

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Identificação bacteriana por derivação de ácidos graxos
extraídos de células íntegras

Fábio Luiz Camacho Pacheco

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Terezinha de Jesus A. Pinto

SÃO PAULO
2009

FÁBIO LUIZ C.
PACHECO

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA POR DERIVAÇÃO DE
ÁCIDOS GRAXOS EXTRAÍDOS DE CÉLULAS ÍNTEGRAS

MESTRADO
FCF/USP
2009

2,5 cm

2 cm

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Identificação bacteriana por derivação de ácidos graxos
extraídos de células íntegras

Fábio Luiz Camacho Pacheco

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Terezinha de Jesus A. Pinto

SÃO PAULO
2009

Fábio Luiz Camacho Pacheco

Identificação bacteriana por derivação de ácidos graxos extraídos de
células íntegras

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Terezinha de Jesus A. Pinto
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, cujo amor e sabedoria atuam como a luz e o sorriso amigo em trilhas escuras e desconhecidas, indicando o melhor caminho a ser seguido.

Sou eternamente grato a toda a minha família pelas palavras de apoio nas horas necessárias, pela paciência, pelo incentivo, pelo sacrifício incondicional. Jamais conseguirei retribuí-los.

Agradeço à Professora Terezinha pelas críticas e sugestões de valor inestimável, que contribuíram significativamente para o resultado obtido.

Agradeço também à Alcon Laboratórios do Brasil por conceder os materiais necessários às análises, pelo incentivo e pela compreensão.

Epígrafe

“Há pessoas que choram por saber que as rosas têm espinhos. Há outras que sorriem por saber que os espinhos têm rosas!” Machado de Assis

RESUMO

PACHECO, F. L. C. **Identificação bacteriana por derivação de ácidos graxos extraídos de células íntegras**. 2009. 167 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

As salas limpas são amplamente empregadas em indústrias farmacêuticas destinadas a fabricar medicamentos e dispositivos estéreis. Nós empregamos coloração de Gram e cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos extraídos de células íntegras de microrganismos ambientais para caracterizar e identificar bactérias isoladas em 50 salas limpas diferentes projetadas para a fabricação de medicamentos estéreis e para fornecer um perfil de ácidos graxos das espécies mais comuns de bactérias isoladas. Uma análise estatística nos permitiu corroborar estudos anteriores e confirmar que cocos Gram positivos é o grupo mais relevante de microrganismos presentes nas salas limpas avaliadas. A espécie predominante é *Micrococcus luteus*, isolada de salas classe B e de pessoal, seguida de *Staphylococcus cohnii* em classe C, *Bacillus subtilis* em classe A e *Staphylococcus hominis* em classe D. Os perfis de ácidos graxos destas bactérias são, na maioria, consistentes com as bibliotecas padrão. Nós também tentamos estabelecer uma correlação entre a estação do ano e o nível de contaminação, embora a análise de variância tenha mostrado que não há diferença significativa entre o nível de contaminação no decorrer das estações. Além do mais, análises repetidas com um aumento gradual de massa celular nos permitiram concluir que a quantidade ótima de material celular necessário para extração de ácidos graxos varia com a espécie de bactéria. Finalmente, um estudo comparativo de algumas bactérias incubadas em diferentes temperaturas confirmou que o perfil de ácidos graxos é altamente influenciado pela temperatura. Portanto, nós acreditamos que este trabalho possa contribuir para identificar e compreender a comunidade bacteriana de algumas salas limpas farmacêuticas.

Palavras-chave: Sala limpa. Ácidos graxos. Cromatografia. FAME.

ABSTRACT

PACHECO, F. L. C. **Bacterial identification by fatty acid derivation extracted from whole cells.** 2009. 167 p. Dissertation (Master Degree) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

Clean rooms are largely employed in pharmaceutical companies whose purpose is to produce sterile drugs and devices. We employed Gram staining and gas chromatography of fatty acid methyl esters extracted from whole cells of environmental isolates to characterize and identify bacteria isolated in each of 50 different clean rooms designed for the manufacturing of sterile medicinal products and to provide a fatty acid profile of the most common species of isolated bacteria. Statistical analysis allowed us to corroborate previous studies and confirm that Gram-positive cocci are the most relevant group of microorganisms inside the studied clean rooms. The predominant species is *Micrococcus luteus*, isolated from Grade B zones and from personnel, followed by *Staphylococcus cohnii* in Grade C, *Bacillus subtilis* in Grade A and *S. hominis* in Grade D. Fatty acid profiles of these bacteria are, to a great extent, consistent with standard libraries. We also attempted to establish a correlation between season and level of contamination, although variance analysis showed that there is no significant difference on the level of contamination throughout seasons. Furthermore, repeated analysis with a gradual increase in cell mass allowed us to conclude that the optimal amount of cell material depends on the species of the bacteria studied. Finally, a comparative study with some bacteria incubated in different temperatures confirmed that fatty acid profile is highly influenced by temperature. Therefore, we believe that this work can contribute to identify and understand the bacterial community of some pharmaceutical clean rooms.

Keywords: Cleanroom. Fatty acids. Chromatography. FAME.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	IMPORTÂNCIA DA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA EM SALAS LIMPAS PROJETADAS PARA EMPRESAS FARMACÊUTICAS	17
2.2	CLASSIFICAÇÕES DE SALAS LIMPAS	19
2.2.1	Padrão ISO 14644-1	19
2.2.2	Classificação para salas limpas farmacêuticas – EC GMP	21
2.3	JUSTIFICATIVA DA IMPORTÂNCIA DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA	22
2.4	SISTEMAS AUTOMATIZADOS PARA IDENTIFICAÇÃO	23
2.5	FUNDAMENTOS BÁSICOS DA TÉCNICA FAME	32
2.5.1	Diferenças morfológicas das bactérias	32
2.5.2	Parede celular	33
2.5.3	Forma das bactérias	35
2.5.4	Ácidos graxos	36
2.5.4.1	Bicamada lipídica	36
2.5.4.2	Nomenclatura sistemática para ácidos graxos	38
2.5.4.3	Nomenclaturas comuns de ácidos graxos	39
2.5.4.4	Nomenclaturas abreviadas (ω) dos ácidos graxos	40
2.5.5	Classificação de ácidos graxos e respectivas nomenclaturas adotadas pela técnica FAME	41
2.5.5.1	Cadeia saturada	41
2.5.5.2	Cadeia insaturada	42
2.5.5.2.1	Conformação <i>cis</i>	42
2.5.5.2.2	Conformação <i>trans</i>	42
2.5.5.3	Iso	42
2.5.5.4	Anteiso	43
2.5.5.5	Ciclopropano	43
2.5.5.6	Hidroxi	43
2.5.5.6.1	2-hidroxi	43
2.5.5.6.2	3-hidroxi	44
2.5.5.6.3	Outros hidroxis	44

2.5.5.7	Grupos funcionais mistos	44
2.5.5.8	Éster metílico de ácido graxo	45
2.5.5.9	Dimetil acetal	45
2.5.5.10	Hidrocarboneto normal	45
2.5.5.11	Aldeído	46
2.5.5.12	Álcoois	46
2.5.6	Ocorrência de ácidos graxos e compostos relacionados	46
2.6	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	51
2.6.1	Microrganismos como fontes de ácidos graxos	51
2.7	BIOSSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS EM BACTÉRIAS	52
2.7.1	Via básica tipo II para biossíntese de ácidos graxos	52
2.7.2	Início da biossíntese dos lipídeos de membrana	55
2.7.3	Controle bioquímico da síntese de ácidos graxos	56
2.7.4	Regulação genética da biossíntese de ácidos graxos	57
2.7.5	Base estrutural do mecanismo de ação do FapR	58
2.8	MECANISMOS DE ALTERAÇÃO DA BICAMADA LIPÍDICA EM VIRTUDE DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS	59
2.8.1	Alteração da proporção de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática	60
2.8.2	Alteração do comprimento da cadeia de ácidos graxos da membrana plasmática	61
2.8.3	Aumento na proporção de ácidos graxos de cadeia ramificada	62
2.8.4	Formação de ácidos graxos do tipo ciclopropano	63
2.8.5	Isomerização de ácidos graxos de conformação <i>cis</i> para <i>trans</i> .	64
2.8.6	Alteração da atividade das bombas de efluxo de membrana	66
2.9	VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO SISTEMA FAME EM RELAÇÃO A OUTROS SISTEMAS AUTOMATIZADOS	67
2.9.1	Vantagens	67
2.9.2	Limitações	69
2.10	CUIDADOS QUE DEVEM SER TOMADOS PARA GARANTIR A QUALIDADE DO RESULTADO DE IDENTIFICAÇÃO PELO SISTEMA FAME	72
2.10.1	Septo	72
2.10.2	Alinhador da porta de injeção ou "Injection port liner"	72

2.10.3	Coluna	73
2.10.4	Vidrarias	74
2.10.5	Reagentes ou meios de cultura	74
2.10.6	Gases	75
2.10.7	Condições de cultivo e incubação da amostra	75
2.10.8	Etapa de metilação	77
2.11	ESTUDOS DE EQUIVALÊNCIA DA TÉCNICA FAME COM MÉTODOS CONVENCIONAIS	77
2.12	TÓPICOS AVANÇADOS SOBRE A TÉCNICA FAME	79
2.12.1	Padrão de calibração	79
2.12.2	Índice de similaridade (IS)	79
2.12.3	Comprimento de cadeia equivalente (ECL)	81
2.12.4	Calibração da coluna	82
3	MATERIAL E MÉTODO	85
3.1	MATERIAL	85
3.1.1	Preparação do meio de cultura e reagentes	88
3.1.1.1	Preparação do Trypticase Soy Broth Agar (TSBA)	88
3.1.1.2	Reagente 1 – reagente de saponificação	89
3.1.1.3	Reagente 2 – reagente de metilação	89
3.1.1.4	Reagente 3 – solvente de extração	90
3.1.1.5	Reagente 4 – lavagem alcalina	90
3.1.1.6	Reagente 5 – quebra de emulsões	90
3.1.1.7	Armazenamento e validade dos reagentes e meios de cultura	90
3.2	MÉTODO	91
3.2.1	Coleta das amostras	91
3.2.2	Amostragem de ar	91
3.2.2.1	Método passivo de amostragem de ar	91
3.2.2.2	Método ativo de amostragem de ar	92
3.2.3	Amostragem de superfícies, luvas e roupas	92
3.2.4	Incubação das amostras	93
3.2.5	Determinação dos tipos de microrganismos isolados com maior frequência nas áreas limpas estudadas	93

3.2.6	Verificação do efeito da mudança das estações do ano sobre a comunidade microbiana das salas limpas	95
3.2.7	Procedimento de extração e derivação de ácidos graxos de células íntegras para identificação bacteriana por cromatografia gasosa	95
3.2.7.1	Primeira etapa – repique em TSBA	97
3.2.7.2	Segunda etapa – saponificação	98
3.2.7.3	Terceira etapa – metilação	99
3.2.7.4	Quarta etapa – extração	99
3.2.7.5	Quinta etapa – lavagem	100
3.2.7.6	Transferência do extrato para o vial	100
3.2.8	Criação de um catálogo com o perfil de ácidos graxos das bactérias isoladas com maior frequência nas áreas limpas estudadas	101
3.2.9	Determinação do efeito da variação da tomada de ensaio sobre o resultado de identificação microbiana	104
3.2.10	Determinação do efeito da variação da temperatura sobre o resultado de identificação microbiana	105
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
4.1	DETERMINAÇÃO DOS TIPOS DE MICRORGANISMOS ISOLADOS COM MAIOR FREQUÊNCIA NAS ÁREAS LIMPAS ESTUDADAS	106
4.2	VARIAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO NO DECORRER DAS ESTAÇÕES DO ANO	109
4.3	IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS PELO MÉTODO FAME	110
4.4	PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS DAS BACTÉRIAS ISOLADAS COM MAIOR FREQUÊNCIA	121
4.5	DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DA TOMADA DE ENSAIO SOBRE O RESULTADO DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA	123
4.6	DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA SOBRE O RESULTADO DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA	131
5	CONCLUSÃO	139
	REFERÊNCIAS	140
	ANEXO A – Cópia do documento Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado	152

ANEXO B – Cópia da ficha do aluno	153
ANEXO B (cont.) – Cópia da ficha do aluno	154
ANEXO C – Mapa das salas limpas destinadas à manipulação e envase dos produtos farmacêuticos	155
ANEXO D – Mapa das salas limpas destinadas ao teste de esterilidade dos produtos farmacêuticos	156
ANEXO E – Mapa das salas de pesagem de matérias-primas	157
ANEXO F – Plano de amostragem das salas limpas para envase de produtos farmacêuticos	158
ANEXO F (cont.) – Plano de amostragem das salas limpas para envase de produtos farmacêuticos	159
ANEXO F (cont.) – Plano de amostragem das salas limpas para envase de produtos farmacêuticos	160
ANEXO G – Plano de amostragem dos fluxos laminares de manipulação de produtos farmacêuticos	161
ANEXO H – Plano de amostragem das salas limpas de classe B, não destinadas ao envase	162
ANEXO I – Plano de amostragem das salas limpas de classe C	163
ANEXO J – Plano de amostragem das salas limpas de classe D	164
ANEXO K – Plano de amostragem do fluxo laminar destinado à amostragem de matérias-primas	165
ANEXO L – Plano de amostragem das salas limpas de classe C, destinadas ao fracionamento e pesagem de matérias-primas	166
ANEXO M – Plano de amostragem das salas limpas de classe D, destinadas ao fracionamento e pesagem de matérias-primas	167

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos medicamentos estéreis, como injetáveis ou oftálmicos, são esterilizados por filtração e envasados assepticamente em salas limpas (OLSON, 1996). Apesar das medidas preventivas que são tomadas para evitar a introdução de microrganismos nas salas limpas, um programa contínuo de monitoramento ambiental consegue, com frequência, detectar bactérias e fungos presentes no ar e superfícies destas salas, assim como nas luvas e roupas dos operadores.

Para se obter produtos com um nível microbiano adequado, é vital monitorar o nível de contaminação e a diversidade microbiana para determinar melhorias nos processos assépticos. Além do mais, os inspetores dos órgãos regulatórios, como ANVISA e FDA, estão pressionando para uma caracterização da microbiota das salas limpas e controladas das indústrias farmacêuticas que realizem envases assépticos, manipulações assépticas ou não assépticas, pesagem e fracionamento de matérias-primas (OLSON, 1996).

Uma boa prática é emitir um relatório, a cada cinco meses, demonstrando a composição qualitativa e quantitativa da microbiota das salas limpas. A composição qualitativa pode ser determinada através dos resultados de identificação dos microrganismos isolados no ambiente, expressos preferencialmente em gênero e espécie; já a composição quantitativa pode ser calculada pela frequência de detecção de um determinado microrganismo, ou seja, pelo número de vezes que ele foi isolado nas salas limpas monitoradas. O microrganismo que foi encontrado com mais frequência deve ser mantido na bacterioteca do laboratório, com a finalidade de avaliar a qualidade da promoção e crescimento dos meios de cultura, e repicado mensalmente até no máximo cinco repiques, quando então um novo relatório deve ser elaborado.

Vários autores já escreveram sobre a necessidade e importância da identificação dos microrganismos isolados do ambiente de salas limpas. Entre eles, ressaltam-se:

- Cumprimento das exigências dos órgãos regulatórios (DESCHENES, 1986), como a Food and Drug Administration (FDA) ou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA);

- Identificação dos contaminantes de um produto, em fase intermediária ou final (NEWBY, 2000);
- Confirmação dos microrganismos a serem utilizados em validação e na promoção de crescimento de meios de cultura destinados ao monitoramento ambiental (NEWBY, 2000);
- Auxiliar na avaliação da eficácia da limpeza e na tentativa de encontrar a origem, ou provável origem, da contaminação de um produto com contagem microbiana acima do limite de ação ou de um teste de esterilidade positivo (SINCLAIR, 1998).

Existem vários métodos de identificação microbiana, todos eles com suas vantagens e desvantagens. Os métodos clássicos e tradicionais dependem de uma comparação bioquímica e fisiológica de características como: condições de crescimento, morfologia da colônia, características de crescimento em meios seletivos, potencial para fermentar certos açúcares, reações bioquímicas específicas, susceptibilidade a antibióticos, entre outras (READ, 2005).

Por muitas décadas, estes métodos antigos foram suficientes, pois coletivamente eles possuíam as seguintes vantagens: uso de materiais baratos, relativa simplicidade, pequeno conhecimento especializado necessário, sem grandes exigências técnicas e aceitação pelos órgãos regulatórios (NEWBY, 2000). Como desvantagens, contudo, estes métodos clássicos costumam ser muito demorados e para algumas identificações, podem levar até seis semanas (HESS; HESS-KOZA, 1996).

Atualmente, há uma pressão constante para que a indústria farmacêutica aperfeiçoe seus processos a fim de reduzir os custos e os tempos para conclusão das etapas de desenvolvimento e fabricação. As margens de lucro estão sendo estranguladas, ao mesmo tempo em que os custos de fabricação e desenvolvimento estão aumentando (SINCLAIR, 1998). Nesta árdua tarefa, a aplicação de novas metodologias, métodos microbiológicos rápidos e uso de automação se apresenta como uma grande aliada.

Além da pressão de mercado, os órgãos regulatórios, como a FDA, estão pressionando para que os resultados de análise, incluindo análises de identificação microbiana, sejam liberados mais rapidamente, a fim de proteger os consumidores e regulamentar as indústrias farmacêuticas em um curto espaço de tempo (FARBER et al., 2001). Ao mesmo tempo, ao produzirem resultados em menor tempo, os

métodos rápidos e automatizados podem também reduzir custos e aumentar a produtividade e eficiência (CLONTZ, 2000), transformando-se em valiosos benefícios para a indústria farmacêutica.

Com o objetivo de atender as necessidades do mercado e as exigências regulatórias, a empresa Microbial Identification Inc. (MIDI) desenvolveu em 1985 uma metodologia rápida para identificação de microrganismos, baseada na cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos, ou FAME, do inglês Fatty Acid Methyl Ester.

A metodologia FAME baseia-se em uma propriedade celular dos microrganismos, que pode ser chamada de individualidade da composição dos ácidos graxos. Os ácidos graxos fazem parte da membrana citoplasmática e do citoplasma de todos os microrganismos, mas a sua composição é única para cada espécie (CAMPBELL; CRONAN, 2001). O primeiro passo, portanto, consiste na extração e metilação destes ácidos graxos com auxílio de reagentes específicos. Logo em seguida, estes compostos são injetados em um cromatógrafo gasoso e os picos da amostra são comparados com uma biblioteca interna do sistema. Feito isso, será emitido um relatório com o nome do microrganismo que se desejava identificar.

Alguns estudos mostram que os resultados obtidos com a técnica FAME, a qual utiliza extratos totais de células, são equivalentes àqueles obtidos por protocolos mais tradicionais e complexos, como a análise de ácidos graxos de fosfolípidios (HAACK et al., 1994). A metodologia FAME também se mostrou equivalente a protocolos de identificação mais tradicionais, como as séries bioquímicas (WINN et al., 2005).

Embora a diversidade microbiana presente em uma sala limpa industrial para montagem de aeronaves tenha sido investigada previamente através da técnica FAME (RETTBERG et al., 2006), não foi possível encontrar nenhum estudo equivalente a respeito de salas limpas para fins farmacêuticos.

Para a realização da identificação microbiana pela técnica FAME, seus parâmetros de ensaio devem ser respeitados, pois alterações no meio de cultura recomendado, nas condições de cultivo, seja temperatura ou tempo, ou no procedimento de preparação do extrato irão alterar os perfis de ácidos graxos, levando a resultados de identificação errados ou duvidosos (MIDI, 2005).

A influência da alteração da temperatura de incubação de *Pseudomonas fluorescens* foi avaliada previamente (PUCCI; HÄRTIG; PUCCI, 2004). Além desse

estudo, entretanto, não foi possível encontrar outros trabalhos que descrevessem as conseqüências da mudança da temperatura, bem como da quantidade de amostra, sobre os resultados de identificação de cocos Gram positivos, bacilos Gram positivos e outros bacilos Gram negativos.

Por essa razão, os objetivos deste projeto foram:

- Efetuar uma análise estatística para determinar quais são os microrganismos mais freqüentes nas áreas limpas estudadas;
- Verificar se a comunidade microbiana das salas limpas se altera significativamente em função da mudança das estações do ano;
- Criar um catálogo com o perfil de ácidos graxos das bactérias isoladas com maior freqüência nas áreas limpas estudadas;
- Avaliar o efeito da variação da tomada de ensaio sobre o resultado de identificação;
- Avaliar o efeito da variação da temperatura sobre o resultado de identificação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA EM SALAS LIMPAS PROJETADAS PARA EMPRESAS FARMACÊUTICAS

As salas limpas são bastante utilizadas em empresas farmacêuticas, sendo extremamente importantes em todos os estágios de produção de componentes farmacêuticos, incluindo medicamentos estéreis e dispositivos médicos.

De acordo com o Federal Standard 209 E (1992), “sala limpa é uma sala cuja concentração de contaminantes é controlada dentro de limites especificados”. A ISO 14644-1 detalha mais o conceito e diz que sala limpa é uma “sala em que a concentração de partículas no ar é controlada, que é construída e utilizada de maneira a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas dentro da sala e em que os outros parâmetros relevantes, como temperatura, umidade e pressão são controlados” (WHITE, 2001).

Com base nestes conceitos, as salas limpas devem obedecer alguns critérios de instalação para apresentarem: superfícies lisas, superfícies não porosas, superfícies de fácil limpeza, ambientes vedados, cantos arredondados e saliências minimizadas. Da mesma forma, o sistema de ar deve assegurar uma concentração adequada de partículas em suspensão no ambiente e temperatura e umidade relativa controladas (WHITE, 2001). Geralmente, a qualidade exigida para o ar em salas limpas só é obtido quando o ar é insuflado em um fluxo unidirecional através de filtros de partículas aéreas de alta eficiência, denominados filtros HEPA, do inglês High Efficiency Particulate Air (COSSLETT, 2007).

As causas de contaminação em salas limpas são (HERLIN, 2007):

- Ar;
- Materiais;
- Pessoal;
- Movimentos, matérias-primas e entradas de materiais;
- Equipamentos;
- Processos

De maneira geral, pode-se dizer que virtualmente toda contaminação que ocorre durante um procedimento asséptico deriva de técnicas precárias e partículas viáveis transportadas pelo ar (RAMSTORP, 2003).

A United States Pharmacopeia (USP), em seu capítulo <1116> afirma que “o programa de controle inclui um nível apropriado de identificação da microbiota obtida na amostragem” (USP, 2009). De fato, a identificação microbiana em indústrias farmacêuticas, embora não obrigatória para 100% dos isolados (DESCHENES, 1986), se faz necessária por uma vasta gama de razões; todas elas associadas ao cumprimento das exigências dos órgãos regulatórios, como a Food and Drug Administration (FDA) ou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Entre as razões para se efetuar uma identificação microbiana, podemos destacar as seguintes: determinação da microbiota presente nas salas de manipulação ou envase, identificação dos contaminantes de um produto, em fase intermediária ou final, e confirmação dos microrganismos a serem utilizados em validação e na promoção de crescimento de meios de cultura destinados ao monitoramento ambiental (NEWBY, 2000).

As Diretrizes de Processos Assépticos da FDA disserta sobre a importância de se identificar os isolados (DESCHENES, 1986), a fim de que a identificação auxilie na avaliação da eficácia da limpeza e na tentativa de encontrar a origem, ou provável origem, da contaminação de um produto com contagem microbiana acima do limite de ação ou de um teste de esterilidade positivo (SINCLAIR, 1998). Geralmente, basta identificar os isolados ambientais ao nível de espécie (FARBER, et al., 2001). Algumas técnicas mais avançadas de identificação microbiana, no entanto, permitem a obtenção de resultados ao nível de subespécies ou até mesmo ao nível de cepas, como é o caso da técnica FAME.

O importante, em todos os casos, é ressaltar que os microrganismos isolados de superfícies, luvas, roupas e ar devem ser identificados com base em um programa de rotina (DESCHENES, 1986), e não somente quando é detectado um limite de alerta ou ação. Na eventual necessidade de uma investigação, ter um perfil dos microrganismos identificados pode ajudar a determinar se o contaminante faz parte da microbiota do ambiente ou se foi introduzido por outras vias. Todos os isolados ambientais devem ser guardados, até que seja finalizado o teste de esterilidade do produto fabricado no local onde o microrganismo foi encontrado. Sem

estes isolados, uma investigação completa de um teste de esterilidade falho é impossível (NEWBY, 2000).

Embora microrganismos potencialmente patogênicos (ex: *Salmonella sp*, *Clostridium tetani*) já tenham sido isolados de matérias-primas farmacêuticas ou produtos prontos, essas ocasiões são relativamente raras desde a década de 1970.

2.2 CLASSIFICAÇÕES DE SALAS LIMPAS

As salas limpas são classificadas de acordo com o grau de limpeza do ar (DIXON, 1999). Durante muito tempo, o método mais universalmente aplicado era aquele sugerido pelo Federal Standard 209 dos Estados Unidos, em suas revisões de A a E. O padrão atual é o estipulado pela International Organization for Standardization (ISO), sob número 14644-1 (HERLIN, 2007), embora a comunidade europeia também tenha criado um padrão exclusivo para salas limpas farmacêuticas, denominado EC GMP, que leva em conta o estado de ocupação da área limpa, ou seja, se está em repouso ou em operação.

2.2.1 Padrão ISO 14644-1

Devido ao grande número de padrões de salas limpas produzidos por vários países, tornou-se necessário elaborar um padrão mundial para uniformização dos critérios de classificação de salas limpas. O primeiro padrão ISO para salas limpas foi publicado em junho de 1999 com o título de 14644-1 “Classification of Air Cleanliness” (WHITE, 2001). A Tabela 1 mostra o padrão internacional adotado. A partir de então, as salas limpas devem ser classificadas de acordo com a norma ISO 14644-1.

Tabela 1 – Limite máximo de concentração de partículas por m³ de ar, de acordo com a classificação ISO 14644-1

ISO	Número máximo de partículas por m ³ de ar					
	≥ 0,1 µm	≥ 0,2 µm	≥ 0,3 µm	≥ 0,5 µm	≥ 1 µm	≥ 5 µm
1	10	2				
2	100	24	10	4		
3	1000	237	102	35	8	
4	10000	2370	1020	352	83	
5	100000	23700	10200	3520	832	29
6	1000000	237000	102000	35200	8320	293
7				352000	83200	2930
8				3520000	832000	29300
9				35200000	8320000	293000

Fonte: WHITE (2001)

De acordo com a norma ISO 14644-1, as classes de salas limpas são determinadas de acordo com a fórmula:

$$C_n = 10^N (0,1 / D)^{2,08} \quad (1)$$

Onde:

C_n = número máximo de partículas por metro cúbico, igual ou maior que o tamanho de partícula especificado, arredondado para número inteiro.

N = número de classe da ISO, que deve ser um múltiplo de 0,1 e menor que nove.

D = tamanho de partículas, em micrômetros.

O estado de ocupação da sala limpa é definido por este padrão, como segue (WHITE, 2001):

- Tal como construída: sala limpa completa e pronta para operação, com todos os serviços conectados e funcionais, mas sem equipamentos ou operadores na instalação;
- Em repouso: sala limpa completa, com todos os serviços funcionando e com equipamentos instalados e operáveis ou operando, mas sem operadores na instalação;

- Operacional: sala limpa em operação normal, com todos os serviços funcionando e com equipamentos e operadores, se aplicável, presentes e realizando suas tarefas normais.

2.2.2 Classificação para salas limpas farmacêuticas – EC GMP

O conjunto mais recente de padrões europeus para classificação de salas limpas farmacêuticas entrou em operação em 1º de março de 2009. Está contido em uma revisão do “Guia da União Européia de Boas Práticas de Fabricação – Anexo I: Fabricação de Produtos Medicinais Estéreis” (European Commission, 2008).

Para a fabricação de produtos medicinais estéreis, quatro classes são fornecidas, de acordo com a concentração de partículas no ar, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Classes de salas limpas, de acordo com o EC GMP.

Classe	Em Repouso		Em Operação	
	Nº máximo de partículas / m ³		Nº máximo de partículas / m ³	
	≥ 0,5 µm	≥ 5,0 µm	≥ 0,5 µm	≥ 5,0 µm
A	3500	0	3500	0
B	3500	0	350000	2000
C	350000	2000	3500000	2000
D	3500000	20000	Não definido	Não definido

Fonte: COSSLETT (2007)

Para Classe A, a classificação pelo número de partículas é equivalente a ISO 4,8, ditada pelo limite de partículas ≥ 5,0 µm. Para Classe B, em repouso, a classificação pelo número de partículas é equivalente a A para ambos os tamanhos de partículas. Para Classe C, em repouso e em operação, a classificação pelo número de partículas é equivalente a C e 8, respectivamente. Para Classe D, em repouso, a classificação pelo número de partículas é equivalente a D.

2.3 JUSTIFICATIVA DA IMPORTÂNCIA DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

Um século se passou entre a descoberta das bactérias por Antony van Leeuwenhoek e o reconhecimento inicial das bactérias em um esquema de classificação por Müller, em 1773. Outro século se passou antes que as técnicas e procedimentos tenham avançado suficientemente para permitir uma identificação adequada destes organismos (GARRITY, 2005).

Um esquema de identificação é baseado em um padrão de características, que seja capaz de diferenciar um determinado microrganismo de outros e identificá-lo exclusivamente dentro do grupo a que pertence. Os métodos clássicos e tradicionais dependem de uma comparação bioquímica e fisiológica de características como: condições de crescimento, morfologia da colônia, características de crescimento em meios seletivos, potencial para fermentar certos açúcares, reações bioquímicas específicas, susceptibilidade a antibióticos, entre outras (READ, 2005). Um sistema ideal, no entanto, é aquele que contém um número mínimo de características, que seja capaz de identificar corretamente um microrganismo (BROOKS et al., 2004).

Por muitas décadas, estes métodos antigos foram suficientes, pois coletivamente eles possuíam as seguintes vantagens: uso de materiais baratos, simplicidade, pequeno conhecimento especializado necessário, sem grandes exigências técnicas e aceitação pelos órgãos regulatórios (NEWBY, 2000). Como desvantagens, contudo, estes métodos clássicos costumam ser muito demorados e para algumas identificações, podem levar até seis semanas (HESS; HESS-KOZA, 1996).

Atualmente, há uma pressão constante para que a indústria farmacêutica aperfeiçoe seus processos a fim de reduzir os custos e os tempos para conclusão das etapas de desenvolvimento e fabricação. As margens de lucro estão sendo estranguladas, ao mesmo tempo em que os custos de fabricação e desenvolvimento estão aumentando (SINCLAIR, 1998). Nesta árdua tarefa, a aplicação de novas metodologias, métodos microbiológicos rápidos e uso de automação se apresenta como uma grande aliada.

Além da pressão de mercado, os órgãos regulatórios, como a FDA, estão pressionando para que os resultados de análise, incluindo análises de identificação microbiana, sejam liberados mais rapidamente, a fim de proteger os consumidores e regulamentar as indústrias farmacêuticas em um curto espaço de tempo (FARBER et al., 2001). Ao mesmo tempo, ao produzirem resultados em menor tempo, os métodos rápidos e automatizados podem também reduzir custos e aumentar a produtividade e eficiência (CLONTZ, 2000), transformando-se em valiosos benefícios para a indústria farmacêutica.

2.4 SISTEMAS AUTOMATIZADOS PARA IDENTIFICAÇÃO

Por todas as razões apresentadas no tópico anterior, os métodos bioquímicos tradicionais foram substituídos gradualmente por métodos mais rápidos e sistemas automatizados. No início da década de 70, a BioMérieux introduziu substratos liofilizados em matrizes plásticas, o que permitiu a identificação de vários isolados clínicos em até 24 horas (BIOMÉRIEUX INDUSTRY, 2008); este sistema foi denominado API e é utilizado até hoje. A partir da segunda metade da década de 70, alguns sistemas de identificação automatizados foram criados (STAGER, 1997).

A Tabela 3 compara as características de alguns sistemas automatizados, selecionados por emitirem resultados automaticamente, por possuírem uma base de dados que seja aplicável a uma grande variedade de microrganismos e por estarem disponíveis no Brasil.

Tabela 3 – Comparação das características dos sistemas automatizados de identificação microbiana

Características	VITEK®	BIOLOG®	RIBOPRINTER®	FAME
Princípio do método ^a	SU	SU	DNA	CG
Capacidade ^b	32, 60 ou 120	Ilimitada	32	200
ID ^c	246	1538	1200	2040
Inoculação	Automática	Manual	Automática	Automática
Incubação	4-48 h	4-72 h	8 h	0,5 h
Adição manual de reagente	Não	Não	Não	Não
Adição necessária de testes antes da incubação	Sim	Não	Não	Não
Temperatura de armazenamento dos reagentes	4 °C	4 °C	4 °C	Ambiente
Interface computadorizada	Sim	Sim	Sim	Sim
Custo do equipamento	US\$52000 - US\$97000	US\$31000	US\$52000	US\$150000
Custo por análise	US\$10	US\$10	US\$25	US\$5

^a SU = utilização de substratos para crescimento microbiano; DNA = PCR-ribotipagem; CG = cromatografia gasosa de ácidos graxos.

^b Número máximo de amostras que podem ser analisadas em uma única bateria de testes.

^c Número de grupos, gêneros ou espécies identificadas.

Fonte: adaptado de STAGER (1997) e OLSON (1996)

Os sistemas VITEK® e BIOLOG® se baseiam na biotipagem de microrganismos pela utilização de substrato para crescimento microbiano, incluindo corantes e antibióticos; o sistema FAME, comercializado pela MIDI, se baseia na biotipagem de microrganismos pela cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos (OLSON, 1996); já, o sistema RIBOPRINTER® é um sistema automatizado, baseado em PCR-ribotipagem, que corta o DNA em fragmentos específicos, através de enzimas de restrição, separa-os por tamanho através de eletroforese em gel e os transfere para uma membrana para serem hibridizados com uma sonda de DNA e misturados com um agente quimioluminescente. Uma câmera digital captura a emissão de luz, a partir do qual o sistema extrai um padrão de ribotipagem, que é comparado com uma biblioteca (DUPONT QUALICON, 2008).

Na maioria dos casos, é suficiente identificar uma bactéria ao nível de espécie, o que pode ser atingido através dos sistemas VITEK® e BIOLOG®. Em alguns casos, no entanto, as bactérias isoladas devem ser agrupadas abaixo do nível de espécie, processo conhecido como sub-tipagem (FARBER et al., 2001). Isto é especialmente necessário quando se deseja rastrear a fonte de contaminação e pode ser conseguido através dos sistemas RIBOPRINTER® e FAME.

Atualmente, existem muitos sistemas automatizados para identificação microbiana, destinados à tipagem ou sub-tipagem de bactérias. Estes métodos são classificados em: fenotípicos (ex: VITEK®, BIOLOG® e FAME) e genotípicos (ex: RIBOPRINTER®). A Tabela 4 fornece uma lista das vantagens e desvantagens dos métodos tradicionais e contemporâneos.

