discussão

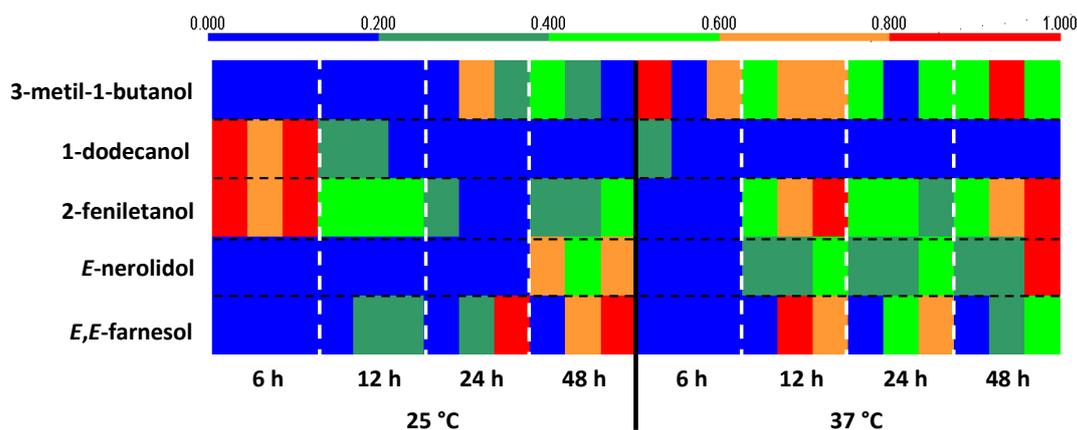


Figura 19- Heatmap dos 5 metabolitos de *C. albicans* produzidos a 25 °C e 37 °C em diferentes tempos de crescimento (6 h, 12 h, 24 h e 48 h). As diferentes intensidades correspondem às áreas cromatográficas normalizadas pelo máximo de cada metabolito em todas as amostras.

Os resultados obtidos para o metabolito *E,E*-farnesol são consistentes com os reportados por Hornby *et al.* [59] para o tempo de crescimento 24 h. *Candida albicans* sintetizou este metabolito continuamente durante o crescimento, em todas as temperaturas testadas e em quantidades proporcionais ao número de UFC/mL, sendo que de 23 °C a 37 °C, a quantidade de *E,E*-farnesol aumentou. Tal também se verificou neste presente estudo, em que a abundância relativa do metabolito *E,E*-farnesol aumentou de 25 °C para 37 °C durante 24 h de crescimento.

As diferenças registadas entre os diferentes tempos de crescimento e temperaturas são também observadas pela análise de componentes principais (Figura 20). Os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicam 76,7% da variabilidade total do conjunto de dados, sendo que o PC1 explica 50,2% da variabilidade e o PC2 explica 26,5% da variabilidade. Os tempos de crescimento foram distribuídos ao longo do PC1, sendo que os primeiros tempos de crescimento encontram-se no PC1 negativo e os tempos mais tardios, no PC1 positivo (Figura 20A). O PC2 permite uma separação por temperaturas. O tempo de crescimento 6 h-25 °C está localizado no PC2 negativo, enquanto o tempo 6 h-37 °C está localizado no PC2 positivo. O tempo de crescimento 24 h-25 °C encontra-se no PC2 positivo e o tempo 24 h-37 °C, no PC2 negativo. Para os tempos de crescimento 12 h e 48 h observa-se também uma separação por temperaturas, sendo que estes, para a temperatura de 25 °C encontram-se no PC2 negativo.

3. Resultados e Discussão

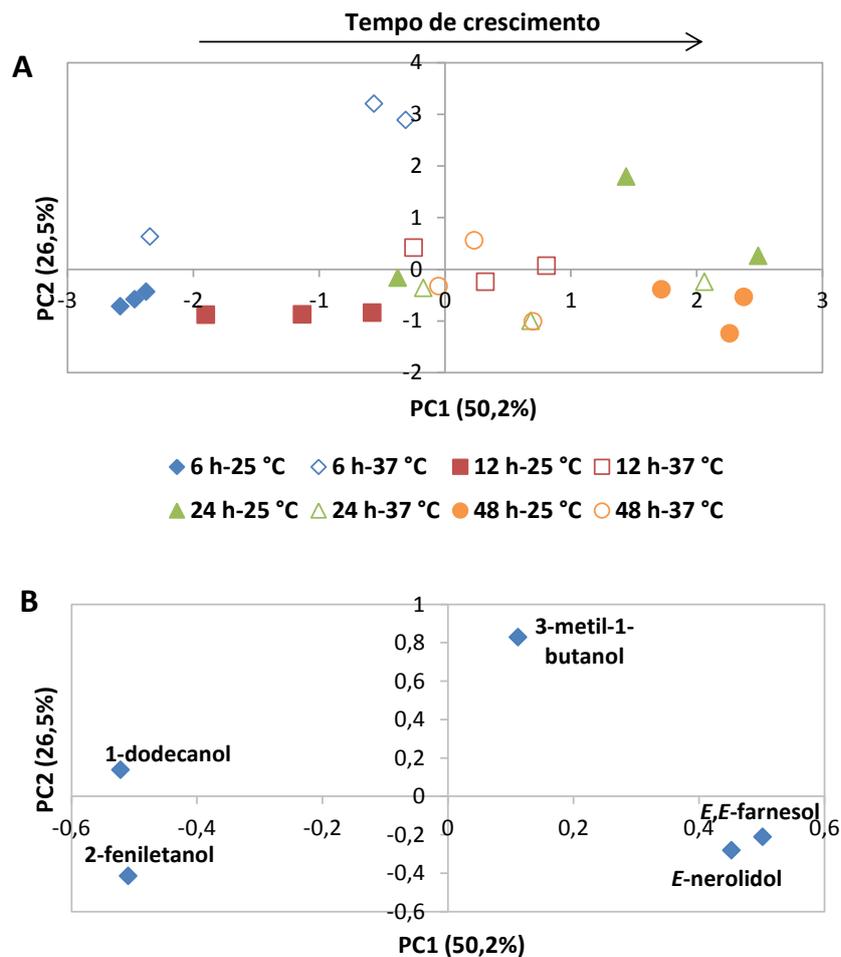


Figura 20- (A) Diagrama de coordenadas fatoriais de PCA baseado na área de 5 metabolitos voláteis selecionados (3-metil-1-butanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol) de *Candida albicans* produzidos a 25 °C e 37 °C em diferentes tempos de crescimento. (B) Diagrama de contribuições fatoriais que explicam a separação observada no diagrama de coordenadas fatoriais.

Pela análise de PCA é possível concluir que os primeiros tempos de crescimento (6 h e 12 h) são distinguidos dos tempos 24 h e 48 h pela presença de 1-dodecanol e 2-feniletanol. O crescimento mais tardio é caracterizado pela presença de 3-metil-1-butanol, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol (Figura 20B).

Esta variação observada na produção de metabolitos em diferentes tempos de crescimento pode dever-se ao facto da biossíntese destes 5 compostos estar relacionada com a disponibilidade de precursores.

A produção do álcool aromático 2-feniletanol por *Candida albicans* está relacionada com a via Ehrlich [61], sendo o seu precursor biossintético, a fenilalanina. O 3-metil-1-butanol é também derivado de um aminoácido, a leucina, estando também a sua biossíntese relacionada com a via

3. Resultados e Discussão

anteriormente referida. O álcool 2-feniletanol caracteriza os primeiros tempos de crescimento, o que poderá indicar que a disponibilidade de precursores para a sua formação, nomeadamente a fenilalanina é superior às 6 h e 12 h, comparativamente com os restantes tempos.

No caso dos sesquiterpenóides *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol, estes caracterizam os tempos de crescimento mais tardios (24 h e 48 h), sendo estes sintetizados, a partir do farnesil difosfato, numa via alternativa à biossíntese de esteróis [100].

3.2.2. Quinze metabolitos alvo normalmente detetados na *Candida albicans*

Para além dos cinco metabolitos referidos anteriormente, também foi avaliada a variação do conjunto de 15 metabolitos com as condições de cultura.

Foram feitos *heatmaps* para ambas as temperaturas separadamente e em conjunto e, a título exploratório, foi feita uma análise de componentes principais (PCA). Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 21-26.

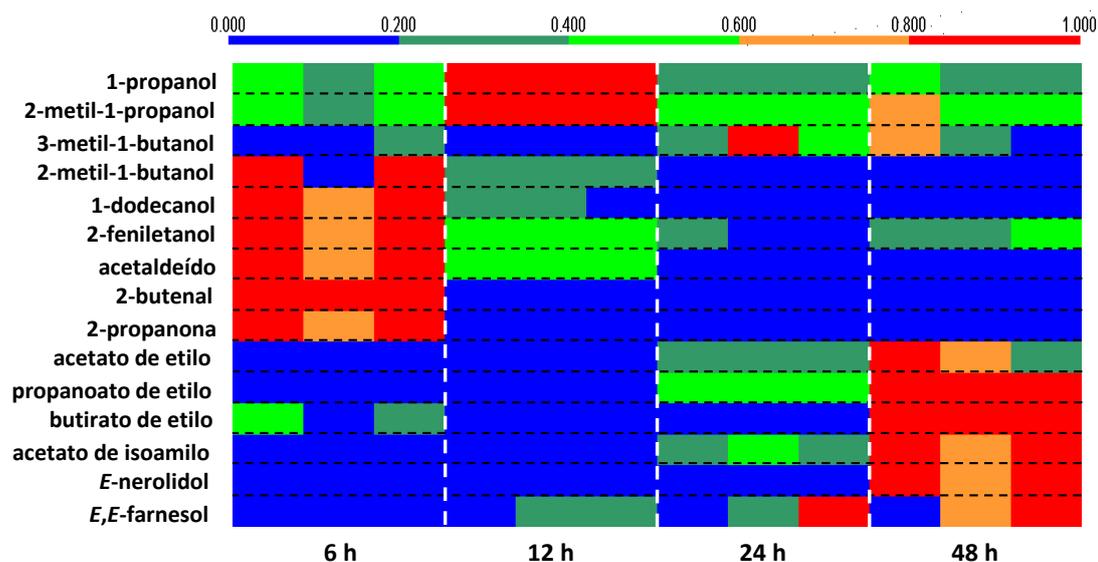


Figura 21- *Heatmap* dos 15 metabolitos de *C. albicans* produzidos a 25 °C em diferentes tempos de crescimento (6 h, 12 h, 24 h e 48 h). As diferentes intensidades correspondem às áreas cromatográficas normalizadas pelo máximo de cada metabolito em todas as amostras.

Analisando a Figura 21, verifica-se que a 25 °C, os metabolitos 2-metil-1-butanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, acetaldeído, 2-butenal e 2-propanona possuíram uma maior abundância relativa (> 0,8) às 6 h de crescimento, comparativamente com os restantes tempos. Os ésteres e sesquiterpenóides surgiram com maior abundância relativa às 48 h. Os metabolitos 1-propanol e

3. Resultados e Discussão

2-metil-1-propanol apresentaram uma abundância relativa elevada ($> 0,8$) às 12 h, sendo que nos restantes tempos estes apresentaram uma abundância relativa superior a 0,2. Relativamente ao metabolito 3-metil-1-butanol, este apresentou maior abundância relativa às horas mais tardias.

A Figura 22 apresenta os resultados da aplicação da análise multivariada ao conjunto de 15 metabolitos seleccionados. As coordenadas fatoriais dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicam 73,5% da variabilidade total do conjunto de dados.

