ISSN 2317-5079

Centro Universitário Uninovafapi
Revista Interdisciplinar
MESTRADO PROFISSIONAL EM SAÚDE DA FAMÍLIA
Qualis B4

PESQUISA

Análise do crescimento de *Candida albicans* e *Candida krusei* com diferentes modelos matemáticos

Analysis of growth C*andida albicans* and C*andida krusei* with different models mathematical

Análisis del crecimiento de *Candida albicans* y *Candida krusei* con diferentes modelos matemáticos

Moisés Lopes Carvalho[1], Laís Mayara Machado de Amorim[2], Ana Paula Pinto[3], Francielzo Ferreira Lima[4], Moacira Lopes Carvalho[5], Rodrigo Sávio Pessoa[6]

RESUMO

Este estudo tem como objetivo avaliar o comportamento do crescimento de *Candida* spp. através do modelamento matemático utilizando o modelo de Verhulst e de regressão linear. Nesta pesquisa foram utilizadas culturas de *Candida albicans* e *Candida krusei*. Após os diferentes tempos de incubação (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120h) o crescimento foi determinado por densidade óptica ajustada a 570nm (OD570). Por conseguinte, prosseguiu-se com a modelagem e simulação computacional no software *Modellus*, empregando a equação do modelo matemático de Verhulst e regressão linear. No presente estudo foram utilizados tais modelos por serem os que mais se ajustaram ao crescimento, ou seja, a função que torna mínima a diferença entre a função escolhida e os dados experimentais. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que os modelos matemáticos utilizados neste estudo de dinâmica populacional podem ser utilizados para analisar o crescimento de *Candida spp.*, assim como, para projetar dados futuros e auxiliar em investigações de tratamento ou formas de controle destes microrganismos que possuem uma estreita relação com a problemática de infecção no ambiente hospitalar. **Descritores:** *Candida albicans. Candida krusei*. Infecções. Modelo de Verhulst. Regressão linear.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the behavior of *Candida* spp growth. by mathematical modeling using the model of Verhulst and linear regression. In this research were used cultures of *Candida albicans* and *Candida krusei*. After different incubation times (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 and 120h) growth was measured by optical density adjusted to 570 nm (OD570). Therefore, it is preceded with computer modeling and simulation in software Modellus, using the equation of the mathematical model and Verhulst linear regression. This study used such models because they are the ones which fit the growth, or the function that makes minimum the difference between the selected function and the experimental data. The results presented in this paper show that the mathematical models used in this population dynamics study can be used to analyze the growth of *Candida* spp., And thus can be used to project future data, helping in the treatment of investigations or forms of control of this microorganism that has large role in morbidity and mortality in hospital infections. **Descriptors:** *Candida albicans. Candida krusei*. Infections. Verhulst model. Linear regression.

RESUMEN

Este estudio tiene como objetivo evaluar el comportamiento del crecimiento de Candida spp. por modelos matemáticos usando el modelo de Verhulst y regresión lineal. En esta investigación se utilizaron cultivos de *Candida albicans* y *Candida krusei*. Después de diferentes tiempos de incubación (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120H) de crecimiento se midió mediante densidad óptica se ajustó a 570 nm (DO570). Por lo tanto, se procede con el modelado y simulación por computadora en software Modellus, usando la ecuación del modelo matemático y de regresión lineal Verhulst. En este estudio se utilizó este tipo de modelos, ya que son los que se adaptan al crecimiento, o la función que hace mínima la diferencia entre la función seleccionada y los datos experimentales. Los resultados presentados en este trabajo muestran que los modelos matemáticos utilizados en este estudio de la dinámica de población se pueden utilizar para analizar el crecimiento de *Candida* spp., Y por lo tanto puede ser utilizado para proyectar los datos futuros, ayudando en el tratamiento de las investigaciones o las formas de control de este microorganismo que tiene gran papel en la morbilidad y mortalidad en las infecciones hospitalarias. **Descriptores:** *Candida albicans. Candida krusei*. Infecciones. Modelo de Verhulst. Regresión lineal.