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens dos métodos de tipagem e sub-tipagem (continua)

Método	Vantagens	Desvantagens
Fenotípico		
Biotipagem	<ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidade de kits comerciais e dispositivos automatizados • Custo relativamente baixo para manutenção do estoque 	<ul style="list-style-type: none"> • Os resultados podem ser altamente variáveis, mesmo entre isolados da mesma cepa, devido a fatores ambientais que causam variação na expressão genética
Serotipagem	<ul style="list-style-type: none"> • Possui uma longa tradição histórica • Relativamente rápido e fácil para realizar, requerendo pequena habilidade técnica • Bem adequado para testar grandes números de isolados 	<ul style="list-style-type: none"> • As proteínas de superfície podem ser de difícil tipagem, devido às cápsulas • Os anti-soros podem sofrer reação cruzada e algumas cepas podem não ser tipáveis, devido à falta de anti-soros disponíveis • Necessidade de criar novos soros para cepas não tipáveis • Muitas cepas podem pertencer a alguns poucos sorotipos conhecidos, faltando o poder discriminatório de outros métodos que podem diferenciar dentro do mesmo sorotipo (ex: PFGE e RAPD) • Pode ser adequado somente para laboratórios de referência

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens dos métodos de tipagem e sub-tipagem (continuação)

Método	Vantagens	Desvantagens
Fagotipagem	<ul style="list-style-type: none"> • Sua estabilidade permite uma investigação a longo prazo de grandes populações • Grandes quantidades de bactérias podem ser rapidamente processadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Alguns microrganismos podem não ser tipáveis devido à falta de fagos disponíveis • Necessidade de isolar novos fagos para cepas não tipáveis • A princípio, aplicável somente a um grupo limitado de microrganismos (Ex: <i>S. aureus</i>) • Requer conhecimento especialista significativo para realizar e interpretar, o que pode gerar resultados ambíguos • Pode ser adequado somente para laboratórios de referência
Susceptibilidade antimicrobiana	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil de usar, ler e interpretar • Tecnicamente simples e de baixo custo • Boa reprodutibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Poder discriminatório relativamente pobre, porque a resistência antimicrobiana está sob tremenda pressão seletiva • Pode falsamente indicar isolados não relacionados ou vice-versa, quando plasmídeos que carregam genes de resistência são adquiridos ou eliminados

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens dos métodos de tipagem e sub-tipagem (continuação)

Método	Vantagens	Desvantagens
“Multi-Locus Enzyme Electrophoresis” (MLEE)	<ul style="list-style-type: none"> • Virtualmente todas as cepas são tipáveis 	<ul style="list-style-type: none"> • Tecnicamente muito exigente • Poder discriminatório moderado
Tipagem protéica por eletroforese & “Imunoblotting”	<ul style="list-style-type: none"> • Virtualmente todas as cepas são tipáveis 	<ul style="list-style-type: none"> • Grande número de bandas leva a interpretações difíceis e subjetivas • Requer manutenção de estoques de anti-soro
Genotípico		
Tipagem de plasmídeos	<ul style="list-style-type: none"> • Relativamente rápido e fácil • Os resultados podem ser padronizados utilizando marcadores conhecidos • Os plasmídeos podem ser facilmente isolados com procedimentos simples de lise celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Muitas cepas não possuem plasmídeos (ou somente um ou dois), produzindo um limitado número de informações • Outras cepas podem facilmente adquirir ou perder plasmídeos, tornando o método um marcador não confiável e instável para tipagem • Plasmídeos diferentes podem parecer do mesmo tamanho, ou formarem agrupamentos que dão a falsa noção de um plasmídeo maior

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens dos métodos de tipagem e sub-tipagem (continuação)

Método	Vantagens	Desvantagens
Análise por Enzima de Restrição (AER)	<ul style="list-style-type: none"> • Universalmente aplicável • Rápido, barato e relativamente fácil de realizar • Muito reprodutível 	<ul style="list-style-type: none"> • É necessário procurar entre um grande número de Endonucleases de Restrição (ER), o que pode ser caro em tempo de dinheiro • Geralmente produz um padrão de bandas extremamente complexo, sujeito a interpretação, devido às numerosas sobreposições e fragmentos não resolvidos (aproximadamente de 0,5 a 50 Kb) • Um único fragmento pode conter fragmentos de tamanho semelhante de áreas muito diferentes do cromossomo e fragmentos maiores tendem a não migrar do topo do gel, portanto nem todas as potenciais bandas úteis são resolvidas

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens dos métodos de tipagem e sub-tipagem (continuação)

Método	Vantagens	Desvantagens
Eletroforese em Gel por Campo Pulsado (PFGE)	<ul style="list-style-type: none"> • Uma ferramenta para estudos taxonômicos e epidemiológicos • Altamente reprodutível e discriminatório • Produz de 5 a 30 bandas facilmente visíveis de 10 a 800 Kb, logo a interpretação é direta 	<ul style="list-style-type: none"> • Pode exigir uma varredura extensiva de ER • O equipamento é caro e o método é tecnicamente complexo • Mais tedioso e demorado que os outros métodos (1 a 3 dias) • O DNA cromossômico de algumas bactérias é degradado devido às nucleases endógenas, antes de ser clivado adequadamente (Ex: <i>Clostridium difficile</i>)
Hibridização Southern com DNA cromossômico	<ul style="list-style-type: none"> • Uma única sonda pode ser utilizada para todos os isolados de uma espécie em particular • Bom poder discriminatório e reprodutibilidade em patógenos importantes (<i>S. aureus</i> e <i>M. tuberculosis</i>) • Algumas aplicações estão bem padronizadas (Ex: <i>M. tuberculosis</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Pode requerer marcadores radiativos • Procurar pelo lócus adequado exige tempo e sondas hiper-variáveis estão geralmente restritas a uma única espécie • Pode ter fraco poder discriminatório se o microrganismo contiver menos que cinco cópias do elemento • O método é tedioso e demorado

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens dos métodos de tipagem e sub-tipagem (continuação)

Método	Vantagens	Desvantagens
PCR baseado em seqüências de elementos repetitivos (rep-PCR)	<ul style="list-style-type: none"> Muito reprodutível e moderadamente discriminatório Uso de iniciadores conservados é amplamente aplicável 	<ul style="list-style-type: none"> Pode não ser tão discriminatório ou ter um campo de aplicação tão amplo como outros métodos (ex: PFGE)
Ribotipagem	<ul style="list-style-type: none"> Uma única sonda pode ser utilizada para realizar a sub-tipagem de todas as eubactérias, devido às seqüências altamente conservadas Padrões reprodutíveis são obtidos com um número razoável de fragmentos (10-15) Pode ser automatizado 	<ul style="list-style-type: none"> Mais tedioso e demorado do que os outros métodos, devido às múltiplas etapas Poder discriminatório moderado se comparado a métodos mais novos (o operon <i>rrn</i> cobre somente 0,1% do DNA cromossômico) Pode não ser útil quando somente 1 ou 2 cópias de gene rRNA estão presentes dentro do genoma bacteriano (Ex: micobactérias)
PCR-ribotipagem	<ul style="list-style-type: none"> Iniciadores bacterianos universais podem ser usados Produz padrões de amplificação facilmente detectáveis e estáveis, de uma maneira rápida Potencial para ser utilizado largamente em epidemiologia 	<ul style="list-style-type: none"> Baixo poder discriminatório se comparado com PFGE ou RAPD

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens dos métodos de tipagem e sub-tipagem (conclusão)

Método	Vantagens	Desvantagens
Análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD)	<ul style="list-style-type: none"> • Universalmente aplicável a todas as eubactérias. Rápido e fácil de realizar • Níveis de discriminação facilmente ajustáveis através da escolha dos iniciadores • Não exige marcação isotópica, nem o uso de endonucleases de restrição • Não requer conhecimento prévio da seqüência de DNA • Aceita métodos rápidos de extração (ex: lisados crus e células inteiras) 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessário escanear centenas de iniciadores potenciais, a fim de encontrar aqueles que são discriminatórios e reprodutíveis • Método sujeito a variações técnicas, portanto os estudos de reprodutibilidade inter e intralaboratórios são problemáticos • Requer uma padronização estrita para alcançar uma razoável reprodutibilidade • Somente observa possíveis diferenças de uma pequena porcentagem do genoma total quando um iniciador é utilizado • A comparação de bandas do mesmo tamanho, mas de diferentes intensidades, pode ser complicado

Fonte: FARBER (2001)

Muitos destes sistemas já estão no mercado há muitos anos. Os sistemas VITEK® e FAME, por exemplo, são utilizados em indústrias farmacêuticas, laboratórios de microbiologia clínica, empresas de monitoramento ambiental e, em menor extensão, em indústrias alimentícias (OLSON, 1996).

2.5 FUNDAMENTOS BÁSICOS DA TÉCNICA FAME

No tópico anterior, foram apresentadas algumas das dificuldades enfrentadas pelos microbiologistas atuais quando se deparam com a necessidade de uma identificação bacteriana precisa e exata.

O presente estudo visa dissertar sobre uma técnica alternativa viável de identificação bacteriana, denominada Fatty Acid Methyl Ester Gas Chromatography (FAME), ou Cromatografia Gasosa de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos, disponível comercialmente desde 1985 (PAISLEY, 1998).

A metodologia FAME baseia-se em uma propriedade dos microrganismos denominada “individualidade da composição dos ácidos graxos”. Esta propriedade confere à cada espécie microbiana um perfil único de ácidos graxos (CAMPBELL; CRONAN, 2001).

Na verdade, a análise de ácidos graxos de cadeia curta (ácidos graxos voláteis) já era rotineiramente utilizada para identificação de bactérias anaeróbicas (FARBER et al., 2001), mas somente com o advento das colunas capilares de sílica fundida, que permitem a recuperação de hidróxi ácidos e a resolução de muitos isômeros, tornou-se possível utilizar a cromatografia gasosa de ésteres metila de ácidos graxos de células integrais para identificar uma grande variedade de microrganismos (MIDI, 2005).

O FAME utiliza os ácidos graxos entre 9 e 20 carbonos de comprimentos (MIDI, 2005). Os picos são automaticamente nomeados e quantificados pelo sistema. Feito isso, o FAME é capaz de emitir um relatório com o nome do microrganismo que se desejava identificar.

2.5.1 Diferenças morfológicas das bactérias

Para que se compreenda a técnica objeto de estudo deste trabalho é fundamental que se conheçam alguns princípios básicos que fundamentam a técnica. São eles:

- Diferenças morfológicas das bactérias;

- Nomenclatura dos ácidos graxos.

A informação genética de uma bactéria está contida em uma única molécula de DNA, suspensa em uma substância gelatinosa, chamada citoplasma. Na maioria dos casos, esta e outras partes da célula estão circundadas por uma membrana flexível, chamada membrana plasmática, membrana citoplasmática ou ergastoplasma, que por sua vez é circundada por uma parede celular rígida. Algumas poucas espécies, como os micoplasmas, não possuem parede celular (GARRITY, 2005).

A Figura 1 mostra o diagrama de uma célula bacteriana típica.

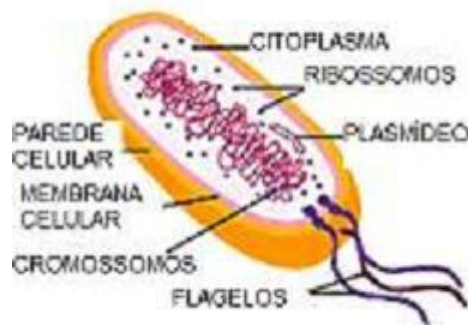


Figura 1 - Estrutura de uma célula bacteriana típica
 Fonte: <http://www.microbeworld.org>. Acesso em 03/11/2008.

Embora cada bactéria seja composta de uma única célula, elas se apresentam de várias formas e tamanhos. Além disso, quando sofrem aplicação de uma técnica, chamada coloração de Gram, elas podem se tornar azuis ou rosas ao microscópio. O conhecimento dessas características constitui-se a fundação de uma boa identificação.

2.5.2 Parede celular

Apesar de descrita há mais de 200 anos (1884) por Christian Gram, a coloração de Gram é uma ferramenta rápida e barata de diagnóstico do tipo de parede celular da bactéria em estudo, ainda amplamente utilizada.

A coloração de Gram se baseia em algumas diferenças estruturais existentes entre a parede celular de uma bactéria Gram negativa e de uma Gram positiva. A Figura 2A mostra que a principal delas é que a parede celular de uma bactéria Gram positiva, embora seja mais espessa, é quimicamente mais simples, ou seja, apresenta predominantemente um único tipo de macromolécula (90% peptidoglicano) (NEUHAUS; BADDILEY, 2003).

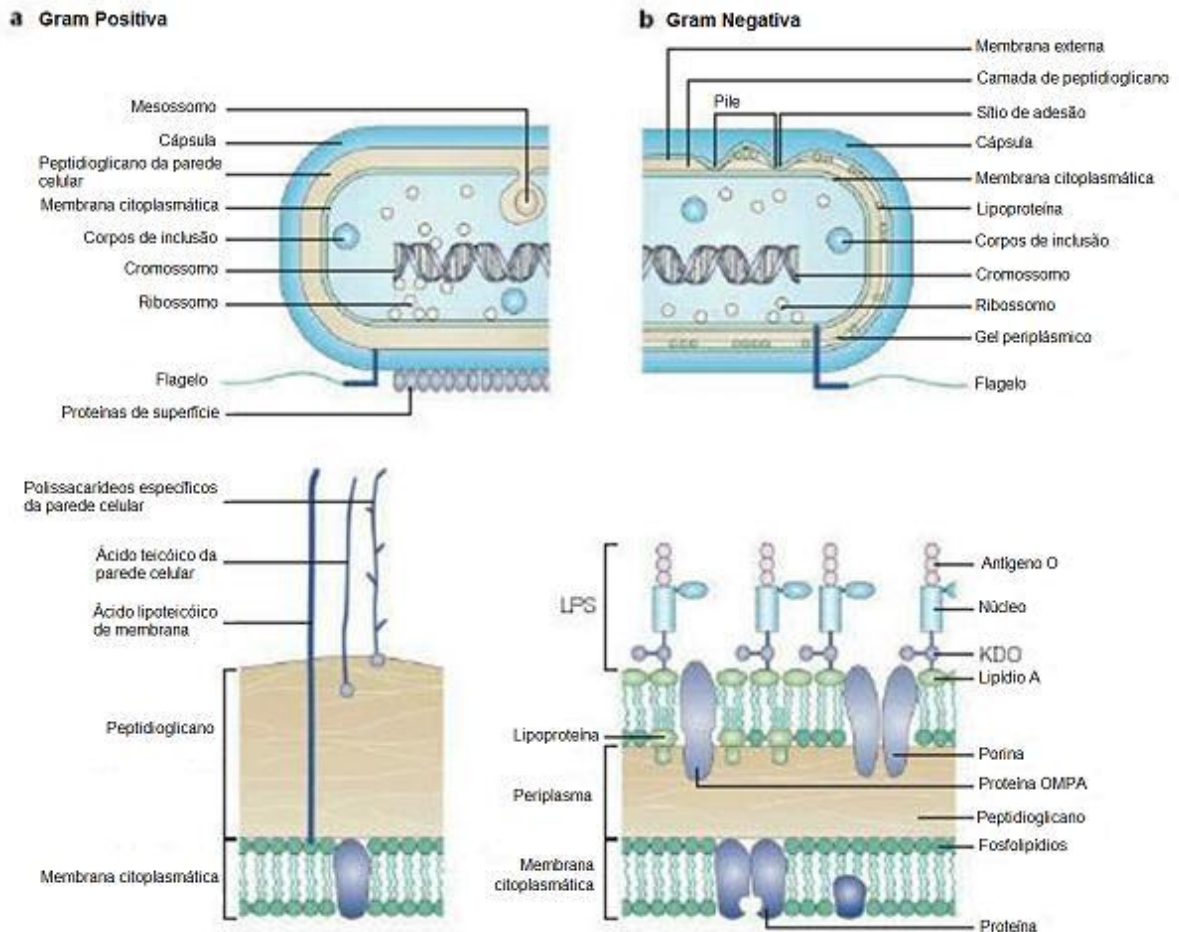


Figura 2 - A) Membrana de uma bactéria Gram positiva; B) Membrana de uma bactéria Gram negativa

Fonte: <http://focosi.immunesig.org/physiobacteria.html>. Acesso em 03/11/2008.

Já a parede celular de uma bactéria Gram negativa (Figura 2B) é mais complexa. É formada por uma ou poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa, separadas entre si por um espaço periplásmico, contendo uma série de enzimas e proteínas. Enquanto nas Gram positivas o peptidoglicano representa de 15 a 50% da massa seca da célula, nas Gram negativas ele representa no máximo 5% (NEUHAUS; BADDILEY, 2003).

Essas informações são importantes, pois é a quantidade de interligações existentes entre as cadeias de peptidoglicano e o comprimento dessas cadeias que determinará a forma da célula, e conseqüentemente, a forma da bactéria (CABEEN; JACOBS-WAGNER, 2005).

Tanto as Gram positivas quanto as Gram negativas possuem, no entanto, uma característica em comum: suas membranas são constituídas de uma bicamada fosfolipídica.

2.5.3 Forma das bactérias

As bactérias de interesse médico podem apresentar formas esféricas (cocos), cilíndricas (bacilos) ou espirais (Figura 3).

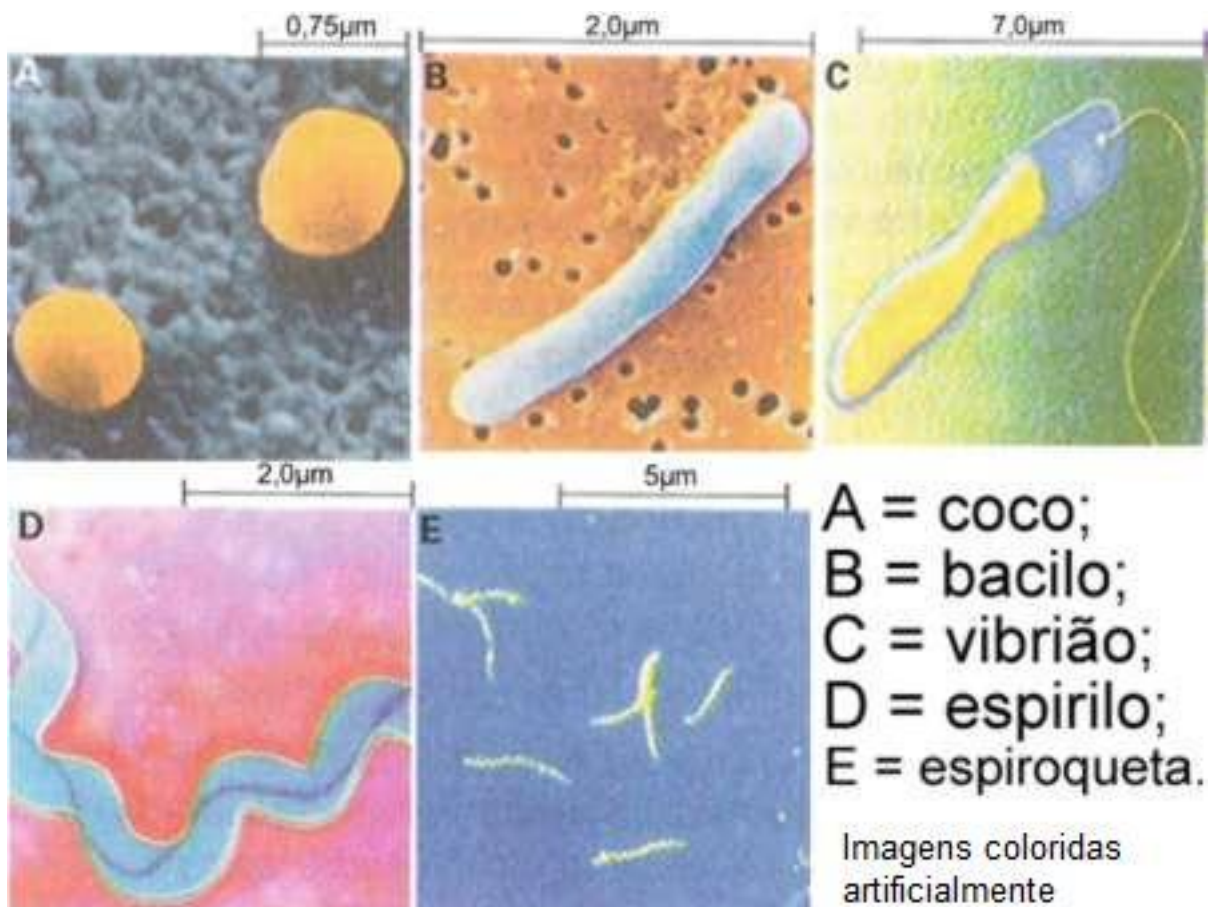


Figura 3 - Principais formas das bactérias

Fonte: <http://www.colegiosaofrancisco.com.br/alfa/bacterias/bacterias-4.php>. Acesso em 03/11/2008.

Os cocos são redondos, mas podem ser ovais, alongados ou achatados em uma das extremidades. Os bacilos assemelham-se a bastões, daí também serem chamados de bastonetes. Já as espiraladas podem ter uma ou mais espirais; quando têm o corpo rígido e em forma de vírgula, são chamadas de vibriões, e espirilos quando têm a forma de saca-rolhas. Há ainda um grupo de organismos espiralados, mas de corpo flexível – os espiroquetas.


As formas das bactérias, no entanto, não são fixas; ao contrário, elas são alteradas quando expostas a forças seletivas, tais como: limitação de nutrientes, divisão celular, aderências, dispersão passiva, motilidade ativa, diferenciação polar, predadores, diferenciação celular (YOUNG, 2006).

2.5.4 Ácidos graxos

2.5.4.1 Bicamada lipídica

Como visto no tópico 2.5.2, as bactérias Gram negativas e Gram positivas possuem uma membrana flexível, chamada membrana plasmática, composta de uma bicamada fosfolipídica.

O termo “fosfolipídica” sugere a associação de um lipídio com um grupo fosfato, enquanto o termo “bicamada” sugere duas camadas de fosfolipídios. Na

Figura 4, cada  representa um fosfolipídio. O círculo (cabeça) representa um grupo fosfato carregado negativamente e as duas caudas representam as duas cadeias de ácidos graxos altamente hidrofóbicas. Quando duas cadeias de ácidos graxos reagem com uma molécula de glicerol, forma-se um lipídio, que ao se associar a um grupo fosfato e um grupo polar carregado, dá origem a um fosfolipídio.

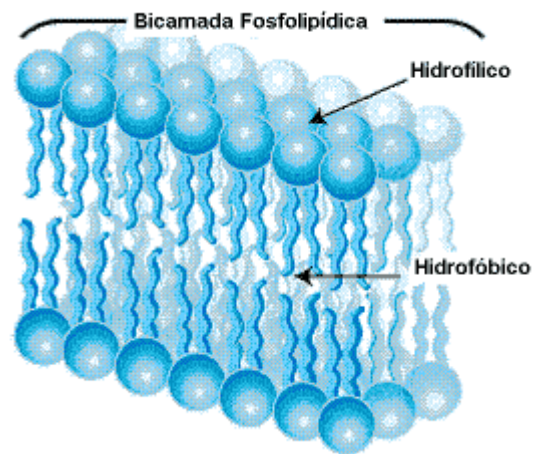


Figura 4 - Diagrama de uma bicamada fosfolipídica
 Fonte: <http://www.biotech.ubc.ca/Bio-industry/Inex>. Acesso em 03/11/2008.

A Figura 5 mostra as partes de uma única molécula de fosfolípido.

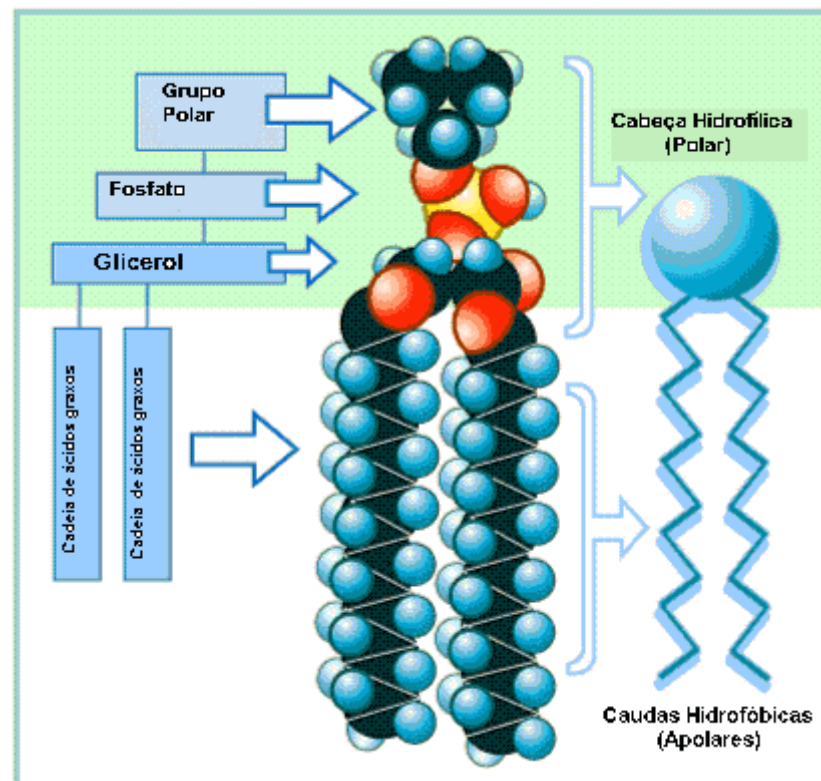


Figura 5 - Esquema de uma molécula de fosfolípido
 Fonte: <http://www.biotech.ubc.ca/Bio-industry/Inex>. Acesso em 03/11/2008.

2.5.4.2 Nomenclatura sistemática para ácidos graxos

Na terminologia IUPAC para ácidos graxos, denominada nomenclatura sistemática, o ácido graxo recebe o nome do hidrocarboneto que o originou (O'KEEFE, 2002). Por exemplo, um ácido carboxílico com 18 carbonos recebe o nome de ácido octadecanóico, derivado do octadecano, um hidrocarboneto alifático de 18 carbonos. A Tabela 5 resume as regras para nomenclatura de hidrocarbonetos.

Tabela 5 - Regras IUPAC para nomenclatura de hidrocarbonetos

Descrição da regra

- a. Hidrocarbonetos acíclicos, saturados, não ramificados, são nomeados com um prefixo numérico e a terminação “ano”. Os primeiros quatro da série usam prefixos triviais (metano, etano, propano e butano), enquanto os restantes usam os prefixos que representam o número de átomos de carbono.
 - b. Hidrocarbonetos acíclicos, saturados, ramificados, são nomeados adicionando a designação da cadeia lateral como prefixo do nome da cadeia mais longa presente na estrutura.
 - c. A cadeia mais longa é numerada de forma a fornecer o menor número possível de cadeias laterais, desconsiderando os substituintes.
 - d. Se mais que duas cadeias laterais estiverem presentes, elas podem ser citadas ou em ordem alfabética ou em ordem crescente de complexidade.
 - e. Se mais que duas cadeias laterais estiverem presentes em posições equivalentes, aquela com menor número é citada em primeiro lugar. A ordem pode ser baseada em ordem alfabética ou em ordem crescente de complexidade.
 - f. Hidrocarbonetos acíclicos, insaturados, não ramificados, com uma dupla ligação têm o sufixo “ano” substituído por “eno”. Se há mais que uma dupla ligação, o “ano” é substituído por “dieno”, “trieno”, “tetraeno”, etc. A cadeia é numerada de forma a fornecer o menor número possível de duplas ligações.
-

Fonte: O'KEEFE (2002)

As duplas ligações são designadas utilizando-se a configuração Δ , a qual representa a distância do carbono da carboxila, numerado como carbono 1. Assim,

um ácido graxo com 18 carbonos e uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 recebe o nome de Δ 9-octadecanóico ou simplesmente 9- octadecanóico.

A geometria da dupla ligação é designada com os sistemas de nomenclatura *cis/trans* ou E/Z. Os termos *cis/trans* são usados para descrever as posições dos átomos ou grupos conectados às duplas ligações, desde que essas duplas ligações não estejam em posição terminal na estrutura ou sirvam para unir anéis a cadeias (O'KEEFE, 2002). Dois exemplos são mostrados na Figura 6.

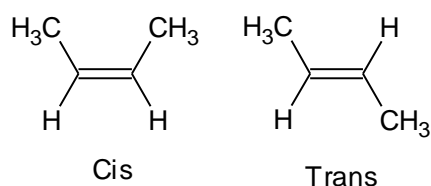


Figura 6 - Conformações cis/trans
Fonte: acervo pessoal

2.5.4.3 Nomenclaturas comuns de ácidos graxos

Alguns nomes comuns foram introduzidos ao longo dos anos e, para certos ácidos graxos, são muito mais comuns que os nomes oficiais IUPAC. Por exemplo, ácido oléico é muito mais comum que ácido *cis*-9-octadecanóico. A nomenclatura para alguns ácidos graxos saturados e insaturados estão ilustrados nas Tabela 6 e Tabela 7 respectivamente.

Tabela 6 - Nomes sistemáticos, comuns e abreviados de ácidos graxos saturados

Nome sistemático	Nome comum	Abreviação
Metanóico	Fórmico	1:0
Etanóico	Acético	2:0
Propanóico	Propiônico	3:0
Butanóico	Butírico	4:0
Pentanóico	Valérico	5:0
Hexanóico	Capróico	6:0
Heptanóico	Enântico	7:0
Octanóico	Caprílico	8:0
Nonanóico	Pelargônico	9:0
Decanóico	Cáprico	10:0

Fonte: adaptado de O'KEEFE (2002)

2.5.4.4 Nomenclaturas abreviadas (ω) dos ácidos graxos

As nomenclaturas abreviadas de ácidos graxos são bastante comuns e são utilizadas nos relatórios impressos do sistema FAME. São constituídas do número de carbonos na cadeia, seguida de dois pontos, o número de duplas ligações e a posição da dupla ligação mais próxima ao lado metil da molécula. O grupo metila é o carbono número 1 (O'KEEFE, 2002). Assim, um ácido graxo com uma dupla ligação entre o sexto e o sétimo carbonos, a contar do grupo metila, é um ácido graxo ω 6.

A notação resumida está limitada a ácidos graxos com conformação *cis*, sem ligações acetileno, grupos funcionais adicionais (tais como grupos hidroxil ou ramificações), ou para sistemas com mais de duas duplas ligações.

Tabela 7 - Nomes sistemáticos, comuns e abreviados de ácidos graxos insaturados

Nome sistemático	Nome comum	Abreviação
c-9-dodecanóico	Lauroleico	12:1 ω 3
c-5-tetradecanóico	Fisetérico	14:1 ω 9
c-9-octadecanóico	Oleico	18:1 ω 9
c-9,c-12-octadecadienóico	Linoleico	18:2 ω 6
c-9,c-12,c-15-octadecatrienóico	Linolênico	18:3 ω 3
c-6,c-9,c-12-octadecatrienóico	γ -Linolênico	18:3 ω 6
c-9-hexadecanóico	Palmitoleico	16:1 ω 7
c-6,c-9,c-12,c-15-octadecatetraenóico	Estearidônico	18:4 ω 3
c-5,c-8,c-11,c-14-eicosatetraenóico	Araquidônico	20:4 ω 6
c-5,c-8,c-11,c-14,c-17-eicosapentaenóico	Eicosapentaenóico (EPA)	20:5 ω 3

Fonte: adaptado de O'KEEFE (2002)

2.5.5 Classificação de ácidos graxos e respectivas nomenclaturas adotadas pela técnica FAME

2.5.5.1 Cadeia saturada

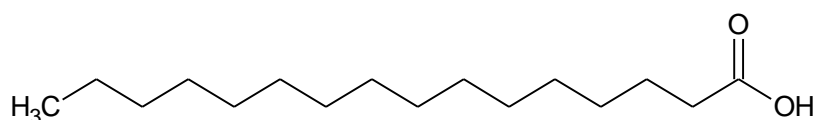


Figura 7 - Ácido graxo de cadeia saturada
Fonte: acervo pessoal

A Figura 7 representa a cadeia saturada do ácido graxo ácido palmítico, designada pela nomenclatura FAME como **16:0** (PAISLEY, 1998). Estes compostos também podem ser escritos com a letra C na frente do número, tal como C16:0. A letra “C” vem de “carbonos” no composto e um composto escrito como C16:0 é o mesmo que um escrito como 16:0.

2.5.5.2 Cadeia insaturada

2.5.5.2.1 Conformação *cis*

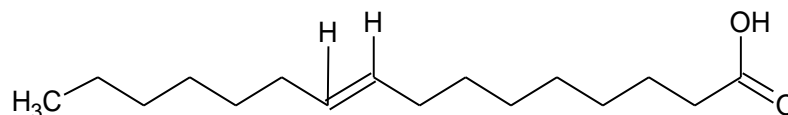


Figura 8 - Ácido graxo de cadeia insaturada - conformação *cis*
Fonte: acervo pessoal

A Figura 8 representa um ácido graxo insaturado **16:1 ω7c**. A designação 16:1 indica que o composto tem 16 carbonos e uma dupla ligação; o símbolo ω7 indica que a dupla ligação está situada no carbono 7 a contar do grupo metila terminal; a letra “c” ao final do nome indica que a conformação é do tipo *cis*, pois ambos os hidrogênios da dupla ligação estão do mesmo lado.

2.5.5.2.2 Conformação *trans*

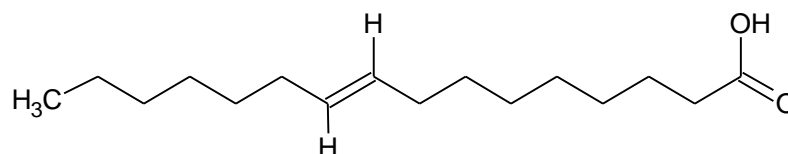


Figura 9 - Ácido graxo de cadeia insaturada - conformação *trans*
Fonte: acervo pessoal

A Figura 9 representa um ácido graxo insaturado **16:1 ω7t**. A letra “t” ao final do nome indica que a conformação é do tipo *trans*, pois os hidrogênios da dupla ligação estão em lados opostos do composto.

2.5.5.3 Iso

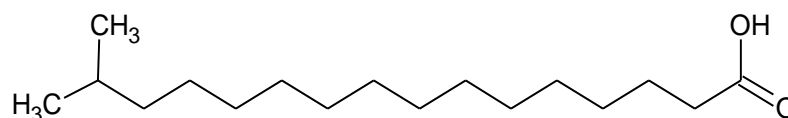


Figura 10 - Ácido graxo com cadeia iso
Fonte: acervo pessoal

A Figura 10 representa um ácido graxo **17:0 ISO**. O termo “ISO” é empregado para indicar que um grupo metila ocorre no **penúltimo** carbono da cadeia.

2.5.5.4 Anteiso

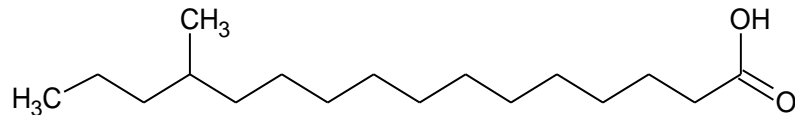


Figura 11 - Ácido graxo com cadeia anteiso
Fonte: acervo pessoal

A Figura 11 representa um ácido graxo **17:0 ANTE**. O termo “ANTE”, abreviação de “anteiso”, é empregado para indicar que um grupo metila ocorre no **antepenúltimo** carbono da cadeia.

2.5.5.5 Ciclopropano

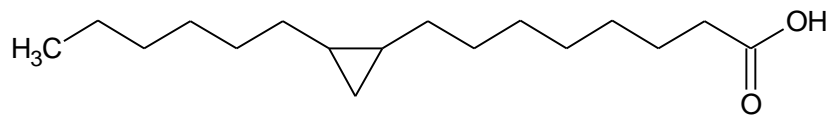


Figura 12 - Ácido graxo com cadeia com ciclopropano
Fonte: acervo pessoal

A Figura 12 representa um ácido graxo **17:0 ωCICLO 7-8**. Neste caso, este composto é sintetizado a partir do 16:1 ω7c com a adição do grupo carbono na posição da dupla ligação.

2.5.5.6 Hidroxi

2.5.5.6.1 2-hidroxi

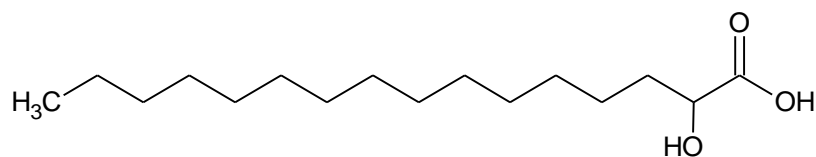


Figura 13 - Ácido graxo com cadeia 2-hidroxi
Fonte: acervo pessoal

A Figura 13 representa um ácido graxo **16:0 2OH**, onde um grupo hidroxila é adicionado à posição 2 (alfa).

2.5.5.6.2 3-hidroxi

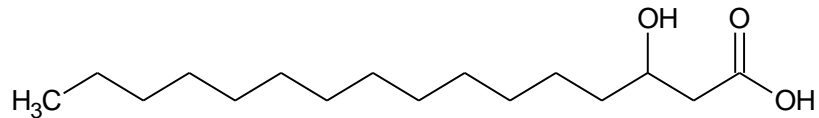


Figura 14 - Ácido graxo com cadeia 3-hidroxi
Fonte: acervo pessoal

A Figura 14 representa um ácido graxo **16:0 3OH**, onde um grupo hidroxila é adicionado à posição 3 (beta).

2.5.5.6.3 Outros hidroxis

Grupos funcionais hidroxila podem ocorrer em outras posições além dos segundos e terceiros carbonos. No entanto, não são comuns nas mais variadas espécies de bactérias que têm sido observadas até hoje.

2.5.5.7 Grupos funcionais mistos

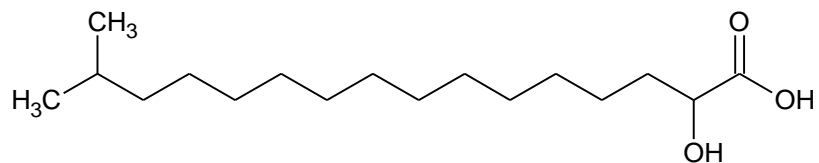


Figura 15 - Ácido graxo com grupo funcional misto
Fonte: acervo pessoal

Combinações de vários grupos funcionais também ocorrem. A Figura 15 representa um ácido graxo **17:0 ISO 2OH**.

2.5.5.8 Éster metílico de ácido graxo

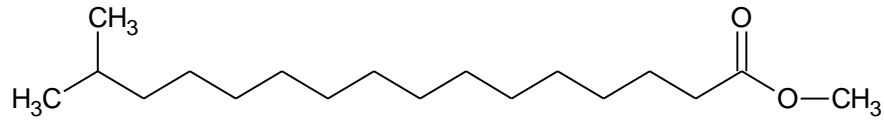


Figura 16 - Éster metílico de ácido graxo
Fonte: acervo pessoal

A Figura 16 representa um éster metílico do ácido graxo 16:0 ISO, escrito como **16:0 FAME** nos relatórios impressos. Um grupo metila é adicionado ao grupo carboxila para aumentar a volatilidade para análise por CG.

2.5.5.9 Dimetil acetal

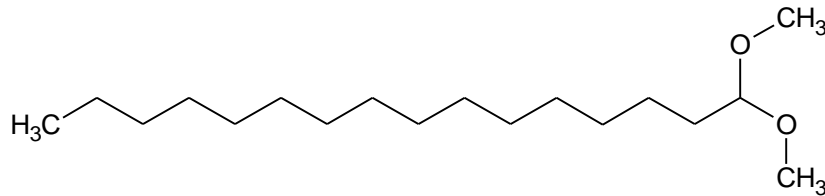


Figura 17 - Dimetil acetal ou dimetil aldeído
Fonte: acervo pessoal

A Figura 17 representa um **dimetil aldeído 16:0**, escrito como 16:0 DMA nos relatórios impressos. Dimetil acetais ocorrem como análogos dos ácidos graxos presentes em bactérias anaeróbicas e podem conter qualquer um dos grupos funcionais acima. Eles resultam dos lipídeos ligados a éter em plasmalogênios.

2.5.5.10 Hidrocarboneto normal

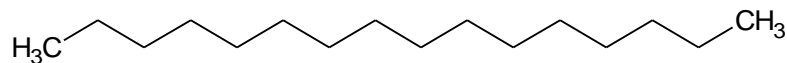


Figura 18 - Hidrocarboneto normal
Fonte: acervo pessoal

A Figura 18 representa um **hidrocarboneto normal 16:0**, denominado n 16:0.

2.5.5.11 Aldeído

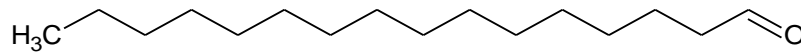


Figura 19 - Aldeído
Fonte: acervo pessoal

A Figura 19 representa um aldeído 16:0.