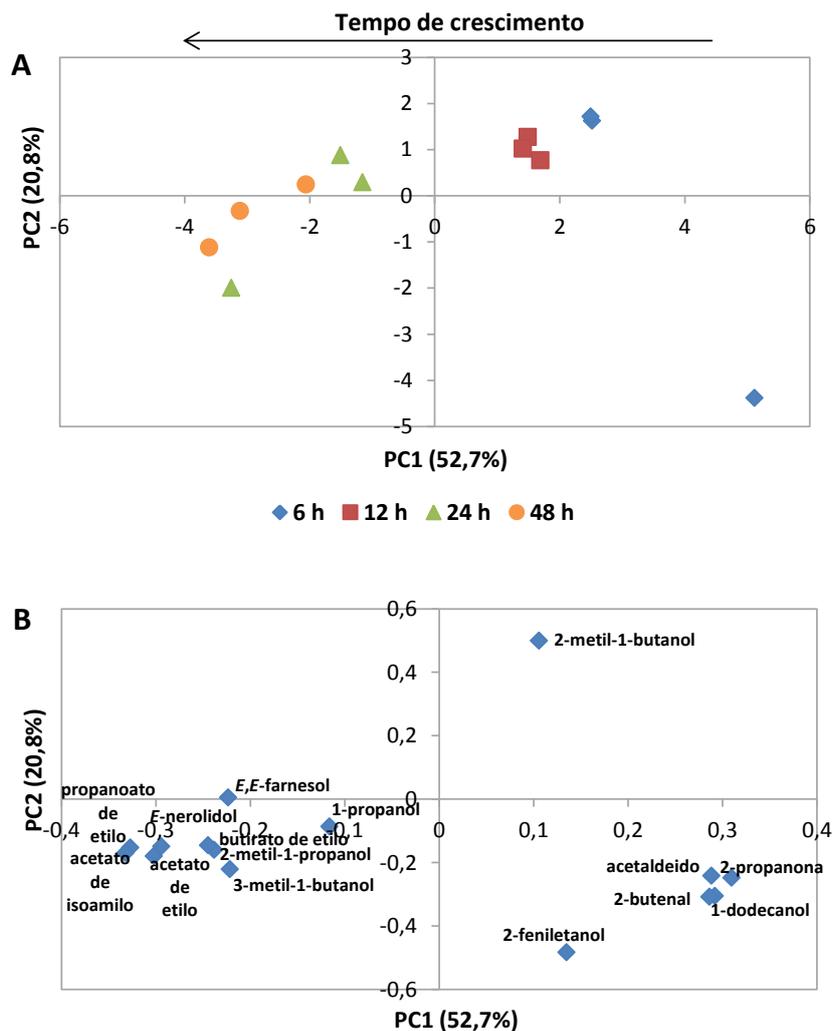


Figura 22- (A) Diagrama de coordenadas fatoriais de PCA baseado na área de 15 metabolitos voláteis seleccionados de *Candida albicans* produzidos a 25 °C em diferentes tempos de crescimento. (B) Diagrama de contribuições fatoriais que explicam a separação observada no diagrama de coordenadas fatoriais.

Os diferentes tempos de crescimento foram dispersos ao longo do PC1 (52,7% da variabilidade) de acordo com a relação entre eles: os tempos de crescimento 6 h e 12 h estão localizados no PC1 positivo e os tempos de crescimento 24 h e 48 h estão localizados no PC1

3. Resultados e Discussão

negativo (Figura 22A). Da análise PCA é possível concluir que os primeiros tempos de crescimento são distinguidos dos restantes tempos pela presença dos metabolitos 2-metil-1-butanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, acetaldeído, 2-butenal e 2-propanona. Os tempos mais tardios (24 h e 48 h) são caracterizados pelos restantes álcoois, ésteres e sesquiterpenóides (Figura 22B).

As diferenças observadas na abundância relativa dos metabolitos são também verificadas a 37 °C (Figura 23).

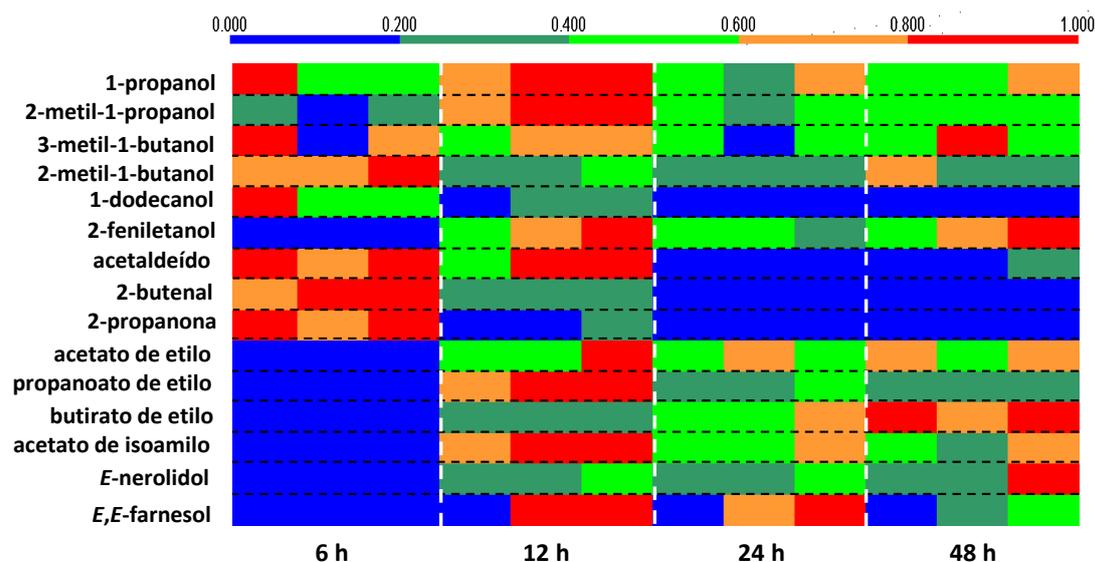


Figura 23- Heatmap dos 15 metabolitos de *C. albicans* produzidos a 37 °C em diferentes tempos de crescimento (6 h, 12 h, 24 h e 48 h). As diferentes intensidades correspondem às áreas cromatográficas normalizadas pelo máximo de cada metabolito em todas as amostras.

Tal como verificado para a temperatura de 25 °C, às 6 h de crescimento os metabolitos 2-metil-1-butanol, 1-dodecanol, acetaldeído, 2-butenal e 2-propanona apresentaram maior abundância relativa comparativamente com os restantes tempos de crescimento. Os metabolitos 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e 2-feniletanol apresentaram abundância relativa elevada das 12 h para as 48 h. Os ésteres e sesquiterpenóides apresentaram maior abundância relativa às horas mais tardias, no entanto, e, ao contrário do observado para a temperatura 25 °C, às 12 h de crescimento, estes metabolitos apresentaram abundâncias relativas elevadas.

Os metabolitos 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, acetato de etilo, propanoato de etilo, butirato de etilo e acetato de isoamilo foram detetados para *Candida albicans* num estudo reportado por Cailleux *et al.* [56], para o tempo de crescimento 48 h a 37 °C. Os metabolitos 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e acetato de isoamilo

3. Resultados e Discussão

apresentaram abundância relativa elevada, tal como verificado neste estudo para o tempo de crescimento 48 h (Figura 23). Neste presente estudo, o metabolito acetaldeído foi detetado para *Candida albicans*, apesar de apresentar abundância relativa baixa. O mesmo não foi verificado por Cailleux *et al.*, que detetou apenas este metabolito para outras espécies de *Candida* não-*albicans*.

Um estudo realizado por Scotter *et al.* [58] revelou também a deteção de alguns metabolitos, nomeadamente acetaldeído, 2-butenal e 2-propanona, produzidos por *Candida albicans* durante 5 dias a 37 °C em diferentes meios de crescimento. Estes metabolitos foram também detetados neste estudo em tempos de crescimento mais curtos e em meio YGC, não sendo este um dos meios utilizados por Scotter *et al.* [58].

Aplicando a análise multivariada ao conjunto de dados relativos à temperatura de 37 °C, verifica-se uma distinção entre os tempos de crescimento (Figura 24). As coordenadas fatoriais dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicam 78,3% da variabilidade total do conjunto de dados. O PC1 explica 61,5% e está relacionado com o tempo de crescimento. O tempo de crescimento 6 h encontra-se no PC1 negativo e os restantes tempos de crescimento (12 h, 24 h e 48 h) encontram-se no PC1 positivo (Figura 24A). O PC2 explica 16,8% da variabilidade e permite distinguir o tempo de crescimento 12 h, que se encontra no PC2 negativo e o tempo 48 h, que se encontra no PC2 positivo. Pela análise PCA é possível distinguir o tempo de crescimento 6 h dos restantes tempos pela presença dos metabolitos 2-metil-1-butanol, 1-dodecanol, acetaldeído, 2-butenal e 2-propanona (Figura 24B). Os restantes tempos de crescimento são caracterizados pelos metabolitos 2-metil-1-propanol, acetato de etilo, propanoato de etilo, butirato de etilo, acetato de isoamilo, *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol.

3. Resultados e Discussão

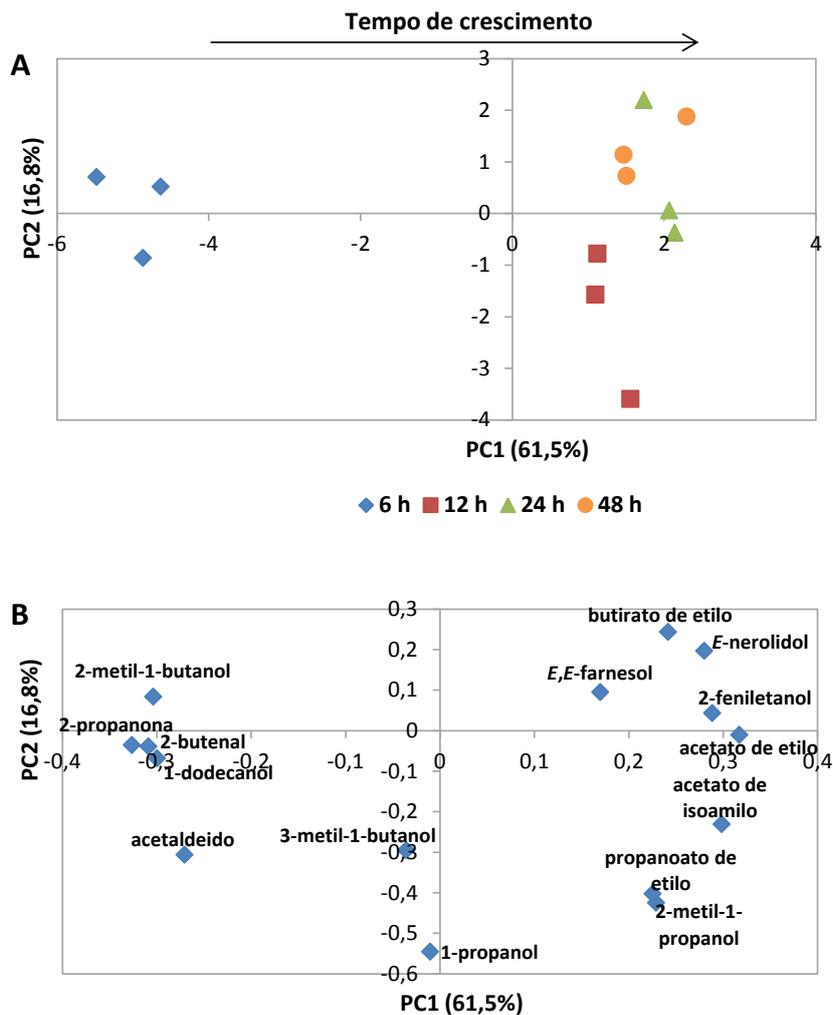


Figura 24- (A) Diagrama de coordenadas fatoriais de PCA baseado na área de 15 metabólitos voláteis selecionados de *Candida albicans* produzidos a 37 °C em diferentes tempos de crescimento. (B) Diagrama de contribuições fatoriais que explicam a separação observada no diagrama de coordenadas fatoriais.

Analisando as duas temperaturas em simultâneo, verificam-se diferenças na abundância relativa dos metabólitos produzidos (Figura 25). Os metabólitos 2-metil-1-butanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, acetaldeído, 2-butenal e 2-propanona possuíram uma abundância relativa elevada (> 0,8) às 6 h de crescimento a 25 °C. Em ambas as temperaturas, os ésteres e os sesquiterpenóides apresentaram maior abundância relativa às horas mais tardias de crescimento, sendo que a 37 °C, estes metabólitos possuíram abundância relativa elevada às 12 h. Os metabólitos 1-propanol e 2-metil-1-propanol apresentaram abundâncias relativas elevadas ao longo do tempo de crescimento, em ambas as temperaturas.