[1]Enfermeiro. Doutorando em Engenharia Biomédica pela Universidade do Vale do Paraíba –UNIVAP. [2]Enfermeira. Mestranda em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP. [3]Graduanda em Fisioterapia, Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP. [4]Tecnólogo em Radiologia. Graduado em Tecnologia em Radiologia pelo Centro Universitário UNINOVAFAPI. [5]Enfermeira. Mestre em Saúde da Família pelo Centro Universitário UNINOVAFAPI. [6]Físico. Doutor em Ciências na área de Física de Plasmas pelo Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem ocorrido um aumento dramático de doenças infecciosas, segundo a perspectiva da Saúde Pública. Tais ocorrências são devidas à infecções emergente/reemergentes e o aumento da resistência dos microrganismos a terapêutica farmacológica atual. As pesquisas que auxiliam no controle de doenças infecciosas vêm empregando efetivamente modelos matemáticos, que além de prover informações relativas à epidemiologia e patogenicidade das doenças, também estimam parâmetros importantes para sua contenção.

O emprego de modelos matemáticos aplicado aos fenômenos biológicos contribui efetivamente para o estudo e desenvolvimento de novas teorias a respeito de um fenômeno de interesse avaliado, além disso, podem-se analisar outros parâmetros e assim buscar equacionar tais comportamentos, com intuito de estabelecer previsões e explicações seguras referentes ao fenômeno analisado (ROBAZZA; TELEKEN; GOMES, 2010).

Os modelos matemáticos aplicados à microbiologia são analisados comumente sob dois aspectos principais: probabilísticos e cinéticos. O primeiro objetiva predizer a probabilidade de ocorrência de alguns eventos, em um determinado período de tempo. Em contrapartida, os modelos cinéticos objetivam representar o aumento ou a diminuição de uma população microbiana (McMEEKIN et al., 2002; McMEEKIN; ROSS, 2002; NAKASHIMA et al., 2000).

Como exemplo, podem-se destacar os modelos de dinâmica populacional, que estuda as variações, em tempo e espaço, das densidades de um determinado grupo ou população através da utilização de equações diferenciais ordinárias (ROCHA; BOTTA, 2009).

Neste sentido, tais modelos podem ser empregados para analisar o crescimento e desenvolvimentos de microrganismos, com destaque para aqueles patogênicos como fungos do gênero Candida que estão ligados aos elevados índices de morbidade e mortalidade.

As espécies do gênero *Candida* estão entre os principais agentes patogênicos envolvidos em infecção de pacientes hospitalizados, possuindo uma taxa de mortalidade elevada entre 20 e 60 %, sendo a quarta causa mais comum de infecção de corrente sanguínea nos EUA (GUDLAUGSSON et al., 2003; MORGAN et al., 2005; PFALLER; DIEKEMA, 2010).

A literatura destaca que os fungos dentre outros microrganismos possuem capacidade de se adaptar rapidamente as diversas mudanças do meio, devido à plasticidade da velocidade de reprodução e obtenção de novos genes, o que permite constante propagação e harmonia com vários habitats (ALVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; LEDERBERG, 1997; CHAFFIN et al., 1998).

Nesta perspectiva, o acúmulo de dados quantitativos através do emprego de modelos matemáticas sobre o comportamento microbiano e em consequência um maior entendimento da fisiologia microbiana, são fatores primordiais, pois podem ser usadas como ferramentas para prevenção, melhoria e aprimoramento de resposta a novas ameaças de seres microscópicos (BUCHANAN, 1997; McMEEKIN et al., 2002).

Neste sentido, este estudo tem como objetivo avaliar o comportamento do crescimento de *Candida* spp. através do modelamento matemático utilizando o modelo de Verhulst e de regressão linear.

METODOLOGIA

Condições de crescimento dos fungos

Culturas de *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida krusei* (ATCC 6258) foram plaqueadas em ágar Sabouraud dextrose (Merck) e incubadas em ar atmosférico, a 37 ° C. Após 48h de incubação, foi removida uma amostra de colónia e suspendida em solução fisiológica estéril (0,9% NaCl), em seguida ajustou-se a quantidade de celular para uma densidade celular de 10^4 células viáveis/mL através da câmara de Neubauer na presença do corante vital azul de metileno.