2.5.5.12 Álcoois

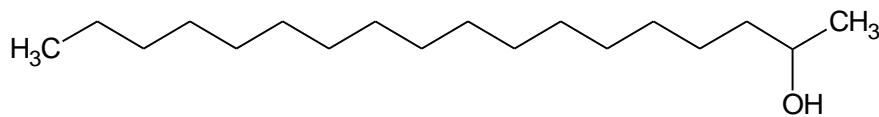


Figura 20 - Álcool
Fonte: acervo pessoal

A Figura 20 representa um álcool **2-octadecanol**. Este composto, assim como o 2-eicosanol (20 carbonos na cadeia), ocorre em algumas espécies de *Mycobacterium*.

2.5.6 Ocorrência de ácidos graxos e compostos relacionados

Mais de 300 ácidos graxos e compostos relacionados já foram encontrados em bactérias analisadas pela metodologia FAME. A riqueza de informações contidas nestes compostos pode ser avaliada não somente pela presença ou ausência de cada ácido, mas também pela análise quantitativa dos mesmos.

Embora a habilidade teórica de diferenciar entre 2^{300} diferentes combinações não seja prática devido à distribuição não aleatória dos ácidos graxos dentro de cada grupo de bactéria, o número enorme de ácidos graxos cria um grande poder de “nomeação” para o FAME (PAISLEY, 1998).

Para fins desta dissertação, todos os compostos serão referidos como ácidos graxos, mesmo que na verdade sejam aldeídos, hidroxicarbonos ou dimetil acetais e sejam analisados como ésteres de metila.

Abaixo está relacionada a ocorrência dos ácidos graxos nos diferentes grupos de bactérias.

- Bactérias Gram negativas: embora possuam predominantemente hidroxi ácidos de cadeia curta, as bactérias Gram negativas também contêm, em geral, alguma combinação de ácidos graxos de cadeia saturada, insaturada, hidroxi, e ciclopropanos (Figura 21). Além disso, elas ocasionalmente também podem conter ácidos graxos ISO e / ou ANTEISO, assim como nas do gênero *Stenotrophomonas*. A maior parte desses ácidos graxos está presente na membrana citoplasmática (MIDI, 2005).
- Bactérias Gram positivas: nas bactérias Gram positivas, predominam os ácidos graxos de cadeia ramificada, mas elas também contêm algumas combinações de ácidos graxos de cadeia saturada, insaturada, ISO e ANTEISO apenas. Elas não contêm quantidades apreciáveis de ácidos graxos hidroxi. *Lactobacillus* e alguns outros microrganismos de outro gênero podem conter ácidos graxos ciclopropano. A maior parte desses ácidos graxos está presente no citoplasma da célula (MIDI, 2005). O perfil típico de bacilos Gram positivos está ilustrado na Figura 22 e o de cocos Gram positivos na Figura 23.
- Anaeróbios: dimetil acetais representam até 30% do conteúdo dos ácidos graxos em anaeróbios. Eles resultam de uma ligação lipídica com éter (plasmologênios) e ocorrem como análogos dos ácidos graxos presentes no mesmo extrato. Os dimetil acetais podem conter qualquer um dos grupos funcionais acima e estes componentes seguem as observações das Gram positivas / Gram negativas acima. Em anaeróbios estritos, hidrocarbonetos normais e aldeídos representam até 10% do conteúdo (MIDI, 2005).

E082214.69A [3481] S. maltophilia 28 C Replicata 3

Page 1

Volume: DATA File: E082214.69A Samp Ctr: 31 ID Number: 3481
 Type: Samp Bottle: 28 Method: TSBA6
 Created: 2/21/2008 11:34:36 PM
 Sample ID: S. maltophilia 28 C Replicata 3

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.643	4.083E+8	0.027	----	7.007	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
2.627	240	0.026	----	8.939		----	< min rt	
2.927	391	0.023	1.226	9.527	unknown 9.531	----	ECL deviates -0.004	
3.168	1232	0.025	1.190	10.000	10:0	0.53	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
3.593	9453	0.025	1.148	10.606	11:0 iso	3.93	ECL deviates 0.000	Reference 0.002
4.261	570	0.031	1.099	11.423	10:0 3OH	0.23	ECL deviates 0.001	
4.609	4651	0.031	1.078	11.799	unknown 11.799	----	ECL deviates 0.000	
4.768	433	0.033	----	11.970		----		
4.899	5410	0.032	1.064	12.089	11:0 iso 3OH	2.08	ECL deviates 0.000	
5.506	1123	0.033	1.039	12.613	13:0 iso	0.42	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
6.088	461	0.042	1.019	13.098	12:0 iso 3OH	0.17	ECL deviates 0.000	
6.579	8946	0.037	1.006	13.456	12:0 3OH	3.26	ECL deviates 0.002	
6.803	1972	0.037	1.000	13.619	14:0 iso	0.71	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
7.326	9171	0.038	0.988	13.999	14:0	3.28	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
7.497	13891	0.039	0.984	14.110	13:0 iso 3OH	4.95	ECL deviates 0.001	
7.627	972	0.040	0.982	14.194	13:0 2OH	0.35	ECL deviates 0.000	
7.968	2456	0.039	0.975	14.415	15:1 iso F	0.87	ECL deviates 0.000	
8.291	121024	0.038	0.970	14.624	15:0 iso	42.49	ECL deviates 0.001	Reference 0.000
8.429	22996	0.039	0.967	14.714	15:0 anteiso	8.05	ECL deviates 0.001	Reference 0.000
8.871	2120	0.044	0.960	15.000	15:0	----	ECL deviates 0.000	
9.917	3088	0.044	0.946	15.628	16:0 iso	1.06	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
10.164	6243	0.041	0.943	15.776	16:1 w9c	2.13	ECL deviates 0.002	
10.237	28763	0.043	0.942	15.820	Sum In Feature 3	9.81	ECL deviates -0.002	16:1 w7c/16:1 w6c
10.537	17627	0.042	0.939	16.000	16:0	5.99	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
11.262	11894	0.046	0.932	16.419	Sum In Feature 9	4.01	ECL deviates 0.003	17:1 iso w9c
11.629	9809	0.044	0.928	16.631	17:0 iso	3.30	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
11.785	505	0.035	0.927	16.721	17:0 anteiso	0.17	ECL deviates -0.002	Reference -0.005
11.909	567	0.033	0.926	16.792	17:1 w8c	0.19	ECL deviates 0.000	
12.076	650	0.044	0.924	16.889	17:0 cyclo	0.22	ECL deviates 0.001	
13.628	2860	0.048	0.913	17.773	18:1 w9c	0.95	ECL deviates 0.004	
13.718	1795	0.048	0.912	17.824	Sum In Feature 8	0.59	ECL deviates 0.001	18:1 w7c
14.769	1713	0.057	----	18.424		----		
15.137	776	0.046	0.904	18.635	19:0 iso	0.25	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
----	28763	----	----	----	Summed Feature 3	9.81	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c
----	1795	----	----	----	Summed Feature 8	0.59	18:1 w7c	18:1 w6c
----	11894	----	----	----	Summed Feature 9	4.01	17:1 iso w9c	16:0 10-methyl

ECL Deviation: 0.002
 Total Response: 286400
 Percent Named: 99.25%

Reference ECL Shift: 0.002 Number Reference Peaks: 12
 Total Named: 284254
 Total Amount: 283713

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA6 6.00	0.899	Stenotrophomonas-maltophilia (Xanthomonas, Pseudomonas)

Figura 21 – Perfil típico de ácidos graxos de uma bactéria Gram negativa
 Fonte: acervo pessoal

E083043.36A [3526] B. subtilis 40 mg

Page 1

Volume: DATA File: E083043.36A Samp Ctr: 6 ID Number: 3526
 Type: Samp Bottle: 5 Method: TSBA6
 Created: 3/4/2008 10:06:00 AM
 Sample ID: B. subtilis 40 mg

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.723	3.239E+8	0.028	----	7.000	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.838	5069	0.021	----	7.218		----	< min rt	
7.035	1431	0.041	1.006	13.619	14:0 iso	1.38	ECL deviates 0.000	Reference 0.007
7.568	491	0.038	0.991	14.000	14:0	0.47	ECL deviates 0.000	Reference 0.006
8.544	29111	0.041	0.969	14.623	15:0 iso	26.97	ECL deviates 0.000	Reference 0.006
8.685	45983	0.042	0.967	14.713	15:0 anteiso	42.47	ECL deviates 0.000	Reference 0.006
10.191	4630	0.046	0.941	15.627	16:0 iso	4.16	ECL deviates 0.000	Reference 0.006
10.816	2270	0.044	0.932	15.999	16:0	2.02	ECL deviates -0.001	Reference 0.004
11.501	509	0.041	0.923	16.392	17:1 iso w10c	0.45	ECL deviates 0.004	
11.658	859	0.043	0.921	16.482	Sum In Feature 4	0.76	ECL deviates -0.004	17:1 anteiso B/iso I
11.918	10809	0.045	0.919	16.631	17:0 iso	9.49	ECL deviates 0.001	Reference 0.005
12.079	13522	0.046	0.917	16.723	17:0 anteiso	11.85	ECL deviates 0.000	Reference 0.005
----	859	---	----	----	Summed Feature 4	0.76	17:1 iso l/anteiso B	17:1 anteiso B/iso I

ECL Deviation: 0.002 Reference ECL Shift: 0.006 Number Reference Peaks: 8
 Total Response: 109616 Total Named: 109616
 Percent Named: 100.00% Total Amount: 104657

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA6 6.00	0.713	Bacillus-subtilis
	0.487	Bacillus-atrophaeus

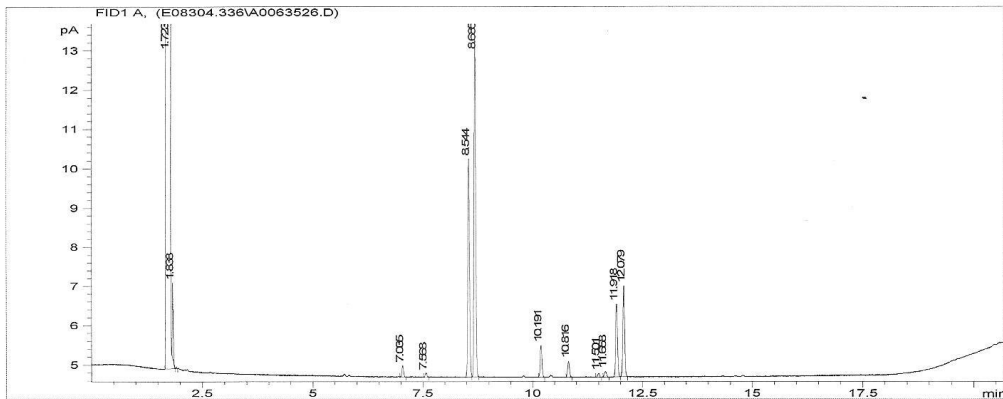


Figura 22 - Perfil típico de ácidos graxos de bacilos Gram positivos
 Fonte: acervo pessoal

E082214.69A [3461] M. luteus 28 C Replicata 1

Page 1

Volume: DATA File: E082214.69A Samp Ctr: 9 ID Number: 3461
 Type: Samp Bottle: 8 Method: TSBA6
 Created: 2/21/2008 2:31:41 PM
 Sample ID: M. luteus 28 C Replicata 1

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.644	4.055E+8	0.027	----	7.003	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
3.657	228	0.031	1.147	10.695	11:0 anteiso	0.23	ECL deviates 0.000	Reference 0.013
5.507	689	0.031	1.040	12.614	13:0 iso	0.64	ECL deviates 0.000	Reference 0.009
5.609	1607	0.035	1.036	12.702	13:0 anteiso	1.49	ECL deviates 0.000	Reference 0.009
6.803	5781	0.036	1.000	13.618	14:0 iso	5.15	ECL deviates -0.001	Reference 0.007
7.327	1411	0.037	0.987	13.999	14:0	1.24	ECL deviates -0.001	Reference 0.006
8.290	22233	0.039	0.968	14.623	15:0 iso	19.20	ECL deviates 0.000	Reference 0.006
8.430	75595	0.038	0.966	14.714	15:0 anteiso	65.11	ECL deviates 0.001	Reference 0.007
9.918	5014	0.041	0.944	15.628	16:0 iso	4.22	ECL deviates 0.001	Reference 0.007
10.241	406	0.038	0.940	15.822	Sum In Feature 3	0.34	ECL deviates 0.000	16:1 w7c/16:1 w6c
10.531	649	0.037	0.937	15.997	16:0	0.54	ECL deviates -0.003	Reference 0.002
10.927	463	0.035	0.933	16.225	15:0 2OH	0.39	ECL deviates 0.006	
11.791	1764	0.043	0.924	16.724	17:0 anteiso	1.45	ECL deviates 0.001	Reference 0.006
----	406	---	----	----	Summed Feature 3	0.34	16:1 w7c/16:1 w6c	16:1 w6c/16:1 w7c

ECL Deviation: 0.002 Reference ECL Shift: 0.008 Number Reference Peaks: 10
 Total Response: 115840 Total Named: 115840
 Percent Named: 100.00% Total Amount: 112126

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA6 6.00	0.801	Micrococcus-luteus-GC subgroup B
	0.622	Micrococcus-lylae-GC subgroup A

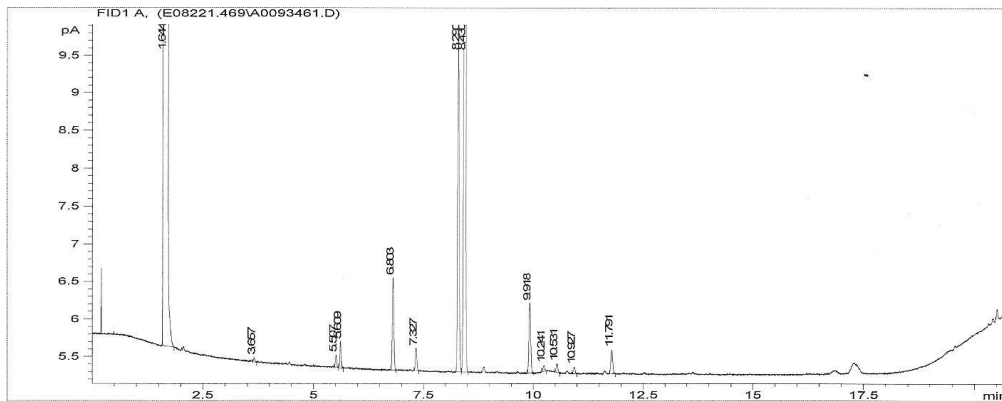


Figura 23 - Perfil típico de ácidos graxos de cocos Gram positivos
 Fonte: acervo pessoal

2.6 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

2.6.1 Microrganismos como fontes de ácidos graxos

O conceito de se utilizar microrganismos como fontes de ácidos graxos se estende pelo século XX. Nos idos de 1878, os microrganismos já foram reconhecidos por possuírem óleos similares às plantas. Contudo, nenhum método de produção em larga escala foi desenvolvido até hoje, pois mesmo com os avanços tecnológicos, continua mais barato obter óleos de plantas. Sabe-se que o acúmulo de lipídios é estimulado quando os microrganismos são cultivados em um meio de cultura rico em carbono altamente assimilável (geralmente glicose ou sacarose) e baixo em nitrogênio, a fim de que a célula rapidamente esgote o suprimento de nitrogênio, mas continue a utilizar o carbono. Dessa forma, o substrato assimilado é diretamente convertido em reserva de óleo dentro da célula (WALSH, 2003). Veja Figura 24.

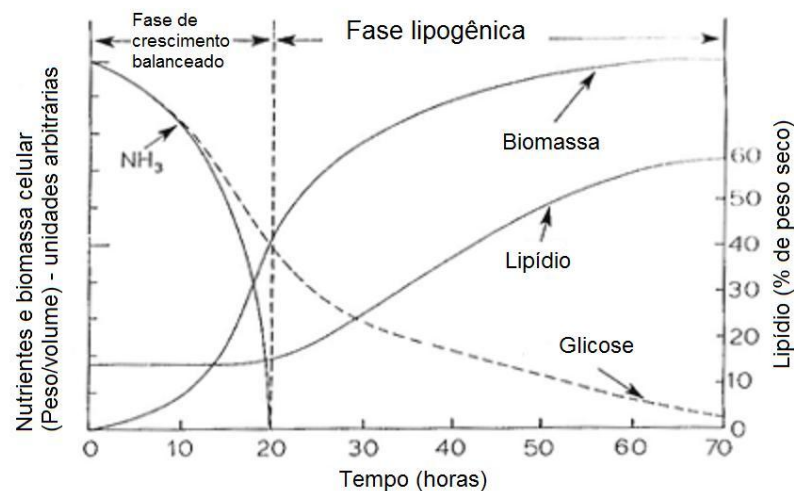


Figura 24 – Diagrama idealizado do processo de acúmulo de lipídios em um microrganismo oleaginoso. O meio de cultura é formulado de maneira que o N (geralmente NH_3) seja esgotado entre 20 e 30 horas, mas a fonte de carbono (geralmente glicose) permaneça em excesso.
Fonte: Ratledge (2001)

Nem todos os microrganismos são igualmente bons em produzirem óleos. As bactérias, por exemplo, são pobres produtoras de triacilgliceróis, ao passo que um pequeno número de leveduras e um número maior de bolores são produtores

extremamente bons. O trabalho da década anterior em listar as composições de ácidos graxos de um grande número de microrganismos fornece agora o banco de dados para reconhecer que os ácidos graxos escassos em plantas podem ser encontrados, em abundância, nos microrganismos (RATLEDGE C. , 2001).

2.7 BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS EM BACTÉRIAS

A biossíntese de ácidos graxos é um processo essencial para a maioria das células vivas, mas também é energeticamente cara. Por isso, os organismos desenvolveram mecanismos homeostáticos que visam preservar a quantidade de lipídeos em um nível mínimo satisfatório (SCHUJMAN; DE MENDOZA, 2008). Em bactérias, a maioria das atividades necessárias à biossíntese de ácidos graxos está contida em uma grande enzima com múltiplos domínios, chamada ácido graxo sintase tipo II, ou sistema FASII (CAMPBELL; CRONAN, 2001). Este sistema utiliza várias proteínas mono funcionais, sendo que cada uma catalisa uma determinada etapa da via biossintética (LU; ZHANG; ROCK, 2004).

2.7.1 Via básica tipo II para biossíntese de ácidos graxos

As bactérias produzem ácidos graxos através de um ciclo contínuo de reações, tais como condensação, redução, desidratação e redução de ligações carbono-carbono (DE MENDOZA; SCHUJMAN; AGUILAR, 2002). Uma característica chave desse sistema é que todos os intermediários acil estão covalentemente ligados a uma pequena proteína acídica, denominada ACP ou proteínas carreadoras de grupos acil, e são transferidos de uma enzima para outra até que os acil-ACPs alcancem o comprimento adequado e se tornem substratos para as aciltransferases, as quais transferem as cadeias de ácidos graxos para o interior dos fosfolipídios de membrana (Figura 25).

Uma molécula essencial para a elongação dos ácidos graxos é o intermediário malonil-CoA, que é formado pela carboxilação da acetil-CoA pela

enzima acetil-CoA carboxilase (ACC). Esse esquema biossintético é conservado em todas as bactérias, mas a especificidade de algumas enzimas envolvidas em relação ao substrato leva à variedade de ácidos graxos encontrados nos diferentes gêneros (LU; ZHANG; ROCK, 2004). Esta característica é fundamental para a compreensão da técnica FAME, que se baseia no princípio de que cada espécie de microrganismo possui um perfil único de ácidos graxos.

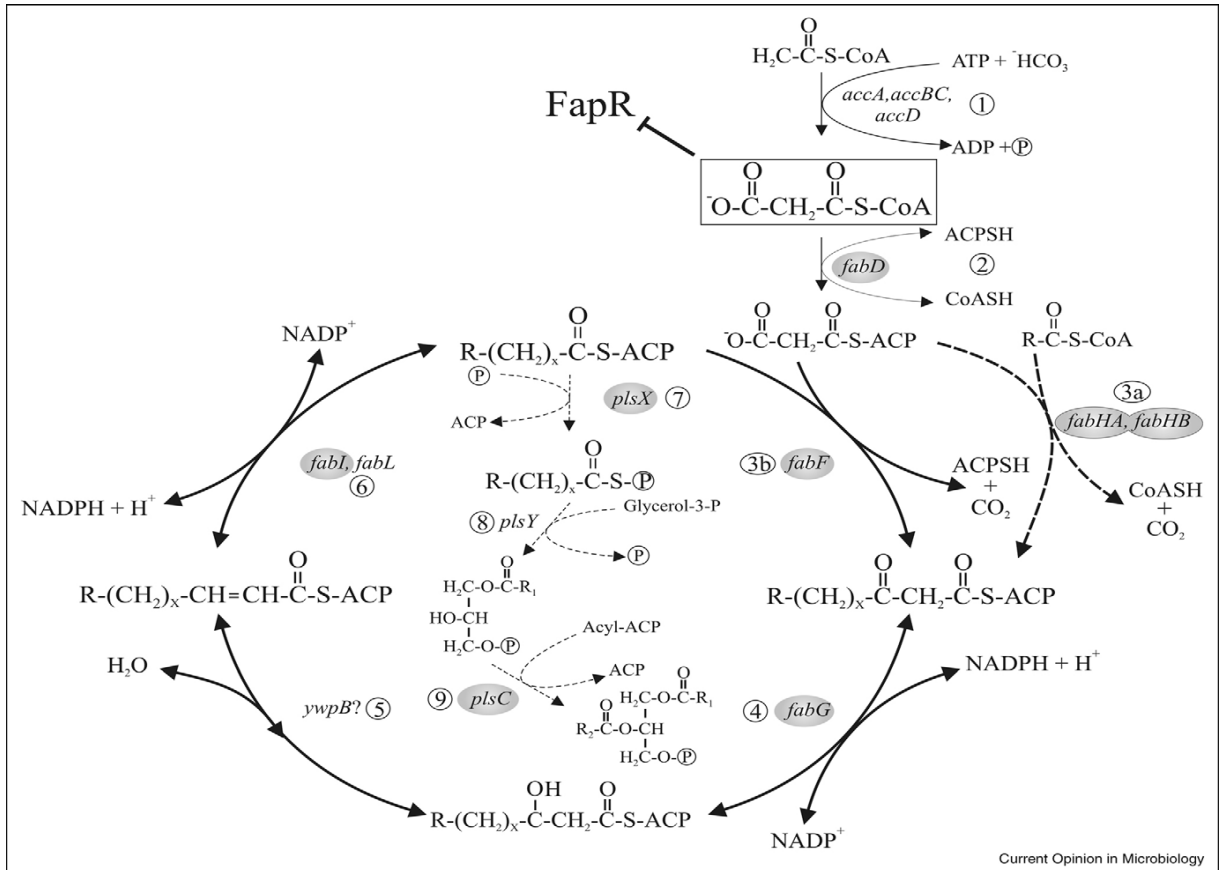
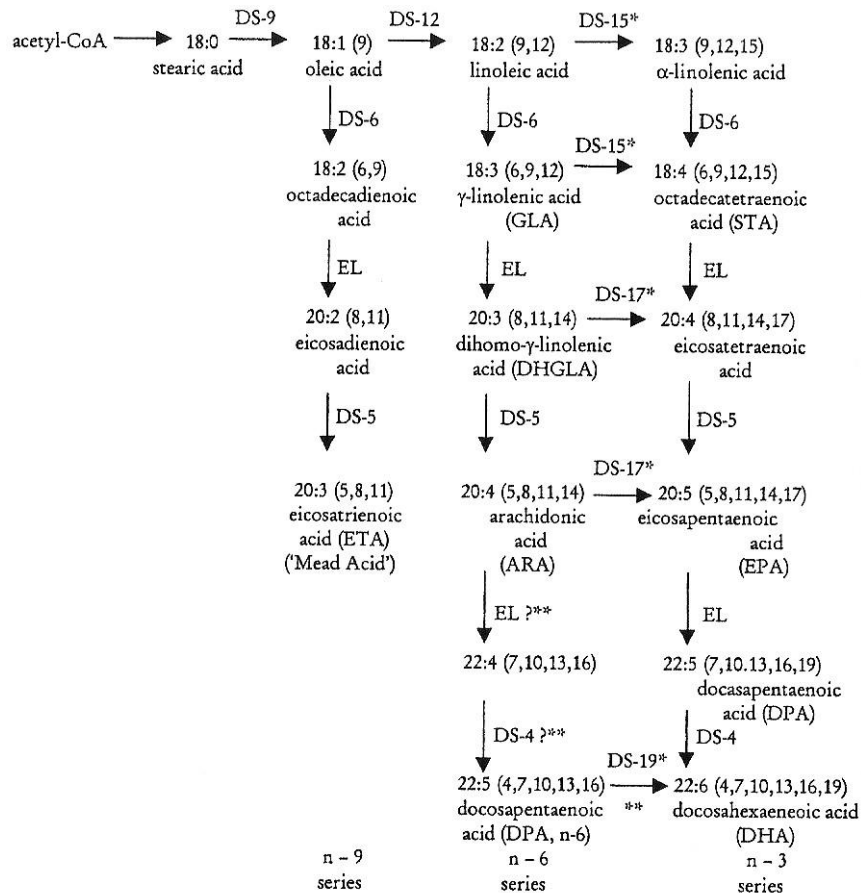


Figura 25 – Biossíntese de ácidos graxos em bactérias Gram positivas. Os ciclos de alongação dos ácidos graxos se iniciam pela condensação dos iniciadores acil-CoA com malonil-ACP, catalisada pelas enzimas de condensação *fabHA* e *fabHB* (3a). O próximo passo é a redução dos β -cetoésteres, catalisada pela β -cetoacil ACP redutase (4). O β -hidroxiacil-ACP é então desidratado para formar o composto trans-2 insaturado acil-ACP pela β -hidroxiacil-ACP desidrase (5). O composto recém-formado é reduzido pela enoil redutase (6) para gerar um acil-ACP dois carbonos mais longos que o original acil-ACP. Rodadas subseqüentes de alongação são iniciadas pela enzima de alongação-condensação *FabF* (3b). Os produtos finais acil-ACP da síntese de ácidos graxos são trans-acilados em três etapas para glicerol-fosfato, para gerar o intermediário na síntese de fosfolipídeos de ácido fosfatídico (AP): primeiro, *plsX* catalisa a síntese de ácido graxo-fosfato a partir de acil-ACP (7); segundo, *plsY* transfere o ácido graxo do intermediário acil ativado para a posição 1 do glicerol-3P (8); finalmente, liso-AP é acilado para AP pela *plsC* (9). A malonil-CoA é gerada a partir da acetil-CoA através da acetil-CoA carboxilase (1) e então é transferida para as ACP através da malonil-CoA transacilase (2).

A expressão dos genes circundados por elipses sombreadas é reprimida pela *FapR*, cuja atividade é, por sua vez, antagonizada pela malonil-CoA (contida na caixa retangular). R denota o grupo terminal de ácidos graxos de cadeia ramificada ou linear.

Fonte: Schujman (2008)



DS = Desaturases atuando no carbono indicado. Ex: DS-12 é uma Δ12 desaturase inserindo uma dupla ligação entre os carbonos 12 e 13 da molécula de ácido graxo.

EL = Elongase

* Todas essas podem ser consideradas desaturases n-3, as quais introduzem uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3; aquelas que atuam sobre GLA e DHGLA ainda precisam ser confirmadas.

* Sequência incerta em Thraustochytrids levando à formação de DPA n-6. Thraustochytrids são protistas marinhos, não fotossintéticos.

Figura 26 – Rotas de biosíntese de ácidos graxos poli-insaturados.

Fonte: Ratledge (2001)

Dentre os ácidos graxos sintetizados pelos microrganismos, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) recebem especial importância, pois além do seu valor nutricional, podem também ser utilizados para aplicações médicas (RATLEDGE C. , 2001). Até os anos 90, pensava-se que, com exceção das cianobactérias, as bactérias não produzissem PUFA's. Isto ocorreu principalmente porque as espécies bacterianas que tiveram sua fisiologia, bioquímica e biologia molecular estudadas eram espécies mesofílicas, como a *E. coli*, as quais não produzem PUFA's e sim ácidos graxos mono-insaturados. A partir de então, foi descoberto que PUFA's de cadeia longa, tais como ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosaexaenóico

(DHA), são preferencialmente distribuídos em bactérias psicrófilas, que habitam ambientes relativamente incomuns e com baixa temperatura, como o fundo do mar e intestinos de peixes marinhos (OKUYAMA et al., 2007). Os principais microrganismos produtores de PUFA, no entanto, são os fungos e algas marinhas (RATLEDGE C. , 2001).

Embora os microrganismos tenham desenvolvido mecanismos distintos para a biossíntese e regulação de PUFA (SCHUJMAN; DE MENDOZA, 2005), todos esses mecanismos envolvem a ação de desaturases e elongases (Figura 26). Deve ser observado que as etapas finais que levam à formação de ácidos graxos 22:6 são diferentes das sugeridas para sistemas animais, os quais aparentemente não possuem uma Δ^4 -desaturase (RATLEDGE C. , 2001).

2.7.2 Início da biossíntese dos lipídeos de membrana

Em *Escherichia coli*, para a qual a abordagem genética, em conjunto com os estudos bioquímicos, resultou em uma compreensão detalhada da síntese de fosfolipídios, a acilação da posição 1 do glicerol-3P (G3P) é catalisada pela proteína PlsB; a PlsC então completa a síntese do ácido fosfatídico transferindo um ácido graxo para a posição 2 do acil-G3P (CRONAN; ROCK, 1996). A análise de múltiplos genomas revelou, no entanto, que a maioria das bactérias não possui o gene *plsB* (SCHUJMAN; DE MENDOZA, 2008), sugerindo que deve haver um caminho bioquímico alternativo para a ligação do primeiro ácido graxo e que o modelo bioquímico estudado para *E. coli* não pode ser ampliado ou generalizado para todas as espécies. Recentemente, uma via bioquímica de duas etapas, que utiliza um ácido graxo intermediário, até então desconhecido, para a iniciação da síntese de fosfolipídios, foi descoberto em *Streptococcus pneumoniae* (LU et al., 2006). Primeiro, uma proteína codificada pelo gene *plsX* catalisa a síntese de ácido graxo fosfato a partir do acil-ACP. Em seguida, uma aciltransferase, conhecida como PlsY, transfere o ácido graxo do intermediário acil ativado para a posição 1 do G3P (Figura 25). Finalmente, a PlsC transfere um ácido graxo para a posição 2 do acil-G3P para gerar o ácido fosfatídico. Esta via bioquímica ocorre em praticamente todas as bactérias seqüenciadas (LU et al., 2006).

2.7.3 Controle bioquímico da síntese de ácidos graxos

As bactérias apresentam um controle rígido sobre a quantidade de ácidos graxos produzidos pelo sistema FASII para garantir a coordenação da síntese de lipídeos da membrana com o crescimento e a síntese macromolecular. Em *E. coli*, os produtos finais acil-ACPs de cadeia longa emergiram como importantes fatores inibidores da atividade do sistema FASII. Esta conclusão foi derivada em parte pela demonstração de que a hidrólise dos acil-ACPs pelas tioesterases leva à superprodução de ácidos graxos (JIANG; CRONAN, 1994). As enzimas que foram inibidas *in vitro* pelas acil-ACPs são: ACC, a enzima que catalisa a conversão de acetil-CoA em malonil-CoA (DAVIS; CRONAN, 2001), FabH, a qual catalisa a primeira etapa da via bioquímica (HEATH; ROCK, 1996) e FabI, a qual catalisa a finalização da elongação dos acil-ACPs (HEATH; ROCK, 1996).

Evidências recentes mostraram que a PlsX, a enzima periférica que catalisa a primeira etapa envolvida na biossíntese de fosfolipídios em *B. subtilis*, desempenha um importante papel na coordenação da produção dos ácidos graxos e fosfolipídios (PAOLETTI et al., 2007). Neste microrganismo, a inativação da PlsX leva não só à cessação da síntese de ácidos graxos, como também de fosfolipídios. A inibição da síntese de lipídeos totais em células sem PlsX foi atribuída à acumulação de acil-ACPs devido ao bloqueio em sua conversão para acil-fosfato. Esta observação sugere que os acil-ACPs também podem agir como fatores inibitórios da biossíntese de ácidos graxos em *B. subtilis* (PAOLETTI et al., 2007). Deve ser observado, contudo, que o *B. subtilis* contém dois isômeros da FabH: FabHA e FabHB (CHOI; HEATH; ROCK, 2000); e duas enoil-ACP redutases: FabI e FabL (HEATH et al., 2000). Além disso, a expressão de *fabHA*, *fabHB* e *fabI* aumenta muito após a inibição do ciclo de elongação do ácido graxo (SCHUJMAN et al., 2003). Portanto, é possível que a regulação da atividade do sistema FASII pelo acil-ACP em *B. subtilis* seja quase completamente exercida ao nível do complexo ACC. Essa enzima é uma candidata razoável para o controle dependente do acil-ACP porque:

- a) Ela catalisa o primeiro passo envolvido na biossíntese de ácidos graxos, ou seja, a formação de malonil-CoA;

- b) Os genes *acc* não possuem um controle de transcrição em conjunto com os genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e fosfolipídios (SCHUJMAN et al., 2003);
- c) A malonil-CoA é o ligante que alivia o efeito repressor da FapR na transcrição dos genes do sistema FASII (SCHUJMAN, et al., 2006).

2.7.4 Regulação genética da biossíntese de ácidos graxos

Até o momento, seis reguladores da transcrição genética em bactérias foram identificados como responsáveis pelo controle da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos. Quatro deles, FadR (HENRY; CRONAN, 1992), DesR (AGUILAR et al., 2001), FabR (ZHANG; MARRAKCHI; ROCK, 2002) e DesT (ZHU et al., 2006), estão dedicados a garantirem níveis adequados de ácidos graxos insaturados nos fosfolipídios de membrana de bactérias Gram negativas e positivas, ao passo que FapR (SCHUJMAN, et al., 2006) e FabT (LU; ROCK, 2006) são repressores globais de transcrição que simultaneamente controlam a expressão de muitos genes envolvidos no metabolismo de fosfolipídios e ácidos graxos de bactérias Gram positivas.

Um grande avanço na compreensão do controle de transcrição da síntese de lipídeos em bactérias ocorreu após a identificação do FapR, um dos repressores globais de transcrição que controlam a expressão do gene *fap*, envolvido na biossíntese de ácidos graxos e fosfolipídios em *B. subtilis*. Esses genes, agrupados em seis óperons, contêm um fragmento de 17 pb ao qual o FapR se liga (SCHUJMAN et al., 2003). A ligação do FapR ao seus alvos de DNA é especificamente inibida pelo malonil-CoA, um intermediário essencial da síntese de ácidos graxos em todas as células vivas, o que serve para regular a expressão do gene *fap* (SCHUJMAN et al., 2006). É importante ressaltar que muitos dos microrganismos contendo FapR são patógenos humanos, incluindo *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (SCHUJMAN et al., 2003). Uma vez que o FapR é altamente conservado nas bactérias Gram positivas, tudo indica que o mecanismo de regulação observado no *B. subtilis* seja o mesmo que em outros microrganismos.

O segundo regulador global, FabT, foi identificado no patógeno humano *S. pneumoniae*. Nessa bactéria, os doze genes necessários para a biossíntese de ácidos graxos estão localizados juntos em um único grupamento (LU; ROCK, 2006). O segundo gene do grupamento codifica para o repressor de transcrição FabT, o qual regula todos esses genes exceto *fabM*, que está envolvido na biossíntese de ácidos graxos insaturados (SCHUJMAN et al., 2006). Uma organização genética similar é encontrada em outras bactérias Gram positivas, tais como *Enterococcus*, *Clostridium* e *Lactococcus* (LU; ROCK, 2006). O ligante que modula a ligação do FabT aos seus alvos de DNA ainda é desconhecido.

2.7.5 Base estrutural do mecanismo de ação do FapR

A estrutura cristalina do sítio ativo do FapR, sozinho e complexado com malonil-CoA, forneceu uma primeira noção sobre o mecanismo de regulação da transcrição induzida por ligante da síntese de ácidos graxos e fosfolípidios (SCHUJMAN et al., 2006). O FapR, assim como muitos repressores bacterianos, é uma proteína de dois sítios ativos com um domínio N-terminal de ligação ao DNA (DBD) conectado por um conector helicoidal (α_L) a um domínio C-terminal maior (CTD). A comparação estrutural do FapR livre e ligado ao malonil-CoA revela que a ligação do ligante promove uma transição do tipo “desordem – ordem”, a qual transforma uma estreita fresta de ligação em um longo túnel ocupado pela molécula efetora. Essa modificação induzida pelo ligante se propaga em unidades HTHs, contidas no DBD, prejudicando sua associação produtiva com o DNA (Figura 27) (SCHUJMAN et al., 2006). Algumas versões estruturais mutantes da FapR, desenhadas para prejudicar suas propriedades de ligação com a malonil-CoA (super-repressores), foram condicionalmente expressas *in vivo*. Esta ação impediu a expressão do gene *fap* e resultou em uma queda acentuada da viabilidade celular (SCHUJMAN et al., 2006). Estes experimentos validam o conceito que a malonil-CoA desempenha um papel central como sinal metabólico, controlando a biossíntese de lipídeos em *B. subtilis* e, dada a ampla ocorrência desta via bioquímica em vários patógenos Gram positivos, fornecem a base para o desenvolvimento de novos antibióticos.