3. Resultados e Discussão

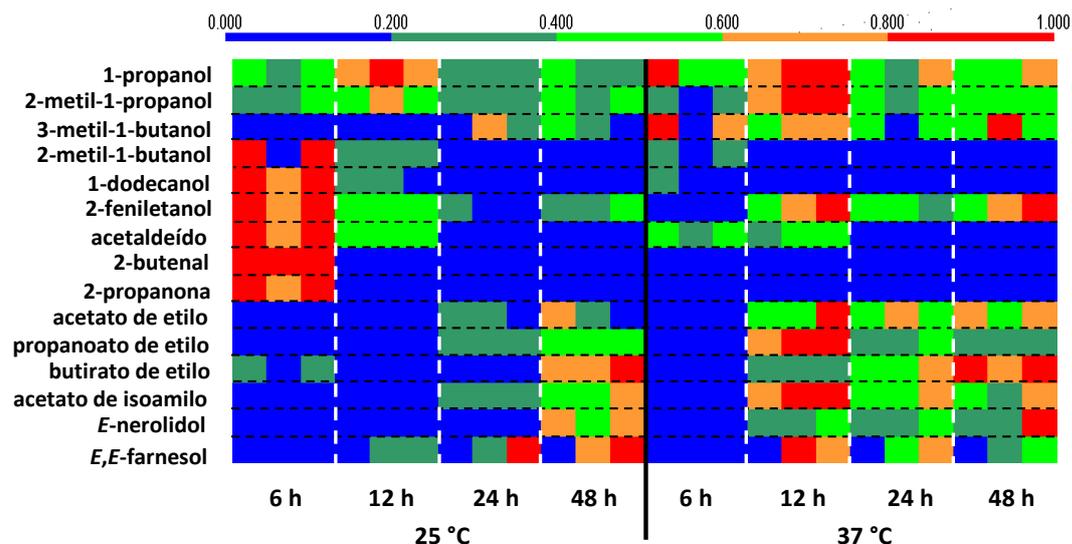


Figura 25- Heatmap dos 15 metabolitos de *C. albicans* produzidos a 25 °C e 37 °C em diferentes tempos de crescimento (6 h, 12 h, 24 h e 48 h). As diferentes intensidades correspondem às áreas cromatográficas normalizadas pelo máximo de cada metabolito em todas as amostras.

Pela análise de componentes principais é também possível observar diferenças nos metabolitos produzidos ao longo do tempo de crescimento (Figura 26). O PC1 e o PC2 explicam 66,9% da variabilidade total, sendo que o PC1 explica 51,7% da variabilidade e o PC2 explica 15,2%. Os diferentes tempos de crescimento distribuem-se ao longo do PC1, sendo que os tempos 6 h e 12 h localizam-se no PC1 negativo e os tempos 24 h e 48 h localizam-se no PC1 positivo (Figura 26A). Os primeiros tempos de crescimento são caracterizados pelos metabolitos 2-metil-1-butanol, 1-dodecanol, acetaldeído, 2-butenal e 2-propanona (Figura 26B). Os restantes álcoois, ésteres e sesquiterpenóides caracterizam os tempos de crescimento mais tardios.

3. Resultados e Discussão

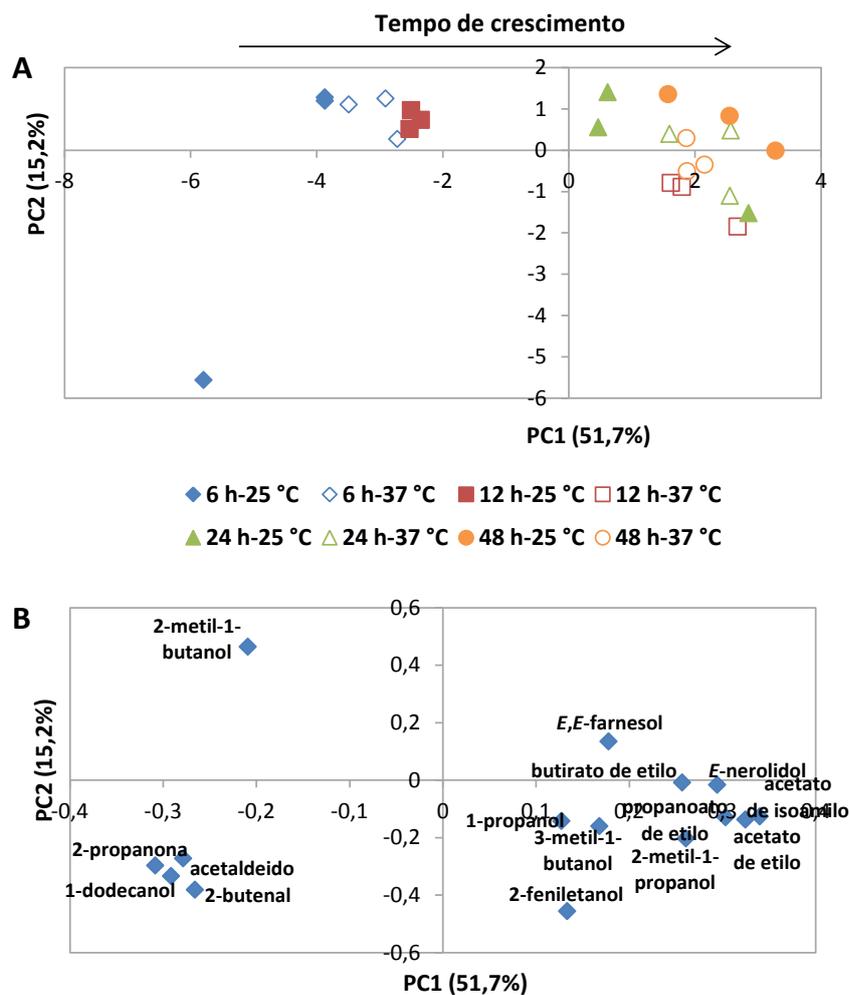


Figura 26- (A) Diagrama de coordenadas fatoriais de PCA baseado na área de 15 metabólitos voláteis selecionados de *Candida albicans* produzidos a 25 °C e 37 °C em diferentes tempos de crescimento. (B) Diagrama de contribuições fatoriais que explicam a separação observada no diagrama de coordenadas fatoriais.

3.3. Distinção da *C. albicans* em relação a espécies de *Candida* não-*albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* a partir de um conjunto de metabolitos alvo

Com o intuito de validar se o padrão de metabolitos selecionado permite caracterizar *C. albicans*, foi realizado um estudo comparativo com outras espécies, nomeadamente *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*.

Inicialmente foi feita uma avaliação comparativa do padrão de metabolitos de *C. albicans* com as quatro leveduras em estudo às 6 h de crescimento a 25 °C. Esta condição foi escolhida com base nos resultados obtidos anteriormente, onde foi observado um maior teor de metabolitos produzidos nesta condição.

Posteriormente foi feita uma avaliação complementar do padrão de metabolitos com as quatro leveduras e também com um fungo filamentososo, *Aspergillus niger*. Neste caso, a condição escolhida foi 72 h-25 °C, de modo a verificar se com um tempo de crescimento mais longo é possível distinguir *C. albicans* das restantes espécies.

Para esta avaliação comparativa, foram feitos *heatmaps* dos 5 e 15 metabolitos produzidos e ainda foi realizada, a título exploratório, uma análise de componentes principais (PCA) de modo a extrair as principais fontes de variabilidade entre as espécies. Os resultados obtidos encontram-se representados nas Figuras 27-30.

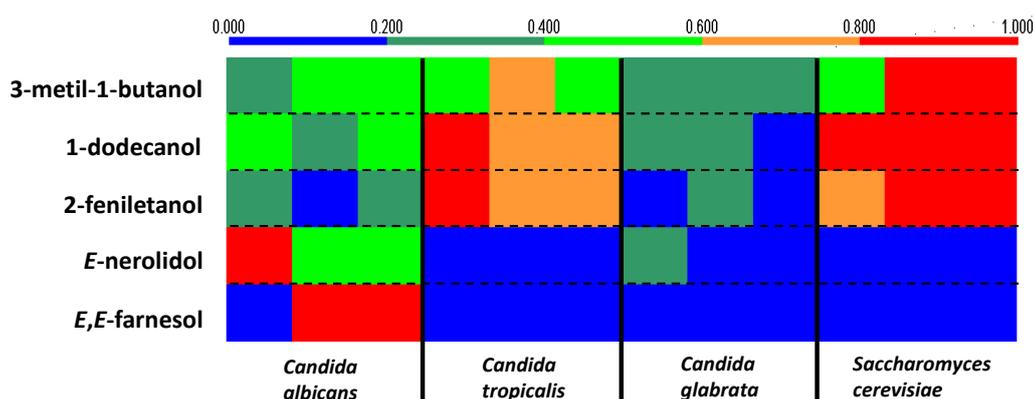


Figura 27- *Heatmap* dos 5 metabolitos voláteis produzidos às 6 h-25 °C pelas quatro leveduras em estudo (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*). As diferentes intensidades correspondem às áreas cromatográficas normalizadas pelo máximo de cada metabolito em todas as amostras.

3. Resultados e Discussão

Analisando a Figura 27, verifica-se que os metabolitos apresentaram abundâncias relativas diferentes entre leveduras. Em *Candida albicans*, os 5 metabolitos produzidos apresentaram abundâncias relativas elevadas. Para as outras espécies de *Candida*, os metabolitos *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol apresentaram abundâncias relativas baixas. *Saccharomyces cerevisiae* produziu 3-metil-1-butanol, 1-dodecanol e 2-feniletanol com uma abundância relativa superior a 0,8, sendo que os metabolitos *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol possuíram abundância relativa inferior a 0,2.

A análise de componentes principais revela a distinção entre a espécie *Candida albicans* e as restantes espécies de *Candida* e *S. cerevisiae* (Figura 28).

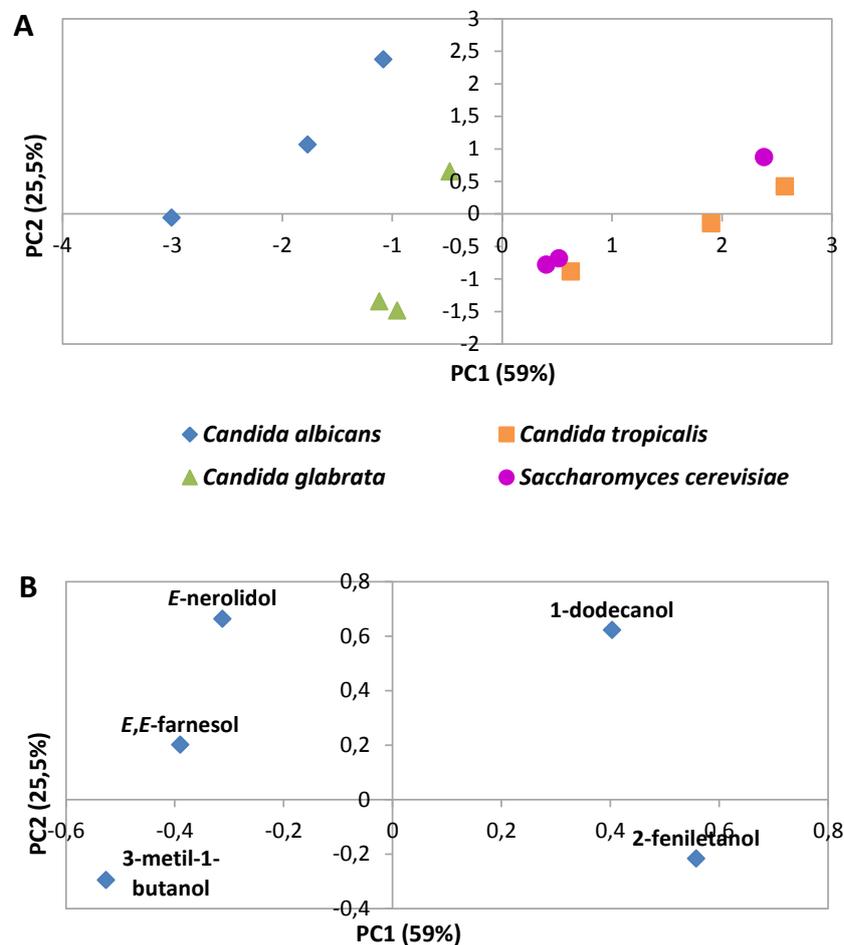


Figura 28- (A) Diagrama de coordenadas fatoriais de PCA baseado na área de 5 metabolitos voláteis produzidos por *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*, às 6 h de crescimento a 25 °C. (B) Diagrama de contribuições fatoriais que explicam a separação observada no diagrama de coordenadas fatoriais.

3. Resultados e Discussão

As coordenadas fatoriais dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicam 84,5% da variabilidade total. As quatro espécies foram distribuídas ao longo do PC1 (59% da variabilidade), de acordo com a relação entre elas: *C. albicans* e *C. glabrata* encontram-se no PC1 negativo e *C. tropicalis* e *S. cerevisiae* encontram-se no PC1 positivo.

Da análise PCA é possível concluir que *C. albicans* é distinguida das restantes espécies pela presença de *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol (Figura 28B). Os metabolitos 1-dodecanol e 2-feniletanol caracterizam as leveduras *C. tropicalis* e *S. cerevisiae*.

Analisando o conjunto de 15 metabolitos, verificam-se também diferenças entre as abundâncias relativas dos metabolitos produzidos pelas quatro leveduras (Figura 29).