Em placas de 24 poços foram distribuídas 1,98mL de caldo Sabouraud Dextrose de (Merck) e 0,02mL da suspensão de cada espécie de Candida (104 cel/mL), resultando em volume final de 2mL. Em seguida as placas foram incubadas na estufa microbiológica à 37ºC. Os experimentos foram realizados sob condições assépticas.

Determinação do crescimento

Após os diferentes tempos de incubação (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120h) os conteúdos de cada placa foram retirados da estufa microbiológica e, por conseguinte eram corretamente homogeneizado dentro do fluxo laminar (mantendo as condições assépticas) e alíquotas de 0,1 mL foram retiradas e colocadas em uma placa de 96 poços para determinar o crescimento do microrganismo. O crescimento foi determinado por densidade óptica ajustada a 570nm (OD570) utilizando uma leitora de microplacas (Bio-Tek, Winooski, VT, EUA).

Após a coleta para a análise de cada tempo a placa era novamente levada a estuda microbiológica para incubação. Foram realizados três ensaios independes em triplicata utilizando os mesmos parâmetros citados.

Simulação e modelo matemático

Inicialmente aplicou-se o cálculo da pseudo-inversa que determinou os parâmetros a e b necessários ao ajuste para a regressão linear e também para a mudança de variável para a função do modelo de Verhulst.

Para a modelagem e simulação computacional foi utilizado o software Modellus que é distribuído gratuitamente na internet (http://modellus.fct.unl.pt/), empregando a equação do modelo matemático de Verhulst e regressão linear.

Os valores utilizados durante a simulação foram elaborados a partir das médias das triplicatas dos três experimentos. Para a elaboração dos gráficos e ajustes de curvas utilizou-se também o software Origin 8 (Microcal Origin®, 8, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS DADOS

Neste estudo utilizou-se o modelo de Verhulst e a Regressão linear por serem os que mais se ajustaram ao crescimento das *Candidas*, ou seja, a função que torna mínima a diferença entre a função escolhida e os dados experimentais.

Verifica-se no gráfico 1, uma diferença no comportamento do crescimento entre as duas espécies utilizadas neste estudo (*Candida albicans* e *Candida krusei*). Entretanto, na análise do gráfico percebe-se uma semelhança nas curvas de crescimento entre as duas espécies.

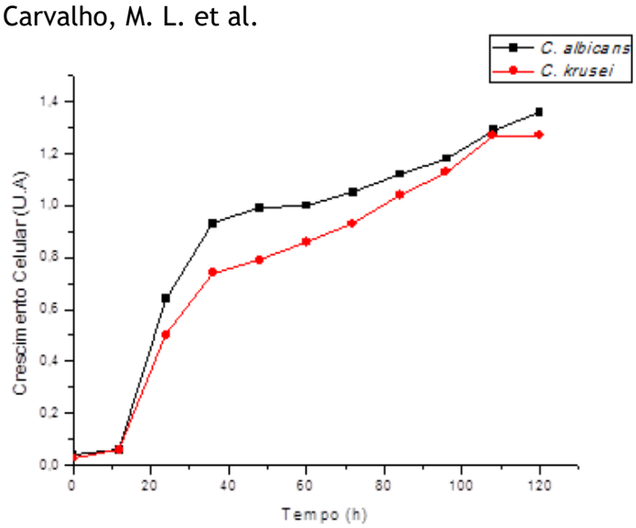

Gráfico 1: Crescimento de *Candida albicans* e *Candida krusei*

Aplicou-se o modelo de Verhulst entre o tempo de 0 a 60 horas para a *Candida albicans* e 0 a 48 horas para a *Candida krusei*. Além disso, aplicou-se também o modelo de Regressão linear nos tempos de 60 a 120, 48 a 120 horas para a *Candida albicans* e *Candida krusei* respectivamente.