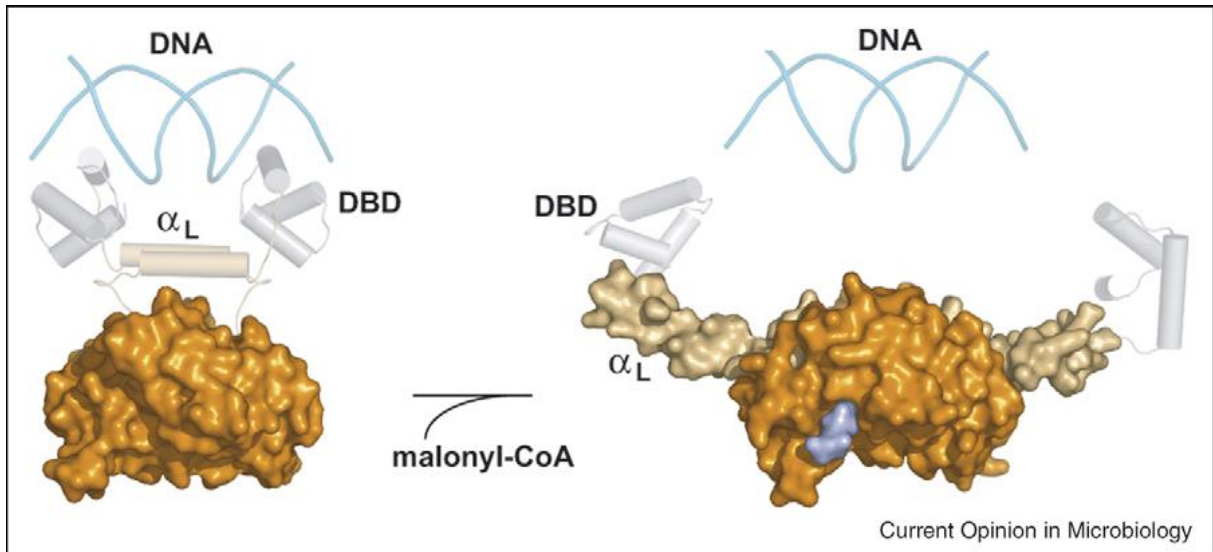


Figura 27 – Modelo proposto para a ação da FapR. A figura mostra os estados reprimidos (esquerda) e não reprimidos (ligado à malonil-CoA – direita) da FapR. Em cada caso, as superfícies moleculares representam as estruturas determinadas experimentalmente por raio X, enquanto que os DBDs (cilindros cinza) são modelados. A unidade adenosil da malonil-CoA, na forma de bastão do lado de fora do núcleo globular da FapR, está colorido em azul.

Fonte: Schujman (2008)

2.8 MECANISMOS DE ALTERAÇÃO DA BICAMADA LIPÍDICA EM VIRTUDE DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS

A membrana citoplasmática é um alvo e/ou receptor importante para fatores de estresse. Em resposta a alterações químicas e físicas permanentes do ambiente celular, vários mecanismos de defesa e reações metabólicas de adaptação foram desenvolvidos (DENICH et al., 2003). No que tange aos lipídios e ácidos graxos de membrana, estes processos são freqüentemente chamados de adaptação homeoviscosa (HÄRTIG; LOFFHAGEN; HARMS, 2005). As células controlam a fluidez de suas membranas alterando a composição de lipídios para compensar as mudanças induzidas por certos fatores ambientais, como temperatura ou presença de compostos tóxicos (PAISLEY, 1998). Na maioria dos casos, contudo, os microrganismos não conseguem compensar estas mudanças com 100% de eficácia (LOFFHAGEN; HÄRTIG; BABEL, 2004). Eles podem tolerar e talvez até mesmo necessitar de uma variedade maior de lipídios para estabelecer a homeostase, especialmente durante a fase de crescimento. Os lipídios podem coexistir em micro-

domínios separados e as funções de membrana são localmente influenciadas por muitos outros fatores além da fluidez. Segundo Härtig: “estas são as razões para as tentativas de substituir o termo adaptação homeoviscosa (para manter a fluidez da membrana) pelo uso do termo adaptação homeofásica (para ajustar a fluidez da membrana)” (2005, p. 1915).

Como já visto anteriormente, a técnica FAME faz uso de bibliotecas de perfis de ácidos graxos de microrganismos cultivados em tempo e temperatura específicos. É frente a estas bibliotecas que a amostra desconhecida será comparada, em busca de um perfil idêntico ou semelhante de ácidos graxos. Para que a identificação microbiana seja exata e confiável, torna-se vital o controle das condições ambientais de incubação da amostra, respeitando-se os parâmetros estabelecidos pelo método de análise escolhido, caso contrário alguns mecanismos de adaptação homeofásica podem ser ativados e ocasionar alterações nos perfis de ácidos graxos dos microrganismos analisados, provocando erros de comparação ou interpretação.

Os tópicos a seguir mostram os mecanismos de adaptação homeofásica que as bactérias desenvolveram em resposta às condições ambientais adversas.

2.8.1 Alteração da proporção de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática

No que diz respeito à composição de lipídios da membrana plasmática, a resposta predominante de muitas bactérias às perturbações ambientais é a mudança das estruturas moleculares dos lipídios pela alteração da proporção de ácidos graxos insaturados durante a fase de crescimento (HÄRTIG; LOFFHAGEN; HARMS, 2005). Este, por exemplo, é o principal mecanismo de adaptação do *Streptococcus mutans* a ambientes ácidos.

S. mutans é um agente etiológico causador de cáries dentárias, capaz de sobreviver em ambientes de baixo pH, metabolizar glicose e acidificar o ambiente até pH 3 (FOZO; QUIVEY, 2004). Para suportar a acidificação do ambiente, *S. mutans* utiliza uma série de mecanismos adaptativos, tais como aumento nas atividades e quantidades de F₁F₀ ATPase e de um sistema de reparo de DNA induzido por baixo pH (QUIVEY; KUHNERT; HAHN, 2000). Um dos principais

mecanismos de defesa é, no entanto, a capacidade de aumentar a proporção de ácidos graxos insaturados de sua membrana plasmática e reduzir a proporção de ácidos graxos saturados (QUIVEY et al., 2000). A Tabela 8 ilustra esta alteração de composição.

Tabela 8 – Proporções de ácidos graxos de membrana em culturas estacionárias de *S. mutans*, nos valores de pH indicados

Ácido graxo	% do total em:		
	pH 6,5	pH 6,0	pH 5,5
C _{14:0}	12,7	8,7	4,8
C _{14:1}	0,2	ND ^a	0,1
C _{16:0}	47,1	43,3	38,4
C _{18:0}	5,5	7,4	9,1
C _{18:1}	17,6	20,1	24,0
C _{20:0}	0,1	0,5	1,0
C _{20:1}	5,3	8,5	13,7
C _{14:0} + C _{16:0}	59,7	52,0	43,3
C _{18:1} + C _{20:1}	22,9	28,6	37,7

^a ND: não detectado.

Fonte: adaptado de Fozo (2004).

O mesmo mecanismo também já foi descrito anteriormente para *Acinetobacter calcoaceticus* (HÄRTIG; LOFFHAGEN; BABEL, 1999) e *Escherichia coli* (MARR; INGRAHAM, 1962).

2.8.2 Alteração do comprimento da cadeia de ácidos graxos da membrana plasmática

Algumas bactérias são capazes de encurtar ou alongar a cadeia de ácidos graxos dos lipídios de membrana, quando expostos a condições ambientais adversas. O *Streptococcus mutans*, por exemplo, quando cultivado em pH ácido, isto é, próximo de 5, aumenta gradualmente a proporção de ácidos graxos de cadeia longa, se comparada com as células cultivadas em pH 7. Mais especificamente, quando cultivado em pH 7, 68% da membrana consiste da soma de ácidos graxos

C_{14:0} e C_{16:0}, ao passo que em pH 5 a membrana consiste de 48% de C_{18:1} + C_{20:1} (FOZO; QUIVEY, 2004).

A *Pseudomonas oleovorans* também aumenta o comprimento das cadeias de ácidos graxos da membrana, quando cultivada em um meio de cultura de valor nutricional pobre (CHEN; JANSSEN; WITHOLT, 1995). Quando cultivada em um meio líquido bifásico, contendo uma mistura de água e 5 a 95% de *n*-octano, a membrana celular de *P. oleovorans* é alterada, como visualizado por microscopia eletrônica (PREUSTING; KINGMA; WITHOLT, 1991), por análise de ácidos graxos de lipídios e por medições da fluidez da membrana (CHEN et al., 1995). Mais especificamente, a composição de ácidos graxos da membrana se altera: mais ácidos graxos 18:1, mais ácidos graxos insaturados e ácidos graxos insaturados *trans* são formados (CHEN; JANSSEN; WITHOLT, 1995). A consequência dessas alterações é o aumento da temperatura de transição dos lipídios de membrana em cerca de 20 °C (CHEN et al., 1995), o que compensa os efeitos fluidizantes do *n*-octano (LOHNER, 1991).

2.8.3 Aumento na proporção de ácidos graxos de cadeia ramificada

A *Listeria monocytogenes* pode crescer em uma ampla faixa de pH, isto é, de 4,1 a 9,0 (TIENUNGOON et al., 2000), aumentando sua habilidade de resistir a processos de fabricação alimentícios e tratamentos de descontaminação (TAORMINA; BEUCHAT, 2002). Ela também possui uma capacidade impressionante de modular os lipídios de sua membrana para manter a fluidez da membrana e funções de transporte (CRONAN J. E., 2003) em resposta ao estresse por temperatura (ANNOUS et al., 1997), concentração salina (CHIHIB et al., 2003) e CO₂ / anaerobiose (JYDEGAARD-AXELSEN et al., 2004). Essa capacidade é atribuída ao teor atipicamente alto de ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), mais especificamente, das formas iso e anteiso, e de sua habilidade de modular o teor geral e as proporções de AGCR, ácidos graxos de cadeia linear e ácidos graxos insaturados (KANEDA, 1991). Por exemplo, uma redução na temperatura ambiental leva a um aumento na quantidade das formas anteiso presentes nas membranas celulares de *L. monocytogenes*, ao passo que um aumento na temperatura provoca

uma redução na quantidade das formas anteiso e outros AGCRs presentes na membrana (NICHOLS et al., 2002).

Frente a alterações súbitas de pH, a *L. monocytogenes* consegue manipular rapidamente o teor de AGCR e das proporções relativas das formas iso e anteiso, como um mecanismo de adaptação muito sensível e eficiente. Em condições alcalinas, ela desenvolve proporções maiores de AGCRs, incluindo mais formas anteiso. Em condições ácidas, o oposto ocorre (GIOTIS et al., 2007).

Este é o mesmo mecanismo de adaptação utilizado pelo *Bacillus subtilis* quando exposto a etanol (KONOPASEK; STRZALKA; SVOBODOVA, 2000), assim como por *Staphylococcus haemolyticus* quando exposto a tolueno. Este último eleva a proporção de ácidos graxos anteiso e reduz a proporção de ácidos graxos saturados, fazendo com que sua membrana se torne mais fluida (NIELSEN et al., 2005); este comportamento é exatamente o oposto do que ocorre com bactérias Gram negativas expostas a solventes, as quais promovem alterações em suas membranas de forma a torná-la menos fluida (PINKART et al., 1996).

2.8.4 Formação de ácidos graxos do tipo ciclopropano

Embora a ciclopropanação esteja amplamente distribuída entre as bactérias, as funções dos ácidos graxos do tipo ciclopropano (AGCs) não são óbvias, visto que os fosfolipídios que os contêm possuem propriedades físicas e químicas semelhantes aos lipídios que contêm ácidos graxos insaturados. Nem a completa ausência de AGCs, nem sua superprodução em todas as fases de crescimento foram capazes de afetar a velocidade de crescimento ou sobrevivência sob condições laboratoriais de cultivo (GROGAN; CRONAN, 1997).

Em *Escherichia coli*, proporções aumentadas de ácidos graxos do tipo ciclopropano foram encontradas em membranas de microrganismos estressados por ácidos (BROWN; ROSS, 1997). O gene *cfa* é o responsável por codificar a CFA sintase, a qual sintetiza AGC; experimentos recentes comprovaram que a expressão deste gene é estimulada em pH ácido (HAYES et al., 2006). Cepas mutantes, deficientes em *cfa*, são mais susceptíveis que as cepas selvagens quando o pH muda rapidamente de 7 para 3. (CHANG; CRONAN, 1999). Este choque ácido

ocorre quando os microrganismos ingeridos passam através do estômago e acredita-se que a sobrevivência ao choque seja importante para a eficiência da patogênese (CRONAN J. E., 2002).

Embora esta modificação lipídica não seja, obviamente, o único mecanismo de sobrevivência em pH ácido, a formação de AGC fornece a maior proteção contra o choque ácido para todas as moléculas da estrutura da bicamada lipídica (CHANG; CRONAN, 1999). Vários modelos foram elaborados para explicar o papel do AGC na proteção do choque ácido. O efeito mais direto seria um decréscimo na permeabilidade de prótons devido à conversão de AGI para AGC dentro do fosfolípido. É importante ressaltar que as cepas patogênicas de *E. coli* são mais resistentes à pH ácido do que as não patogênicas, além de possuírem maior teor de AGC (BROWN; ROSS, 1997).

2.8.5 Isomerização de ácidos graxos de conformação *cis* para *trans*.

As duplas ligações existem em dois diastereoisômeros: *cis* (ou *Z*, de acordo com a nova nomenclatura) e *trans* (ou *E*). Ambos os isômeros retorcem as cadeias acil nos quais residem, embora este efeito, quando provocado pelos isômeros *cis*, seja muito maior (CRONAN J. E., 2002) (Figura 28). Praticamente todas as duplas ligações dos ácidos graxos naturais são isômeros *cis*, embora a ocorrência de ácidos graxos *trans* seja bem documentada em um número restrito de bactérias, como *Pseudomonas* e *Vibrio* (KEWELOH; HEIPIEPER, 1996). Essas bactérias contêm uma mistura de isômeros *cis* e *trans* e vários fatores de estresse ambientais podem provocar aumento no número de isômeros *trans* e redução dos isômeros *cis* (CRONAN J. E., 2002). A razão *trans:cis* de ácidos graxos de membrana da *P. putida* aumenta linearmente de 30 a 40 vezes quando a temperatura é elevada (HEIPIEPER et al., 1996); resultados semelhantes foram obtidos com o *Vibrio*, uma bactéria psicrófila (MORITA et al., 1993). A enzima da *Pseudomonas putida* responsável por catalisar a isomerização, denominada *cis-trans* isomerase (Cti), foi demonstrada e purificada (PEDROTTA; WITHOLT, 1999).

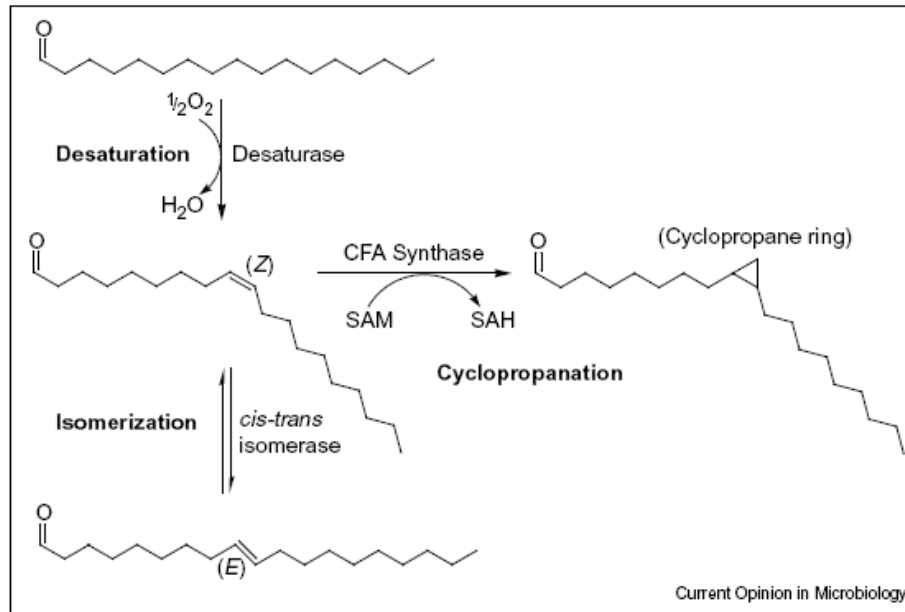


Figura 28 – Modificação das duplas ligações de cadeias acil de lipídios bacterianos. A dupla ligação da cadeia acil *cis* (*Z*) – estrutura central – pode ser formada por desnaturação, isomerizada para uma cadeia acil *trans* (*E*), ou metilenada para formar um anel ciclopropano. Observe que a configuração da dupla ligação fica conservada durante a reação de ciclopropanação. A cadeia mostrada, junto com a função carbonila do grupo éster que une a cadeia ao esqueleto de fosfolipídios, é de um ácido graxo C16 com uma dupla ligação na nona posição. Observe que as desnaturases bacterianas são raras. A maioria das bactérias introduz a dupla ligação *cis* durante a síntese dos ácidos graxos. SAH = S-adenosilhomocisteína; SAM = S-adenosilmetionina.
Fonte: Cronan (2002)

Alguns avanços foram obtidos na tentativa de descobrir o motivo pelo qual as bactérias convertem seus ácidos graxos insaturados *cis* (cAGI) para o isômero *trans* (tAGI). Sabe-se hoje que níveis aumentados de cAGI diminuem a temperatura de transição de fase da bicamada lipídica e aumentam sua permeabilidade, ao passo que níveis aumentados de tAGI ou ácidos graxos saturados (AGS) provocam o efeito oposto (KEWELOH; HEIPIEPER, 1996). Isso se deve ao melhor empacotamento das cadeias de AGS ou tAGI; o impedimento estérico causado pela dupla ligação *cis* resulta em um empacotamento muito menos rígido e conseqüente diminuição da temperatura de transição (CRONAN J. E., 2002) (Figura 29).

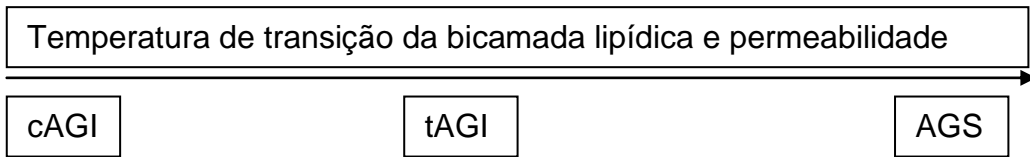


Figura 29 – Efeito das duplas ligações das cadeias de ácidos graxos sobre a temperatura de transição da membrana citoplasmática de bactérias. cAGI = ácidos graxos insaturados cis; tAGI = ácidos graxos insaturados trans; AGS = ácidos graxos saturados

Fonte: acervo pessoal

Isto significa que em altas temperaturas as membranas de *Pseudomonas* e *Vibrio* podem se tornar muito fluidas para um crescimento ótimo e a conversão de cAGI para tAGI permite que a membrana reduza rapidamente sua fluidez e permita um melhor crescimento. Portanto, a isomerização *cis*→*trans* parece ser um mecanismo muito rápido de adaptação da composição lipídica a elevadas temperaturas.

2.8.6 Alteração da atividade das bombas de efluxo de membrana

Um dos mecanismos mais relevantes desenvolvidos pelas bactérias, para resistirem ao efeito letal de substâncias químicas, é a redução ativa da entrada dessas substâncias na célula através da ação de bombas de efluxo de membrana (RAMOS et al., 2002). Estas bombas de efluxo expulsam uma ampla gama de substâncias químicas naturais e sintéticas, mesmo que estruturalmente não relacionadas (DUQUE et al., 2007) e, portanto se constituem em uma barreira eficiente contra substâncias químicas tóxicas.

A *Pseudomonas putida* exibe a característica incomum de ser altamente tolerante a solventes orgânicos (MOSQUEDA; RAMOS, 2000), tais como tolueno, xileno e estireno, os quais são capazes de se dissolverem na membrana celular, desorganizá-la, causar a perda de lipídios e proteínas e eventualmente levar a morte celular (RAMOS et al., 2002). A tolerância ao solvente nesta espécie é atribuída ao resultado de um trabalho em conjunto entre três sistemas de efluxo, conhecidos como TtgABC, TtgDEF e TtgGHI (SEGURA et al., 2004). Destas três bombas de efluxo, a TtgGHI parece ser a mais eficiente na remoção de solventes, de um ponto

de vista quantitativo (ROJAS et al., 2001). Os óperons *ttgGHI* e *ttgDEF* são induzidos em resposta à exposição a solventes (GUAZZARONI et al., 2005), ao passo que a bomba de efluxo TtgABC é expressa constitutivamente. Esta última bomba protege a célula não somente contra solventes, mas também contra antibióticos, compostos monocatiônicos (ex.: brometo de etídio) e produtos tóxicos secundários de plantas (TERÁN et al., 2006).

2.9 VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO SISTEMA FAME EM RELAÇÃO A OUTROS SISTEMAS AUTOMATIZADOS

2.9.1 Vantagens

Normalmente, os sistemas automatizados para identificação microbiana têm sua base de dados construída sobre cepas e espécies obtidas de coleções de culturas bem descritas como a American Type Culture Collection (ATCC) ou National Type Culture Collection (NTCC) (OLSON, 1996). O sistema FAME, no entanto, construiu suas bibliotecas através da análise de microrganismos extraídos de amostras clínicas e do meio ambiente de várias partes do mundo, para eliminar tendências relacionadas a um determinado nicho ou localização geográfica (MIDI, 2005).

A biblioteca ampla do sistema FAME, com suas mais de 1500 bactérias, permite que o sistema identifique corretamente bactérias que os sistemas baseados em consumo de substrato não conseguem. Por exemplo, um grande número de *Methylobacterium spp* e *Pseudomonas vesicularis* foi identificado corretamente pelo sistema FAME, mas não pelo VITEK® ou pelo BIOLOG® (OLSON, 1996).

O sistema FAME não requer que uma coloração de Gram seja efetuada antes da análise propriamente dita, pois há diferenças químicas significativas entre bactérias Gram negativas e Gram positivas. Isto é claramente uma vantagem, se considerarmos que os sistemas baseados em substratos exigem uma coloração de Gram prévia e exata, pois caso ela seja interpretada erroneamente, causará um erro grosseiro no sistema VITEK® ou BIOLOG® (OLSON, 1996).

O microrganismo isolado deve ser incubado por 24 horas para ser analisado pela técnica FAME, pois 40 mg ou mais de células é necessário. O que, à princípio, poderia ser uma desvantagem, é na verdade uma vantagem, pois este tempo de incubação determina se as bactérias não são viáveis ou se são apenas de crescimento lento, além de fornecer também material suficiente para outras análises complementares, tais como sondas de DNA ou RNA. Existe a possibilidade da análise de ácidos graxos a partir de uma única colônia, onde os ésteres metílicos são gerados através de hidróxido de trimetilsulfônio (OLSON, 1996).

Uma vez que uma quantidade suficiente de inóculo seja obtida para análise pela técnica FAME, a amostra pode ser autoclavada e transportada sem avisos de advertência ou considerações especiais, visto que o material não é infeccioso ou não é viável (OLSON, 1996). O próprio procedimento de extração de ácidos graxos destrói as bactérias, tornando o material não infeccioso (MIDI, 2005). Isto não seria possível com as técnicas baseadas em consumo de substrato, onde bactérias viáveis são necessárias para transformar os substratos.

A Tabela 9 mostra um resumo das vantagens da técnica FAME sobre métodos bioquímicos ou genotípicos.

Tabela 9 – Vantagens da técnica FAME sobre métodos bioquímicos ou genotípicos

Sobre Testes Bioquímicos	Sobre Identificações Baseadas em DNA
A análise de ácidos graxos é mais objetiva e menos suscetível ao erro humano.	O custo por amostra da análise de ácidos graxos é baixa se comparado com as técnicas de DNA.
Os testes bioquímicos exigem um controle de qualidade extensivo a cada novo lote.	A habilidade técnica requerida para análises de DNA é alta.
Em contraste com os testes bioquímicos, a composição dos ácidos graxos não é influenciada por perda ou ganho de plasmídeos e é raramente influenciada por mutações de organismos.	A análise de ácidos graxos pode identificar até o nível de cepa versus o nível de espécie para a maioria dos métodos baseados em DNA.
A análise de ácidos graxos é baseada em banco de dados de espécies (leva em conta a variabilidade normal das espécies) versus uma série de respostas do tipo sim ou não.	A identificação baseada em DNA é muito trabalhosa.
As identificações bioquímicas podem levar vários dias, comparadas às poucas horas para identificação por ácidos graxos.	A identificação baseada em DNA pode levar vários dias, comparada às poucas horas para identificação por ácidos graxos.
Os consumíveis são de baixo custo.	Os consumíveis são de baixo custo.

Fonte: MIDI (2005)

2.9.2 Limitações

Quando vários microrganismos compartilham o mesmo nicho ecológico (ex: bactérias entéricas) e possuem composições semelhantes de ácidos graxos, a identificação pode ser difícil (OLSON, 1996).

Os métodos fenotípicos de identificação bacteriana, inclusive o método FAME, estão sujeitos à variação de expressão dentro do mesmo microrganismo isolado, devido às pressões ambientais e aquisição de DNAs extra-cromossomais carregando genes que possam alterar seu fenótipo (FARBER et al., 2001). Isso pode resultar em:

- Bactérias taxonomicamente distantes exibindo padrões fenotípicos semelhantes e levando a uma falsa conclusão de que elas são semelhantes;
- Cepas semelhantes exibindo padrões fenotípicos distintos e levando a uma falsa conclusão de que elas são diferentes.

Alterações no meio de cultura recomendado, nas condições de cultivo, seja temperatura ou tempo, ou no procedimento de preparação do extrato irão alterar os perfis de ácidos graxos, levando a resultados de identificação errados ou duvidosos (MIDI, 2005). Diferenças na idade fisiológica da população microbiana no momento da análise podem ocasionar resultados variáveis. Vários pesquisadores demonstraram uma variação, tanto qualitativa quanto quantitativa, entre a composição de ácidos graxos e a idade da população bacteriana (OLSON, 1996). As condições de cultivo recomendadas para a técnica FAME (28 ± 1 °C por 24 ± 2 horas) oferecem um potencial para diferenças na idade fisiológica das bactérias, devido à baixa temperatura de incubação e o conseqüente aumento do tempo de geração (OSTERHOUT; SHULL; DICK, 1991). A composição mais estável de ácidos graxos é obtida na fase log tardia, equivalente às células do terceiro quadrante de uma placa semeada no padrão em estrias em quadrantes.

Há ligeiras, mas significativas diferenças, na composição química dos meios de cultura empregados para o cultivo das bactérias, que podem ocasionar alterações quantitativas no perfil de ácidos graxos (MIDI, 2005). Conseqüentemente, o analista deve seguir corretamente os procedimentos de preparação.

Vibrio spp ocasionalmente demonstra variações na morfologia da colônia, que acarreta variações no perfil de ácidos graxos e conseqüente falha na identificação ou baixo índice de similaridade.

A área total sob os picos, em unidades de microvolt-segundos, reflete a quantidade relativa de ácidos graxos. A área total de uma amostra deve estar entre 50000 e 300000. Se a área total ficar abaixo de 50000, a amostra deve ser corrida novamente; se a área total ficar acima de 300000, a amostra deve ser diluída e corrida novamente. Muito poucas células podem não fornecer ácidos graxos suficientes para uma comparação confiável com o banco de dados; por outro lado, células demais podem gerar altas contagens de área e sobrecarga da coluna, com subseqüente alteração nos tempos de retenção (OLSON, 1996). Estes picos podem não ser nomeados adequadamente e a comparação com o banco de dados será inválida.

Algumas bactérias, embora vivas, não podem ser detectadas por métodos microbiológicos convencionais. A este estado, em que as bactérias se mantêm metabolicamente ativas, porém fragilizadas e incapazes de se desenvolver normalmente, é dado o nome de VBNC (do inglês Viable but Non Culturable Bacteria ou Bactérias Viáveis Não Cultiváveis) (OLIVER, 2005). A possibilidade de um medicamento estar contaminado com alguma bactéria no estado VBNC é uma preocupação especial e, ao mesmo tempo, real. As condições que induzem uma bactéria a entrar no estado VBNC são fundamentalmente ambientais, tais como escassez de nutrientes, alterações bruscas de temperatura, baixa concentração de oxigênio, exposição à luz branca (LECLERC, 2003), além de tratamentos com desinfetantes e estresse oxidativo (STEPHENS; MACKEY, 2003). Nem todas as bactérias entram neste estado quando expostas a estes agentes estressores naturais (STEPHENS; MACKEY, 2003); a Tabela 10 mostra que há uma predominância de bactérias Gram negativas, mas há também Gram positivas, como *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*.

Tabela 10 – Bactérias capazes de entrar no estado VBNC (Viable but Non Culturable Bacteria)

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Aquaspirillum sp.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio campbellii</i>
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Pasteurella piscida</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Vibrio natriegens</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Vibrio proteolytica</i>
<i>Escherichia coli</i> (incluindo EHEC)	<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Vibrio shiloi</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>Vibrio vulnificus</i> (tipos 1 e 2)
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Salmonella typhi</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Klebsiella planticola</i>		

Fonte: Oliver (2005)

O fato de uma bactéria estar viva, mas não ser cultivável, torna-se uma limitação para todos os métodos fenotípicos de identificação bacteriana, principalmente aqueles baseados em consumo de substrato.

2.10 CUIDADOS QUE DEVEM SER TOMADOS PARA GARANTIR A QUALIDADE DO RESULTADO DE IDENTIFICAÇÃO PELO SISTEMA FAME

2.10.1 Septo

O septo é o componente do CG trocado com maior frequência. Trata-se de um disco de borracha que é furado pela agulha para introduzir a amostra no CG. Depois de repetidas injeções, o septo poderá começar a vaziar, originando tempos de retenção instáveis, perda de resposta e / ou perda de pressão na cabeça da coluna.

Para uma operação confiável, o septo deve ser trocado (junto com o alinhador de injeção) após 100 injeções (MIDI, 2005).

Nota: para não danificar a coluna, é recomendável resfriar a coluna para próximo da temperatura ambiente antes de trocar o septo.

2.10.2 Alinhador da porta de injeção ou "Injection port liner"

A porta de injeção vaporiza as amostras líquidas e mistura os vapores para produzir uma amostra homogênea. A técnica FAME opera a uma taxa de repartição de 1:100 (MIDI, 2005), significando que 1/100 da amostra de fato entra na coluna capilar, enquanto o resto é expulso.

A vaporização e a mistura ocorrem em um tubo de vidro aquecido dentro da porta de injeção, abaixo do septo. Este tubo de vidro, chamado alinhador da porta de injeção, possui uma superfície desativada para evitar interação com os componentes

da amostra. O interior deste tubo deve estar limpo e livre de partículas, tais como pequenos pedaços de septo quebrado devido a repetidas injeções.

Embora o alinhador da porta de injeção seja mantido a 250 °C, resíduos carbônicos dos extratos das amostras tendem a se acumular com o tempo. Se cuidados apropriados não forem tomados, pequenas quantidades de hidróxido de sódio (NaOH) provenientes da lavagem alcalina na preparação da amostra também podem ser transportadas para o extrato do CG, reduzindo a recuperação dos hidróxi ácidos.

Como a biblioteca do sistema de identificação contém um registro para o Padrão de Calibração, o IS pode ser utilizado para monitorar o desempenho geral do sistema, pois ele cai rapidamente quando a recuperação quantitativa dos hidróxi ácidos se torna inaceitável, sendo que o limite mínimo aceitável é de 0,900. Quando o desempenho cair a um nível inaceitável, um pequeno pico de ECL igual a 10,914 geralmente surge, indicando a quebra do pico hidróxi 14:0 3OH para um aldeído 12:0. Além disso, o pico 14:0 3OH pode cair para menos que 1,00%, ou o pico 16:0 2OH pode cair para baixo de 2,05%, indicando desempenho ruim (PAISLEY, 1998).

Se algum dos casos acima for observado, uma ação corretiva deve ser tomada, como troca do “liner” de injeção.

2.10.3 Coluna

A causa principal de danos à coluna é devido à preparação inadequada da amostra (PAISLEY, 1998). Muito cuidado deve haver para evitar que se tome qualquer parte da fase inferior (aquosa) ao transferir o extrato orgânico para o “vial” do CG.

Uma coluna danificada resulta em picos com caudas. De novo, da mesma forma que com alinhadores de porta de injeção contaminados, os hidróxi ácidos são os primeiros a apresentar cauda. Neste caso, o sistema gera uma mensagem de erro indicando que os picos do padrão de calibração estão com caudas.

Esta situação é mais freqüente devido aos alinhadores de porta de injeção sujos, que devem ser substituídos antes de trocar a coluna. Se o problema persistir, a coluna deverá ser substituída.

2.10.4 Vidrarias

Algumas precauções são necessárias para eliminar possíveis contaminações de amostra por vidraria suja.

- Tubos de cultura e tampas de rosca são reutilizáveis e são facilmente limpos por imersão em um detergente de alta qualidade, seguido por rinsagem com água purificada. Recomenda-se, no entanto, que os tubos de vidro e as tampas sejam utilizados apenas uma vez e descartados após o uso (MIDI, 2005).
- Os frascos de reagentes devem possuir tampas de Teflon®. Os frascos devem ser limpos e rinsados com água purificada antes da preparação dos reagentes.
- As ponteiros descartáveis das pipetas Pasteur embaladas com “pads” de espuma devem ser aquecidas ou flambadas antes do uso para eliminar picos de contaminantes na análise cromatográfica.

Ao analisar as amostras, deve-se verificar o procedimento de preparação da amostra quanto à limpeza e pureza dos reagentes correndo, em paralelo, um branco (procedimento completo sem células adicionadas).

2.10.5 Reagentes ou meios de cultura

Alguns cuidados devem ser tomados para a preparação dos meios de cultura ou reagentes (PAISLEY, 1998):

- Os reagentes devem ser preparados em frascos de vidro âmbar;
- Somente vidro e Teflon® devem entrar em contato com os reagentes;
- O ácido clorídrico 32% utilizado deve ser adquirido em frascos de vidro;
- A água utilizada deve ser de alta qualidade;
- Os reagentes não devem entrar em contato com materiais plásticos ou borracha, pois picos indesejados poderiam aparecer no cromatograma;

- Há pequenas, mas significativas, diferenças na composição química de um meio de cultura de acordo com o fornecedor; diferenças essas que podem causar alterações quantitativas no perfil de ácidos graxos.

2.10.6 Gases

Tubos de cobre, válvulas, ajustes e algumas vezes os próprios cilindros de gases podem conter traços de materiais orgânicos e água. Estes contaminantes podem resultar em linhas de base altas ou com ruídos, produzir picos fantasmas ou até mesmo obstruir a distribuição dos gases. Por esta razão, é imprescindível a utilização de gases com 99,999% de pureza e com a adição de um filtro de linha (MIDI, 2005).

2.10.7 Condições de cultivo e incubação da amostra

A reprodução dos microrganismos ocorre de uma maneira que pode ser representada graficamente, na forma de uma curva de crescimento.

Embora mudanças de parâmetro possam afetar esta curva de crescimento, ela é geralmente a mesma para todos os microrganismos. A curva consiste de quatro estágios ou fases. São elas a fase lag, fase log, fase estacionária e fase de declínio ou morte.

Na fase lag, o crescimento e a reprodução estão acabando de começar a ocorrer. Durante a fase log, a reprodução ocorre em uma velocidade exponencial. Este crescimento exponencial ocorre até que o meio ambiente circundante e o fornecimento de nutrientes suportem.

Os microrganismos então entram na fase estacionária. Nesta fase, o número de microrganismos alcançou seu limite. Embora a reprodução dos microrganismos ainda continue, o número de microrganismos não aumenta com a velocidade da fase log. Finalmente, quando todos os nutrientes estiverem exauridos, os microrganismos entrarão na fase de declínio. Nesta fase, a população começa a desaparecer.

A Figura 30 mostra uma curva de crescimento típica.



Figura 30 - Curva de Crescimento Microbiano
Fonte: KYAW (2008)

O objetivo do repique em quatro quadrantes é criar quatro densidades de células e verificar a pureza da cultura.

As composições de ácidos graxos mais estáveis são de culturas na fase log tardia, representada pelo quadrante 3, uma vez que ao final da fase log, muitas bactérias passam a apresentar fenótipos novos, decorrentes do processo de comunicação denominado "quorum sensing" (KYAW, 2008). A biblioteca do sistema FAME foi desenvolvida selecionando condições de incubação que são mais favoráveis para a maioria dos microrganismos.

A MIDI recomenda que sejam realizadas duas subculturas sucessivas. A primeira subcultura ajuda a avaliar a taxa de crescimento do microrganismo no meio e, portanto, a determinar o tamanho do inóculo. Já a segunda subcultura visa garantir uma composição mais estável de ácidos graxos e uma quantidade satisfatória de amostra para análise (MIDI, 2005).

2.10.8 Etapa de metilação

Esta etapa é a mais crítica do processo. Tempo ou temperatura em excesso conduzem à degradação de compostos ciclopropanos, alterando os perfis de ácidos graxos (PAISLEY, 1998).

2.11 ESTUDOS DE EQUIVALÊNCIA DA TÉCNICA FAME COM MÉTODOS CONVENCIONAIS

Em um estudo realizado em 1994, Haack et al comparou os perfis de ácidos graxos de 10 isolados microbianos de solo e avaliou se eles refletiam, de forma exata e reprodutiva, a estrutura taxonômica das comunidades com composições conhecidas. Seus resultados mostram que esta abordagem possui um grande potencial como procedimento de análise de rotina para avaliar se as comunidades microbianas são semelhantes ou não, ainda mais se combinadas com outras medidas de função e estrutura de comunidades (HAACK et al., 1994).

Tem havido muita ênfase na necessidade de confirmar a identificação dos picos de ácidos graxos obtidos pela técnica FAME com abordagens alternativas, como espectrofotometria de massa (VESTAL; WHITE, 1989). Isto levou, sem dúvida, à conclusão enganosa de que a análise de ácidos graxos é uma técnica cara e trabalhosa, dedicada a especialistas. Embora a confirmação seja necessária naqueles casos em que ácidos graxos muito específicos e estruturas moleculares novas devam ser analisados para fins taxonômicos, os estudos de Haack mostram que os resultados obtidos com a técnica FAME, que utiliza extratos totais de células, são equivalentes àqueles obtidos por protocolos mais tradicionais e complexos, como a análise de ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA). Além do mais, os perfis obtidos com a técnica FAME se mostraram altamente reprodutíveis sob as condições especificadas de crescimento e semelhantes aos perfis gerados por PLFA, relatados na literatura (HAACK et al., 1994).