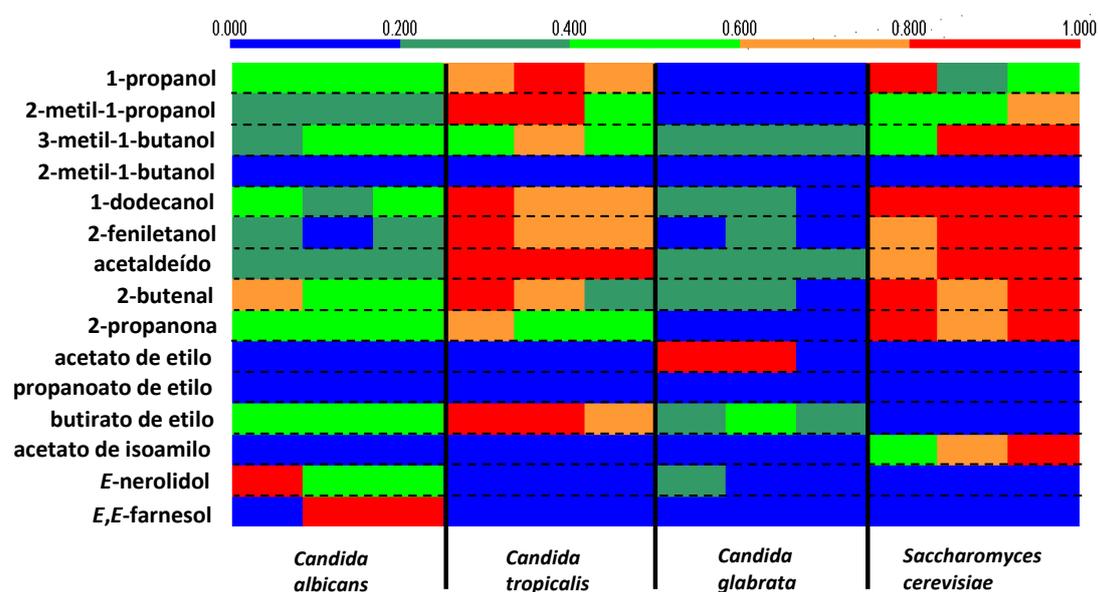


Figura 29- Heatmap dos 15 metabolitos voláteis produzidos às 6 h-25 °C pelas quatro leveduras em estudo (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*). As diferentes intensidades correspondem às áreas cromatográficas normalizadas pelo máximo de cada metabolito em todas as amostras.

Analisando a Figura 29, observa-se que os metabolitos 1-propanol e 2-metil-1-propanol apresentaram abundâncias relativas elevadas em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *S. cerevisiae*, sendo que em *C. glabrata*, a abundância relativa foi inferior a 0,2. O metabolito 3-metil-1-butanol apresentou uma abundância relativa elevada para todas as leveduras. Os metabolitos 1-dodecanol, 2-feniletanol, acetaldeído, 2-butenal e 2-propanona, apresentaram abundâncias relativas elevadas em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *S. cerevisiae*. O butirato de etilo apresentou uma abundância relativa elevada para as espécies de *Candida*, sendo que para *S. cerevisiae*, este

3. Resultados e Discussão

metabolito não foi detetado nesta condição estudada. Os metabolitos 2-metil-1-butanol e propanoato de etilo não foram detetados nestas condições. O acetato de etilo foi apenas detetado para *C. glabrata*, sendo que apresentou uma abundância relativa superior a 0,8 e o acetato de isoamilo foi apenas detetado para *S. cerevisiae*, com uma abundância relativa superior a 0,4.

Pela análise PCA, verificam-se também diferenças entre os metabolitos produzidos pelas quatro leveduras (Figura 30).

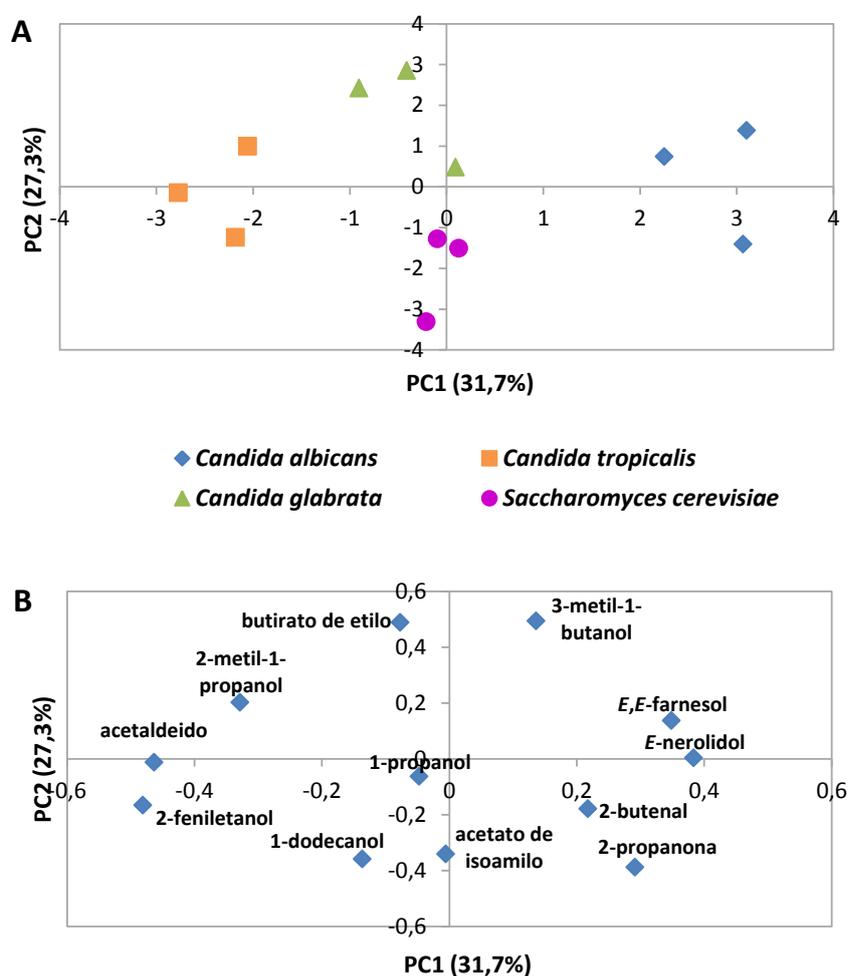


Figura 30- (A) Diagrama de coordenadas fatoriais de PCA baseado na área de 15 metabolitos voláteis produzidos por *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*, às 6 h de crescimento a 25 °C. (B) Diagrama de contribuições fatoriais que explicam a separação observada no diagrama de coordenadas fatoriais.

3. Resultados e Discussão

O PC1 e PC2 explicam 59% da variabilidade total dos dados, sendo que as quatro leveduras foram distribuídas ao longo do PC1 (31,7% da variabilidade). *C. albicans* localiza-se no PC1 positivo, enquanto *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *S. cerevisiae* localizam-se maioritariamente no PC1 negativo (Figura 30A). *C. albicans* é caracterizada principalmente pelos metabolitos *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol, sendo que as restantes leveduras são caracterizadas pelos metabolitos 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-dodecanol, 2-feniletanol, acetaldeído, butirato de etilo e acetato de isoamilo (Figura 30B). Os resultados obtidos revelam que, quando *C. albicans* e as restantes espécies em estudo são cultivadas nas mesmas condições (6 h-25 °C), é possível distinguir *C. albicans* das restantes espécies com base nos 5 e 15 metabolitos selecionados.

Dado que às 6 h poderá existir maior variabilidade na produção de metabolitos entre as diferentes espécies em estudo por se encontrarem no início da fase exponencial, foi utilizado um tempo de crescimento mais longo, de modo a comparar a produção de metabolitos entre as leveduras e também entre um fungo filamentososo. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 31-34.

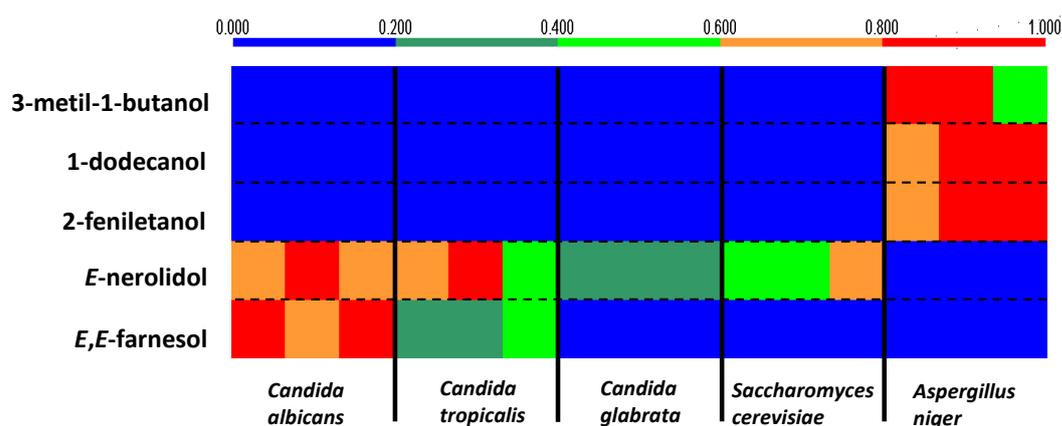


Figura 31- Heatmap dos 5 metabolitos voláteis produzidos às 72 h-25 °C pelas quatro leveduras em estudo (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*) e por *Aspergillus niger*. As diferentes intensidades correspondem às áreas cromatográficas normalizadas pelo máximo de cada metabolito em todas as amostras.

Analisando a Figura 31, verifica-se que *A. niger* produziu álcoois (3-metil-1-butanol, 1-dodecanol e 2-feniletanol) com maior abundância relativa comparativamente com as leveduras. Por sua vez, as leveduras produziram sesquiterpenóides com maior abundância relativa, sendo que *C. albicans* produziu *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol com uma abundância relativa superior a 0,8.

Pela análise PCA, é possível distinguir *C. albicans* das restantes espécies em estudo (Figura 32).

3. Resultados e Discussão

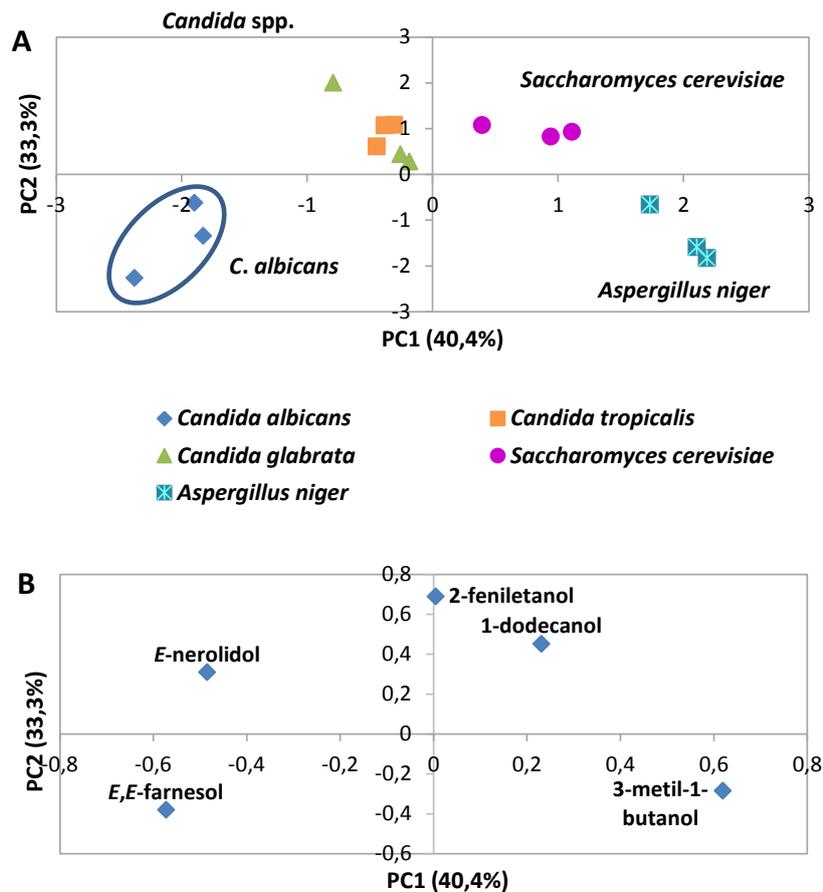


Figura 32- (A) Diagrama de coordenadas fatoriais de PCA baseado na área de 5 metabolitos voláteis produzidos por *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*, às 72 h de crescimento a 25 °C. (B) Diagrama de contribuições fatoriais que explicam a separação observada no diagrama de coordenadas fatoriais.