O gráfico 2 representa o modelo matemático de Verhulst, também conhecido como modelo logístico. Ambas as espécies de fungo estão crescendo rapidamente no início (até metade de sua capacidade) e depois o crescimento desacelera até um determinado limite, resultando na estabilização/saturação da população.

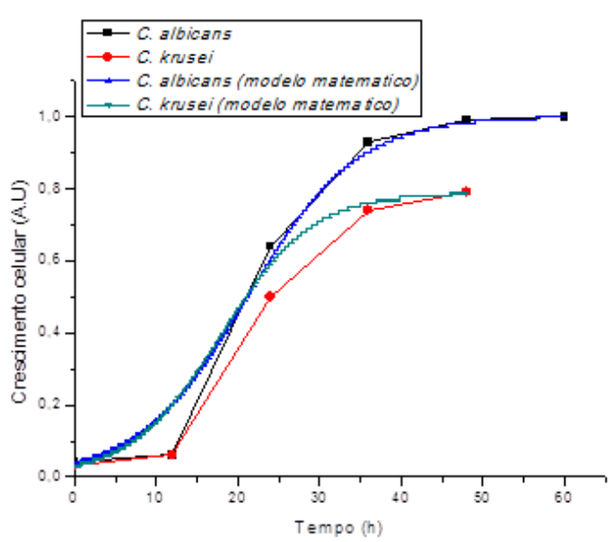

Gráfico 2: Representando o modelo matemático de Verhulst. Fonte: pesquisa direta, 2016.

Para o modelo apresentado acima, o valor de k utilizado foi de 1,36 (*Candida albicans*) e 1,27 (*Candida krusei*) respectivamente.

A literatura destaca que a saturação da população no modelo de Verhulst relaciona-se com a capacidade de suporte do meio que esta população habita (BORZANI et al., 2001). Abaixo está representada a equação diferencial para o modelo de Verhulst:

$$\frac{dN}{dt} = rN(1 - \frac{N}{k})$$

Na equação deste modelo supõe-se que o r é a taxa de crescimento da população e o fator 1 – N/K elimina a explosão demográfica, em consequência faz com que a taxa de crescimento resulte a zero quando a população N = K é alcançada. O termo K refere-se ao equilíbrio da população, isto é, o limite suportado pela população no meio onde habita (K também é chamado de equilíbrio de suporte).

Verificou-se também a partir dos tempos de 60 e 48 horas para a *Candida albicans* e *Candida krusei* respectivamente, um crescimento contínuo até o final do período de 120 horas, caracterizando uma fase linear (Gráfico 3).

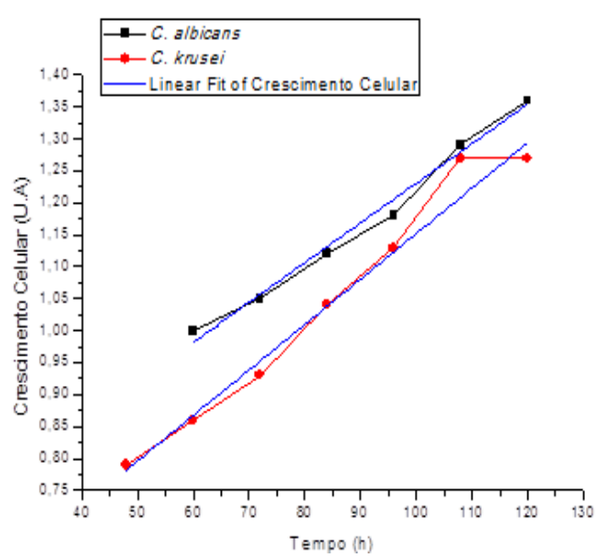

Gráfico 3: Representando o modelo matemático de Regressão linear. Fonte: pesquisa direta, 2016.