Os fatores que influenciam a exatidão das estimativas de biomassa ou interpretações taxonômicas a partir dos perfis de ácidos graxos são os mesmos para a técnica FAME e para PLFA. São eles:

- a) A semelhança de ácidos graxos dominantes em perfis de grupos taxonômicos muito distintos (KANEDA, 1991);
- b) A falta de ácidos graxos típicos de uma espécie como uma alta porcentagem do total (RATLEDGE; WILKINSON, 1988);
- c) Grande variação das porcentagens de ácidos graxos entre os grupos taxonômicos (BAATH; FROSTEGARD; FRITZE, 1992);
- d) O estado relativamente imaturo de nosso conhecimento a respeito da quantidade e distribuição relativa dos ácidos graxos pelos grupos taxonômicos, considerando as variáveis ambientais (HAACK et al., 1994).
- e) A dificuldade de acessar dados de ácidos graxos na literatura (GUCKERT et al., 1992).

A técnica FAME também se mostrou equivalente a protocolos de identificação mais tradicionais. Em um estudo comparativo da técnica FAME com séries bioquímicas para identificação de estafilococos, houve uma concordância de 87,8% entre os resultados. A técnica FAME conseguiu identificar todas as cepas de *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. sciuri* e *S. xylosus*. Em outras ocasiões, a técnica FAME se mostra complementar às técnicas tradicionais. Por exemplo, o perfil de ácidos graxos é um parâmetro que deve ser avaliado em conjunto com a fermentação da celobiose e lactose e a falta de pigmento para diferenciar a *Prevotella zoogloformans* das outras espécies de *Prevotella* indol positivas. Da mesma forma, a determinação da proporção de ácidos graxos de cadeia longa, além da determinação do tipo de parede celular, é uma característica chave para diferenciação da *Nocardia* de outros gêneros de actinomicetos aeróbios (WINN et al., 2005).

2.12 TÓPICOS AVANÇADOS SOBRE A TÉCNICA FAME

Uma vez que o microrganismo foi cultivado, processado e adequadamente analisado pelo software Sherlock®, sua composição de ácidos graxos pode coincidir com algumas composições dos microrganismos conhecidos que estão armazenadas nas bibliotecas padrões. Os perfis das bibliotecas padrões foram cuidadosamente desenvolvidos para levar em consideração as variações experimentais e de cepa para cepa (MIDI, 2005). Por fim, o sistema gera um relatório que lista as coincidências mais prováveis do microrganismo desconhecido e fornece um índice de similaridade (IS) para cada coincidência.

2.12.1 Padrão de calibração

O padrão de calibração fornecido pela MIDI contém uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos C9:0 a C20:0, utilizados pelo sistema para quantitativamente calibrar e compensar a diferença da área do pico entre ácidos graxos de baixo e alto ponto de ebulição. Cinco hidróxi ácidos são adicionados à mistura para detectar uma eventual degradação da coluna ou do alinhador da porta de injeção.

2.12.2 Índice de similaridade (IS)

Muitos sistemas de identificação microbiana apresentam os resultados como porcentagens de “probabilidade”. Dessa forma, um sistema pode gerar um resultado de 98% de probabilidade para a identificação de um isolado. A premissa básica por trás destas “probabilidades” é que as espécies são grupos bem definidos de organismos com pequena variação nas reações frente a certos testes bioquímicos. Uma vez que as comparações são tradicionalmente feitas entre dois ou mais sistemas de testes bioquímicos, as comparações são, na verdade, entre a qualidade

dos ensaios enzimáticos realizados por estes sistemas. Mesmo quando a identificação seja incorreta, a “probabilidade” da identificação pode ser bem alta e pode ser “confirmada” utilizando um sistema enzimático semelhante.

As técnicas mais modernas, tais como homologia de DNA e análise de ácidos graxos, exigem outros modos de expressar a identificação dos microrganismos. O padrão atual para homologia de DNA é que acima de 70% de homologia indicaria que duas cepas sejam da mesma espécie.

A técnica utilizada pelo sistema Sherlock® é baseada no Índice de Similaridade (IS). O IS é um valor numérico, que expressa o quão próxima a composição de ácidos graxos de uma amostra desconhecida se compara com a composição de ácidos graxos de uma cepa conhecida, listada como sua coincidência no relatório. A busca no banco de dados apresenta as melhores coincidências e ISs associados. Este valor é um cálculo da distância, em um espaço multi-dimensional, entre o perfil da amostra desconhecida e o perfil mais semelhante da biblioteca. Portanto, não é uma “probabilidade” ou porcentagem, mas uma expressão da distância relativa da média da população, também chamada de distância euclidiana. Uma coincidência exata da mistura de ácidos graxos da amostra desconhecida com a média de um registro da biblioteca resultaria em um IS igual a 1,000. Como cada ácido graxo varia em relação à porcentagem média, o IS irá diminuir em proporção à variação cumulativa entre a composição da amostra desconhecida e o registro da biblioteca.

O IS assume que as espécies de microrganismos têm uma distribuição normal de Gauss e que a média da população em quaisquer séries de medidas (ex: porcentagens de ácidos graxos) caracteriza o grupo. A maioria da população cai em algum lugar próximo da média, mas os indivíduos vão diferir na composição e, portanto podem mostrar uma variação considerável em relação à média. Outra maneira de visualizar o IS é olhando para a curva de Gauss da população (neste caso, a composição de ácidos graxos). Na Figura 31 a porcentagem média perfeita para todos os ácidos graxos de uma única espécie (sem variância para qualquer ácido graxo) é indicada pela linha central. O IS para uma cepa que caia nesta linha é 1,000. À medida que a variância aumente, a cepa se distancia cada vez mais da linha e o IS cai.

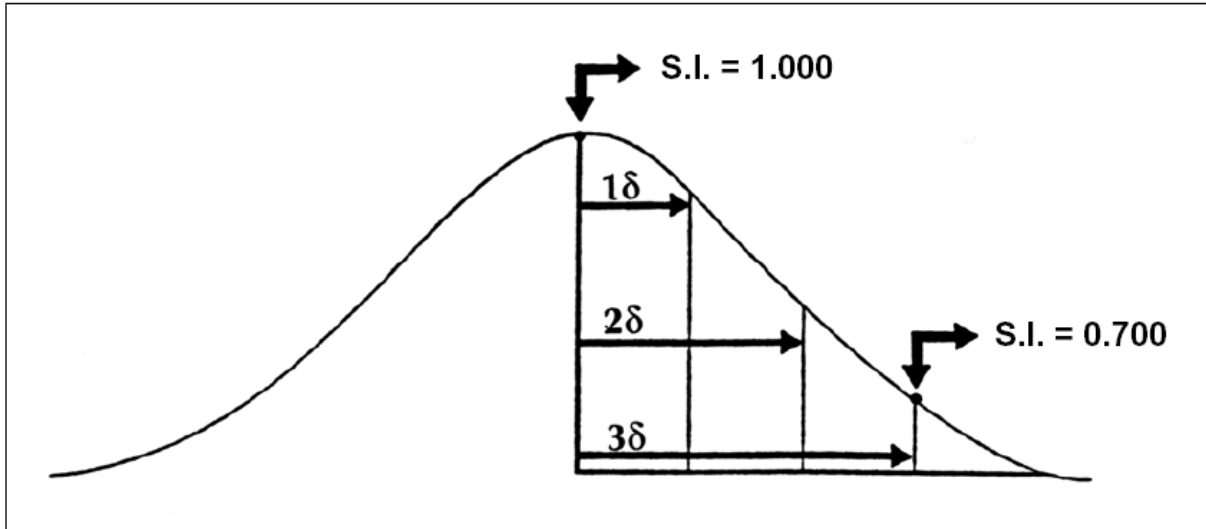


Figura 31 – Distribuição da população na biblioteca TSBA6
 Fonte: MIDI (2005)

Como pode ser visto na Figura 31, na biblioteca de TSBA6, uma cepa com um IS de 0,700 cai dentro de um intervalo de três desvios padrões da média.

2.12.3 Comprimento de cadeia equivalente (ECL)

Duas corridas com um padrão de calibração são executadas antes da análise das amostras e repetidas após cada 11 injeções. Se a análise resultar em um relatório com picos fora da faixa de tolerância ajustada para a calibração, uma advertência é impressa no relatório e a calibração é repetida. O padrão de calibração contém uma mistura de ácidos graxos em proporção conhecida. Os ésteres metílicos de ácidos graxos de cadeia linear C9:0 a C20:0 são utilizados pelo sistema para calibrar quantitativamente e compensar a diferença da área do pico entre ácidos graxos de baixo e alto ponto de ebulição. Cinco hidróxi ácidos são adicionados à mistura para detectar uma degradação no “liner” de injeção ou na coluna, o que pode resultar em um formato ruim de pico (picos com cauda), ou até mesmo uma perda real da área do pico de hidróxi ácido.

Uma segunda função do padrão de calibração é fornecer tempos de retenção exatos para os ésteres metílicos de ácidos graxos saturados de cadeia linear C9:0 a C20:0. Estes tempos de retenção são utilizados para calcular o “Equivalent Chain

Length” (ECL) ou Comprimento de Cadeia Equivalente a partir do qual os picos subseqüentes serão nomeados.

O uso do ECL é uma abordagem alternativa ao sistema de Kováts para índices de retenção. É também a abordagem mais eficiente para análise de FAME. O sistema ECL utiliza os ácidos graxos saturados de cadeia linear como compostos de referência e o valor ECL das referências é igual ao número de carbonos na cadeia de ácidos graxos saturados (MJOS, 2006).

Em condições isotérmicas, há uma relação linear entre o $\log t'_R$ e o número de carbonos em uma série homóloga e o valor de ECL de um composto x pode ser calculado pela seguinte equação:

$$ECL_x = n \frac{\log t'_R(x) - \log t'_R(z)}{\log t'_R(z+n) - \log t'_R(z)} + z \quad (2)$$

Se a biblioteca possuir um registro para o Padrão de Calibração, o IS pode ser utilizado para monitorar o desempenho geral do sistema. O IS cai rapidamente quando a recuperação quantitativa de hidroxí ácidos se torna inaceitável. O limite aceitável para o IS está na faixa de 0,980 a 1,000. O relatório de calibração também deve ser examinado quanto a sinais de baixa recuperação de hidroxí ácidos. À medida que o desempenho diminui a um nível inaceitável, um pequeno pico em 10,914 ECL geralmente aparece, indicando a quebra do pico de hidroxí 14:0 3OH para um aldeído 12:0. Da mesma forma, o pico 14:0 3OH pode cair para baixo de 1,00% ou o pico de 16:0 2OH pode cair para baixo de 2,05%, indicando baixo desempenho. Em qualquer um dos casos, medidas corretivas devem ser tomadas, como troca do “liner” de injeção.

2.12.4 Calibração da coluna

A calibração da coluna é uma ação corretiva a ser tomada para alguns problemas, como quando a porcentagem da área nomeada é menor que 85% ou quando algum pico foi sinalizado pelo sistema como duvidoso.

A pressão na cabeça da coluna e a temperatura de calibração do forno podem ser ajustadas para compensar a pequena variação entre colunas novas e pelos desvios que aparecem após um longo tempo de uso. Ao calibrar a coluna, os ECLs dos hidroxi ácidos serão centralizados nos ECLs esperados, listados na tabela de nomeação de picos. Isto fará com que o sistema apareça idêntico ao que gerou as bibliotecas e conferirá um valor de desvio máximo em que os picos ainda sejam corretamente nomeados.

O ECL dos ácidos graxos 2OH varia +0,012 a cada 1 °C de alteração na temperatura de eluição do pico. O primeiro pico hidroxi da corrida (10:0 2OH) é mais influenciado pela temperatura inicial e pode ser ajustada pela calibração da temperatura do forno. O último pico hidroxi a sair (16:0 2OH) é mais influenciado pela velocidade linear (fluxo) do gás carreador e pode ser ajustado pela pressão da cabeça da coluna. Os dois ajustes estão de certa forma inter-relacionados, como mostra a Figura 32.

ECL		<u>10:0</u> <u>2OH</u>	11.152	11.153	11.154	11.155	11.156 target	11.157	11.158	11.159	11.160
<u>16:0 2OH</u>											
17.230	Temp		-1.74	-0.83	+0.08	+0.99	+1.90	+2.81	+3.72	+4.63	+5.54
	Press		-0.64	-0.69	-0.74	-0.79	-0.84	-0.89	-0.94	-0.99	-1.04
17.231	Temp		-2.21	-1.30	-0.39	+0.52	+1.43	+2.34	+3.25	+4.16	+5.07
	Press		-0.43	-0.48	-0.53	-0.58	-0.63	-0.68	-0.73	-0.78	-0.83
17.232	Temp		-2.69	-1.78	-0.87	+0.04	+0.95	+1.86	+2.77	+3.68	+4.59
	Press		-0.22	-0.27	-0.32	-0.37	-0.42	-0.47	-0.52	-0.57	-0.62
17.233	Temp		-3.16	-2.25	-1.34	-0.43	+0.48	+1.39	+2.30	+3.21	+4.12
	Press		-0.01	-0.06	-0.11	-0.16	-0.21	-0.26	-0.31	-0.36	-0.41
17.234	Temp		-3.64	-2.73	-1.82	-0.91	0.00	+0.91	+1.82	+2.73	+3.64
target	Press		+0.20	+0.15	+0.10	+0.05	0.00	-0.05	-0.10	-0.15	-0.20
17.235	Temp		-4.12	-3.21	-2.30	-1.39	-0.48	+0.43	+1.34	+2.25	+3.16
	Press		+0.41	+0.36	+0.31	+0.26	+0.21	+0.16	+0.11	+0.06	+0.01
17.236	Temp		-4.59	-3.68	-2.77	-1.86	-0.95	-0.04	+0.87	+1.78	+2.69
	Press		+0.62	+0.57	+0.52	+0.47	+0.42	+0.37	+0.32	+0.27	+0.22
17.237	Temp		-5.07	-4.16	-3.25	-2.34	-1.43	-0.52	+0.39	+1.30	+2.21
	Press		+0.83	+0.78	+0.73	+0.68	+0.63	+0.58	+0.53	+0.48	+0.43
17.238	Temp		-5.54	-4.63	-3.72	-2.81	-1.90	-0.99	-0.08	+0.83	+1.74
	Press		+1.04	+0.99	+0.94	+0.89	+0.84	+0.79	+0.74	+0.69	+0.64

Figura 32 – Tabela de ajuste da pressão e temperatura para calibração da coluna
Fonte: (MIDI, 2005)

O procedimento detalhado para calibração da coluna está descrito no Manual MIDI.

Se, durante a operação normal, a média dos ECLs dos picos 10:0 2OH ou 16:0 2OH desviarem mais que $\pm 0,002$ dos valores de referência, que são 11,156 e 17,234, respectivamente, o analista deverá fazer pequenas correções necessárias para trazê-los de volta aos valores normais. Se correções maiores devem ser feitas, o procedimento de calibração deve ser repetido (FARBER et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 MATERIAL

Adotou-se como material de estudo para este trabalho os microrganismos amostrados do ar e das superfícies de várias salas limpas para produção de medicamentos estéreis, além daqueles isolados em luvas e roupas dos operadores dessas áreas.

As tabelas a seguir listam os materiais e equipamentos utilizados para coleta, isolamento e identificação dos microrganismos pela metodologia FAME.

Tabela 11 – Materiais e equipamentos utilizados para a amostragem, cultivo e identificação dos microrganismos pela metodologia FAME (continua)

Item	Fornecedor	Código
<u>Coleta da amostra por monitoramento ambiental</u>		
Amostrador de ar STA®	New Brunswick	204
Amostrador de ar MAS-100®	Merck	1.09227.0001
<u>Preparação da amostra</u>		
Dosificador de volume variável Dispensette® III - capacidade de 1 a 10 ml	Brand	4700 140
Agitador orbital	New Brunswick	INNOVA 2100
Agitador tipo “vortex”	IKA	220A-2
Estufa a 28 °C	Heraeus	B15
Banho-maria ajustado para 80 °C	Julabo	TW20
Banho de óleo ajustado para 100 °C	Lauda	E100
Estantes para tubos de ensaio	Vários fornecedores	---

Tabela 11 – Materiais e equipamentos utilizados para a amostragem, cultivo e identificação dos microrganismos pela metodologia FAME (conclusão)

Item	Fornecedor	Código
<u>Análise cromatográfica</u>		
Cromatógrafo HP 6890	Agilent	---
Regulador do cilindro de gás hidrogênio CGA 305	Agilent	5183-4642
Regulador do cilindro de gás nitrogênio CGA 580	Agilent	5183-4644
Regulador do cilindro de ar sintético CGA 590	Agilent	5183-4645
Septo Merlin com selo de ouro	Agilent	5181-8816
Filtro de peneira molecular	Agilent	5060-9084
Estante para vials	Agilent	9301-0722
<u>Computador e software</u>		
PC com processador Intel Dual Core de 1,6 GHz, memória de 1024 Mb e disco rígido de 160 Gb	Dell	---
Windows XP Professional® em português	Microsoft	---
Software Agilent Chemstation®, versão B.01.02	MIDI	---
Software MIDI Sherlock®, com bibliotecas TSBA 4.5 e 6.0	MIDI	---
Drive para leitura e gravação de DVD e CD	Dell	---
Monitor VGA com resolução 1024 x 768 pixels	Dell	---
Interface LAN	Agilent	---

Tabela 12 – Itens consumíveis utilizados para a amostragem, cultivo e identificação dos microrganismos pela metodologia FAME (continua)

Item	Fornecedor	Código
<u>Coleta da amostra por monitoramento ambiental</u>		
Soybean Casein Digest Agar (SCDA), placas prontas 90 x 15 mm	BioMérieux	43157
SCDA, placas prontas 140 x 15 mm	BioMérieux	
SCDA com lecitina e polissorbato 80, placas prontas 90 x 15 mm	BioMérieux	43562
SCDA com lecitina e polissorbato 80, placas prontas Rodac	BioMérieux	43699

Tabela 12 – Itens consumíveis utilizados para a amostragem, cultivo e identificação dos microrganismos pela metodologia FAME (continuação)

Item	Fornecedor	Código
Swabs de algodão	COPAN	SRK Pharma
<u>Preparação da amostra</u>		
Hidróxido de sódio, grau ACS ^a	Carlo Erba	480507
Metanol, grau HPLC ^a	J. T. Baker	9093-68
Hexano, grau HPLC ^a	Fisher	H302-4
Cloreto de sódio, grau ACS ^a	Merck	1.06404.1000
Ácido clorídrico 32% ^a	Merck	1.00319.1000
Metil-terc-butil-éter (MTBE), grau HPLC ^a	Merck	1.01845.1000
Solução tampão pH 7,2 ^b	Produção local	---
Água purificada ^a	Produção local	---
Alça de inoculação descartável de 10 µl	Pleion	0079
Tubos de cultura 100 x 13 mm	Corning	99447-16
Tampas de rosca com selo de Teflon®	Corning	409331
Vials de 2 ml, com tampa de rosca e selo de Teflon®	Agilent	5182-0865
Vials de 4 ml para rejeito de solventes	Agilent	9301-0723
Placas de Petri de 90 x 15 mm	INLAB	P0034
Pipetas Pasteur de vidro, descartáveis	CORNING	7095B-9
Frascos âmbar de vidro de 250 ml	Schott-Duran	GL45
<u>Sistema de cromatografia gasosa</u>		
Gás hidrogênio, 99,999% de pureza	White Martins	---
Gás nitrogênio, 99,999% de pureza	White Martins	---
Ar sintético, grau industrial, seco, com THC <1	White Martins	---
Coluna capilar de 25 m x 0,2 mm de sílica fundida com fase estacionária de 5% de fenilmetil silicone	Agilent	19091B-102
Seringa com agulha	Agilent	9301-0713
Ferrulha de grafite, 0,5 mm	Agilent	5080-8853
Septo da porta de injeção	Agilent	5080-8096
Alinhador da porta de injeção	MIDI	1220

Tabela 12 – Itens consumíveis utilizados para a amostragem, cultivo e identificação dos microrganismos pela metodologia FAME (conclusão)

Item	Fornecedor	Código
<u>Meios de cultura para cultivo de aeróbios</u>		
Agar granulado	BD-DIFCO	214530
Trypticase Soy Broth	BD-DIFCO	211771
Trypticase Soy Broth Agar (TSBA) ^a	Preparado localmente	---
<u>Padrão de calibração</u>		
Padrão de calibração do método FAME	MIDI	1200-A

^a Utilizados e preparados de acordo com as instruções do item 3.1.1

^b Diluído 1:800 a partir da solução estoque, preparada de acordo com as instruções da USP 31.

3.1.1 Preparação do meio de cultura e reagentes

3.1.1.1 Preparação do Trypticase Soy Broth Agar (TSBA)

A composição típica do TSBA está descrita abaixo:

Trypticase Soy Broth (TSB)	30,0 g
Ágar granulado	15,0 g
Água purificada	1,0 l

Método de preparo (MIDI, 2005):

- Pesar 30 g de TSB e 15 g de ágar em um frasco de 2 litros.
- Adicionar 1 litro de água purificada.
- Aquecer sob agitação até que a mistura entre em ebulição e o ágar tenha se fundido.
- Autoclavar por 15 minutos a 121 °C e 15 psi.
- Resfriar a 60 °C em banho-maria.

- Dispensar, assepticamente, de 20 a 25 ml do ágar fundido em placas de Petri estéreis de 90 x 15 mm. O ágar deve estar com 2,5 a 3,2 mm de profundidade.
- Deixar o ágar solidificar em temperatura ambiente. Quando objetivando o armazenamento das placas por um período de tempo, elas deverão permanecer em repouso em temperatura ambiente por 24 horas, antes de serem embaladas em pacotes estéreis.

3.1.1.2 Reagente 1 – reagente de saponificação

Hidróxido de sódio (NaOH).....	45 g
Metanol (grau HPLC).....	150 ml
Água purificada.....	150 ml

Adicionou-se NaOH à água. Agitou-se até que o hidróxido de sódio estivesse dissolvido. Em seguida, acrescentou-se o metanol.

3.1.1.3 Reagente 2 – reagente de metilação

Ácido clorídrico 32%	195 ml
Água purificada.....	130 ml
Metanol (grau HPLC).....	275 ml

Adicionou-se o ácido clorídrico à água purificada. Em seguida, adicionou-se o metanol à solução diluída de ácido clorídrico, sob agitação.

3.1.1.4 Reagente 3 – solvente de extração

Hexano (grau HPLC)200 ml
Metil-tert-butil-éter (MTBE) (grau HPLC)200 ml

Adicionou-se MTBE ao hexano e agitou-se.

3.1.1.5 Reagente 4 – lavagem alcalina

Hidróxido de sódio (NaOH).....10,8 g
Água purificada.....900,0 ml

Adicionou-se o NaOH à água e agitou-se até completa dissolução.

3.1.1.6 Reagente 5 – quebra de emulsões

Cloreto de sódio (NaCl).40 g
Água purificada.....100 ml

Adicionou-se o NaCl à água purificada. Esta é uma solução aquosa saturada.

3.1.1.7 Armazenamento e validade dos reagentes e meios de cultura

O prazo de validade dos reagentes e meios de cultura preparados é de um mês, desde que armazenados bem fechados, em temperatura ambiente. Todos os reagentes e meios de cultura foram rotulados adequadamente, incluindo nome do

reagente ou meio de cultura, lote de preparação, data de preparação e data de validade.

A pureza dos reagentes foi checada periodicamente preparando um branco de reagente como controle (procedimento sem células) a cada lote de amostras.

3.2 MÉTODO

3.2.1 Coleta das amostras

Os anexos C, D e E mostram as plantas baixas das salas limpas amostradas e suas respectivas classificações.

O monitoramento ambiental destas áreas obedeceu ao plano de amostragem estabelecido nos Apêndices A, B, C e D e o período de amostragem compreendeu os anos de 2005 e 2006.

3.2.2 Amostragem de ar

Dois métodos de amostragem do ar das salas limpas foram utilizados: o método passivo e o método ativo.

3.2.2.1 Método passivo de amostragem de ar

Uma ou mais placas de Petri 90 x 15 mm, contendo SCDA, ficaram expostas durante 4 horas nas classes A. Ao término do período de amostragem, ela foi substituída por uma nova placa, a qual ficou exposta por mais 4 horas. A exposição de placas cobriu todo o período de processo produtivo.

3.2.2.2 Método ativo de amostragem de ar

Com o equipamento STA® e placas de Petri 140 x 15 mm, contendo SCDA, foi realizada a amostragem de ar das linhas de envase, classe A. O equipamento foi programado para 1 hora de amostragem por placa, tendo sido realizadas uma amostragem durante o início, meio e final do envase asséptico.

Com o equipamento MAS-100® e placas de Petri 90 x 15 mm, contendo SCDA, foi realizada a amostragem das salas limpas classe B, C e D. O equipamento foi programado para amostrar 1 m³ de ar em 10 minutos.

3.2.3 Amostragem de superfícies, luvas e roupas

As roupas dos operadores e as superfícies planas ou de fácil acesso foram amostradas com placas Rodac contendo SCDA com lecitina e Polissorbato 80, exercendo-se uma leve pressão da placa contra a área de amostragem e mantendo-se o contato por aproximadamente 5 segundos.

As luvas dos operadores foram amostradas com placas de Petri 90 x 15 mm, contendo SCDA com lecitina e Polissorbato 80. Os operadores foram instruídos a tocarem os dez dedos das mãos no meio de cultura, tomando o cuidado de não sobrepor os dedos, utilizando-se para isso cinco dedos em cada metade da placa.

As superfícies de difícil acesso, como reentrâncias ou fendas das máquinas de envase, foram amostradas com “swabs” de algodão. A área de amostragem foi de 25 cm². Logo em seguida, os “swabs” foram transferidos para um tubo contendo 6 ml de solução tampão pH 7,2 e agitados em vortex. O conteúdo líquido foi vertido em placas de Petri vazias, onde foi adicionado o meio de cultura SCDA com lecitina e polissorbato 80, previamente fundido e resfriado à temperatura de não mais que 44 °C. As placas ficaram em repouso até solidificação do agar.

3.2.4 Incubação das amostras

Após a coleta em placas contendo o meio de cultura apropriado, todos os materiais foram incubados por dois dias a 30 a 35 °C, seguido de um período de cinco dias a 20 a 25 °C, totalizando, no mínimo, sete dias de incubação. Foram utilizadas estufas exclusivas para incubação de amostras derivadas do monitoramento ambiental.

3.2.5 Determinação dos tipos de microrganismos isolados com maior frequência nas áreas limpas estudadas

As placas que apresentaram crescimento bacteriano, após o tempo de incubação descrito em 3.2.4, foram submetidas aos critérios estabelecidos na Tabela 13 para determinar o método de identificação requerido, com base na classificação da sala em que o microrganismo foi isolado. Se o nível de contaminação havia excedido o limite de alerta ou ação para o local amostrado, todas as bactérias eram segregadas para identificação, independente da classe da sala.

Todas as placas que apresentaram crescimento de fungos foram selecionadas somente para classificação dos mesmos como bolores ou leveduras, independente da classificação da sala limpa em que foram isolados. A identificação do gênero e espécie dos fungos isolados foge ao escopo desta dissertação.

Já foi mostrado anteriormente que as pessoas são a fonte primária de contaminação microbiana em salas limpas (COBO; CONCHA, 2007). Portanto, os microrganismos provenientes de operadores, analistas e visitantes foram reunidos em uma classe diferente, nomeada como "Pessoal". Todas as bactérias provenientes de luvas e roupas foram selecionadas para descrição da micro-morfologia e identificação por FAME, independentemente da classificação da sala limpa em que foram isoladas.

Tabela 13 - Critério para seleção do método de identificação microbiana de acordo com a classificação da sala limpa em que a bactéria foi isolada

Bactérias isoladas em classe	Freqüência da coloração de Gram	Freqüência da Análise por FAME
A (ISO 4,8)	Toda bactéria deve ser descrita quanto à micro-morfologia.	Todas as bactérias devem ser identificadas em gênero e espécie.
B (ISO 6)	Toda bactéria deve ser identificada quanto à micro-morfologia.	Identificar gênero e espécie de duas bactérias por semana, sendo uma de ar e outra de superfície, ou sempre que a contagem exceder a especificação.
C (ISO 7)	Descrever a micro-morfologia de duas bactérias por semana, sendo uma de ar e outra de superfície, ou sempre que a contagem exceder a especificação.	Identificar gênero e espécie de duas bactérias por semana, sendo uma de ar e outra de superfície, ou sempre que a contagem exceder a especificação.
D (ISO 8)	Descrever a micro-morfologia de duas bactérias por mês, sendo uma de ar e outra de superfície, ou sempre que a contagem exceder a especificação.	Identificar gênero e espécie das bactérias, somente se a contagem exceder a especificação.

Fonte: acervo pessoal

Para avaliar os tipos de microrganismos mais freqüentes nas salas limpas estudadas, os resultados obtidos após descrição da morfologia foram tabulados e, em seguida, foi construído um gráfico de Pareto com os tipos de microrganismos e o local em que foram isolados. De acordo com esta técnica estatística, considerou-se como microrganismo mais freqüente aquele com freqüência acumulada maior ou igual a 80% entre todos os tipos de microrganismos isolados.

As bactérias que foram selecionadas, pelo critério estabelecido na Tabela 13, para identificação pelo método FAME, seguiram os passos descritos em 3.2.7.

3.2.6 Verificação do efeito da mudança das estações do ano sobre a comunidade microbiana das salas limpas

Nesta etapa do projeto, os microrganismos foram agrupados por morfologia, estação do ano e classe de área limpa em que foram encontrados. O passo seguinte foi a condução de um estudo de variância ANOVA (dois fatores sem replicação), em um nível de significância de $p=0,05$, para determinar se a estação do ano interfere no nível de contaminação de cada classe.

As colônias derivadas de luvas e roupas de pessoal foram classificadas como um grupo distinto, denominado “Pessoal”, a fim de que fosse possível analisar separadamente os microrganismos provenientes dos operadores, analistas e visitantes.

Um gráfico de Pareto foi construído para mostrar os tipos de microrganismos mais relevantes em cada classe e em cada estação do ano, considerando que os mais importantes são aqueles responsáveis por 80% do total de ocorrências.

3.2.7 Procedimento de extração e derivação de ácidos graxos de células íntegras para identificação bacteriana por cromatografia gasosa

A identificação das bactérias selecionadas ocorreu em um prazo máximo de 21 dias a contar da data da coleta.

O procedimento de extração e derivação de ácidos graxos de células íntegras de bactérias para identificação por cromatografia gasosa pelo método FAME ocorreu em cinco etapas bem definidas, descritas detalhadamente a seguir. Um resumo das atividades associadas à cada etapa é exibida na Figura 33.



Figura 33 – Etapas para extração de ácidos graxos de bactérias
Fonte: MIDI (2005)

3.2.7.1 Primeira etapa – repique em TSBA

As bactérias separadas para identificação por FAME foram repicadas em uma placa de TSBA, no padrão de estrias em quatro quadrantes, padrão recomendado para cultivar células em placas para identificação pelo método FAME (Figura 34).

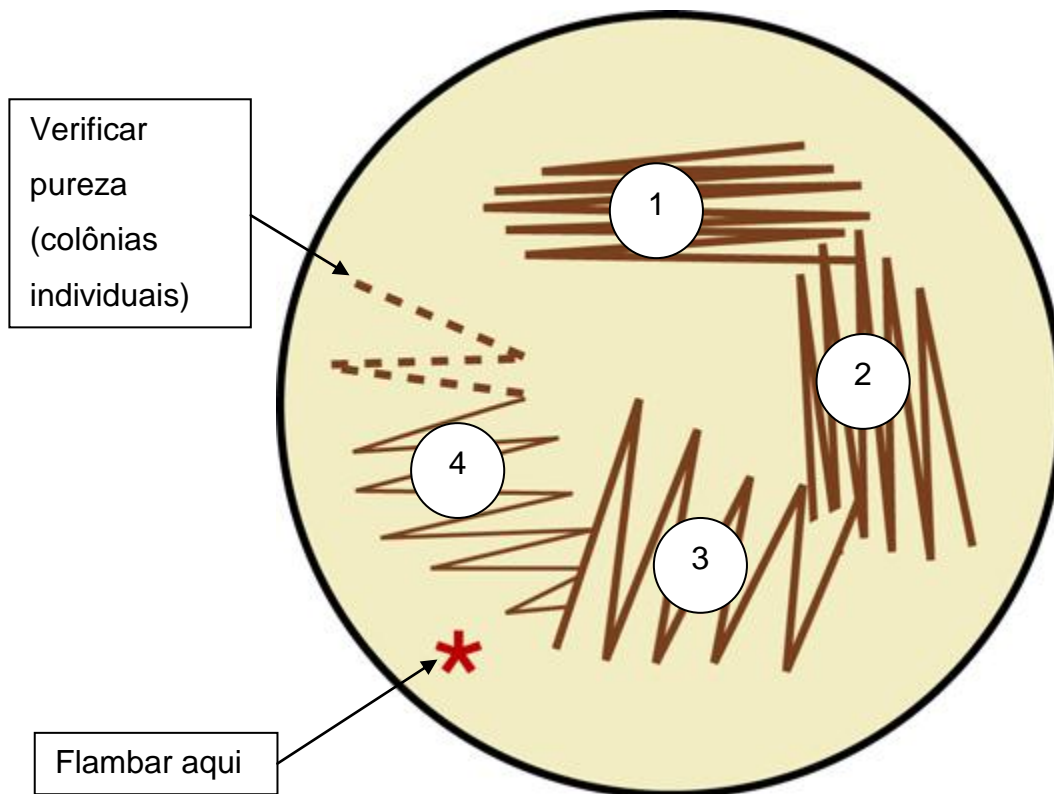


Figura 34 – Técnica do Repique em Quadrantes
 Fonte: <http://www.midi-inc.com>. Acesso em 03/11/2008

Os passos abaixo foram seguidos para repique, em quadrantes, das bactérias isoladas:

- Com auxílio de uma alça de inoculação descartável de 10 µl, uma colônia bem isolada ou uma quantidade pequena de amostra foi selecionada a partir da placa de isolamento primária (Ex.: SCDA).
- A colônia foi espalhada sobre a área do quadrante 1 tocando o anel inteiro da alça no meio de cultura, a fim de que a região fosse densamente inoculada.
- O quadrante 2 foi inoculado rotacionando a alça em 90° e passando a borda da alça pelo canto do quadrante 1 duas vezes, como mostrado na Figura 34.

Então, o restante do quadrante 2 foi semeado com linhas paralelas sem reentrar no quadrante 1.

- O quadrante 3 foi inoculado passando uma borda da alça pelo canto do quadrante 2 duas vezes. Em seguida, o restante do quadrante 3 foi semeado com linhas paralelas sem reentrar no quadrante 2.
- O quadrante 4 foi inoculado rotacionando-se a alça em 180° e passando-se a outra borda da alça pelo canto do quadrante 3 duas vezes. Então, o restante do quadrante 4 foi semeado com linhas paralelas sem reentrar no quadrante 3.

Nota: Para bactérias de crescimento lento, foi necessário substituir as duas passagens da alça de inoculação por quatro a cinco passagens.

As placas foram incubadas a 28 ± 1 °C por 24 ± 2 horas. Terminado o período de incubação, células do terceiro quadrante foram repicadas novamente em TSBA e incubadas a 28 ± 1 °C por adicionais 24 ± 2 horas. As colônias foram, geralmente, coletadas do quadrante 3, pois é o quadrante que contém células na fase log tardia e, portanto fornece composições de ácidos graxos mais estáveis.

Uma quantidade suficiente de células (entre 40 e 50 mg) foi removida da placa com auxílio da alça bacteriológica e transferida para um tubo de ensaio de vidro.

3.2.7.2 Segunda etapa – saponificação

Nesta etapa, uma base metanólica forte, combinada com a ação do calor, matou e lisou as células. Os ácidos graxos foram clivados dos lipídios celulares e convertidos a seus sais de sódio.

- Em cada tubo foi pipetado $1,0 \pm 0,1$ ml do Reagente 1, a base metanólica.
- Depois de fechado com tampa de Teflon, o tubo foi agitado em vortex por 5 a 10 segundos.

- A estante com os tubos identificados foi colocada em um banho de óleo com temperatura ajustada para 100 ± 2 °C.
- Após 5 minutos, os tubos foram removidos do banho, resfriados e agitados em vortex por 5 a 10 segundos. Em seguida, foram retornados ao banho de óleo a 100 ± 2 °C por mais 25 minutos.
- Depois de um total de 30 minutos de saponificação, os tubos foram removidos e resfriados em um banho de água fria.

3.2.7.3 Terceira etapa – metilação

A metilação converteu os ácidos graxos (como sais de sódio) em ésteres metila de ácidos graxos, o que aumentou a volatilidade dos ácidos graxos para análise pelo CG.

- Em cada tubo, foi adicionado $2,0 \pm 0,1$ ml do Reagente 2, o reagente de metilação.
- Os tubos foram agitados em vortex por 5-10 segundos.
- Os tubos foram aquecidos em um banho de água a 80 ± 1 °C por 10 ± 1 minutos.
- Os tubos foram removidos do banho e rapidamente resfriados à temperatura ambiente, em um recipiente com água fria.

3.2.7.4 Quarta etapa – extração

Nesta fase, os ésteres metila de ácidos graxos foram removidos da fase aquosa ácida e transferidos para uma fase orgânica através de uma extração líquido-líquido, de acordo com as etapas seguintes:

- Em cada tubo, foi adicionado $1,25 \pm 0,1$ ml do Reagente 3, o solvente de extração.
- Os tubos foram agitados em agitador orbital a 250 rpm por 10 minutos.

- Utilizando uma pipeta Pasteur limpa e seca para cada amostra, a fase aquosa (inferior) foi removida e descartada.

3.2.7.5 Quinta etapa – lavagem

Uma solução alcalina suave foi adicionada a cada tubo de preparação da amostra para remover, do extrato orgânico, ácidos graxos livres e reagentes residuais, uma vez que estes poderiam danificar o sistema cromatográfico, resultando em caudas de picos e perda dos ésteres de metila de ácidos graxos hidroxilados.

- Em cada tubo, foi adicionado $3,0 \pm 0,1$ ml do Reagente 4, o reagente de lavagem.
- Embora não seja obrigatório, também foram adicionadas 5 a 10 gotas da solução saturada de cloreto de sódio a cada tubo, a fim de prevenir a formação de emulsões.
- Os tubos foram agitados em um agitador orbital a 250 rpm por 5 minutos.

3.2.7.6 Transferência do extrato para o vial

Nesta etapa, 2/3 da fase orgânica (superior) foi transferida para um “vial” de 2 ml. Muito cuidado foi tomado para não transferir nada da fase aquosa (inferior) para o “vial”.