As diferentes espécies distribuíram-se ao longo do PC1 e PC2, os quais explicam 40,4% e 33,3% da variabilidade, respetivamente. *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. albicans* localizam-se no PC1 negativo, sendo que *C. albicans* localiza-se no PC2 negativo e as restantes espécies de *Candida* localizam-se no PC2 positivo. *S. cerevisiae* localiza-se no PC1 e PC2 positivos e *A. niger* localiza-se no PC1 positivo e PC2 negativo. Da análise PCA é possível concluir que *C. albicans* é distinguida das restantes espécies pela presença de *E-nerolidol* e *E,E-farnesol* (Figura 32B). Os metabolitos 3-metil-1-butanol, 1-dodecanol e 2-feniletanol permitiram a separação entre *S. cerevisiae* e *A. niger*.

Analisando o conjunto de 15 metabolitos, é também possível verificar a existência de diferenças nos metabolitos produzidos entre as espécies (Figura 33).

3. Resultados e Discussão

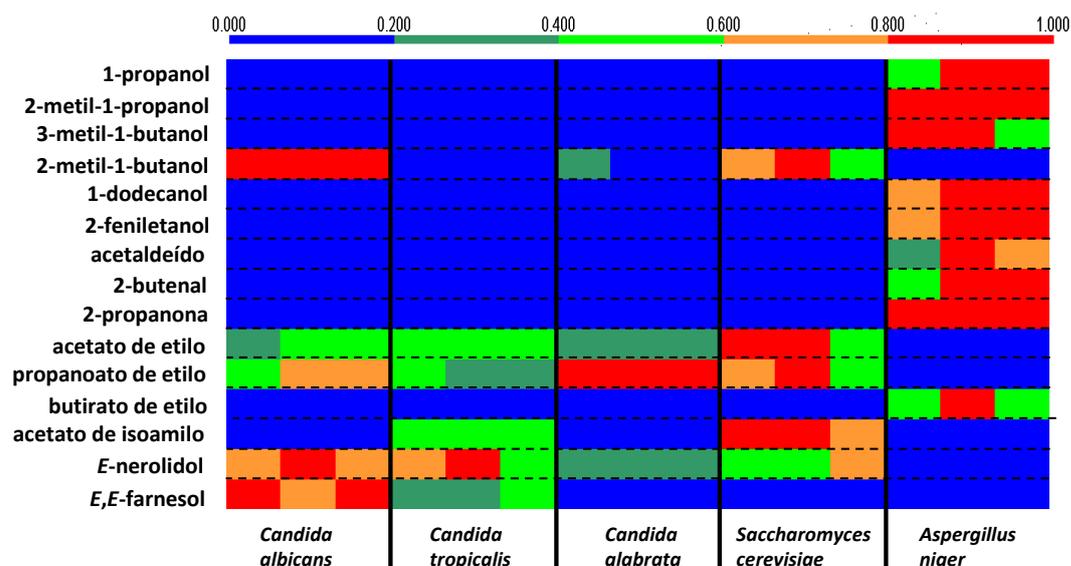


Figura 33- Heatmap dos 15 metabolitos voláteis produzidos às 72 h-25 °C pelas quatro leveduras em estudo (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae*) e por *Aspergillus niger*. As diferentes intensidades correspondem às áreas cromatográficas normalizadas pelo máximo de cada metabolito em todas as amostras.

Os álcoois, com exceção do 2-metil-1-butanol, aldeídos e 2-propanona foram produzidos com elevada abundância relativa por *A. niger* (Figura 33). No caso do acetato de etilo e propanoato de etilo, estes foram produzidos com elevada abundância relativa pelas leveduras. Os sesquiterpenóides foram produzidos com abundância relativa elevada por *C. albicans*, comparativamente com as restantes leveduras, sendo que para o fungo filamentoso, estes metabolitos não foram detetados.

Analisando a Figura 34, verifica-se que com base nos 15 metabolitos é possível distinguir o fungo filamentoso das leveduras. Os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicam 65,9% da variabilidade total do conjunto de dados (Figura 34A). O PC1 explica 42,3% da variabilidade e permite a separação entre leveduras e fungo filamentoso. *A. niger* encontra-se no PC1 negativo e as leveduras encontram-se no PC1 positivo. O fungo filamentoso é distinguido das leveduras maioritariamente pela presença dos metabolitos 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e 2-propanona. As leveduras são caracterizadas maioritariamente pelos ésteres e sesquiterpenóides (Figura 34B).

3. Resultados e Discussão

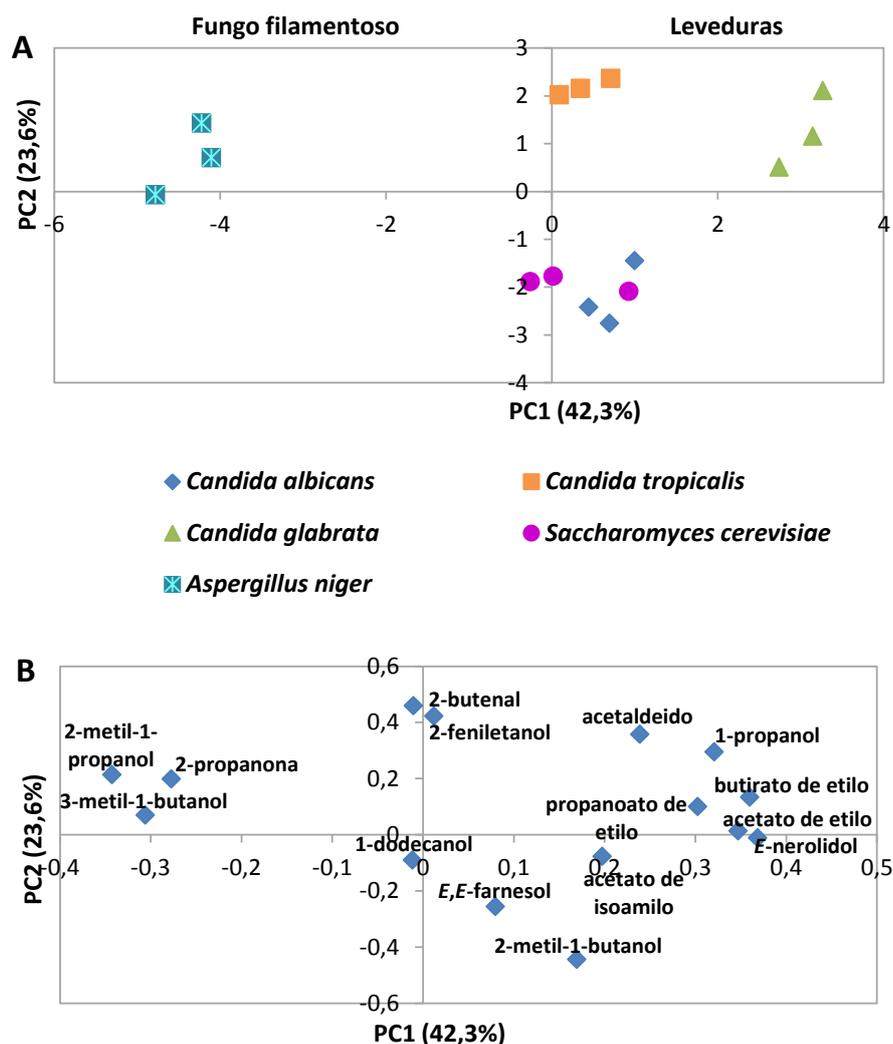


Figura 34- (A) Diagrama de coordenadas fatoriais de PCA baseado na área de 15 metabolitos voláteis produzidos por *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*, às 72 h de crescimento a 25 °C. (B) Diagrama de contribuições fatoriais que explicam a separação observada no diagrama de coordenadas fatoriais.

Os resultados obtidos revelaram que os 15 metabolitos selecionados permitiram caracterizar *C. albicans*, quando comparada com outras espécies de *Candida* não-*albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*. Foi possível distinguir *C. albicans* das restantes leveduras num tempo de crescimento curto (6 h), com base nos 5 e 15 metabolitos, sendo que os 15 metabolitos possibilitaram uma melhor separação.

Com um tempo de crescimento mais longo (72 h) foi possível distinguir as leveduras do fungo filamentososo com base nos 15 metabolitos. Quando foram apenas utilizados os 5 metabolitos, foi possível uma separação entre *C. albicans* e as restantes leveduras e também o fungo filamentososo.

4. Conclusão

4. Conclusão

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o impacto das condições de crescimento (tempo e temperatura) no perfil metabólico global da *C. albicans*, assim como em alguns metabolitos alvo. Numa primeira abordagem, foi avaliado o efeito da temperatura e do tempo de crescimento no metabolismo de *C. albicans*, de modo a selecionar a melhor condição que permitia a produção de maior teor em metabolitos. Ambas as condições de crescimento tiveram influência no metabolismo de *C. albicans*, sendo que às 6 h a 25 °C o teor global de metabolitos/UFC/mL foi superior relativamente aos restantes tempos.

Numa fase seguinte, foi avaliada a variação de um conjunto de 15 metabolitos selecionados com as condições de cultura (temperatura e tempo de crescimento). Considerando o subconjunto de 5 metabolitos reportados como estando associados ao *quorum sensing*, verificou-se que, em ambas as temperaturas, os primeiros tempos de crescimento (6 h e 12 h) foram caracterizados pelos metabolitos 1-dodecanol e 2-feniletanol e os tempos mais tardios (24 h e 48 h) foram caracterizados pelos sesquiterpenóides (*E*-nerolidol e *E,E*-farnesol). Em relação aos 15 metabolitos selecionados, verificou-se que, de uma forma geral, em ambas as temperaturas, os primeiros tempos de crescimento foram caracterizados pelos álcoois, aldeídos e 2-propanona e os tempos mais tardios (24 h e 48 h), pelos ésteres e sesquiterpenóides.

O estudo exploratório realizado com vista a avaliar a aplicabilidade dos metabolitos alvo estudados na distinção da *Candida albicans* em relação a espécies de *Candida* não-*albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* permitiu concluir a viabilidade destes metabolitos em futuros estudos de deteção da *C. albicans*. Num tempo de crescimento mais curto, nomeadamente 6 h, foi possível distinguir *C. albicans* das restantes leveduras com base nos 5 metabolitos, sendo que *C. albicans* foi caracterizada pelos metabolitos *E*-nerolidol e *E,E*-farnesol. Quando foram considerados os 15 metabolitos, foi possível uma melhor distinção entre *C. albicans* e outras espécies de *Candida* e *S. cerevisiae*. A distinção entre espécies foi também verificada com um tempo de crescimento mais longo (72 h). As leveduras foram distinguidas do fungo filamentoso com base nos 15 metabolitos, sendo as leveduras caracterizadas principalmente por ésteres e sesquiterpenóides, enquanto o fungo filamentoso foi caracterizado pela presença de 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e 2-propanona. Considerando o subconjunto de 5 metabolitos, foi possível distinguir *C. albicans* das restantes espécies, sendo esta caracterizada pelos sesquiterpenóides.

Em conclusão, os resultados obtidos permitem concluir que o padrão de metabolitos alvo selecionado caracteriza *C. albicans* e permite a sua distinção quando comparada com outras espécies, tanto num tempo de crescimento curto como num tempo mais longo. Deste modo, este

4. Conclusão

padrão de metabolitos alvo estudado poderá possivelmente ser utilizado no futuro para a detecção de infecções fúngicas por *Candida albicans*.

Trabalho Futuro

Os resultados do presente trabalho abrem várias linhas de ação, das quais se enumeram as seguintes:

- Realizar ensaios com amostras clínicas de modo a testar a aplicabilidade do padrão de metabolitos alvo estudado na detecção de infecções fúngicas por *Candida albicans*;
- Realizar o mesmo estudo mas com um maior número de espécies com importância na área clínica;
- Estudar o exometaboloma de *Candida albicans*, de modo a identificar mais metabolitos que possam ser utilizados na detecção de infecções causadas por esta espécie.