No modelo de Regressão linear também conhecido como ajuste de curvas é um recurso formal utilizado para expressar alguma tendência ou relação entre a variável dependente y e a variável independente x (RODNEY, 2004, p.54). Na prática este modelo é o mais utilizado, pois elucida questões da variação de uma variável resposta em função da variável explicativa (BUSSAB; MORETTIN, 2010). Abaixo está representada a equação diferencial para o modelo linear:

$$y(x) = f(x; a, b) = ax + b$$

Para minimizar o erro entre a curva de ajuste e os dados experimentais do comportamento de crescimento entre as duas espécies de Candida utilizou-se o modelo linear, com os seguintes parâmetros: y= 0,00614x + 0,61381 (*Candida albicans*) e y= 0,00697x + 0,45976 (*Candida krusei)*.

A Tabela 1 destaca-se os erros do funcional quadrático, sendo que um baixo valor de erro minimiza a discrepância entre a função ajustada e os dados experimentais. Neste sentido, as funções usadas nas condições experimentais deste estudo são as que melhor descrevem o comportamento de crescimento das espécies de *Candida*.

Tabela1: Erro padrão das *Candida albicans* e *Candida krusei*. São José dos Campos (SP), 2016.

	Candia albicans	***Candida krusei***
Erro padrão	$3{,}51005^{-4}$	$4{,}13862^{-4}$

Fonte: pesquisa direta, 2016.

Com base nos dados apresentados e a análise morfológica verificou-se mínima alteração no crescimento das *Candida albicans* e *Candida krusei* entre os tempos de zero (t=0) e 12 horas (t=12), como pode ser visualizado nas figuras 1 e 2 que demonstram a morfologia do crescimento das *Candida albicans* e *Candida krusei* respectivamente.

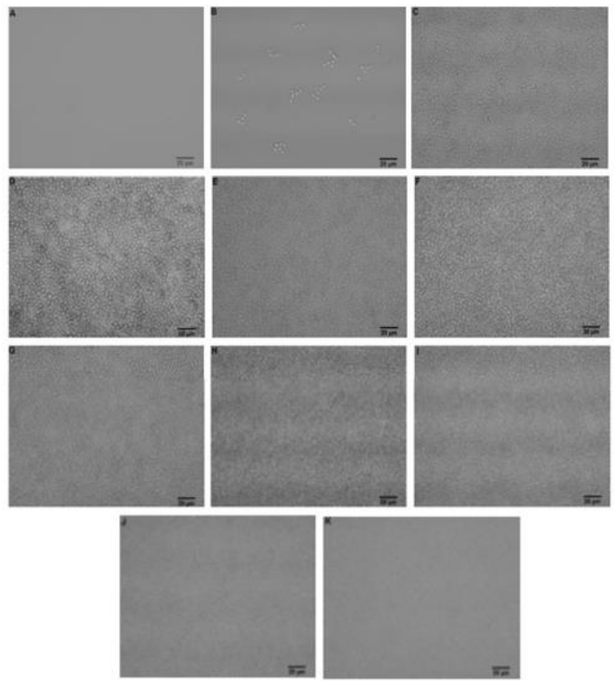

Figura 1: Análise morfológica do crescimento da *Candida albicans*. São José dos Campos (SP), 2016. Legenda: t = tempo. A – t=0h; B – t=12h; C – t=24h; D – t=36h; E – t=48h; F – t=60h; G – t=72h; H – t=84h; I – t=96h; J – t=108h e K – t=120h. Bar, 20µm. Fonte: pesquisa direta, 2016.