Como controle positivo, utilizou-se a cepa ATCC 13637 de *Stenotrophomonas maltophilia*. O cromatógrafo gasoso (CG) foi carregado, então, com os extratos recém-preparados de amostra e do controle positivo. Além das amostras, foi acrescentado o padrão de calibração e um branco da amostra, para avaliar possíveis problemas na preparação dos reagentes utilizados na extração.

3.2.8 Criação de um catálogo com o perfil de ácidos graxos das bactérias isoladas com maior frequência nas áreas limpas estudadas

O reconhecimento dos perfis de ácidos graxos foi realizado utilizando o software MIDI Sherlock®, em conjunto com a biblioteca TSBA 4.5 e TSBA 6.0. Foi utilizado ar sintético (400 ml/min), gás hidrogênio como gás de arraste (30 ml/min para o FID) e gás nitrogênio como gás de compensação (30 ml/min).

Os extratos de ácidos graxos dos microrganismos foram carregados na bandeja de amostras do CG. O controlador comandou o injetor para injetar uma pequena porção do extrato no CG. A coluna capilar instalada no forno do CG separou os ésteres metílicos de ácidos graxos presentes na mistura à medida que eles migravam da coluna para o detector. O detector de ionização de chama (FID) queimou o carbono de cada éster gerando um sinal.

A integração dos picos e impressão do cromatograma foi realizada pelo software Chemstation (versão A.06.03; Hewlett-Packard). Através do uso de macros, a ChemStation enviou o Tempo de Retenção, Área e Proporção Área / Altura de cada pico para o Sherlock®. O relatório com a composição dos ácidos graxos da bactéria foi processado, impresso e armazenado pelo Sherlock®. A Figura 35 mostra a seqüência de etapas de operação do CG, para análise de amostras pela técnica FAME.

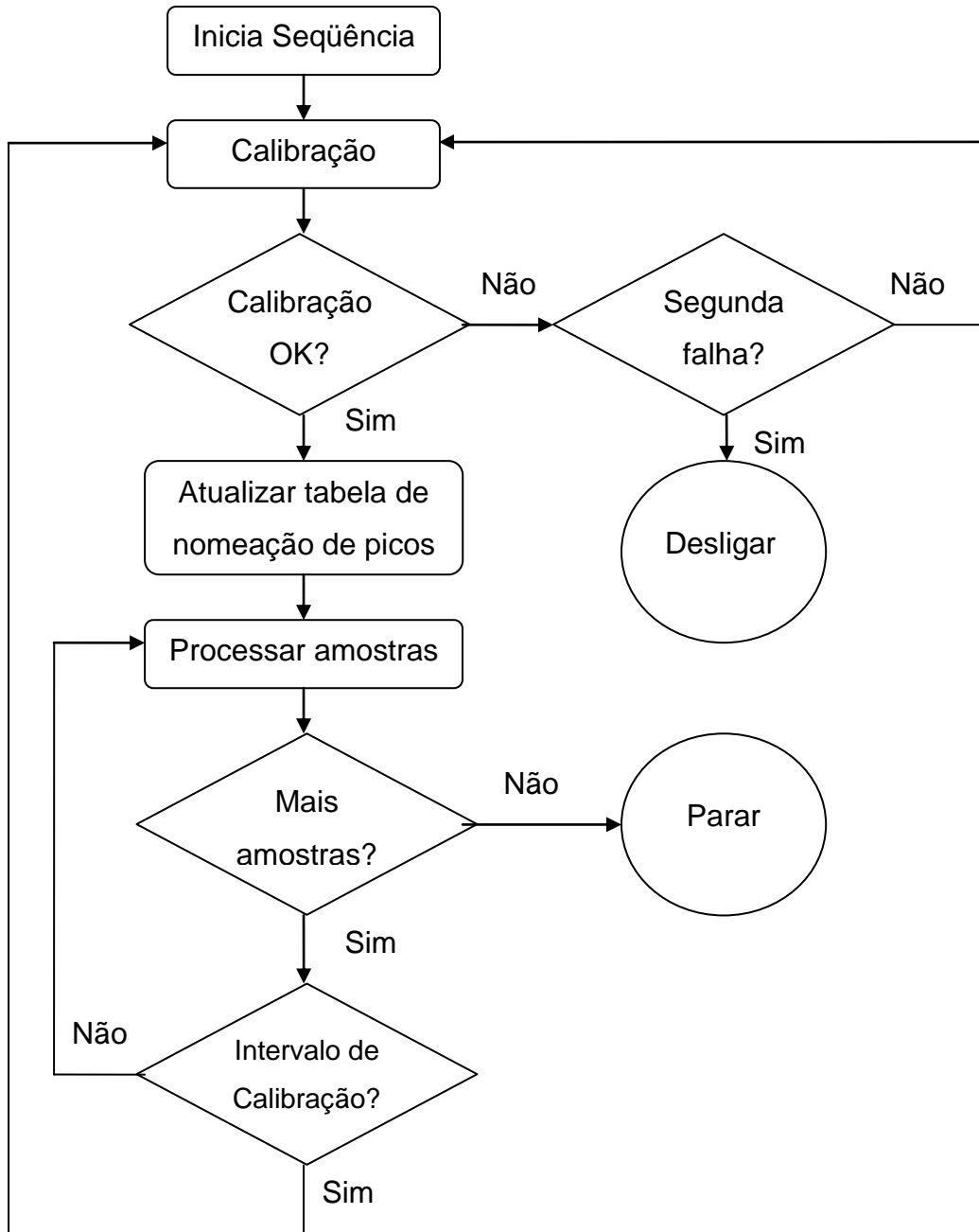


Figura 35 – Fluxograma geral de operação do cromatógrafo gasoso para análise de amostras pela técnica FAME

Fonte: Acervo pessoal

O software Sherlock® utilizou algoritmos para nomeação de picos e reconhecimento de padrões para comparar o perfil de ácidos graxos da amostra com a biblioteca de composições de ácidos graxos, também chamada de Biblioteca de Identificação (BI).

Durante o processamento pós-corrida, um vetor de tempo de retenção / porcentagem de área foi construído a partir dos dados cromatográficos. O vetor foi comparado com uma tabela interna denominada Tabela de Nomeação de Picos e

cada pico nomeado com base nos tempos de retenção relativos. Pelo fato do algoritmo de nomeação de picos identificar padrões, a nomeação de picos é robusta (PAISLEY, 1998). A Tabela de Nomeação de Picos é uma estrutura dinâmica, que se adapta às variações normais do instrumento (alterações qualitativas entre corridas) através de uma re-calibração periódica durante as seqüências de amostras.

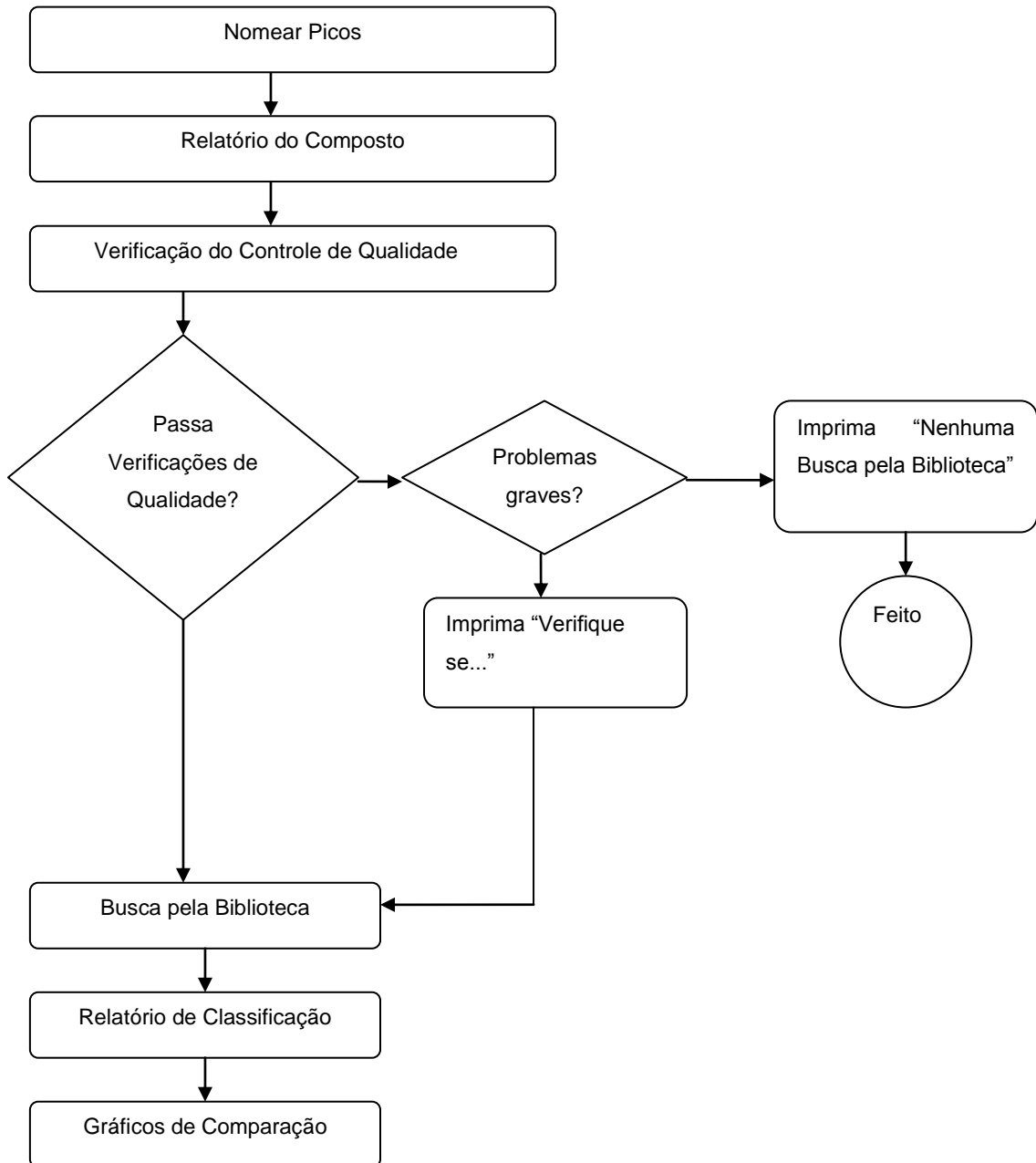


Figura 36 – Fluxograma do sistema Sherlock para geração de um relatório com o resultado de identificação microbiana

Fonte: Acervo pessoal

A qualidade cromatográfica das corridas de calibração e amostra foi verificada com os parâmetros de controle de calibração e amostra. A seguir, o vetor de pares de picos nomeados / porcentagem de área foi comparado com os mesmos vetores presentes na BI. Técnicas estatísticas de reconhecimento de padrões foram usadas para identificar as equivalências mais prováveis e os coeficientes de similaridade. Esta busca pela BI resultou em um relatório com as identificações mais prováveis da bactéria analisada (Figura 36).

Em seguida, foram criadas tabelas para cada classificação de área limpa, listando-se as espécies de bactérias que foram isoladas, a frequência de ocorrência de cada espécie e calculando-se a porcentagem acumulada desta espécie em relação ao número de ocorrências de todas as bactérias isoladas naquela classe de área limpa. De acordo com a técnica estatística de Pareto, foram consideradas as espécies mais frequentes aquelas responsáveis por uma frequência acumulada de, no mínimo, 80% do número total de ocorrências em uma determinada classe de área limpa.

De posse destes dados, foram determinadas as espécies mais frequentes em cada classe de área limpa e as espécies mais frequentes entre todas as salas limpas, as quais serviram de base para criação de um catálogo com o perfil dos seus ácidos graxos.

3.2.9 Determinação do efeito da variação da tomada de ensaio sobre o resultado de identificação microbiana

Para esta etapa do projeto, foram selecionados como objeto de estudo os cinco microrganismos isolados com maior frequência nas áreas limpas estudadas, sendo dois cocos Gram positivos, dois bacilos Gram positivos e um bacilo Gram negativo, além da *Stenotrophomonas maltophilia*, que é um bacilo Gram negativo utilizado como controle positivo de todas as análises de identificação de microrganismos ambientais.

Todos os microrganismos foram isolados em placas de TSBA e incubados a 28 °C. Ao término do período de incubação, foram recolhidas amostras de 10 mg, 20

mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg e 70 mg de cada microrganismo. Em seguida, procedeu-se à extração dos ácidos graxos, como descrito no item 3.2.7.

Este procedimento foi repetido por mais duas vezes, em dias diferentes, a fim de se obter valores em triplicata para cada microrganismo e avaliar a reprodutibilidade dos resultados.

3.2.10 Determinação do efeito da variação da temperatura sobre o resultado de identificação microbiana

Para esta etapa do projeto, foram selecionados como objeto de estudo os dois microrganismos isolados com maior frequência nas áreas limpas estudadas, sendo um bacilo Gram positivo e um coco Gram positivo, além da *Stenotrophomonas maltophilia*, que é um bacilo Gram negativo utilizado como controle positivo de todas as análises de identificação de microrganismos ambientais.

Todos os microrganismos foram isolados em placas de TSBA e incubados a 28 °C, 32,5 °C e 37 °C. Ao término do período de incubação, foram recolhidas amostras de 40 mg a 50 mg de cada microrganismo e procedeu-se à extração dos ácidos graxos, como descrito no item 3.2.7.

Este procedimento foi repetido mais duas vezes, em dias diferentes, a fim de se obter valores em triplicata para cada microrganismo e avaliar a reprodutibilidade dos resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DOS TIPOS DE MICRORGANISMOS ISOLADOS COM MAIOR FREQUÊNCIA NAS ÁREAS LIMPAS ESTUDADAS

Para determinar os tipos de microrganismos isolados com maior frequência nas áreas limpas estudadas, entre 2005 e 2006, os mesmos foram descritos em relação às suas características macroscópicas, no caso dos fungos, e microscópicas, no caso de bactérias. Os resultados foram tabulados e classificados de acordo com o número de ocorrências, o local de origem e morfologia (Tabela 14).

Tabela 14 – Distribuição do número de ocorrências dos microrganismos isolados em salas limpas, de acordo com a morfologia e local em que foram amostrados.

Morfologia	Classes de Salas Limpas				Pessoal ^a	Total
	A	B	C	D		
Cocos Gram positivos	66 (18,8%) ^b	878 (72,1%)	4314 (70,2%)	763 (66,5%)	4007 (82,4%)	10028 (73,1%)
Bolores	56 (15,9%)	162 (13,3%)	1026 (16,7%)	305 (26,6%)	287 (5,9 %)	1836 (13,4%)
Bacilos Gram negativos	19 (5,4%)	78 (6,4%)	550 (9,0%)	27 (2,4%)	215 (4,4 %)	889 (6,5%)
Bacilos Gram positivos	210 (59,7%)	88 (7,2%)	252 (4,1%)	53 (4,6%)	275 (5,7%)	878 (6,4%)
Leveduras	1 (0,3%)	11 (0,9%)	2 (0,0%)	0 (0,0%)	81 (1,7%)	95 (0,7%)
Total	352	1217	6144	1148	4865	13726

^a Pessoal: refere-se às colônias isoladas de operadores e visitantes, desconsiderando a classe na qual eles estavam no momento que a amostra foi retirada.

^b O valor entre parênteses se refere à porcentagem sobre o total da coluna.

Fonte: acervo pessoal

Da Tabela 14, pode-se depreender que todas as classes juntas (A + B + C + D) totalizam 8861 isolados, enquanto apenas o grupo “Pessoal” responde por 4865 dos isolados, correspondente a 55% da contaminação de todas as classes. Deve ser enfatizado, contudo, que este tipo de estudo comparativo possui várias limitações e deve ser avaliado cuidadosamente. Vamos tomar, por exemplo, uma situação em que um operador com as luvas contaminadas toca a parede. A contaminação irá, muito provavelmente, ser parcialmente transferida para a parede e poderá ser detectada por uma amostragem de superfícies. Embora as colônias derivadas de pessoal tenham sido separadas como um grupo distinto, não podemos, na verdade, isolar os operadores das salas em que trabalham. Esta separação é meramente teórica.

Pode-se concluir também que cocos Gram positivos foram os mais freqüentes, com 73,1% do total de microrganismos isolados, seguidos de bolores (13,4%), de bacilos Gram negativos (6,5%), de bacilos Gram positivos (6,4%) e de leveduras (0,7%). Os cocos Gram positivos se confirmaram como o principal contaminante gerado pelo grupo “Pessoal” e são encontrados em maior número na classe C do que nas classes B ou A. Uma explicação para isso é o fato de que a classe A constitui o ambiente mais crítico, exigindo operadores constantemente treinados, roupas especiais, máscaras, luvas e ar filtrado através de filtros HEPA. As roupas especiais funcionam como uma barreira protetora contra microrganismos, evitando contaminação do ambiente com bactérias geradas pelo “Pessoal” e conseqüentemente reduzindo o número de cocos Gram positivos nesta classe. Dos 352 microrganismos isolados da classe A, bacilos Gram positivos respondem por 59,7%, ao passo que cocos Gram positivos respondem por somente 18,8%. A identificação dos bacilos Gram positivos isolados revelou bacilos formadores de esporos, os quais são muito resistentes à maioria dos desinfetantes comuns utilizados. Uma redução deste nível de contaminação poderia ser alcançada com o uso de um desinfetante esporocida e com a alteração do esquema de sanificação e limpeza. O número relativamente pequeno de microrganismos isolados na classe D é devido aos poucos pontos amostrados neste período. Esta classe foi monitorada para avaliar a contaminação microbiana sob condições sem quaisquer medidas de proteção específicas.

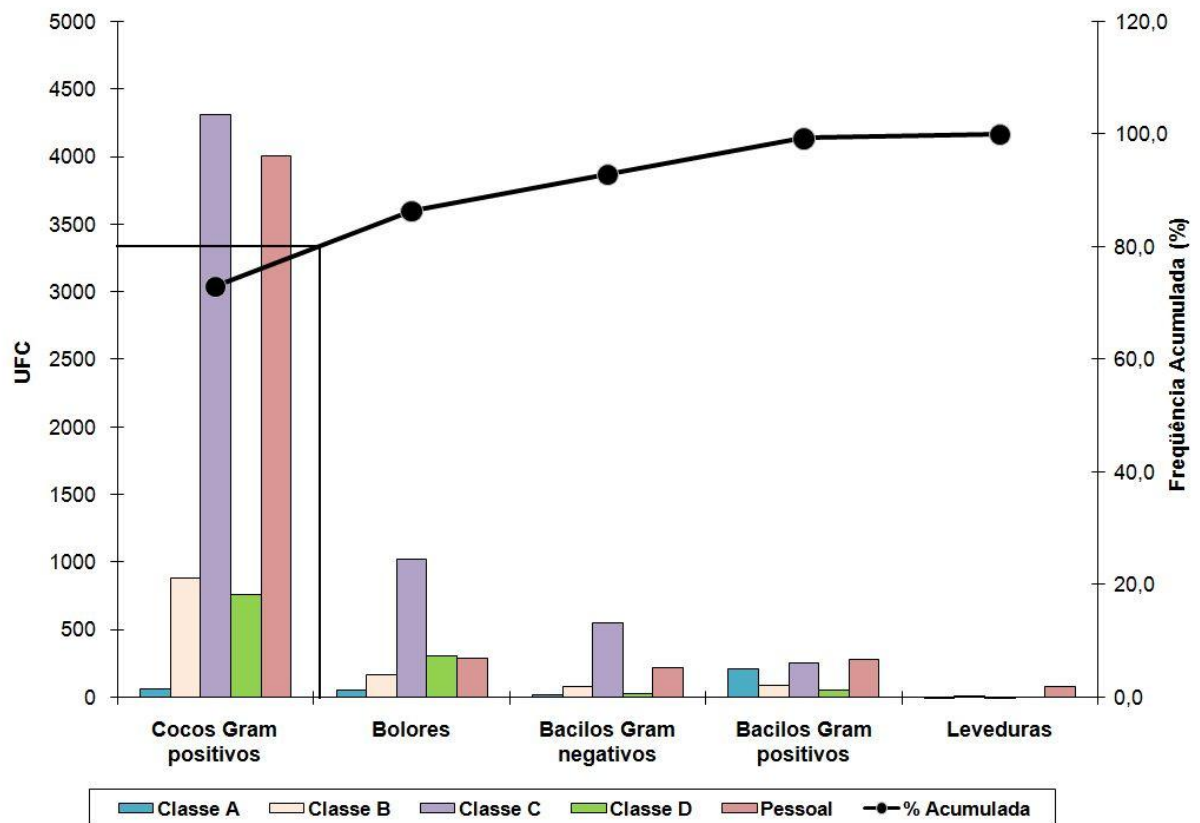


Figura 37 – Gráfico de Pareto demonstrando o grupo de microrganismos mais freqüentes em todas as salas limpas amostradas.
Fonte: acervo pessoal

Esta análise confirma que os microrganismos mais relevantes encontrados nas salas limpas estudadas foram os cocos Gram positivos, e que as pessoas foram a principal fonte de contaminação destas áreas. Este grupo de microrganismos deve ser o alvo para programas de monitoramentos futuros desenhados para reduzir o nível de contaminação dentro das salas limpas, através de medidas apropriadas como treinamento intensivo de lavagem e limpeza das mãos, substituição do tipo de tecido das roupas e treinamento contínuo baseado nos procedimentos específicos de vestimenta de roupas e luvas para entrada na área limpa.

4.2 VARIAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO NO DECORRER DAS ESTAÇÕES DO ANO

Nesta etapa, foi avaliada a hipótese de que a estação do ano pudesse interferir no nível de contaminação em uma sala limpa, agrupando os microrganismos isolados durante 2005 e 2006 de acordo com a estação do ano e sala limpa em que foi encontrado. A Figura 38 ilustra a distribuição do nível de contaminação nas salas limpas no decorrer das estações do ano.

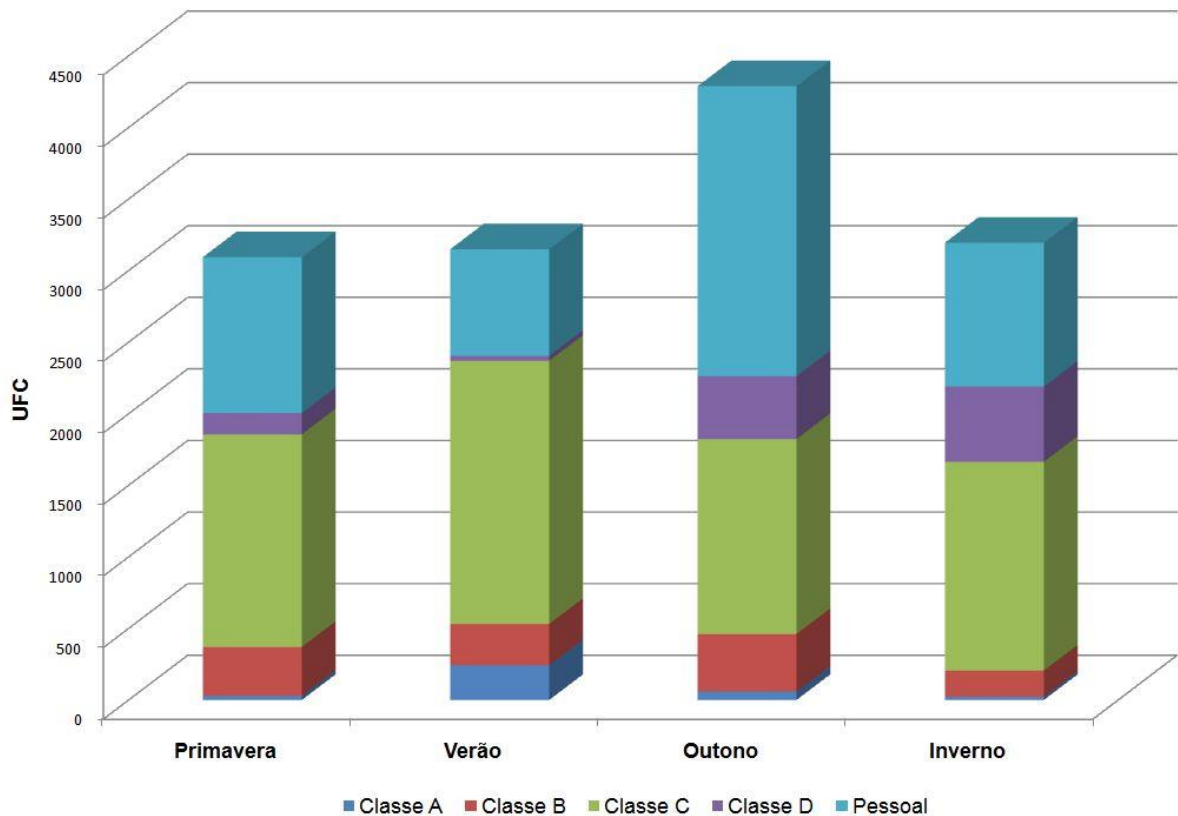


Figura 38 - Nível de contaminação nas classes de salas limpas no decorrer das estações do ano.

Fonte: acervo pessoal

A seguir, foi realizado um teste ANOVA (dois fatores sem replicação), cujos resultados estão na Tabela 15.

Tabela 15 – Estudo de hipótese de que a estação do ano afeta o nível de contaminação nas salas limpas

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F	P-value	F crit
Classe	6562880,3	4	1640720,1	16,68394	7,62703E-05	3,25916
Estação	186773,8	3	62257,933	0,63308	0,607726017	3,4903
Erro	1180095,7	12	98341,308			
Total	7929749,8	19				

(ANOVA com dois fatores sem replicação; $p=0.05$; SQ = Soma de Quadrados; gl = graus de liberdade; MQ = Erro Médio Quadrático; Fcrit = F crítico)

Fonte: acervo pessoal

Embora se perceba claramente pela Figura 38 que no outono o nível de contaminação tenha sido maior, a partir deste teste estatístico é possível concluir que esta variação do nível de contaminação no decorrer das estações não é significativa, ao nível de $p=0,05$, já que a célula em destaque apresenta valor menor que 0,95. Este resultado já era esperado, visto que independente das condições ambientais externas, as salas limpas são mantidas em condições de temperatura, pressão e umidade controladas, com valores relativamente constantes dentro dos parâmetros estabelecidos. Variações significativas no decorrer do ano poderiam indicar deficiências no procedimento de vestimenta ou lavagem das mãos, ou ainda problemas com a infra-estrutura da área limpa, como ar condicionado ou desbalanceamento das pressões relativas entre salas. Como mostrado pela Figura 38, a classe A, a mais crítica, apresentou um nível mais alto de contaminação no verão. Isto pode ter sido ocasionado por um possível problema com os agentes sanitizantes empregados ou por uma alteração no programa de limpeza, uma vez que as bactérias mais frequentes foram bacilos Gram positivos formadores de esporos.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS PELO MÉTODO FAME

Uma vez que o perfil de ácidos graxos é altamente dependente da temperatura e do meio de cultura utilizado, as condições padrão previamente

mencionadas, isto é, 28 °C, 24 h, meio TSBA, foram estritamente controladas e somente aqueles isolados bacterianos que puderam crescer em conformidade com estas condições padrão foram submetidas à identificação por FAME, a fim de que pudéssemos chegar a conclusões válidas a partir da análise dos ácidos graxos. Desta forma, de um total de 11795 isolados bacterianos (Tabela 14), 9543 foram selecionados para identificação por FAME e 6056 mostraram índices de similaridade significativos ($IS > 0,500$) com os registros de dados da biblioteca FAME, suficientes para atribuição do nome da espécie. 1197 isolados, os quais mostraram baixas similaridades ($0,300 < IS < 0,500$), só receberam atribuição do nome de gênero. Os resultados de identificação são mostrados nas Tabelas 16-20, de acordo com a classe de área limpa em que os microrganismos foram isolados.

Não é possível diferenciar todas as espécies de bactérias utilizando somente a técnica FAME, uma vez que algumas espécies são bactérias Viáveis Mas Não Cultiváveis (do inglês, VBNC), ou requerem testes adicionais para confirmação ou somente podem ser distinguidas por métodos genotípicos. Contudo, algumas classes de microrganismos possuem ácidos graxos distintos, que podem servir para positivamente confirmar suas presenças. De fato, em nosso estudo, 63,5% dos isolados bacterianos puderam ser identificados ao nível de espécie, 12,5% puderam somente ser identificados ao nível de gênero e o restante 24% foram considerados como “desconhecidos” (dados não mostrados).

Há várias razões que podem levar a uma má nomeação:

- 1) As amostras podem simplesmente ser de uma espécie não presente no banco de dados da MIDI. Embora o banco de dados contenha muitas espécies comuns, nenhum banco de dados possui todas as espécies de bactérias;
- 2) As amostras podem ser de cepas atípicas de uma espécie do banco de dados. Mesmo que a MIDI tenha coletado uma ampla variedade de cepas para construir sua biblioteca, as bactérias continuam a divergir e é impossível ter uma cobertura completa;
- 3) É possível que o processo de semeadura e repique não tenha sido ótimo. É preciso ter certeza que células na fase log de crescimento estejam sendo coletadas, para garantir boas comparações com o banco de dados, uma vez que células mais jovens ou mais velhas terão diferentes padrões de ácidos graxos;

- 4) Quando o valor de resposta total exibido é menor que 50.000, picos pequenos podem deixar de ser integrados e estes picos pequenos podem impactar na nomeação. Assumindo que a extração foi realizada conforme o procedimento padrão, é possível concentrar a amostra; para isso, basta evaporar o extrato orgânico e correr novamente a amostra;
- 5) O sistema cromatográfico pode estar com problemas. Para confirmar, é preciso verificar os controles positivos, controles negativos e calibrações contra os parâmetros recomendados;
- 6) A qualidade dos reagentes empregados não é satisfatória. Em nossos estudos, foi percebido que a marca do metanol interfere diretamente na análise, sendo que os melhores resultados foram obtidos com o metanol da J. T. Baker. Outras marcas, embora com o mesmo grau de pureza expresso no rótulo, resultaram em ausência parcial ou total de picos e conseqüente falha na identificação dos microrganismos

Tem havido muita ênfase na necessidade de confirmar a identificação dos picos de ácidos graxos obtidos por cromatografia gasosa (como no sistema MIDI) com abordagens alternativas, como espectrometria de massa. Isto levou indubitavelmente à preocupação de que a análise do perfil de ácidos graxos é uma abordagem cara e trabalhosa, melhor deixada para os especialistas. Embora a confirmação seja certamente necessária naqueles casos onde ácidos graxos únicos e novas estruturas moleculares devam ser analisadas para propósitos taxonômicos, os resultados obtidos por Haack et al (1994) sugerem que os perfis de ácidos graxos obtidos com o sistema MIDI-FAME fornece informação equivalente àqueles obtidos com técnicas mais tradicionais e mais demoradas, como a análise de ácidos graxos de fosfolipídios (PLFA). Além do mais, os perfis de ácidos graxos mostraram ser altamente reprodutivos quando obtidos de isolados ou comunidades sob as mesmas condições ambientais.

Nossos resultados diferem do primeiro estudo semelhante previamente realizado (FAVERO et al., 1966), principalmente porque as técnicas de identificação microbiana avançaram enormemente desde 1966. Com a introdução da análise de identificação por FAME, se tornou possível distinguir muito mais espécies de microrganismos do que com os métodos bioquímicos empregados no estudo de Favero et al. Há uma limitação da técnica FAME, contudo, em distinguir várias

espécies de microrganismos, como *S. aureus* de espécies coagulase negativas ou *E. coli* de outras *Enterobacteriaceae*, uma vez que as composições de ácidos graxos celulares de tais microrganismos são muito semelhantes (WELCH, 1991). Por estas razões, métodos bioquímicos e imunológicos permanecem como ferramentas úteis que podem ser usadas em adjunto com a técnica FAME para identificação de espécies e subespécies de bactérias.

Tabela 16 – Bactérias isoladas em classe A. (As células destacadas exibem as bactérias responsáveis por, no mínimo, 80% da microbiota do local) (continua)

Nome	Número de colônias (UFC)	%
<i>Bacillus subtilis</i>	199	23,86
<i>Micrococcus luteus</i>	99	35,73
<i>Staphylococcus cohnii</i>	82	45,56
<i>Kocuria varians</i>	63	53,12
<i>Staphylococcus arlettae</i>	55	59,71
<i>Staphylococcus hominis</i>	48	65,47
<i>Staphylococcus sp</i>	48	71,22
<i>Staphylococcus kloosii</i>	29	74,70
<i>Micrococcus lylae</i>	26	77,82
<i>Bacillus oleoroni</i>	23	80,58
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	20	82,97
<i>Arthrobacter aurescens</i>	18	85,13
<i>Micrococcus sp</i>	17	87,17
<i>Acinetobacter sp</i>	15	88,97
<i>Pseudomonas putida</i>	15	90,77
<i>Flavobacterium resinovorum</i>	14	92,45
<i>Arthrobacter ilicis</i>	13	94,00
<i>Kocuria sp</i>	7	94,84
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	95,56
<i>Moraxella sp</i>	5	96,16
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	4	96,64
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	4	97,12
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	3	97,48
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	97,84
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	98,20

Tabela 16 – Bactérias isoladas em classe A. (As células destacadas exibem as bactérias responsáveis por, no mínimo, 80% da microbiota do local) (conclusão)

Nome	Número de colônias (UFC)	%
<i>Clavibacter michiganense</i>	2	98,44
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	98,68
<i>Arthrobacter sp</i>	1	98,80
<i>Bacillus cereus</i>	1	98,92
<i>Brevibacillus brevis</i>	1	99,04
<i>Brevibacterium casei</i>	1	99,16
<i>Brevibacterium linens</i>	1	99,28
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	1	99,40
<i>Micrococcus halobius</i>	1	99,52
<i>Paenibacillus macerans</i>	1	99,64
<i>Rothia dentocariosa</i>	1	99,76
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1	99,88
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	100,00
TOTAL	834	

Fonte: acervo pessoal

Tabela 17 – Bactérias isoladas em classe B. (As células destacadas exibem as bactérias responsáveis por, no mínimo, 80% da microbiota do local) (continua)

Nome	Número de colônias (UFC)	%
<i>Micrococcus luteus</i>	60	14,08
<i>Micrococcus sp</i>	54	26,76
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	51	38,73
<i>Staphylococcus sp</i>	39	47,89
<i>Staphylococcus cohnii</i>	24	53,52
<i>Brevibacillus brevis</i>	20	58,22
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	20	62,91
<i>Staphylococcus kloosii</i>	20	67,61
<i>Staphylococcus arlettae</i>	13	70,66
<i>Bacillus sphaericus</i>	11	73,24
<i>Kocuria kristinae</i>	11	75,82
<i>Staphylococcus hominis</i>	11	78,40
<i>Kocuria varians</i>	10	80,75

Tabela 17 – Bactérias isoladas em classe B. (As células destacadas exibem as bactérias responsáveis por, no mínimo, 80% da microbiota do local) (conclusão)

Nome	Número de colônias (UFC)	%
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	9	82,86
<i>Bacillus coagulans</i>	7	84,51
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	86,15
<i>Acinetobacter genospecies</i>	6	87,56
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	6	88,97
<i>Staphylococcus warneri</i>	6	90,38
<i>Arthrobacter aurescens</i>	5	91,55
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4	92,49
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	4	93,43
<i>Bacillus cereus</i>	4	94,37
<i>Bacillus megaterium</i>	3	95,07
<i>Kocuria sp</i>	3	95,77
<i>Micrococcus lylae</i>	3	96,48
<i>Moraxella sp</i>	3	97,18
<i>Staphylococcus simulans</i>	3	97,89
<i>Bacillus firmus</i>	2	98,36
<i>Bacillus micoydes</i>	1	98,59
<i>Brevibacterium linens</i>	1	98,83
<i>Flavobacterium resinovorum</i>	1	99,06
<i>Gordona bronchialis</i>	1	99,30
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	1	99,53
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	99,77
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	100,00
TOTAL	426	

Fonte: acervo pessoal

Tabela 18 – Bactérias isoladas em classe C. (As células destacadas exibem as bactérias responsáveis por, no mínimo, 80% da microbiota do local) (continua)

Nome	Número de colônias (UFC)	%
<i>Staphylococcus cohnii</i>	237	13,09
<i>Staphylococcus sp</i>	214	24,90
<i>Flavobacterium resinovororum</i>	202	36,06
<i>Staphylococcus arlettae</i>	148	44,23
<i>Acinetobacter baumannii</i>	109	50,25
<i>Micrococcus luteus</i>	89	55,16
<i>Staphylococcus warneri</i>	88	60,02
<i>Micrococcus halobius</i>	83	64,61
<i>Micrococcus sp</i>	75	68,75
<i>Kocuria sp</i>	67	72,45
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	59	75,70
<i>Staphylococcus hominis</i>	45	78,19
<i>Staphylococcus aureus</i>	38	80,29
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	35	82,22
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	33	84,04
<i>Staphylococcus xylosum</i>	28	85,59
<i>Kocuria varians</i>	24	86,91
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	24	88,24
<i>Staphylococcus capitis</i>	23	89,51
<i>Arthrobacter ilicis</i>	22	90,72
<i>Brevibacillus brevis</i>	21	91,88
<i>Staphylococcus kloosii</i>	21	93,04
<i>Bacillus subtilis</i>	15	93,87
<i>Brevibacterium stationis</i>	14	94,64
<i>Bacillus megaterium</i>	13	95,36
<i>Corynebacterium sp</i>	13	96,08
<i>Micrococcus lylae</i>	12	96,74
<i>Staphylococcus sciuri</i>	11	97,35
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	10	97,90

Tabela 18 – Bactérias isoladas em classe C. (As células destacadas exibem as bactérias responsáveis por, no mínimo, 80% da microbiota do local) (conclusão)

Nome	Número de colônias (UFC)	%
<i>Burkholderia cepacia</i>	9	98,40
<i>Moraxella sp</i>	8	98,84
<i>Paenibacillus macerans</i>	4	99,06
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	3	99,23
<i>Bacillus coagulans</i>	2	99,34
<i>Bacillus sphaericus</i>	2	99,45
<i>Brevibacterium casei</i>	2	99,56
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	99,67
<i>Acinetobacter sp</i>	1	99,72
<i>Arthrobacter aurescens</i>	1	99,779
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	99,834
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1	99,89
<i>Moraxella osloensis</i>	1	99,945
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	100,00
TOTAL	1811	

Fonte: acervo pessoal

Tabela 19 – Bactérias isoladas em classe D. (As células destacadas exibem as bactérias responsáveis por, no mínimo, 80% da microbiota do local)

Nome	Número de colônias (UFC)	%
<i>Staphylococcus hominis</i>	92	40,00
<i>Micrococcus luteus</i>	45	59,57
<i>Brevibacterium linens</i>	36	75,22
<i>Staphylococcus cohnii</i>	18	83,04
<i>Staphylococcus arlettae</i>	14	89,13
<i>Kocuria sp</i>	13	94,78
<i>Staphylococcus kloosii</i>	12	100,00
TOTAL	230	

Fonte: acervo pessoal

Tabela 20 – Bactérias isoladas em luvas e roupas do grupo “Pessoal”. (As células destacadas exibem as bactérias responsáveis por, no mínimo, 80% da microbiota do local) (continua)

Nome	Número de colônias (UFC)	%
<i>Micrococcus luteus</i>	636	23,09
<i>Micrococcus lylae</i>	370	36,52
<i>Micrococcus sp</i>	346	49,07
<i>Staphylococcus sp</i>	184	55,75
<i>Kocuria varians</i>	141	60,87
<i>Staphylococcus arlettae</i>	123	65,34
<i>Bacillus oleronius</i>	120	69,69
<i>Staphylococcus cohnii</i>	116	73,90
<i>Micrococcus halobius</i>	80	76,81
<i>Staphylococcus hominis</i>	63	79,09
<i>Staphylococcus kloosii</i>	60	81,27
<i>Arthrobacter sp</i>	59	83,41
<i>Staphylococcus xylosum</i>	55	85,41
<i>Kocuria sp</i>	37	86,75
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	87,91
<i>Arthrobacter aureescens</i>	31	89,04
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	25	89,95
<i>Arthrobacter ilicis</i>	24	90,82
<i>Bacillus sp</i>	22	91,62
<i>Staphylococcus warneri</i>	22	92,41
<i>Acinetobacter baumannii</i>	21	93,18
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	16	93,76
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	16	94,34
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15	94,88
<i>Kocuria kristinae</i>	12	95,32
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	10	95,68
<i>Staphylococcus simulans</i>	10	96,04
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9	96,37
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	9	96,70
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	8	96,99

Tabela 20 – Bactérias isoladas em luvas e roupas do grupo “Pessoal”. (As células destacadas exibem as bactérias responsáveis por, no mínimo, 80% da microbiota do local) (conclusão)

Nome	Número de colônias (UFC)	%
<i>Corynebacterium auris</i>	8	97,28
<i>Enterobacter agglomerans</i>	7	97,53
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	7	97,79
<i>Microbacterium saperdae</i>	7	98,04
<i>Staphylococcus sciuri</i>	7	98,29
<i>Deinococcus erythromyxa</i>	6	98,51
<i>Flavobacterium resinovororum</i>	6	98,73
<i>Bacillus circulans</i>	5	98,91
<i>Paenibacillus macerans</i>	5	99,093
<i>Bacillus cereus</i>	3	99,20
<i>Acinetobacter sp</i>	2	99,274
<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	2	99,347
<i>Brevibacillus brevis</i>	2	99,419
<i>Brevibacterium linens</i>	2	99,492
<i>Chryseomonas luteola</i>	2	99,564
<i>Ralstonia pickettii</i>	2	99,637
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2	99,71
<i>Bacillus megaterium</i>	1	99,746
<i>Bacillus pumilus</i>	1	99,782
<i>Brevibacterium casei</i>	1	99,819
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	1	99,855
<i>Deinococcus sp</i>	1	99,891
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	1	99,927
<i>Moraxella osloensis</i>	1	99,964
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	100,00
TOTAL	2755	

Fonte: acervo pessoal

Como mostrado pela Figura 39, é possível observar que *Micrococcus luteus* foi o mais frequentemente isolado da classe B e “Pessoal”; *Staphylococcus cohnii* foi o principal contaminante da classe C, enquanto *Bacillus subtilis* e *S. hominis*

estiveram presentes em maior número nas classes A e D, respectivamente. A biocontaminação com *M. luteus*, *S. cohnii* e *S. hominis* pode ser reduzida ou eliminada através de procedimentos de manutenção rigorosos, tais como limpezas regulares. *B. subtilis* e outros bacilos formadores de esporos, como *Brevibacillus brevis* e *B. sphaericus*, podem requerer desinfetantes esporicidas. *Staphylococcus sp* são facilmente adaptados aos ambientes diversos do hospedeiro humano e ocorrem como microbiota dos homens na pele, conjuntiva, nariz, faringe, boca, intestino grosso, uretra anterior e vagina. *Micrococcus sp* são também comumente encontrados na pele do corpo humano (TODAR, 2007).