5. Bibliografia

5. Bibliografia

- [1] Kim, J., Sudbery, P., *Candida albicans*, a major human fungal pathogen., *Journal of Microbiology*. 49 (2011) 171–177.
- [2] Sudbery, P., Gow, N., Berman, J., The distinct morphogenic states of *Candida albicans*., *Trends of Microbiology*. 12 (2004) 317–324.
- [3] Nickerson, K.W., Atkin, A.L., Hornby, J.M., Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond., *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (2006) 3805–3813.
- [4] Chen, H., Fink, G.R., Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols., *Genes & Development*. 20 (2006) 1150–1161.
- [5] Gregus, P., Vlcková, H., Buchta, V., Kestranek, J., Krivčíková, L., Nováková, L., Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of quorum-sensing molecules of *Candida albicans*., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 53 (2010) 674–681.
- [6] Han, T.-L., Cannon, R.D., Villas-Bôas, S.G., The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing., *Fungal Genetics and Biology*. 48 (2011) 747–763.
- [7] Shchepin, R., Hornby, J.M., Burger, E., Niessen, T., Dussault, P., Nickerson, K.W., Quorum Sensing in *Candida albicans*: Probing Farnesol 's Mode of Action with 40 Natural and Synthetic Farnesol Analogs., *Chemistry & Biology*. 10 (2003) 743–750.
- [8] Chaffin, W.L., *Candida albicans* cell wall proteins., *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72 (2008) 495–544.
- [9] Gow, N. A. R., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J.P., Netea, M.G., *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization., *Nature Reviews Microbiology*. 10 (2012) 112–122.
- [10] Perez-Garcia, L.A., Diaz-Jimenez, D.F., Lopez-Esparza, A., Mora-Montes, H.M., Role of Cell Wall Polysaccharides during Recognition of *Candida albicans* by the Innate Immune System., *Journal of Glycobiology*. 01 (2011).
- [11] Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L., Gil, C., Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome., *Proteomics*. 9 (2009) 4770–4786.
- [12] Hippelein, M., Rügamer, M., Ergosterol as an indicator of mould growth on building materials., *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 207 (2004) 379–385.
- [13] Dhillon, R.H., Clark, J., Fungal infections in the critically ill., *Trends in Anaesthesia and Critical Care*. 1 (2011) 210–218.
- [14] Procop, G.W., Molecular diagnostics for invasive fungal infections: a call for refinement and implementation., *Journal of Molecular Diagnostics*. 12 (2010) 17–19.

5. Bibliografia

- [15] Dean, D. A., Burchard, K.W., Surgical perspective on invasive *Candida* infections., *World Journal of Surgery*. 22 (1998) 127–134.
- [16] Sipsas, N. V, Kontoyiannis, D.P., Invasive fungal infections in patients with cancer in the Intensive Care Unit., *International Journal of Antimicrobial Agents*. 39 (2012) 464–471.
- [17] Kaul, A., Chauhan, T.S., Opportunistic infection in renal transplant recipients., *Indian Journal of Transplantation*. 8 (2014) S57–S64.
- [18] Hernández-Haro, C., Llopis, S., Molina, M., Monteoliva, L., Gil, C., Immunoproteomic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* systemic infection in a murine model., *Journal of Proteomics*. 112 (2014) 14–26.
- [19] Lim, C.S.-Y., Rosli, R., Seow, H.F., Chong, P.P., *Candida* and invasive candidiasis: back to basics., *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 31 (2012) 21–31.
- [20] Ruhnke, M., Rickerts, V., Cornely, O. A., Buchheidt, D., Glöckner, A., Heinz, W., et al., Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy., *Mycoses*. 54 (2011) 279–310.
- [21] Ha, J.F., Italiano, C.M., Heath, C.H., Shih, S., Rea, S., Wood, F.M., Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon., *Burns*. 37 (2011) 181–195.
- [22] Cuenca-Estrella, M., Bassetti, M., Lass-Flörl, C., Ráčil, Z., Richardson, M., Rogers, T.R., Detection and investigation of invasive mould disease., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66 Suppl 1 (2011) i15–24.
- [23] Liu, X., Ling, Z., Li, L., Ruan, B., Invasive fungal infections in liver transplantation., *International Journal of Infectious Diseases*. 15 (2011) e298– e304.
- [24] Morrell, M., Fraser, V.J., Kollef, M.H., Delaying the Empiric Treatment of *Candida* Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained: a Potential Risk Factor for Hospital Mortality., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (2005) 3640-3645.
- [25] Pasqualotto, A.C., Denning, D.W., Diagnosis of invasive fungal infections-current limitations of classical and new diagnostic methods., *European Oncology Review* (2005) 1-11.
- [26] Mayr, A., Lass-Flörl, C., Non-Culture-Based Methods for the Diagnosis of Invasive Candidiasis., *Current Fungal Infection Reports*. 5 (2011) 151–156.
- [27] Ahmad, S., Khan, Z., Invasive candidiasis: a review of nonculture-based laboratory diagnostic methods., *Indian Journal of Medical Microbiology*. 30 (2012) 264–269.
- [28] Vitale, R.G., Nucci, M., Diagnosis of Candidemia., *Current Fungal Infection Reports*. 8 (2014) 90–94.

5. Bibliografia

- [29] Alam, M.Z., Alam, Q., Jiman-Fatani, A., Kamal, M.A., Abuzenadah, A.M., Chaudhary, A.G., et al., *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30 (2014) 1437–1451.
- [30] Parkinson, D.-R., Warren, J.M., Pawliszyn, J., Analysis of ergosterol for the detection of mold in soils by automated on-fiber derivatization headspace extraction-SPME-GC/MS., *Analytica Chimica Acta*. 661 (2010) 181–187.
- [31] Pihet, M., Marot, A., Diagnostic biologique des candidoses., *Revue Francophone des Laboratoires*. 2013 (2013) 47–61.
- [32] Nguyen, M.H., Clancy, C.J., Biomarkers for Diagnosis of Candidal Infections., *Current Fungal Infection Reports*. 6 (2012) 56–62.
- [33] Ostrosky-Zeichner, L., Invasive mycoses: diagnostic challenges., *The American Journal of Medicine*. 125 (2012) S14– S24.
- [34] Anane, S., Khalfallah, F., Biological diagnosis of systemic candidiasis: difficulties and future prospects., *Pathologie Biologie*. 55 (2007) 262–272.
- [35] Stone, N.R.H., Gorton, R.L., Barker, K., Ramnarain, P., Kibbler, C.C., Evaluation of PNA-FISH yeast traffic light for rapid identification of yeast directly from positive blood cultures and assessment of clinical impact., *Journal of Clinical Microbiology*. 51 (2013) 1301–1302.
- [36] Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M., Sebel, M., Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry., *Biotechnology Advances*. 32 (2014) 230–241.
- [37] Lacroix, C., Gicquel, A., Sendid, B., Meyer, J., Accoceberry, I., François, N., et al., Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species., *Clinical Microbiology and Infection*. 20 (2014) 153–158.
- [38] Arthington-Skaggs, B. A., Jradi, H., Desai, T., Morrison, C.J., Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*., *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (1999) 3332–3337.
- [39] Pasanen, A.-L., Yli-Pietila, K., Pasanen, P., Kalliokoski, P., Tarhanen, J., Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials., *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (1999) 138–142.
- [40] Parsi, Z., Górecki, T., Determination of ergosterol as an indicator of fungal biomass in various samples using non-discriminating flash pyrolysis., *Journal of Chromatography A*. 1130 (2006) 145–150.
- [41] Sardari, S., Mori, Y., Kurosawa, T., Daneshtalab, M., Modulatory effect of cAMP on fungal ergosterol level and inhibitory activity of azole drugs., *Canadian Journal of Microbiology*. 49 (2003) 344–349.

5. Bibliografia

- [42] Ruzicka, S., Edgerton, D., Norman, M., Hill, T., The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils., *Soil Biology & Biochemistry*. 32 (2000) 989-1005.
- [43] De Ridder-Duine, A.S., Smant, W., van der Wal, A., van Veen, J. A., de Boer, W., Evaluation of a simple, non-alkaline extraction protocol to quantify soil ergosterol., *Pedobiologia*. 50 (2006) 293–300.
- [44] Gong, P., Guan, X., Witter, E., A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption., *Applied Soil Ecology*. 17 (2001) 285–289.
- [45] Görs, S., Schumann, R., Häubner, N., Karsten, U., Fungal and algal biomass in biofilms on artificial surfaces quantified by ergosterol and chlorophyll *a* as biomarkers., *International Biodeterioration & Biodegradation*. 60 (2007) 50–59.
- [46] Axelsson, B.-O., Saraf, A., Larsson, L., Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry., *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 666 (1995) 77–84.
- [47] Lau, A.P.S., Lee, A.K.Y., Chan, C.K., Fang, M., Ergosterol as a biomarker for the quantification of the fungal biomass in atmospheric aerosols., *Atmospheric Environment*. 40 (2006) 249–259.
- [48] Liebeke, M., Lalk, M., *Staphylococcus aureus* metabolic response to changing environmental conditions - a metabolomics perspective., *International Journal of Medical Microbiology*. 304 (2014) 222–229.
- [49] Dunn, W.B., Ellis, D.I., Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies., *Trends in Analytical Chemistry*. 24 (2005) 285–294.
- [50] Tang, J., Microbial metabolomics., *Current Genomics*. 12 (2011) 391–403.
- [51] Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., Wang, X., Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics., *Journal of Proteomics*. 75 (2012) 1079–1088.
- [52] Korpi, A., Järnberg, J., Pasanen, A.-L., Microbial volatile organic compounds., *Critical Reviews in Toxicology*. 39 (2009) 139–193.
- [53] Martins, M., Henriques, M., Azeredo, J., Rocha, S.M., Coimbra, M. A., Oliveira, R., Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells., *Eukaryotic Cell*. 6 (2007) 2429–2436.
- [54] Martins, M., Henriques, M., Azeredo, J., Rocha, S.M., Coimbra, M. A., Oliveira, R., *Candida* species extracellular alcohols: production and effect in sessile cells., *Journal of Basic Microbiology*. 50 Suppl 1 (2010) S89– S97.
- [55] Martins, M., Insights into *Candida* world : the extracellular milieu., Tese de Doutorado: Universidade do Minho (2010).

5. Bibliografia

- [56] Cailleux, A., Bouchara, J., Daniel, V., Chabasse, D., Allain, P., Gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile organic compounds produced by some micromycetes., *Chromatographia*. 34 (1992) 613–617.
- [57] Annan, N.T., Poll, L., Sefa-Dedeh, S., Plahar, W. A., Jakobsen, M., Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture fermentations of Ghanaian maize dough., *Journal of Applied Microbiology*. 94 (2003) 462–474.
- [58] Scotter, J.M., Langford, V.S., Wilson, P.F., McEwan, M.J., Chambers, S.T., Real-time detection of common microbial volatile organic compounds from medically important fungi by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS)., *Journal of Microbiological Methods*. 63 (2005) 127–134.
- [59] Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., Nickerson, K.W., Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol., *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (2001) 2982–2992.
- [60] KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Consult. 18-9-2014]. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg/>.
- [61] Ghosh, S., Kebaara, B.W., Atkin, A.L., Nickerson, K.W., Regulation of aromatic alcohol production in *Candida albicans*., *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (2008) 7211–7218.
- [62] Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., Dickinson, J.R., The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism., *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (2008) 2259–2266.
- [63] Pires, E.J., Teixeira, J.A., Brányik, T., Vicente, A.A., Yeast: the soul of beer's aroma-a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast., *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98 (2014) 1937–1949.
- [64] Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W., Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics., *Nature Reviews Microbiology*. 3 (2005) 937–947.
- [65] Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J., Applications of solid-phase microextraction in food analysis., *Journal of Chromatography A*. 880 (2000) 35–62.
- [66] Deibler, K.D., Acree, T.E., Lavin, E.H., Solid phase microextraction application in gas chromatography/olfactometry dilution analysis., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (1999) 1616–1618.
- [67] Pawliszyn, J., Pawliszyn, B., Pawliszyn, M., Solid Phase Microextraction (SPME)., *The Chemical Educator*. 2 (1997) 1–7.
- [68] Arthur, C.L., Pawliszyn, J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers., *Analytical Chemistry*. 62 (1990) 2145–2148.