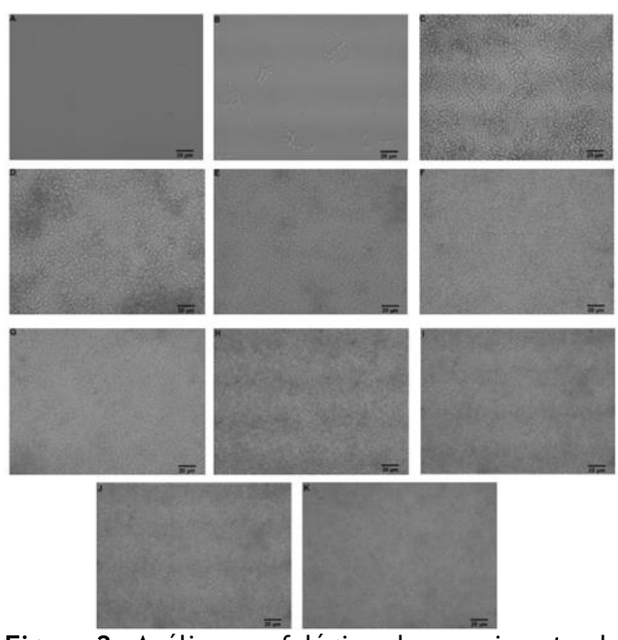

Figura 2: Análise morfológica do crescimento da *Candida krusei*. São José dos Campos (SP), 2016. Legenda: t = tempo. A – t=0h; B – t=12h; C – t=24h; D – t=36h; E – t=48h; F – t=60h; G – t=72h; H – t=84h; I – t=96h; J – t=108h e K – t=120h. Bar, 20µm. Fonte: pesquisa direta, 2016.

Outra alteração observada foi o aumentado acentuadamente na quantidade de células entre 12 (t=12) e 36 horas (t=36) nas duas espécies de

fungo analisadas (Figura 1 e 2 a partir da imagem D).

Pode-se observar também que após o tempo de 36 horas nas figuras D (t=36) a quantidade de células se manteve semelhantes entre as duas espécies, dificultando a análise deste parâmetro. Após o tempo de 84 horas (t=84), a baixa resolução da morfologia está relacionada à grande quantidade de células, como demonstra as figuras 1 e 2 acima.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que os modelos matemáticos utilizados neste estudo de dinâmica populacional podem ser utilizados para analisar o crescimento de *Candida spp.*, assim como, para projetar dados futuros e auxiliar em investigações de tratamento ou formas de controle destes microrganismos que possuem uma estreita relação com a problemática de infecção no ambiente hospitalar.

REFERÊNCIA

ALVARES, Cassiana Aparecida; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet and CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 5 p.319-327, 2007.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial**: Fundamentos, 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001.

BUCHANAN, R. L. Identifying and Controlling Emerging Foodborne Pathogens: Research Needs. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p.517-521, 1997.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P.A. **Estatística básica.** 6. ed. São Paulo: Saraiva, 2010. 540p.

CHAFFIN, W.L. et al. Cell wall and secreted proteins of Candida albicans: identification, function, and expression. **Microbiol Molec Biol Rev,** v. 62, n. 1, p. 130-80, 1998.

GUDLAUGSSON, O. et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia. **Clin Infect Dis**, v. 37, n. 9, p. 1172–1177, 2003.

LEDERBERG, J. Infectious Disease as an Evolutionary Paradigm. **Emerging Infectious deases**, v. 3, n. 4, p. 417-423, 1997.

McMEEKIN, T. A. et al. Predictive microbiology: Towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, n. 2-3, p. 395- 407, 2002.

McMEEKIN, T. A., ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework or change management. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1-2, p. 133-153, 2002.

MORGAN, J. et al. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case–control study using data from population-based candidemia surveillance. **Infect Control Hosp Epidemiol** v. 26, n. 6, p. 540–547, 2005.

NAKASHIMA, S.M.K.; ANDRÉ, D.S. ; FRANCO, B.D.G.M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p.41-51, 2000.

PFALLER, M. A; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Crit Rev Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 1–53, 2010.

ROBAZZA, W.S; TELEKEN, J.T; GOMES, G.A. Modelagem Matemática do Crescimento de Microrganismos em Alimentos. **Tend. Mat. Apl. Comput.,** v.11, n. 1, p.101-110, 2010.

ROCHA, N. C.; BOTTA, V. Dinâmica populacional aplicada à população de Adamantina. **Omnia Exatas,** v.2, n.2, p.56-65, 2009.

RODNEY, C. B. **Ensino-aprendizagem com modelagem matemática**: uma nova estratégia. 2.ed. São Paulo: Contexto, 2004.

Submissão: 14/12/2015

Aprovação: 22/01/2016