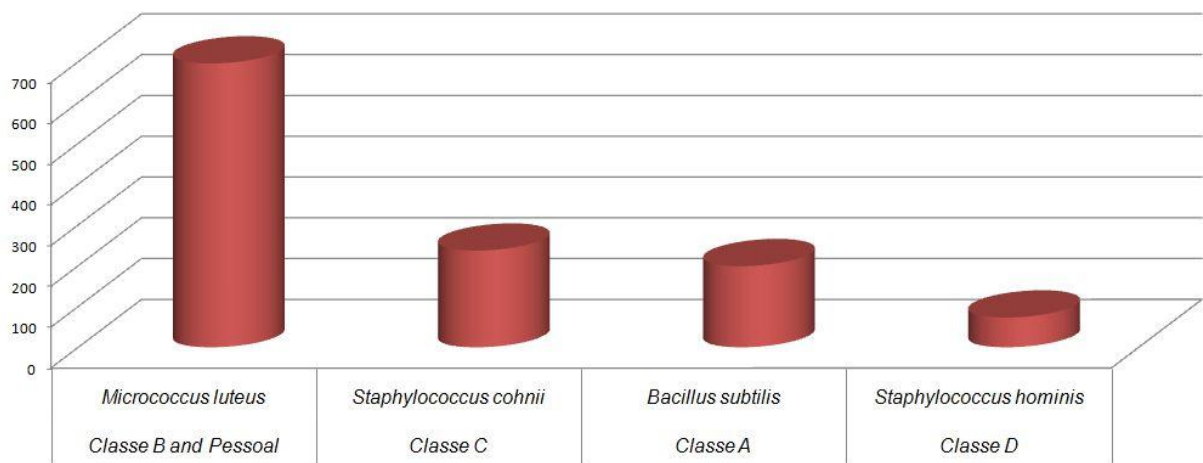


Figura 39 - Bactérias mais freqüentemente isoladas nas diferentes classes de salas limpas
Fonte: acervo pessoal

Na época em que este estudo foi conduzido, 202 bactérias foram isoladas da classe C e identificadas como *Flavobacterium resinovorum*, posteriormente reclassificada por Lim et al como *Novosphingobium resinovorum* (LIM; MOON; CHUN, 2007). Estas bactérias são bacilos Gram negativos, decompositores de resinas ácidas, e estão amplamente distribuídos no ambiente, sendo capazes de crescer em resinas ácidas como único substrato orgânico (MARTIN; YU; MOHN, 1999). *Flavobacteria* são geralmente bactérias comensais e são patógenos oportunistas. A sala da qual *N. resinovorum* foi isolada é utilizada principalmente para limpeza e lavagem de tanques, fazendo com que água se acumule temporariamente no chão. Uma deficiência na limpeza e desinfecção do chão e o fato de que *N. resinovorum* seja amplamente distribuída no solo e água fresca podem indicar a provável fonte de contaminação nesta sala limpa.

4.4 PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS DAS BACTÉRIAS ISOLADAS COM MAIOR FREQUÊNCIA

Tabela 21 – Perfil de Ácidos Graxos das Bactérias Mais Comumente Encontradas em Salas Limpas (continua)

Ácido Graxo	<i>Micrococcus</i>		<i>Staphylococcus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus</i>	
	<i>luteus</i>		<i>cohnii</i>				<i>hominis</i>	
	Média (%)	n	Média (%)	n	Média (%)	n	Média (%)	n
10:0	ND		0,11-0,15	2	ND	-	ND	-
11:0 anteiso	0,14-0,20	5	ND	-	ND	-	ND	-
12:0	ND	-	0,10 (a)	1	ND	-	ND	-
13:0 anteiso	0,65-1,07	10	ND	-	ND	-	ND	-
13:0 iso	0,36-0,50	10	0,26-0,46	8	0,21-0,27	2	0,29-0,41	6
14:0	1,06-1,58	10	0,45-0,81	10	0,25-0,37	3	0,22 (a)	1
14:0 iso	2,32-3,72	10	0,67-0,95	10	1,30-1,46	10	1,66-2,95	10
15:0	0,50-1,85	3	1,12 (a)	1	1,13 (a)	1	1,06-1,92	4
15:0 2OH	0,23-0,45	4	ND	-	ND	-	ND	-
15:0 anteiso	61,18- 68,02	10	46,76-50,66	10	39,13- 43,60	10	36,91- 39,57	10
15:0 iso	18,92- 22,02	10	13,88-16,74	10	23,11- 27,83	10	9,35-11,10	10
15:1 iso H/13:0 30H	0,27-0,49	3	ND	-	ND	-	ND	-
16:0	0,64-1,36	9	1,56-2,23	10	1,91-2,22	10	0,78-1,28	9
16:0 iso	2,70-4,81	10	1,15-1,81	10	3,80-4,36	10	0,93-1,44	10
16:1 iso H	0,50 (a)	1	ND	-	ND	-	ND	-
16:1 ω11c	ND	-	ND	-	0,53-0,91	6	ND	-
16:1 ω7c alcohol	ND	-	ND	-	0,45-0,95	6	ND	-
16:1 ω7c/15 iso	0,31-0,79	6	ND	-	ND	-	ND	-
2OH								
17:0 anteiso	1,34-4,93	10	11,51-13,33	10	11,12- 13,14	10	6,75-8,75	10

Tabela 21 – Perfil de Ácidos Graxos das Bactérias Mais Comumente Encontradas em Salas Limpas (conclusão)

Ácido Graxo	<i>Micrococcus</i>		<i>Staphylococcus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus</i>	
	<i>luteus</i>		<i>cohnii</i>				<i>hominis</i>	
	Média (%)	n	Média (%)	n	Média (%)	n	Média (%)	n
17:0 iso	0,20-0,50	3	6,00-7,62	10	8,95-10,89	10	5,45-7,15	10
17:1 anteiso B	ND	-	ND	-	0,62-2,13	6	ND	-
18:0	ND	-	2,69-3,69	10	ND	-	6,93-9,17	10
18:0 iso	ND	-	0,29-0,49	6	ND	-	1,21-1,99	10
19:0	ND	-	ND	-	ND	-	0,43-0,63	7
19:0 anteiso	ND	-	1,09-1,51	10	ND	-	4,15-6,10	10
19:0 iso	ND	-	2,03-2,82	10	ND	-	6,68-8,35	10
20:0	ND	-	3,10-5,60	10	ND	-	7,87-10,28	10
20:0 iso	ND	-	ND	-	ND	-	0,45-1,45	6
anteiso 17:1 ω 9c	0,32 (a)	1	ND	-	ND	-	ND	-
iso 17:1 ω 10c	ND	-	ND	-	0,77-1,47	9	ND	-
IS	0,693- 0,839	10	0,582-0,695	10	0,494- 0,739	10	0,488- 0,573	10

n: número de cepas contendo o respectivo ácido graxo.

a: ácido graxo detectado em apenas uma cepa, portanto o intervalo de confiança não pôde ser calculado.

IS: Índice de Similaridade. O valor varia de 0 a 1.

A porcentagem foi calculada com um intervalo de confiança de 95%

ND: Não Detectado.

Fonte: acervo pessoal

As composições de ácidos graxos de *M. luteus*, *S. cohnii*, *B. subtilis* e *S. hominis* isolados de salas limpas e cultivados em condições padrão do FAME foram determinados. A Tabela 21 mostra que esses microrganismos possuem perfis de ácidos graxos semelhantes, no sentido de que contêm frações maiores de ácidos graxos saturados de cadeia reta (n:0), insaturados de cadeia reta com uma configuração cis (n:1c), iso (um grupo metila ocorre no penúltimo carbono da cadeia) e anteiso (um grupo metila ocorre no antepenúltimo carbono da cadeia), na faixa de 10 a 20 carbonos, onde “n” é o número total de carbonos detectados. 15:0 anteiso apareceu como o ácido graxo mais abundante na composição de todos esses microrganismos. Os padrões de ácidos graxos observados são típicos de bactérias Gram positivas (STACKENBRANDT et al., 1995). Esses microrganismos diferem um do outro por conterem diferentes quantidades de ácidos graxos. Dois picos típicos

de bacilos formadores de esporos foram detectados em seis de dez cepas e foram adequadamente nomeados como 16:1 ω 11c e 16:1 ω 7c álcool.

Alguns ácidos graxos, como 16:1 ISO H e ANTEISO 17:1 ω 9c em *M. luteus*, 12:0 em *S. cohnii*, 15:0 em *S. cohnii* e *B. subtilis* ou 14:0 em *S. hominis*, ocorreram como traços nestas bactérias Gram positivas, sendo detectadas em somente uma de dez cepas analisadas. De fato, é muito atípico da parte desses microrganismos apresentarem tais ácidos graxos, sendo mais comuns ácidos graxos de cadeia ramificada (MIDI, 2005), fato que contribui para explicar a razão de terem sido encontrados índices de similaridade relativamente baixos ($0,300 < IS < 0,500$) para algumas cepas.

4.5 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DA TOMADA DE ENSAIO SOBRE O PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE BACTÉRIAS

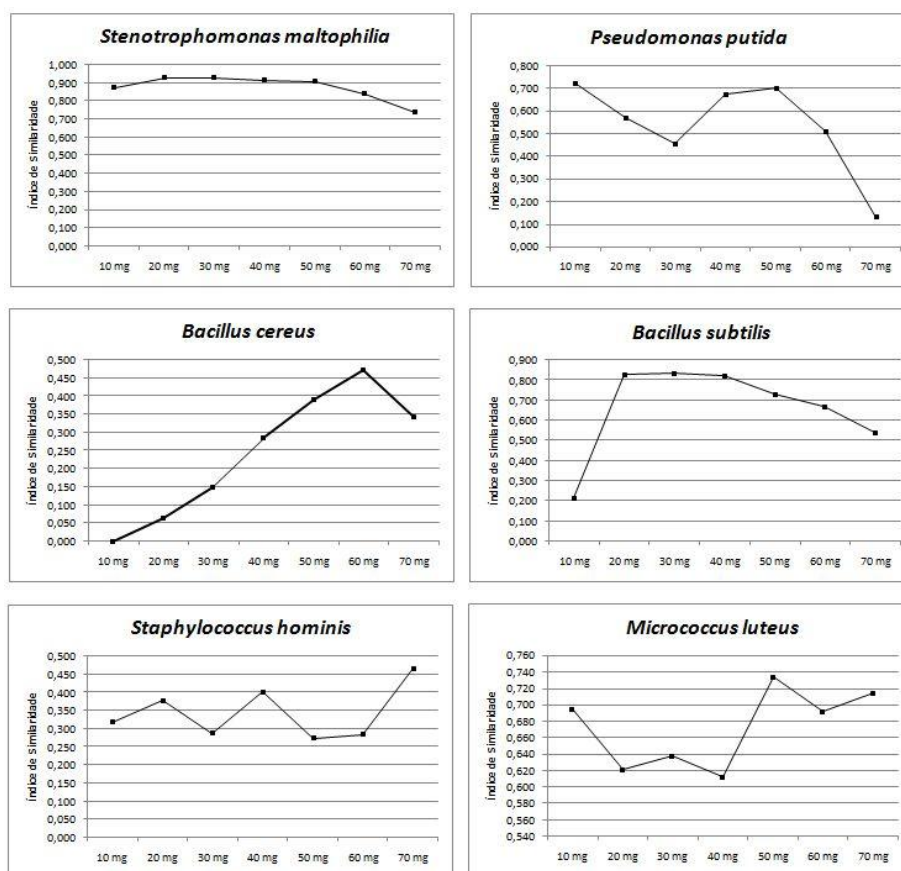


Figura 40 – Influência da tomada de ensaio sobre o índice de similaridade.
Fonte: acervo pessoal

O procedimento padrão de análise determina que 40 a 50 mg de microrganismos sejam tomados como amostra.

Ao contrário do que se esperava, no entanto, nem todos os microrganismos apresentaram o maior valor de IS com esta tomada de ensaio, como indica a Figura 40. Os bacilos Gram negativos analisados apresentaram maiores valores de IS com tomada de ensaio de 20 mg para *S. maltophilia* e 10 mg para *P. putida*. Os bacilos Gram positivos apresentaram uma tomada de ensaio ideal de 60 mg para *B. cereus* e de 30 mg para *B. subtilis*. Já os cocos Gram positivos analisados apresentaram melhores resultados com tomada de ensaio de 70 mg para *S. hominis* e 50 mg para *M. luteus*.

A escolha destes microrganismos para avaliação do efeito da tomada de ensaio sobre a qualidade do resultado de identificação foi baseada na elevada frequência com que eles foram isolados das áreas limpas amostradas.

Entre todos esses microrganismos avaliados, a *S. maltophilia* é a que apresentou o patamar mais constante de valores de IS, demonstrando que a tomada de ensaio pouco influencia o resultado da identificação bacteriana. Uma possível explicação para esta observação pode ser deduzida a partir da análise da Tabela 22, que mostra como a composição de ácidos graxos deste microrganismo se manteve praticamente inalterada em todas as tomadas de ensaio. De fato, esta é uma das razões principais pela qual a *S. maltophilia* é utilizada como controle positivo das análises de identificação por FAME, ou seja, ela possui um perfil bem característico, com 36 ácidos graxos, que, em razão de serem em grande número, a não expressão de um ou a super-expressão de outro não alteram significativamente o resultado final.

Como também mostrado pela Tabela 22, o valor máximo de IS com a tomada de ensaio de 20 mg não está diretamente relacionado à área total sob a curva do cromatograma. Com 20 mg de amostra, a área total foi de 133780, bem inferior à área máxima de 302273 obtida com 60 mg de amostra.

Tabela 22 – Perfis de ácidos graxos de *Stenotrophomonas maltophilia* em função de diferentes tomadas de ensaio.

<i>S. maltophilia</i>	Média (%)						
Ácido Graxo	10 mg	20 mg	30 mg	40 mg	50 mg	60 mg	70 mg
Saturado							
10:0	0,65	0,57	0,56	0,60	0,62	0,66	0,79
14:0	3,88	3,67	3,65	3,70	3,57	3,59	3,41
15:0	1,03	0,70	0,64	0,60	0,61	0,54	0,55
16:0	6,11	5,91	5,49	5,54	5,85	4,88	5,19
Insaturado							
14:1 w5c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,15	0,17
16:1 w9c	2,89	2,91	2,87	2,89	2,68	2,66	2,48
17:1 w8c	0,00	0,00	0,07	0,22	0,14	0,13	0,19
18:1 w9c	1,12	1,26	1,10	1,09	1,09	0,85	0,94
18:1 w7c	0,43	0,68	0,62	0,61	0,62	0,49	0,54
Ramificado com radical metila							
11:0 ISO	3,74	3,49	3,57	3,79	4,03	4,41	5,04
11:0 ANTEISO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,10
13:0 ISO	0,17	0,48	0,42	0,47	0,44	0,46	0,48
13:0 ANTEISO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
14:0 ISO	0,42	0,58	0,61	0,59	0,62	0,65	0,61
15:1 ISO F	1,05	1,00	1,01	0,99	0,91	0,96	0,91
15:0 ISO	39,75	39,90	40,29	39,47	38,85	38,79	36,56
15:0 ANTEISO	6,96	7,31	7,59	7,27	7,42	8,05	7,03
16:0 ISO	0,60	0,83	0,85	0,83	0,87	0,79	0,80
17:0 ISO	3,05	3,12	2,70	2,70	2,89	2,18	2,54
17:0 ANTEISO	0,00	0,00	0,00	0,10	0,05	0,03	0,04
19:0 ISO	0,00	0,27	0,09	0,10	0,20	0,00	0,12
ISO 17:1 w9c	4,28	4,44	4,35	4,25	4,06	3,85	3,70
Hidroxi							
10:0 2OH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,17
10:0 3OH	0,00	0,15	0,21	0,23	0,25	0,26	0,32
11:0 3OH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
12:0 3OH	3,82	3,26	3,37	3,63	3,74	3,98	4,75
12:1 3OH	0,00	0,00	0,00	0,02	0,03	0,00	0,00
13:0 2OH	0,00	0,09	0,31	0,34	0,36	0,44	0,46
Ramificado com radical hidroxi							
11:0 ISO 3OH	2,09	1,81	1,93	2,01	2,16	2,30	2,78
12:0 ISO 3OH	0,00	0,00	0,00	0,08	0,08	0,14	0,19
13:0 ISO 3OH	4,99	4,43	4,64	4,92	5,16	5,61	6,60
Ciclopropano							
17:0 CYCLO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
Outros							
Unknown 11,799 (a)	1,65	1,53	1,62	1,70	1,74	1,98	2,35
Sum in feature 2 (b)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,05	0,07
Sum in feature 3 (c)	11,29	11,36	11,45	11,27	10,77	10,87	10,05
Sum in feature 4 (d)	0,00	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Area total	69192	133780	176708	227819	287557	302273	288503

^a Este ácido graxo possui uma identidade desconhecida e os números indicam seus comprimentos de cadeia equivalente (ECL).

^b Este ácido graxo, cujo comprimento de cadeia equivalente é 10,928, possui identidade incerta, podendo representar um 12:0 ALDE, e por esta razão foi considerado como “sum in feature 2”.

^c Os ácidos graxos 16:1 w7c e 15 iso 2OH não puderam ser separados um do outro por cromatografia gasosa, pelo método FAME, e juntos foram considerados como “sum in feature 3”.

^d Os ácidos graxos 17:1 anteiso B e 17:1 iso I não puderam ser separados um do outro por cromatografia gasosa, pelo método FAME, e juntos foram considerados como “sum in feature 4”.

Tabela 23 - Perfis de ácidos graxos de *Pseudomonas putida* em função de diferentes tomadas de ensaio.

<i>P. putida</i>	Média (%)						
Ácido Graxo	10 mg	20 mg	30 mg	40 mg	50 mg	60 mg	70 mg
Saturado							
10:0	0,00	0,04	0,11	0,12	0,15	0,13	0,10
12:0	2,40	2,07	2,00	2,05	2,10	2,06	1,83
13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
14:0	0,76	0,65	0,64	0,59	0,58	0,58	0,50
15:0	2,14	1,44	1,10	0,91	0,72	0,67	0,75
16:0	28,84	29,55	29,51	29,64	28,59	27,12	25,94
17:0	0,00	0,41	0,45	0,36	0,25	0,22	0,46
18:0	0,12	0,37	0,34	0,33	0,23	0,21	0,30
Insaturado							
16:1 w5c	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,09	0,25
17:1 w8c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03
18:1 w7c	17,81	17,96	17,78	18,93	18,64	17,44	17,81
18:1 w9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04
Ramificado com radical metila							
13:0 ISO	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,05	0,14
15:0 ISO	0,11	1,67	2,24	0,77	0,79	2,20	5,10
15:0 ANTEISO	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,13	0,28
16:0 ISO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
17:0 ISO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07
19:0 ISO	0,00	0,07	0,07	0,04	0,00	0,00	0,02
ISO 17:1 w9c	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,07	0,32
ANTEISO 17:1 w9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
Hidroxi							
8:0 3OH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00
10:0 3OH	5,72	4,62	4,21	4,50	4,80	4,44	3,74
11:0 3OH	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
12:0 2OH	3,90	3,00	2,71	2,86	2,98	2,95	2,30
12:0 3OH	3,39	2,54	2,30	2,36	2,45	2,35	1,78
14:0 2OH	0,00	0,05	0,05	0,15	0,16	0,16	0,15
15:0 2OH	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,05
16:0 2OH	0,64	0,72	0,76	0,79	0,75	0,73	0,74
16:0 3OH	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,18	0,41
16:1 2OH	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,02
Ramificado com radical hidroxi							
15:0 ISO 3OH	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,12	0,40
17:0 ISO 3OH	0,00	0,63	0,84	0,26	0,25	0,71	1,99
Ciclopropano							
17:0 CYCLO	5,64	9,14	10,30	8,51	6,01	5,19	5,97
19:0 CYCLO w8c	0,20	1,41	1,73	1,16	0,48	0,33	0,73
Outros							
Unknown 16,582 (a)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07
Sum in feature 2 (b)	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00	0,02
Sum in feature 3 (c)	28,33	23,64	22,52	25,64	30,04	31,82	27,65
Area total	95945	194556	365051	398282	435820	492401	738648

^a Este ácido graxo possui uma identidade desconhecida e os números indicam seus comprimentos de cadeia equivalente (ECL).

^b Este ácido graxo, cujo comprimento de cadeia equivalente é 10,928, possui identidade incerta, podendo representar um 12:0 ALDE, e por esta razão foi considerado como "sum in feature 2".

^c Os ácidos graxos 16:1 w7c e 15 iso 2OH não puderam ser separados um do outro por cromatografia gasosa, pelo método FAME, e juntos foram considerados como "sum in feature 3".

A *P. putida* revelou um comportamento irregular dos valores de IS em função da variação da tomada de ensaio. O valor de IS começou em 0,722, caiu suavemente até 0,454 com 30 mg de amostra, voltou a subir até 0,700 em 50 mg e diminuiu rapidamente até o valor mínimo de 0,129 em 70 mg. Como mostrado pela Tabela 23, a porcentagem de ácidos graxos saturados de cadeia curta 12:0, ácidos graxos hidroxi 10:3OH, 12:0 2OH e 12:0 3OH pareceram acompanhar as elevações e declínios dos valores de IS; da mesma forma, a porcentagem do ácido graxo 16:0, que é o ácido graxo presente em maior concentração na *P. putida*, diminuiu acentuadamente com o aumento da tomada de ensaio. Estes componentes do perfil de ácidos graxos deste microrganismo parecem exercer forte impacto direto sobre o valor de IS.

Para *P. putida*, a área total é diretamente proporcional à tomada de ensaio, muito embora o valor máximo de área total corresponda ao valor mínimo de IS.

A Figura 40 mostra que *B. cereus* apresenta uma tendência crescente dos valores de IS em decorrência do aumento da tomada de ensaio, mas esta tendência é subitamente interrompida quando a tomada de ensaio passa de 60 mg para 70 mg. Como é possível observar pela Tabela 24, o aumento da tomada de ensaio não necessariamente implica em aumento da porcentagem de ácidos graxos detectados; muito pelo contrário, o que se observa no geral é justamente uma redução da porcentagem em função da tomada de ensaio. A princípio, pode parecer estranho que valores maiores de IS sejam obtidos com baixas porcentagens de ácidos graxos, mas é importante ressaltar aqui que valores altos de IS ocorrem quando o perfil de ácidos graxos de uma amostra desconhecida é muito semelhante a um perfil da biblioteca padrão do sistema FAME. Neste caso, o perfil típico de *B. cereus* foi mais semelhante ao obtido com 60 mg de amostra.

A queda do valor de IS de 0,471 em 60 mg para 0,342 em 70 mg pode ser explicada pela interrupção da tendência decrescente da porcentagem do ácido graxo saturado 14:0 e pela brusca elevação da porcentagem do ácido graxo ramificado 13:0 iso.

Tabela 24 - Perfis de ácidos graxos de *Bacillus cereus* em função de diferentes tomadas de ensaio.

B. cereus	Média (%)						
Ácido Graxo	10 mg	20 mg	30 mg	40 mg	50 mg	60 mg	70 mg
Saturado							
14:0	25,40	13,13	10,97	9,10	8,33	7,73	8,34
15:0	3,00	1,99	2,33	1,67	1,55	1,57	1,63
16:0	3,21	5,02	5,11	5,16	4,96	4,17	3,33
18:0	0,00	1,20	1,27	0,85	0,42	0,19	0,00
Insaturado							
16:1 w7c alcohol	0,00	0,00	0,00	0,20	0,80	0,91	0,99
18:1 w9c	0,00	0,20	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00
Ramificado com radical metila							
12:0 ISO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,52	0,58	0,91
14:0 ISO	2,76	2,47	2,67	2,55	3,26	3,55	4,55
13:0 ISO	6,95	6,95	8,00	7,59	7,89	8,45	12,69
13:0 ANTEISO	0,00	0,00	0,00	0,58	0,71	0,75	1,19
15:0 ISO	29,56	33,22	35,03	35,29	31,85	31,86	30,79
15:0 ANTEISO	2,93	3,01	2,99	3,06	3,43	3,38	3,48
16:0 ISO	3,89	4,10	4,02	4,05	5,16	5,30	4,79
17:0 ISO	7,53	11,53	11,03	11,71	10,68	9,71	7,21
17:0 ANTEISO	0,00	1,16	1,08	1,12	1,30	1,13	0,86
17:1 ANTEISO A	0,00	0,23	0,00	0,44	0,81	0,72	0,44
ISO 17:1 w5c	3,67	4,48	4,30	4,55	4,59	5,15	4,25
ISO 17:1 w10c	2,31	2,57	2,48	2,71	3,01	3,61	2,87
Hidroxi							
15:0 2OH	0,00	0,00	0,00	0,41	0,76	0,95	1,03
Outros							
Sum in feature 2 (a)	1,80	1,83	1,78	1,94	2,36	2,52	2,81
Sum in feature 3 (b)	6,99	6,93	6,94	6,85	7,62	7,79	7,83
Área total	33428	49739	45302	70722	74848	76226	68937

^a Este ácido graxo, cujo comprimento de cadeia equivalente é 10,928, possui identidade incerta, podendo representar um 12:0 ALDE, e por esta razão foi considerado como “sum in feature 2”.

^b Os ácidos graxos 16:1 w7c e 15 iso 2OH não puderam ser separados um do outro por cromatografia gasosa, pelo método FAME, e juntos foram considerados como “sum in feature 3”.

Ao contrário de *B. cereus*, o microrganismo *B. subtilis* exibiu uma tendência decrescente de IS com o aumento da tomada de ensaio. Através da Tabela 25, é possível inferir que esta tendência está diretamente relacionada ao aumento gradativo da porcentagem do ácido graxo ramificado 15:0 anteiso, e redução gradativa da porcentagem dos ácidos graxos ramificados 17:0 iso e 17:0 anteiso.

O valor de IS igual a 0,214 obtido com 10 mg de amostra pode ser explicado pela área total abaixo de 50000, onde alguns ácidos graxos importantes para a correta nomeação não foram detectados ou foram detectados em porcentagens abaixo do normal. É o caso, por exemplo, dos ácidos graxos 16:1 w11c, 14:0 iso e iso 17:1 w10c, que não foram detectados com 10 mg de amostra. Com isso, a

proporção dos outros ácidos graxos muda significativamente, o que impacta diretamente sobre o resultado da identificação.

Tabela 25 - Perfis de ácidos graxos de *Bacillus subtilis* em função de diferentes tomadas de ensaio.

<i>B. subtilis</i>	Média (%)						
Ácido Graxo	10 mg	20 mg	30 mg	40 mg	50 mg	60 mg	70 mg
Saturado							
14:0	0,00	0,00	0,31	0,25	0,36	0,00	0,13
15:0	5,40	1,63	1,38	1,31	1,12	1,17	1,22
16:0	3,02	2,78	2,59	2,63	2,41	2,35	2,24
Insaturado							
16:1 w11c	0,00	0,84	0,92	0,86	0,88	0,92	0,91
Ramificado com radical metila							
14:0 ISO	0,00	0,71	0,75	0,78	0,83	0,83	0,86
15:0 ISO	27,49	26,70	27,23	27,20	27,74	28,60	28,42
15:0 ANTEISO	39,57	38,28	39,16	39,66	41,24	41,69	43,12
16:0 ISO	0,79	2,34	2,31	2,37	2,23	2,21	2,12
17:0 ISO	11,61	11,62	10,96	11,02	9,84	9,25	8,53
17:0 ANTEISO	12,12	12,46	11,81	11,59	10,89	10,35	9,85
ISO 17:1 w10c	0,00	1,61	1,56	1,43	1,45	1,49	1,51
Outros							
Sum in feature 4 (a)	0,00	1,02	1,02	0,89	1,02	1,14	1,08
Área total	17017	59102	77731	76461	88853	85337	78548

^a Os ácidos graxos 17:1 anteiso B e 17:1 iso I não puderam ser separados um do outro por cromatografia gasosa, pelo método FAME, e juntos foram considerados como “sum in feature 4”.

Tanto para *B. cereus* como para *B. subtilis*, um aumento na tomada de ensaio não necessariamente se correlaciona com um aumento na área total. Acima de 60 mg, as proporções de ácidos graxos se alteraram e a área total diminuiu com o aumento da massa celular. Isto parece ser devido à formação de gel durante a etapa de saponificação, o que pode ter resultado em uma extração diferencial de alguns ácidos graxos.

A Tabela 26 e a Tabela 27 mostram que estes cocos Gram positivos possuem uma variedade bem menor de ácidos graxos em suas composições que os bacilos Gram negativos, por exemplo. Microrganismos como estes, com poucos ácidos graxos, tendem a apresentar um comportamento semelhante ao exibido pela Figura 40, com valores de IS praticamente aleatórios em função da variação da tomada de ensaio. Isto é explicado justamente pela baixa diversidade de ácidos graxos presentes, pois qualquer mínima variação na concentração de um deles poderá alterar significativamente toda a proporção de ácidos graxos e resultar em baixos valores de IS.

Tabela 26 - Perfis de ácidos graxos de *Staphylococcus hominis* em função de diferentes tomadas de ensaio.

S. hominis		Média (%)						
Ácido Graxo	10 mg	20 mg	30 mg	40 mg	50 mg	60 mg	70 mg	
Saturado								
14:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,15	
16:0	1,40	1,13	0,98	1,07	0,98	1,03	1,19	
18:0	10,51	10,27	9,40	9,96	8,94	9,30	7,34	
19:0	0,00	0,00	0,00	0,56	0,42	0,45	0,17	
20:0	10,33	9,54	7,77	8,87	6,71	6,34	3,28	
Ramificado com radical metila								
14:0 ISO	1,13	1,00	0,90	0,96	0,91	0,87	1,04	
13:0 ISO	0,00	0,00	0,00	0,11	0,17	0,17	0,21	
15:0 ISO	8,96	7,88	6,79	7,71	7,10	7,66	8,99	
15:0 ANTEISO	39,56	38,31	39,29	38,72	40,60	40,25	47,45	
16:0 ISO	0,00	0,84	0,84	0,75	0,90	0,78	0,91	
17:0 ISO	6,94	7,35	7,56	7,23	7,64	7,71	7,65	
17:0 ANTEISO	10,81	12,50	14,47	12,39	14,34	13,96	14,15	
18:0 ISO	0,00	0,90	0,96	0,84	0,94	0,89	0,72	
19:0 ISO	5,82	5,39	5,37	5,64	5,09	5,29	3,33	
19:0 ANTEISO	4,55	4,90	5,68	5,19	5,24	5,30	3,43	
Área total	39157	79724	107904	137979	166462	242657	245037	

Tabela 27 - Perfis de ácidos graxos de *Micrococcus luteus* em função de diferentes tomadas de ensaio.

M. luteus		Média (%)						
Ácido Graxo	10 mg	20 mg	30 mg	40 mg	50 mg	60 mg	70 mg	
Saturado								
14:0	1,66	1,20	1,08	1,12	1,57	1,40	1,28	
15:0	0,00	0,00	0,41	0,51	0,45	0,41	0,47	
16:0	0,00	0,00	0,69	0,48	0,62	0,55	0,53	
Ramificado com radical metila								
11:0 ANTEISO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	
14:0 ISO	4,24	4,25	4,24	4,34	4,74	4,72	4,47	
13:0 ISO	0,00	0,00	0,00	0,22	0,41	0,36	0,34	
13:0 ANTEISO	0,26	0,81	1,25	0,93	0,80	0,78	0,75	
15:0 ISO	20,71	18,53	17,86	17,64	20,01	19,11	19,41	
15:0 ANTEISO	68,56	70,42	69,77	70,26	66,41	67,25	66,85	
16:0 ISO	3,61	3,46	3,50	3,27	3,55	3,75	3,72	
17:0 ANTEISO	0,96	1,32	1,22	1,24	1,01	1,30	1,22	
Outros								
Sum in feature 3 (a)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,36	0,38	
Sum in feature 4 (b)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	
Área total	37360	55564	77292	108079	121362	148076	228676	

^a Os ácidos graxos 16:1 w7c e 15 iso 2OH não puderam ser separados um do outro por cromatografia gasosa, pelo método FAME, e juntos foram considerados como “sum in feature 3”.

^b Os ácidos graxos 17:1 anteiso B e 17:1 iso I não puderam ser separados um do outro por cromatografia gasosa, pelo método FAME, e juntos foram considerados como “sum in feature 4”.

Como é virtualmente impossível determinar a tomada de ensaio ótima para cada microrganismo, é recomendável coletar de 40 a 50 mg de células por tubo, conforme manual do sistema FAME. Poucas células podem não fornecer ácidos graxos suficientes para uma comparação confiável com a biblioteca; células demais, no entanto, podem resultar em valores excessivos de áreas totais e sobrecarga da coluna.

4.6 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA SOBRE O PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE BACTÉRIAS

Como já abordado no tópico 2.8, os microrganismos desenvolveram mecanismos de adaptação homeofásica, ajustando a composição e a fluidez de suas membranas, para compensar as mudanças induzidas por certos fatores ambientais, como a temperatura. Portanto, o perfil de ácidos graxos, e conseqüentemente o valor de IS, variam significativamente com a mudança da temperatura de incubação das amostras, uma vez que a biblioteca FAME foi construída com amostras cultivadas a 28 °C.