5. Bibliografia

- [69] Arthur, C.L., Killam, L.M., Buchholz, K.D., Pawliszyn, J., Berg, J.R., Automation and optimization of solid-phase microextraction., *Analytical Chemistry*. 64 (1992) 1960–1966.
- [70] Castro, R., Natera, R., Durán, E., García-Barroso, C., Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products., *European Food Research and Technology*. 228 (2008) 1–18.
- [71] Garcia-Esteban, M., Ansorena, D., Astiasarán, I., Ruiz, J., Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME)., *Talanta*. 64 (2004) 458–466.
- [72] Pillonel, L., Bosset, J., Tabacchi, R., Rapid Preconcentration and Enrichment Techniques for the Analysis of Food Volatile. A Review., *LWT - Food Science and Technology*. 35 (2002) 1–14.
- [73] Petronilho, S., Coimbra, M.A., Rocha, S.M., A critical review on extraction techniques and gas chromatography based determination of grapevine derived sesquiterpenes., *Analytica Chimica Acta*. 846 (2014) 8–35.
- [74] Augusto, F., Valente, A.L.P., Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 21 (2002) 428–438.
- [75] Kataoka, H., Saito, K., Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 54 (2011) 926–950.
- [76] Kumar, A., Gaurav, Malik, A.K., Matysik, F.-M., Analysis of biological samples using solid-phase microextraction., *Bioanalytical Reviews*. 1 (2009) 35–55.
- [77] Spietelun, A., Kloskowski, A., Chrzanowski, W., Namieśnik, J., Understanding solid-phase microextraction: key factors influencing the extraction process and trends in improving the technique., *Chemical Reviews*. 113 (2013) 1667–1685.
- [78] Rocha, S., Ramalheira, V., Barros, A., Delgadillo, I., Coimbra, M. A., Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (2001) 5142–5151.
- [79] Perestrelo, R., Barros, A.S., Câmara, J.S., Rocha, S.M., In-depth search focused on furans, lactones, volatile phenols, and acetals as potential age markers of Madeira wines by comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (2011) 3186–3204.
- [80] Silva, I., Rocha, S.M., Coimbra, M.A., Marriott, P.J., Headspace solid-phase microextraction combined with comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for the determination of volatile compounds from marine salt., *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 5511–5521.

5. Bibliografia

- [81] Perestrelo, R., Petronilho, S., Câmara, J.S., Rocha, S.M., Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction as a powerful tool for quantification of ethyl carbamate in fortified wines. The case study of Madeira wine., *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 3441–3445.
- [82] Górecki, T., Harynuk, J., Panić, O., The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC)., *Journal of Separation Science*. 27 (2004) 359–379.
- [83] Rocha, S.M., Freitas, R., Cardoso, P., Santos, M., Martins, R., Figueira, E., Exploring the potentialities of comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry to distinguish bivalve species: Comparison of two clam species (*Venerupis decussata* and *Venerupis philippinarum*)., *Journal of Chromatography A*. 1315 (2013) 152–161.
- [84] Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A., Bernal, J., Multidimensional chromatography in food analysis., *Journal of Chromatography A*. 1216 (2009) 7110–7129.
- [85] Rocha, S.M., Coelho, E., Zrostlíková, J., Delgadillo, I., Coimbra, M.A., Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry of monoterpenoids as a powerful tool for grape origin traceability., *Journal of Chromatography A*. 1161 (2007) 292–299.
- [86] Dallüge, J., Beens, J., Brinkman, U.A.T., Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool., *Journal of Chromatography A*. 1000 (2003) 69–108.
- [87] Murray, J. A., Qualitative and quantitative approaches in comprehensive two-dimensional gas chromatography., *Journal of Chromatography A*. 1261 (2012) 58–68.
- [88] Salvador, A.C., Baptista, I., Barros, A.S., Gomes, N.C.M., Cunha, A., Almeida, A., Rocha, S.M., Can volatile organic metabolites be used to simultaneously assess microbial and mite contamination level in cereal grains and coffee beans?, *PLoS One*. 8 (2013) e59338.
- [89] Van Den Dool, H., Kratz, P.D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography., *Journal of Chromatography A*. 11 (1963) 463–471.
- [90] MetaboAnalyst. Disponível em: <http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>.
- [91] Rembold, H., Wallner, P., Nitz, S., Kollmannsberger, H., Drawert, F., Volatile components of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37 (1989) 659–662.
- [92] Adams, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL. (1995).
- [93] Qian, M., Reineccius, G., Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method., *Flavour and Fragrance Journal*. 18 (2003) 252–259.

5. Bibliografia

- [94] Dallüge, J., van Stee, L.L.P., Xu, X., Williams, J., Beens, J., Vreuls, R.J.J., Brinkman, U.A.Th., Unravelling the composition of very complex samples by comprehensive gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry: Cigarette smoke., *Journal of Chromatography A*. 974 (2002) 169–184.
- [95] El-Sayed, A.M., Heppelthwaite, V.J., Manning, L.M., Gibb, A.R., Suckling, D.M., Volatile constituents of fermented sugar baits and their attraction to lepidopteran species., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (2005) 953–958.
- [96] Bylaite, E., Meyer, A.S., Characterisation of volatile aroma compounds of orange juices by three dynamic and static headspace gas chromatography techniques., *European Food Research and Technology*. 222 (2006) 176–184.
- [97] Pino, J.A., Mesa, J., Muñoz, Y., Martí, M.P., Marbot, R., Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (2005) 2213–2223.
- [98] Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M., Sánchez, A., Pannecouque, C., Witvrouw, M., De Clercq, E., Chemical studies of essential oils of *Juniperus oxycedrus* ssp. *badia*, *Journal of Ethnopharmacology*. 81 (2002) 129–134.
- [99] Da Silva, M.H.L., Andrade, E.H.A., Zoghbi, M. das G.B., Luz, A.I.R., da Silva, J.D., Maia, J.G.S., The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in North Brazil., *Flavour and Fragrance Journal*. 14 (1999) 208–210.
- [100] Hornby, J.M., Kebaara, B.W., Nickerson, K.W., Farnesol Biosynthesis in *Candida albicans*: Cellular Response to Sterol Inhibition by Zaragozic Acid B., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47 (2003) 2366–2369.

6. Anexos

6. Anexos

Tabela A1- Metabolitos voláteis produzidos por *Aspergillus* spp.(A), *Candida* spp.(B), *Mucor* sp.(C), *Penicillium* spp. (D) e *Saccharomyces cerevisiae* (E) e métodos utilizados para a sua análise

Metabolito	Micorganismo ^a												Método de análise	Referência bibliográfica															
	A B C D E																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
Ácidos																													
ácido acético																											+	SDE/GC-MS SPME/ GC-MS	[1] [2]
ácido caprílico																											+	SPME/ GC-MS	[2]
Álcoois Alifáticos																													
etanol						+			+								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DHS/ GC-MS HS-SPME/ GC-MS HS/SIFT-MS	[3] [4] [5]
1-propanol						+			+								+	+	+		+	+					+	SDE/GC-MS DHS/ GC-MS	[1] [3]
butanodiol																											+	HS-SPME/ GC-MS	[4]
2-metil-1-propanol																											+	DHS/ GC-MS AE/ GC-MS	[3] [6]
álcool furfurílico																											+	SPME/ GC-MS	[7] [2]
2-metil-1-butanol																											+	DHS/ GC-MS AE/ GC-MS HS-SPME/ GC-MS SPME/ GC-MS	[3] [6] [4] [7]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Micorganismo ^a												Método de análise	Referência bibliográfica														
	A						B								C	D						E						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1-dodecanol															+	+											HS-SPME/ GC-MS	[9,10]
geosmina																											HS-SPME/ GC-MS	[4,8]
																											SPME/ GC-MS	[7]
Aromáticos																												
benzenometanol																											HS-SPME/ GC-MS	[4]
2-metilfenol																											AE/ GC-MS	[6]
3-metilfenol																											HS-SPME/ GC-MS	[4]
2,6-dimetilfenol																											HS-SPME/ GC-MS	[4]
																											HS-SPME/ GC-MS	[4,9,10]
2-feniletanol																											SDE/GC-MS	[1]
																											SPME/ GC-MS	[2]
Aldeídos Alifáticos																												
acetaldeído																											DHS/ GC-MS	[3]
																											HS/SIFT-MS	[5]
2-butenal																											HS/SIFT-MS	[5]
3-metil-butanal																											SPME/ GC-MS	[11]
Aromáticos																												
furfural																											SDE/GC-MS	[1]
																											SPME/ GC-MS	[2]
5-metil-furfural																											SPME/ GC-MS	[2]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Microrganismo ^a												Método de análise	Referência bibliográfica																
	A						B								C	D						E								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
benzaldeído																											+	SPME/ GC-MS	[2]	
Cetonas Alifáticas																														
2-propanona						+	+								+	+													HS-SPME/ GC-MS	[4]
																													HS/ SIFT-MS	[5]
2-butanona															+														HS-SPME/ GC-MS	[4]
ciclopentanona							+																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
2-pentanona							+																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
																													SPME/ GC-MS	[7]
2,4-pentanodiona							+																						SPME/ GC-MS	[7]
2-hexanona							+								+														HS-SPME/ GC-MS	[4]
3-hexanona																													AE/ GC-MS	[6]
3-ciclohepteno-1-ona																													AE/ GC-MS	[6]
																													HS-SPME/ GC-MS	[4]
2-heptanona							+																						SDE/ GC-MS	[1]
																													SPME/ GC-MS	[7]
4-heptanona							+																						HS-SPME/ GC-MS	[4]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Micorganismo ^a												Método de análise	Referência bibliográfica																									
	A						B								C	D						E																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
4-metil-3-hexanona																																					AE/ GC-MS	[6]	
																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
bicicloctano-2-ona																																						AE/ GC-MS	[6]
biciclo-(3,2,1)-octano-2-ona																																						AE/ GC-MS	[6]
2,5-metil-3-heptanona																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
4-metil-6-hepteno-3-ona																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
6-metil-2-heptanona																																						AE/ GC-MS	[6]
2-octanona																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
3-octanona																																						HS-SPME/ GC-MS	[4,8]
																																						SPME/ GC-MS	[7,11]
2-nonanona																																						SPME/ GC-MS	[7]
5-etil-4-metil-3-heptanona																																						SPME/ GC-MS	[7]
2,6-di- <i>tert</i> -butil- <i>p</i> -benzoquinona																																						SPME/ GC-MS	[7]
Aromáticas																																							
acetofenona																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Micorganismo ^a												Método de análise	Referência bibliográfica																									
	A						B								C	D						E																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
3-metilbutanoato de etilo																									+													HS-SPME/ GC-MS	[4]
																																					SPME/ GC-MS	[7]	
3-metil-2-butenato de etilo									+																												+	SPME/ GC-MS	[7]
tiglato de etilo									+																												+	HS-SPME/ GC-MS	[4]
																																					SPME/ GC-MS	[7]	
acetato de hexilo																																					+	HS-SPME/ GC-MS	[4]
caproato de etilo																																					+	SPME/ GC-MS	[2]
succinato de dietilo																																					+	SPME/ GC-MS	[2]
acetato de etilhexilo																																					+	SPME/ GC-MS	[7]
acetato de 3-octenilo																																					+	HS-SPME/ GC-MS	[8]
acetato de 3-octilo																																					+	HS-SPME/ GC-MS	[8]
caprilato de etilo																																					+	SPME/ GC-MS	[2]
2-metilbutanoato de isopentilo																																					+	HS-SPME/ GC-MS	[4]
3-metilbutanoato de pentilo									+																												+	SPME/ GC-MS	[7]
tiglato de isoamilo									+																												+	SPME/ GC-MS	[7]
caprato de etilo																																					+	SPME/ GC-MS	[2]
caprilato de isoamilo																																					+	SPME/ GC-MS	[2]
palmitato de etilo	+								+																													SPME/ GC-MS	[11]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Microrganismo ^a												Método de análise	Referência bibliográfica													
	A						B								C	D						E					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
linoleato de etilo	+								+																	SPME/ GC-MS	[11]
Aromáticos																											
benzoato de metilo									+																	SPME/ GC-MS	[7]
acetato de 2- feniletilo																									+	SPME/ GC-MS	[2]
Éteres Alifáticos																											
butoxietoxietanol									+																	SPME/ GC-MS	[7]
1-metoxi-2- metilpropano																									+	HS-SPME/ GC-MS	[4]
1-metoxi-3- metilbutano																									+	HS-SPME/ GC-MS	[4]
Aromáticos																											
metoxibenzeno			+																						+	AE/ GC-MS	[6]
1,2-dimetoxibenzeno																									+	AE/ GC-MS	[6]
1,3-dimetoxibenzeno																									+	HS-SPME/ GC-MS	[4]
																									+	SPME/ GC-MS	[7]
3-metilanisol																									+	HS-SPME/ GC-MS	[4,8]
																									+	AE/ GC-MS	[6]
																									+	SPME/ GC-MS	[7]
1,4-dimetoxi-2- metilbenzeno																									+	SPME/ GC-MS	[7]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Micorganismo ^a																								Método de análise	Referência bibliográfica													
	A														B						C	D						E											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
2,5-dimetoxitolueno									+																			+										HS-SPME/ GC-MS	[4]
4-etilanol																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
1,2,3-trimetoxi-benzeno								+						+																								SPME/ GC-MS	[11]
Furanos																																							
2-metilfurano																																					HS-SPME/ GC-MS	[4]	
3-metilfurano									+		+																										HS-SPME/ GC-MS SPME/ GC-MS	[4] [7]	
2,5-dimetilfurano																													+	+				+			AE/ GC-MS HS-SPME/ GC-MS	[6] [4]	
2-etilfurano																														+							AE/ GC-MS	[6]	
2-acetil-5-metilfurano																																			+		AE/ GC-MS	[6]	
2-etil-5-metilfurano																																			+		AE/ GC-MS	[6]	
isopropilfurano																																			+		AE/ GC-MS	[6]	
2,3,5-trimetilfurano			+																																+	+	AE/ GC-MS	[6]	

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Micorganismo ^a																								Método de análise	Referência bibliográfica																
	A														B						C	D						E														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						
Hidrocarbonetos																																										
Alcanos																																										
heptano	+				+	+	+	+	+		+	+	+	+																									HS-SPME/ GC-MS	[4]		
2,2,3,3-tetrametil butano	+	+		+	+		+	+			+	+	+	+																									SPME/ GC-MS	[11]		
nonano														+																									HS-SPME/ GC-MS	[4]		
1,2,3-trimetilciclo- hexano			+																																				AE/ GC-MS	[6]		
decano													+																										HS-SPME/ GC-MS	[4]		
undecano						+							+																										HS-SPME/ GC-MS	[4]		
dodecano																																								AE/ GC-MS	[6]	
hexadecano																																									SPME/ GC-MS	[7]
Alcenos																																										
isopreno						+					+																												HS-SPME/ GC-MS	[4]		
2,4-hexadieno						+																																		HS-SPME/ GC-MS	[4]	
2-metil-1,3- pentadieno						+																																		HS-SPME/ GC-MS	[4]	
1,3,5-heptatrieno											+																													HS-SPME/ GC-MS	[4]	
1-hepteno																																									SPME/ GC-MS	[7]
ciclooctatrieno											+																														HS-SPME/ GC-MS	[4]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Microrganismo ^a												Método de análise	Referência bibliográfica												
	A						B								C	D						E				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1,3,5-ciclooctatrieno																									AE/ GC-MS	[6]
ciclocteno																									AE/ GC-MS	[6]
3-metil-1-hepteno			+																						AE/ GC-MS	[6]
																									HS-SPME/ GC-MS	[4]
1,3-octadieno						+					+														HS-SPME/ GC-MS	[4,8]
																									AE/ GC-MS	[6]
																									SPME/ GC-MS	[7]
1,3,6-octatrieno			+																						AE/ GC-MS	[6]
2,4,6-octatrieno																									HS-SPME/ GC-MS	[4]
1-octeno									+																SPME/ GC-MS	[7,11]
1,3- <i>trans</i> -5- <i>cis</i> -octatrieno																									HS-SPME/ GC-MS	[8]
1,3-nonadieno																									SPME/ GC-MS	[7]
1-noneno																									SPME/ GC-MS	[7]
3,5,5-trimetil-2-hexeno				+					+																SPME/ GC-MS	[11]
tetradeceno																									SPME/ GC-MS	[7]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Microrganismo ^a												Método de análise	Referência bibliográfica																									
	A						B								C	D						E																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
pentadeceno									+																													SPME/ GC-MS	[7]
Aromáticos																																							
tolueno										+																												HS-SPME/ GC-MS	[4]
estireno																																						AE/ GC-MS	[6]
																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
etilbenzeno																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
xileno																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
																																						SPME/ GC-MS	[11]
1-etil-2-metilbenzeno																																						AE/ GC-MS	[6]
trimetilnaftaleno																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
Pirazinas																																							
pirazina																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
metilpirazina																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
2-isopropil-3-metoxipirazina																																						HS-SPME/ GC-MS	[4]
Terpenos																																							
Monoterpenos																																							
α-pineno																																						HS-SPME/ GC-MS	[8]
																																						AE/ GC-MS	[6]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Microrganismo ^a												Método de análise	Referência bibliográfica															
	A						B								C	D						E							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
α-terpineno																												AE/ GC-MS	[6]
α-terpineol																												SPME/ GC-MS	[7]
β-felandreno							+																					AE/ GC-MS	[6]
β-mirceno															+													HS-SPME/ GC-MS	[4,8]
																												AE/ GC-MS	[6]
β-pineno																												HS-SPME/ GC-MS	[8]
borneol																												HS-SPME/ GC-MS	[8]
bornileno																										+		HS-SPME/ GC-MS	[8]
canfeno							+																					HS-SPME/ GC-MS	[8]
																												AE/ GC-MS	[6]
cânfora																												HS-SPME/ GC-MS	[8]
eucaliptol																										+	+	HS-SPME/ GC-MS	[4,8]
γ-terpineno																												HS-SPME/ GC-MS	[8]
limoneno																												HS-SPME/ GC-MS	[4,8]
																												AE/ GC-MS	[6]
																												SPME/ GC-MS	[11]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Micorganismo ^a																								Método de análise	Referência bibliográfica												
	A														B						C	D						E										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
linalol																																					HS-SPME/ GC-MS	[8]
																																					SPME/ GC-MS	[11]
mirtenol																																					HS-SPME/ GC-MS	[4]
sabineno																																					HS-SPME/ GC-MS	[8]
terpinoleno																																					HS-SPME/ GC-MS	[8]
terpineno-4-ol																																					HS-SPME/ GC-MS	[4]
2-metileno-bornano																																					AE/ GC-MS	[6]
2-metil-2-borneno																																					AE/ GC-MS	[6]
2-metil-isoborneol																																					HS-SPME/ GC-MS	[8]
Sesquiterpenos																																						
acoradieno																																					HS-SPME/ GC-MS	[8]
α-bisaboleno																																					HS-SPME/ GC-MS	[4]
α-chamigreno																																					HS-SPME/ GC-MS	[8]
α-copaeno																																					HS-SPME/ GC-MS	[8]
α-cubebeno																																					HS-SPME/ GC-MS	[4,8]
α-farneseno																																					AE/ GC-MS	[6]
																																					HS-SPME/ GC-MS	[4]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Micorganismo ^a														Método de análise	Referência bibliográfica																								
	A							B									C	D					E																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
α -muroлено														+																								AE/ GC-MS	[6]	
aromadendreno																																						AE/ GC-MS	[6]	
β -bisaboleno																																						HS-SPME/ GC-MS	[8]	
β -cariofileno																																						HS-SPME/ GC-MS	[8]	
																																						AE/ GC-MS	[6]	
β -cubebeno																																						HS-SPME/ GC-MS	[8]	
																																							SPME/ GC-MS	[11]
β -elemeno																																						AE/ GC-MS	[6]	
																																							SPME/ GC-MS	[11]
β -farneseno																																							HS-SPME/ GC-MS	[4]
β -himachaleno																																							HS-SPME/ GC-MS	[4,8]
β -malieno																																							HS-SPME/ GC-MS	[8]
bicicloelemeno																																							AE/ GC-MS	[6]
chamigreno																																							HS-SPME/ GC-MS	[4]
<i>cis</i> - α -bergamoteno																																							HS-SPME/ GC-MS	[8]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Micorganismo ^a														Método de análise	Referência bibliográfica																								
	A							B									C	D							E															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
<i>E,E</i> -farnesol															+	+																						HPLC/ GC-MS	[12]	
																																						HS-SPME/ GC-MS	[9,10]	
elemeno																																					HS-SPME/ GC-MS	[4]		
elemol																																						AE/ GC-MS	[6]	
<i>E</i> -nerolidol															+	+																						SDE/GC-MS	[1]	
																																						HS-SPME/ GC-MS	[9,10]	
γ -cadineno																																						SPME/ GC-MS	[11]	
germacreno																																						AE/ GC-MS	[6]	
italiceno																																						HS-SPME/ GC-MS	[8]	
																																						AE/ GC-MS	[6]	
longifoleno																																						HS-SPME/ GC-MS	[8]	
longipineno															+																							HS-SPME/ GC-MS	[4]	
χ -cadineno																																						AE/ GC-MS	[6]	
χ -curcumeno																																						AE/ GC-MS	[6]	
<i>trans</i> - α -bergamoteno																																						HS-SPME/ GC-MS	[8]	
<i>trans</i> - β -farneseno																																							AE/ GC-MS	[6]

6. Anexos

Tabela A1- Continuação

Metabolito	Microrganismo ^a															Método de análise	Referência bibliográfica																							
	A														B			C	D												E									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
tujopreno																																						+	HS-SPME/ GC-MS	[8]
widdrol																																						+	HS-SPME/ GC-MS	[8]

^a**A1-Aspergillus alliaceus; A2-Aspergillus amstelodami; A3-Aspergillus candidus; A4-Aspergillus fisherii; A5-Aspergillus flavus; A6-Aspergillus fumigatus; A7-Aspergillus glaucus; A8-Aspergillus melleus; A9-Aspergillus niger; A10-Aspergillus ochraceus; A11-Aspergillus ostianus; A12-Aspergillus repens; A13-Aspergillus terreus; A14-Aspergillus versicolor; B1-Candida albicans; B2-Candida dubliniensis; B3-Candida famata; B4-Candida glabrata; B5-Candida inconspicua; B6-Candida kefyr; B7-Candida krusei; B8-Candida parapsilosis; B9-Candida pelliculosa; B10-Candida tropicalis; C-Mucor sp.; D1-Penicillium brevicompactum; D2-Penicillium chrysogenum; D3-Penicillium claviforme; D4-Penicillium clavigerum; D5-Penicillium crustosum; D6-Penicillium cyclopium; D7-Penicillium decumbens; D8-Penicillium discolor; D9-Penicillium expansum; D10-Penicillium glabrum; D11-Penicillium hirsutum var. venetum; D12-Penicillium vulpinum; E-Saccharomyces cerevisiae**

AE- Extração com adsorvente (Tenax); **DHS-** Espaço de cabeça dinâmico; **GC-MS-** Cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massa; **HPLC-** Cromatografia líquida de alta eficiência; **HS-** Espaço de cabeça; **SDE-** Destilação-extração simultânea; **SIFT-MS-** Tubo de fluxo de íões selecionados acoplado a espectrometria de massa; **SPME-** Microextração em fase sólida

Bibliografia

- [1] Annan, N.T., Poll, L., Sefa-Dedeh, S., Plahar, W. A., Jakobsen, M., Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture fermentations of Ghanaian maize dough., *Journal of Applied Microbiology*. 94 (2003) 462–474.
- [2] Osorio-Cadavid, E., Chaves-López, C., Tofalo, R., Paparella, A., Suzzi, G., Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage., *Food Microbiology*. 25 (2008) 771–777.
- [3] Cailleux, A., Bouchara, J., Daniel, V., Chabasse, D., Allain, P., Gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile organic compounds produced by some micromycetes., *Chromatographia*. 34 (1992) 613–617.
- [4] Fiedler, K., Schütz, E., Geh, S., Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials., *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 204 (2001) 111–121.
- [5] Scotter, J.M., Langford, V.S., Wilson, P.F., McEwan, M.J., Chambers, S.T., Real-time detection of common microbial volatile organic compounds from medically important fungi by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS)., *Journal of Microbiological Methods*. 63 (2005) 127–134.
- [6] Fischer, G., Schwalbe, R., Möller, M., Ostrowski, R., Dott, W., Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility., *Chemosphere*. 39 (1999) 795–810.
- [7] Matysik, S., Herbarth, O., Mueller, A., Determination of volatile metabolites originating from mould growth on wall paper and synthetic media., *Journal of Microbiological Methods*. 75 (2008) 182–187.
- [8] Nilsson, T., Larsen, T.O., Montanarella, L., Madsen, J.Ø., Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species., *Journal of Microbiological Methods*. 25 (1996) 245–255.
- [9] Martins, M., Henriques, M., Azeredo, J., Rocha, S.M., Coimbra, M. A., Oliveira, R., Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells., *Eukaryotic Cell*. 6 (2007) 2429–2436.
- [10] Martins, M., Henriques, M., Azeredo, J., Rocha, S.M., Coimbra, M. A., Oliveira, R., *Candida* species extracellular alcohols: production and effect in sessile cells., *Journal of Basic Microbiology*. 50 Suppl 1 (2010) S89–S97.
- [11] Jeleń, H.H., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Volatile compounds of *Aspergillus* strains with different abilities to produce ochratoxin A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (2005) 1678–1683.
- [12] Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., Nickerson, K.W., Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol., *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (2001) 2982–2992.