Os resultados obtidos a partir das análises de um bacilo Gram negativo (*S. maltophilia*), um bacilo Gram positivo (*B. subtilis*) e um coco Gram positivo (*M. luteus*), nas temperaturas de 28 °C, 32,5 °C e 37 °C, confirmaram resultados publicados previamente e mostraram que o fator temperatura exerce forte influência sobre a composição da bicamada lipídica dos microrganismos, como ilustrado pela Figura 41.

A *S. maltophilia* foi escolhida para este estudo por ser o bacilo Gram negativo utilizado como controle positivo em todas as corridas cromatográficas. O *B. subtilis* é o bacilo Gram positivo mais freqüente nas áreas limpas amostradas, ao passo que o *M. luteus* é o coco Gram positivo mais freqüente.

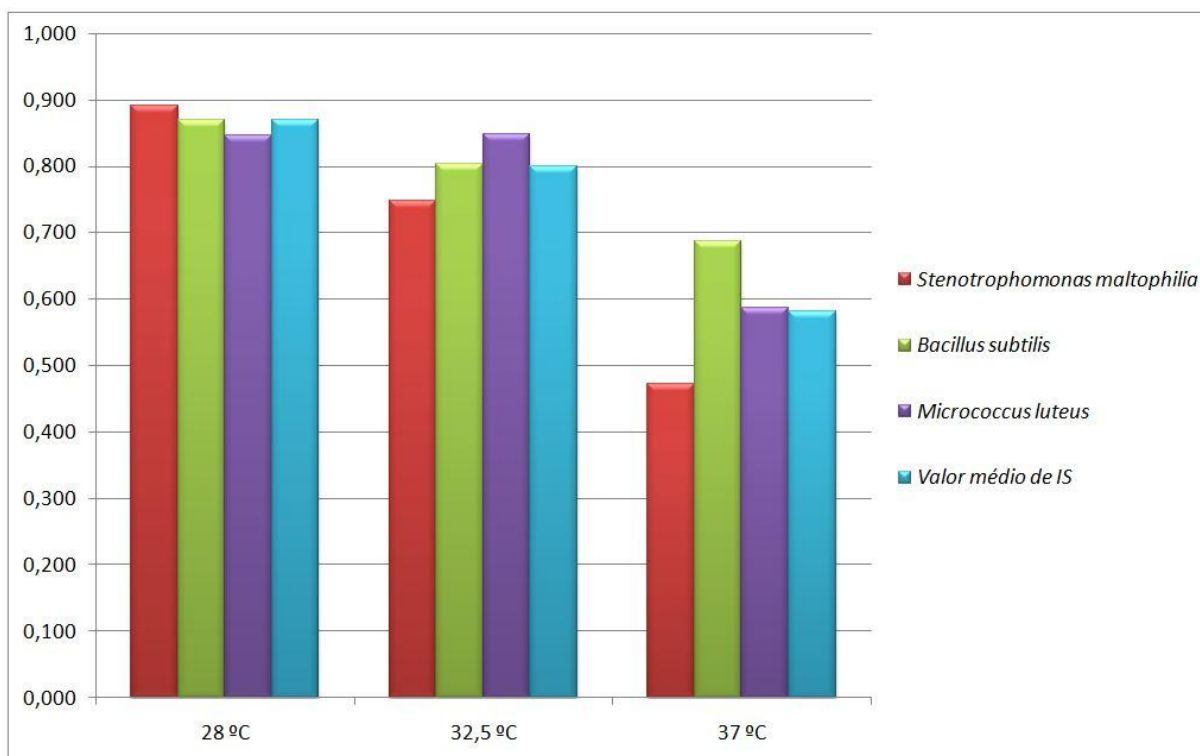


Figura 41 – Efeito da variação da temperatura de incubação sobre o índice de similaridade
Fonte: acervo pessoal

Como esperado, o IS diminuiu conforme a temperatura se afastou do valor padrão de 28 °C. À temperatura de 28 °C, os microrganismos analisados forneceram um valor médio de IS igual a 0,869, reduzindo para 0,800 a 32,5 °C e para 0,582 a 37 °C. A *S. maltophilia* foi o microrganismo que sofreu queda mais acentuada de IS com o aumento da temperatura, ao passo que *M. luteus* pareceu ser o que sofreu menor alteração do perfil de ácidos graxos.

As tabelas a seguir mostram a composição de ácidos graxos de cada microrganismo em cada uma das temperaturas avaliadas. Para todos os casos, foi considerado o perfil típico aquele obtido com a temperatura de 28 °C, em relação ao qual os outros perfis foram comparados.

Tabela 28 - Perfis de ácidos graxos de *Stenotrophomonas maltophilia* em função de diferentes temperaturas.

<i>S. maltophilia</i>	Média (%)		
	28 °C	32,5 °C	37 °C
Ácido Graxo			
Saturado			
10:0	0,48	0,44	0,54
14:0	3,56	3,37	3,56
16:0	6,15	8,49	13,03
18:0	0,00	0,14	0,30
Insaturado			
14:1 w5c	0,04	0,00	0,00
16:1 w9c	2,36	1,87	1,54
17:1 w8c	0,18	0,11	0,00
18:1 w9c	0,95	0,85	0,56
18:1 w7c	0,57	0,49	0,28
Ramificado com radical metila			
11:0 ISO	3,56	3,46	3,66
13:0 ISO	0,44	0,50	0,54
14:0 ISO	0,68	0,73	0,55
15:1 ISO F	0,96	0,93	0,87
15:0 ISO	43,75	44,26	44,28
15:0 ANTEISO	7,87	7,35	6,65
16:0 ISO	0,99	1,18	0,99
17:0 ISO	2,97	3,83	3,78
17:0 ANTEISO	0,06	0,15	0,00
19:0 ISO	0,08	0,32	0,24
ISO 17:1 w9c	4,23	3,74	2,86
Hidroxi			
10:0 2OH	0,00	0,04	0,00
10:0 3OH	0,20	0,19	0,22
12:0 3OH	2,83	2,83	3,00
13:0 2OH	0,32	0,31	0,31
Ramificado com radical hidroxil			
11:0 ISO 3OH	1,86	2,00	2,35
12:0 ISO 3OH	0,14	0,15	0,08
13:0 ISO 3OH	4,32	4,40	4,10
Ciclopropano			
17:0 CYCLO	0,07	0,13	0,04
Outros			
Unknown 11,799 (a)	0,00	0,00	0,00
Sum in feature 3 (b)	10,37	7,74	5,67
Área total	285692	303189	273450

^a Este ácido graxo possui uma identidade desconhecida e os números indicam seus comprimentos de cadeia equivalente (ECL).

^b Os ácidos graxos 16:1 w7c e 15 iso 2OH não puderam ser separados um do outro por cromatografia gasosa, pelo método FAME, e juntos foram considerados como "sum in feature 3".

A principal resposta da *S. maltophilia* ao aumento da temperatura ambiental foi a redução da proporção de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados, tendo como consequência um aumento na temperatura de transição dos lipídios de membrana, tornando-a menos fluida. Esta resposta pode ser evidenciada pela observação da Tabela 28, que mostra que o teor de ácido graxo 16:1 w9c caiu de 2,36% para 1,54%, enquanto o teor de 16:0 subiu de 6,15% para 13,03%. A alteração da fluidez da membrana ocorre porque o ponto de fusão dos ácidos graxos aumenta com o aumento do comprimento da cadeia, mas reduz com o aumento do número de insaturações, pois a configuração cis das duplas ligações provoca uma dobra de 30° na cadeia, o que dificulta a agregação das moléculas. Concomitantemente, observou-se um aumento na proporção de ácidos graxos saturados de cadeia longa, isto é, com 16 e 18 carbonos. Esta alteração tem como efeito o aumento na temperatura de transição dos lipídios de membrana e a potencialização do efeito enrijecedor causado pela redução de ácidos graxos insaturados.

Frente ao aumento da temperatura, a *S. maltophilia* também se mostrou capaz de modificar rapidamente o teor de ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), principalmente pela redução da proporção das formas anteiso em relação às formas iso. Este efeito pode ser confirmado pela observação dos teores dos ácidos graxos 15:0 anteiso, 15:0 iso, 17:0 anteiso e iso 17:1 w9c.

Enquanto, para *S. maltophilia*, o principal mecanismo de adaptação frente ao aumento da temperatura tenha sido a alteração da proporção de ácidos graxos insaturados, o *B. subtilis*, por sua vez, apresentou como principal mecanismo a alteração da proporção de AGCR, através do aumento da proporção das formas iso em relação às formas anteiso. A Tabela 29 mostra que houve uma redução no teor dos ácidos graxos 15:0 anteiso e 17:0 anteiso e um aumento nas formas 14:0 iso, 15:0 iso, 16:0 iso e 17:0 iso.

Tabela 29 - Perfis de ácidos graxos de *Bacillus subtilis* em função de diferentes temperaturas.

<i>B. subtilis</i>	Média (%)		
	28 °C	32,5 °C	37 °C
Ácido Graxo			
Saturado			
14:0	0,57	0,55	0,51
16:0	3,01	2,93	2,93
Insaturado			
16:1 w11c	0,61	0,00	0,00
Ramificado com radical metila			
14:0 ISO	0,68	0,86	1,42
15:0 ISO	24,40	27,03	25,36
15:0 ANTEISO	41,55	39,77	36,71
16:0 ISO	2,27	2,60	3,80
17:0 ISO	12,06	13,38	16,62
17:0 ANTEISO	13,45	12,18	11,49
ISO 17:1 w10c	1,00	0,71	1,15
Outros			
Sum in feature 4 (a)	0,40	0,00	0,00
Área total	93192	75612	86046

^a Os ácidos graxos 17:1 anteiso B e 17:1 iso I não puderam ser separados um do outro por cromatografia gasosa, pelo método FAME, e juntos foram considerados como "sum in feature 4".

A quantidade total de AGCR, em ambas as formas iso e anteiso, também aumentou ligeiramente com a temperatura. A 28 °C, o teor total de AGCR foi de 95,41%; a 32,5 °C, este teor subiu para 96,52%; a 37 °C, este teor subiu ligeiramente para 96,55%.

Ainda não está clara a vantagem deste tipo de modificação para o microrganismo, nem mesmo o efeito que esta alteração provoca sobre a fluidez da membrana. Sabe-se, porém, que quando *B. subtilis* é exposto ao etanol, ele apresenta o mesmo mecanismo de adaptação aqui observado (KONOPASEK; STRZALKA; SVOBODOVA, 2000).

Tabela 30 - Perfis de ácidos graxos de *Micrococcus luteus* em função de diferentes temperaturas.

<i>M. luteus</i>	Média (%)		
	28 °C	32,5 °C	37 °C
Ácido Graxo			
Saturado			
14:0	0,92	0,72	0,75
16:0	0,40	0,34	0,59
Hidroxi			
15:0 2OH	0,13	0,10	0,20
Ramificado com radical metila			
11:0 ANTEISO	0,14	0,06	0,00
14:0 ISO	4,86	4,81	5,67
13:0 ISO	0,59	0,48	1,01
13:0 ANTEISO	1,63	1,41	0,99
15:0 ISO	17,08	16,42	25,55
15:0 ANTEISO	69,21	70,59	59,26
16:0 ISO	3,57	3,66	4,79
17:0 ANTEISO	1,36	1,41	1,20
Outros			
Sum in feature 3 (a)	0,11	0,00	0,00
Área total	117095	118780	133961

^a Os ácidos graxos 16:1 w7c e 15 iso 2OH não puderam ser separados um do outro por cromatografia gasosa, pelo método FAME, e juntos foram considerados como “sum in feature 3”.

O *M. luteus* apresentou um comportamento não linear de teor de ácidos graxos em função da temperatura, como mostrado pela Tabela 30: houve uma redução do teor dos ácidos graxos 14:0, 16:0, 15:0 2OH, 14:0 iso, 13:0 iso, 15:0 iso e 16:0 iso quando a temperatura subiu de 28 °C para 32,5 °C; já, quando a temperatura passou de 32,5 °C para 37 °C, estes mesmos ácidos graxos sofreram um aumento de proporção. Inversamente, os ácidos graxos 15:0 anteiso e 17:0 anteiso tiveram um aumento de proporção quando a temperatura se elevou de 28 °C para 32,5 °C e uma redução de proporção quando a temperatura subiu para 37 °C. Os únicos que apresentaram uma tendência linear decrescente em função do aumento da temperatura foram os ácidos graxos 11:0 anteiso, 13:0 anteiso e “sum in feature 3”.

É possível explicar este comportamento através da comparação dos perfis de *M. luteus* obtidos a 28 °C e a 32,5 °C e da sua associação aos valores de IS obtidos em cada temperatura: 0,846 e 0,848, respectivamente. A partir disso, é possível inferir que os dois perfis são semelhantes e equivalentes, uma vez que forneceram valores de IS praticamente idênticos, e que a alteração da temperatura de 28 °C para 32,5 °C não foi suficiente para acionar mecanismos de adaptação homeofásica em *M. luteus*. Portanto, para alcançarmos conclusões válidas acerca do efeito do aumento da temperatura sobre a composição de ácidos graxos deste microrganismo, foi necessário comparar o perfil obtido a 37 °C com a média dos perfis obtidos nas outras temperaturas (Tabela 31).

Tabela 31 – Comparação do perfil de ácidos graxos de *Micrococcus luteus* obtido a 37 °C com o perfil médio obtido com as temperaturas de 28 °C e 32,5 °C.

<i>M. luteus</i>	Média (%)	
	28 °C/32,5 °C	37 °C
Ácido Graxo		
Saturado		
14:0	0,82	0,75
16:0	0,37	0,59
Hidroxi		
15:0 2OH	0,12	0,20
Ramificado com radical metila		
11:0 ANTEISO	0,10	0,00
14:0 ISO	4,84	5,67
13:0 ISO	0,54	1,01
13:0 ANTEISO	1,52	0,99
15:0 ISO	16,75	25,55
15:0 ANTEISO	69,90	59,26
16:0 ISO	3,61	4,79
17:0 ANTEISO	1,39	1,20
Outros		
Sum in feature 3 (a)	0,06	0,00
Área total	117938	133961

^a Os ácidos graxos 16:1 w7c e 15 iso 2OH não puderam ser separados um do outro por cromatografia gasosa, pelo método FAME, e juntos foram considerados como “sum in feature 3”.

A partir desta comparação, observa-se que *M. luteus* adota o mesmo mecanismo de adaptação de *B. subtilis*, ou seja, o aumento das formas iso e redução das formas anteiso. Com a diferença de que, em *M. luteus*, também ocorre um aumento do comprimento da cadeia de ácidos graxos saturados, uma vez que a proporção de 16:0 aumentou em relação ao 14:0. Este efeito também foi observado com *S. maltophilia* e provoca uma redução da fluidez de membrana.

5 CONCLUSÃO

Este estudo confirma que os cocos Gram positivos, que são derivados dos seres humanos, são o principal grupo de contaminantes em salas limpas farmacêuticas. Este tipo de contaminação pode ser minimizado através de medidas apropriadas que funcionem como barreira protetora contra esses microrganismos. Além disso, é possível concluir que o nível de contaminação dentro de salas limpas não é afetado pela estação do ano.

Utilizando a técnica de identificação por FAME, 6056 isolados foram identificados ao nível de espécie, sendo que *Micrococcus luteus* é a bactéria mais freqüentemente encontrada nas classes B e no grupo chamado "Pessoal". *Staphylococcus cohnii* foi o principal contaminante em classe C, ao passo que *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus hominis* estiveram presentes em maior número nas classe A e D, respectivamente. Todas estas espécies, exceto *B. subtilis*, ocorrem na microbiota dos seres humanos. Além disso, as composições dos ácidos graxos destes microrganismos foram determinadas e exibiram padrões típicos de bactérias Gram positivas, exceto para alguns ácidos graxos que não são parte da composição das cepas referência.

O estudo da influência da tomada de ensaio sobre o Índice de Similaridade (IS) revelou que a quantidade de células coletadas para extração afeta diretamente o resultado. Este estudo pode auxiliar os analistas a confirmarem resultados de identificação de *S. maltophilia*, *P. putida*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. hominis* e *M. luteus*, porém quando a amostra é totalmente desconhecida é recomendável se ater à tomada de ensaio padrão de 40 a 50 mg, recomendada pelo manual do sistema FAME.

A etapa de avaliação do efeito da variação da temperatura sobre o IS confirmou que o fator temperatura exerce forte influência sobre o resultado da identificação bacteriana, uma vez que as bactérias desenvolveram vários mecanismos de adaptação que provocam alterações na composição de ácidos graxos de suas células. A fim de sobreviverem em ambientes com temperaturas mais altas, as bactérias alteram a estrutura molecular dos ácidos graxos, aumentando o ponto de fusão dos mesmos, conseqüentemente aumentando a rigidez de suas membranas.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, P.S.; HERNANDEZ-ARRIAGA, A.M.; CYBULKSI, L.E.; ERAZO, A.C.; DE MENDOZA, D. Molecular basis of thermosensing: a two component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO Journal*, v.20, n.7, p.1681-1691, 2001.

ANNOUS, B.A.; BECKER, L.A.; BAYLES, D.O.; LABEDA, D.P.; WILKINSON, B.J. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.10, p.3887-3894, 1997.

BAATH, E.; FROSTEGARD, A.; FRITZE, H. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.12, p.4026-4031, 1992.

BIOMÉRIEUX INDUSTRY. *The identification of all the microorganisms - API*. Disponível em: <http://www.biomerieux-industry.com>. Acesso em: 14 abr. 2008.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A.; JAWETZ, E. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 23.ed. New York: McGraw-Hill Professional, 2004. 818p.

BROWN, J.L.; ROSS, T.M. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, v.37, n.2/3, p.163-173, 1997.

CABEEN, M.T.; JACOBS-WAGNER, C. Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology*, v.3, n.8, p.601-610, 2005.

CAMPBELL, J.W.; CRONAN, J.E. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. *Annual Review of Microbiology*, v.55, p. 305-332, 2001.

CHANG, Y.Y.; CRONAN, J.E. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, v.33, n.2, p. 249-259, 1999.

CHEN, Q.; JANSSEN, D.B.; WITHOLT, B. Growth on octane alters the membrane lipid fatty acids of *Pseudomonas oleovorans* due to the induction of alkB and synthesis of octanol. *Journal of Bacteriology*, v.177, n.23, p.6894-6901, 1995.

CHEN, Q.; NIJENHUIS, A.; PREUSTING, H.; DOLFING, J.; JANSSEN, D.B.; WITHOLT, B. Effects of octane on the fatty acid composition and transition temperature of *Pseudomonas oleovorans* membrane lipids during growth in two-liquid-phase continuous culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v.17, n.7, p.647-652, 1995.

CHIHIB, N.E.; SILVA, M.R.; DELATTRE, G.; LAROCHE, M.; FEDERIGHI, M. Different cellular fatty acid pattern behaviours of two strains of *Listeria monocytogenes* Scott A and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions. *FEMS Microbiology Letters*, v.218, n.1, p.155-160, 2003.

CHOI, K.H.; HEATH, R.J.; ROCK, C.O. Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, v.182, n.2, p.365-370, 2000.

CLONTZ, L. *Microbial limits and bioburden tests: validation approaches and global requirements*. Boca Raton: CRC Press, 2000. 240p. Disponível em: http://books.google.com.br/books?id=9feZFDLPLxUC&pg=PR2&lpg=PR2&dq=CLONTZ+Microbial+Limit+and+Bioburden+Tests:+Validation+Approaches+and+Global+Requirements+crc+press+florida&source=bl&ots=vPONMkPw-M&sig=0fA1Dt8RsXTy_ZhiWmFsdgkr3Wg&hl=pt-BR&sa=X&oi=book_result&resnum=1&ct=result#PPR2,M1. Acesso em: 16 set. 2008

COBO, F.; CONCHA, A. Environmental microbial contamination in a stem cell bank. *Letters in Applied Microbiology*, v.44, n.4, p.379-386, 2007.

COSSLETT, A.G. The design of controlled environments. In: DENYER, S.P.; BAIRD, R.M. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals and medical devices*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. cap.4, p.69-88.

CRONAN, J.E. Bacterial membrane lipids: where do we stand? *Annual Review of Microbiology*, v.57, p.203-224, 2003.

CRONAN, J.E. Phospholipid modifications in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, v.5, p.202-205, 2002.

CRONAN, J.E.; ROCK, C.O. Biosynthesis of membrane lipids. In: NEIDHARDT, F. C.; CURTISS III, R., eds. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. 2.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1996. cap.37, p.315-420.

DAVIS, M.S.; CRONAN, J.E. Inhibition of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein. *Journal of Bacteriology*, v.183, n.4, p.1499-1503, 2001.

DE MENDOZA, D.; SCHUJMAN, G.E.; AGUILAR, P.S. Biosynthesis and function of membrane lipids. In: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R., eds. *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*. Washington: ASM Press, 2002. cap.5, p.43-55..

DENICH, T.J.; BEAUDETTE, L.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*, v.52, n.2, p.149-182, 2003.

DESCHENES, P.D. Viable environmental microbiological monitoring. In: CARLETON, F.J.; AGALLOCO, J.P., eds. *Validation of pharmaceutical processes: sterile products*. New York: Informa Healthcare, 1998. cap.8, p.197-216.

DIXON, A.M. Cleaning and Sanitization of Cleanrooms and Materials. In: CARLETON, F.J.; AGALLOCO, J.P., eds. *Validation of pharmaceutical processes: sterile products*. New York: Informa Healthcare, 1998. cap.22, p.645-668.

DUQUE, E.; RODRÍGUEZ-HERVA, J.J.; DE LA TORRE, J.; DOMÍNGUEZ-CUEVAS, P.; MUÑOZ-ROJAS, J.; RAMOS, J.L. The RpoT Regulon of *Pseudomonas putida* DOT-T1E and its role in stress endurance against solvents. *Journal of Bacteriology*, v.189, n.1, p.207-219, 2007.

DUPONT QUALICON. *Riboprinter microbial characterization system*. Disponível em: <http://www.qualicon.com>. Acesso em: 16 abr. 2008.

EUROPEAN COMMISSION. *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use*. Annex I: Manufacture of Sterile Medicinal Products. Bruxelas: 2008.

FARBER, J.M.; GENDEL, S.M.; TYLER, K.D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W.L.; FRITSCHER, S.J.; BARRETT, T.J. Molecular typing and differentiation. In: DOWNES, F.P.; ITO, K., eds. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.11, p.127-156.

FAVERO, M.S.; PULEO, J.R.; MARSHALL, J.H.; OXBORROW, G.S. Comparative levels and types of microbial contamination detected in industrial clean rooms. *Applied Microbiology*, v.14, n.4, p.539-551, 1966.

FOZO, E.M.; QUIVEY, R.G. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, n.2, p.929-936, 2004.

GARRITY, G.M., ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2.ed. New York: Springer, 2005. v.2, pt.C, 1363p.

GIOTIS, E.S.; MCDOWELL, D.A.; BLAIR, I.S.; WILKINSON, B.J. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, n.3, p.997-1001, 2007.

GROGAN, D.W.; CRONAN, J.E. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.61, n.4, p.429-441, 1997.

GUAZZARONI, M.E.; KRELL, T.; FELIPE, A.; RUÍZ, R.; MENG, C.; ZHANG, X.; GALLEGOS, M.T.; RAMOS, J.L. The multidrug efflux regulator TtgV recognizes a wide range of structurally different effectors in solution and complexed with target DNA. *Journal of Biological Chemistry*, v.280, n.21, p.20887-20893, 2005.

GUCKERT, J.B.; NOLD, S.; BOSTON, H.L.; WHITE, D.C. Periphyton response in an industrial receiving stream: lipid-based physiological stress analysis and pattern recognition of microbial community structure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v.49, p.2579-2587, 1992.

HAACK, S.K.; GARCHOW, H.; ODELSON, D.A.; FORNEY, L.J.; KLUG, M. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n.7, p.2483-2493, 1994.

HÄRTIG, C.; LOFFHAGEN, N.; BABEL, W. Glucose stimulates a decrease of the fatty acid degree in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Archives of Microbiology*, v.171, n.3, p.166-172, 1999.

HÄRTIG, C.; LOFFHAGEN, N.; HARMS, H. Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.4, p.1915-1922, 2005.

HAYES, E.T.; WILKS, J.C.; SANFILIPPO, P.; YOHANNES, E.; TATE, D.P.; JONES, B.D.; RADMACHER, M.D.; BONDURANT, S.S.; SLONCZEWSKI, J.L. Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiology*, v.6, n.89, p.1-18, 2006.

HEATH, R.J.; ROCK, C. O. Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, v.271, n.18, p.10996-11000, 1996.

HEATH, R.J.; ROCK, C.O. Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, v.271, n.4, p.1833-1836, 1996.

HEATH, R.J.; SU, N.; MURPHY, C.K.; ROCK, C.O. The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductases FabI and FabL from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, v.275, n.51, p.40128-40133, 2000.

HEIPIEPER, H.J.; MEULENBELD, G.; VAN OIRSCHOT, Q.; DE BONT, J.A. Effect of environmental factors on the trans/cis ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.8, p.2773-2777, 1996.

HENRY, M.F.; CRONAN, J.E. A new mechanism of transcriptional regulation: release of an activator triggered by small molecule binding. *Cell*, v.70, n.4, p.671-679, 1992.

HERLIN, J.P. Construção, regulamentação e classificação de salas limpas. In: FUNGOS FILAMENTOSOS E O CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM SALAS LIMPAS, 1., São Paulo, 2007. *Anais*. São Paulo: SBCC, 2007. p.1-3.

HESS, K.; HESS-KOZA, K. *Environmental sampling for unknowns*. Florida: CRC Press, 1996, 298p.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. *FED-STD-209E*. Airborne Particulate Cleanliness Classes in Cleanrooms and Clean Zones: Mount Prospect. Arlington: IEST, 1992.

JIANG, P.; CRONAN, J.E. Inhibition of fatty acid synthesis in *Escherichia coli* in the absence of phospholipid synthesis and release of inhibition by thioesterase action. *Journal of Bacteriology*, v.176, n.10, p.2814-2821, 1994.

JYDEGAARD-AXELSEN, A.M.; HOIBY, P.E.; HOLMSTROM, K.; RUSSELL, N.; KNOCHEL, S. CO₂ and anaerobiosis-induced changes in physiology and gene expression of different *Listeria monocytogenes* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, n.7, p.4111-4117, 2004.

KANEDA, T. Iso-fatty and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews*, v.55, n.2, p.288-302, 1991.

KEWELOH, H.; HEIPIEPER, H.J. Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids*, v.31, n.2, p.129-137, 1996.

KONOPASEK, I.; STRZALKA, K.; SVOBODOVA, J. Cold shock in *Bacillus subtilis*: different effects of benzyl alcohol and ethanol on the membrane organisation and cell adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1464, n.1, p.18-26, 2000.

LECLERC, H. Relationships between common water bacteria and pathogens in drinking water. In: BARTRAM, J.; COTRUVO, J.; EXNER, M.; FRICKER, C.; GLASMACHER, A. *Heterotrophic plate counts and drinking water safety: the significance of HPCs for water quality and human health*. London: IWA, World Health Organization, 2003. cap.6, p.80-118. (Emerging issues in water and infectious disease series).

LIM, Y.W.; MOON, E.Y.; CHUN, J. Reclassification of *Flavobacterium resinovorum* Delaporte and Daste 1956 as *Novosphingobium resinovorum* comb. nov., with *Novosphingobium subarticum* (Nohynek et al. 1996) Takeuchi et al. 2001 as a later heterotypic synonym. *Int J. Syst. Evol Microbiol*, v.57, n.8, p.1906-1908, 2007.

LOFFHAGEN, N.; HÄRTIG, C.; BABEL, W. *Pseudomonas putida* NCTC 10936 balances membrane fluidity in response to physical and chemical stress by changing the saturation degree and the trans/cis ratio of fatty acids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.68, n.2, p.317-323, 2004.

LOHNER, K. Effects of small organic molecules on phospholipid phase transition. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.57, n.2/3, p.341-362, 1991.

LU, Y.J.; ROCK, C.O. Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, v.59, n.2, p.551-566, 2006.

LU, Y.J.; ZHANG, Y.M.; ROCK, C.O. Product diversity and regulation of type II fatty acid synthases. *Biochemistry and Cell Biology*, v.82, n.1, p.145-155, 2004.

LU, Y.J.; ZHANG, Y.M.; GRIMES, K.D.; QI, J.; LEE, R.E.; ROCK, C.O. Acyl-phosphates initiate membrane phospholipid synthesis in Gram-positive pathogens. *Molecular Cell*, v.23, n.5, p.765-772, 2006.

MARR, A.G.; INGRAHAM, J.L. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v.84, n.6, p.1260-1267, 1962.

MARTIN, V.J.; YU, Z.; MOHN, W.W. Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism. *Archives of Microbiology*, v.172, n.3, p.131-138, 1999.

MIDI. *Sherlock® analysis user's manual*. Version 6.0. Newark: MIDI, 2005. 165p.

MJOS, S.A. Prediction of equivalent chain lengths from two-dimensional fatty acid retention indices. *Journal of Chromatography, A*, v.1122, n.1/2, p.249-254, 2006.

MORITA, N.; SHIBAHARA, A.; YAMAMOTO, K.; SHINKAI, K.; KAJIMOTO, G.; OKUYAMA, H. Evidence for cis-trans isomerization of a double bond in the fatty acids of the psychrophilic bacterium *Vibrio sp.* strain ABE-1. *Journal of Bacteriology*, v.175, n.3, p.916-918, 1993.

MOSQUEDA, G.; RAMOS, J.L. A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the tod genes for toluene metabolism. *Journal of Bacteriology*, v.182, n.4, p.937-943, 2000.

NEUHAUS, F.C.; BADDILEY, J. A continuum of anionic charge: structures and functions of d-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.67, n.4, p.686-723, 2003.

NEWBY, P. Rapid methods for enumeration and identification in microbiology. In: BAIRD, R.M.; HODGES, N.A.; DENYER, S.P. *Handbook of microbiological quality control: pharmaceuticals and medical devices*. Londres: CRC Press, 2000. cap.7. p.107-119.

NICHOLS, D.S.; PRESSER, K.A.; OLLEY, J.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T.A. Variation of branched-chain fatty acids marks the normal physiological range for growth in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.6, p.2809-2813, 2002.

NIELSEN, L.E.; KADAVY, D.R.; RAJAGOPAL, S.; DRIJBER, R.; NICKERSON, K.W. Survey of extreme solvent tolerance in Gram-positive cocci: membrane fatty acid changes in *Staphylococcus haemolyticus* grown in toluene. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.9, p.5171-5176, 2005.

O'KEEFE, S.F. Nomenclature and classification of lipids. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*. 2. ed. New York: McGraw Hill, 2002. cap.1. p.3-38.

OKUYAMA, H.; ORIKASA, Y.; NISHIDA, T.; WATANABE, K.; MORITA, N. Bacterial genes responsible for the biosynthesis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their heterologous expression. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, n.3, p.665-670, 2007.

OLIVER, J.D. Viable but nonculturable bacteria in food environments. In: FRATAMICO, P.M.; BHUNIA, A.K.; SMITH, J.L. *Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology*. Wymondham: Caister Academic Press, 2005. cap.6. p.99-112.

OLSON, W.P. *Automated microbial identification and quantitation: technologies for the 2000s*. Boca Raton: CRC Press, 1996. 424p.

OSTERHOUT, G.; SHULL, V.; DICK, J. Identification of clinical isolates of gram-negative nonfermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, n.9, p.1822-1830, 1991.

PAISLEY, R. *MIS whole cell fatty acid analysis by gas chromatography*. Delaware: MIDI, 1998, 98p.

PAOLETTI, L.; LU, Y.J.; SCHUJMAN, G.E.; DE MEMDOZA, D.; ROCK, C.O. Coupling of fatty acid and phospholipid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, v.189, n.16, p.5816-5824, 2007.

PEDROTTA, V.; WITHOLT, B. Isolation and characterization of the cis-trans-unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* G Po12. *Journal of Bacteriology*, v.181, n.10, p.3256-3261, 1999.

PINKART, H.C.; WOLFRAM, J.W.; ROGERS, R.; WHITE, D.C. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to o-xylene. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.3, p.1129-1132, 1996.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325p.

PREUSTING, H.; KINGMA, J.; WITHOLT, B. Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid phase cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, v.13, n.10, p.770-780, 1991.

PUCCI, G.N.; HÄRTIG, C.; PUCCI, O.H. Influencia de la concentración salina y la temperatura en la composición de ácidos grasos de membrana de *Pseudomonas fluorescens* GNP-OHP-3. *Revista Argentina de Microbiología*, v.36, p.6-15, 2004.

QUIVEY, R.G.; FAUSTOFERRI, R.; MONAHAN, K.; MARQUIS, R. Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, v.189, n.1, p.89-92, 2000.

QUIVEY, R.G.; KUHNERT, W.L.; HAHN, K. Adaptation of oral streptococci to low pH. *Advances in Microbial Physiology*, v.42, p.239-274, 2000.

RAMOS, J.L.; DUQUE, E.; GALLEGOS, M.T.; RAMOS-GONZÁLES, M.I.; ROJAS, A.; TERÁN, W.; SEGURA, A. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology*, v.56, p.743-768, 2002.

RAMSTORP, M. *Contamination control in practice*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. 191p.

RATLEDGE, C., ed. Microorganisms as sources of polyunsaturated fatty acids. In: GUNSTONE, F.D., ed. *Structure and modified lipids*. New York: Marcel Dekker, 2001. cap.13. p.351-400.

RATLEDGE, C.; WILKINSON, S.G. *Microbial lipids*. New York: Academic Press, 1988. v.1.

READ, M.M. *Trends in DNA fingerprinting research*. New York: Nova Science Publishers, 2005. 226p.

RETTBERG, P.; FRITZE, D.; VERBARG, S.; NELLEN, J.; HORNECK, G.; STACKENBRANDT, E.; KMINEK, G. Determination of the microbial diversity of spacecraft assembly, testing and launch facilities: First results of the ESA project MiDiv. *Advances in Space Research*, v.38, p.1260-1265, 2006.

ROJAS, A.; DUQUE, E.; MOSQUEDA, G.; GOLDEN, G.; HURTADO, A.; RAMOS, J. L.; SEGURA, A. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Journal of Bacteriology*, v.183, n.13, p.3967-3973, 2001.

SCHUJMAN, G.E.; DE MENDOZA, D. Transcriptional control of membrane lipid synthesis in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, v.8, n.2, p.149-153, 2005.

SCHUJMAN, G.E.; DE MENDOZA, D. Regulation of type II fatty acid synthase in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, v.11, n.2, p.148-152, 2008.

SCHUJMAN, G.E.; GUERIN, M.; BUSCHIAZZO, A.; SCHAEFFER, F.; LLARRULL, L.I.; REH, G.; VILA, A.J.; ALZARI, P.M.; DE MENDOZA, D. Structural basis of lipid biosynthesis regulation in Gram-positive bacteria. *EMBO Journal*, v.25, n.17, p.4074-4083, 2006.

SCHUJMAN, G.E.; PAOLETTI, L.; GROSSMAN, A.D.; DE MENDOZA, D. FapR, a bacterial transcription factor involved in global regulation of membrane lipid biosynthesis. *Developmental Cell*, v.4, n.5, p.663-672, 2003.

SEGURA, A.; HURTADO, A.; DUQUE, E.; RAMOS, J.L. Transcriptional phase variation at the *flhB* gene of *Pseudomonas putida* DOT-T1E is involved in response to environmental changes and suggests the participation of the flagellar export system in solvent tolerance. *Journal of Bacteriology*, v.186, n.6, p.1905-1909, 2004.

SINCLAIR, M.G. Is it time to try a faster and more accurate method for microbial identification? In: BOOTH, A. N., ed. *Sterilization of medical devices*. Buffalo Grove: Interpharm Press, 1998. cap.30. p.217-225.

STACKENBRANDT, E.; KOCH, C.; GVOZDIK, O.; SCHUMANN, P. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen.nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 45, n. 4, p.682-692, 1995.

STAGER, C.E. Automated microbial identification systems. In: TORTORELLO, M.L.; GENDEL, S.M. *Food microbiological analysis: new technologies*. New York: Marcel Dekker, 1997. cap.7, p.91-113.

STEPHENS, P.J.; MACKEY, B.M. Recovery of stressed microorganisms. In: CORRY, J.E.; CURTIS, G.D.; BAIRD, R.M., eds. *Handbook of culture media for food microbiology*. Amsterdam, Oxford: Elsevier Science, 2003. cap.2, p.25-48. (Progress in industrial microbiology, v.37).

TAORMINA, P.J.; BEUCHAT, L.R. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food-processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat. *Journal of Applied Microbiology*, v.92, n.1, p.71-80, 2002.

TERÁN, W.; KRELL, T.; RAMOS, J.L.; GALLEGOS, M.T. Effector-repressor interactions. Binding of a single effector molecule to the operator bound TtgR homodimer mediates derepression. *Journal of Biological Chemistry*, v.281, n.11, p.7102-7109, 2006.

TIENUNGOON, S.; RATKOWSKY, D.A.; MCMEEKIN, T.A.; ROSS, T. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.11, p.4979-4987, 2000.

TODAR'S ONLINE TEXTBOOK OF BACTERIOLOGY. *The bacterial flora of humans*. 2007. Disponível em: <http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html>. Acesso em: 17 abr. 2007.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA. Aulas de microbiologia. *Crescimento*. Disponível em: <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/crescimento/crescimento.html>. Acesso em: 7 out. 2008.

VESTAL, J.R.; WHITE, D.C. Lipid analysis in microbial ecology. *Bioscience*, v.39, p.535-541, 1989.

WALSH, G. *Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology*. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2003. 551p.

WELCH, D.F. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin Microbiol Rev*, v.4, n.4, p.422-438, 1991.

WHITE, W. *Cleanroom technology: fundamentals of design, testing and operation*. New York: John Wiley, 2001. 309p.

WINN, W.C.; KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., PROCOP, G. W. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 1565p.

YOUNG, K.D. The selective value of bacterial shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.70, n.3, p.660-703, 2006.

ZHANG, Y.M.; MARRAKCHI, H.; ROCK, C.O. The FabR (YijC) transcription factor regulates unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, v.277, n.18, p.15558-15565, 2002.

ZHU, K.; CHOI, K.H.; SCHWEIZER, H.P.; ROCK, C.O.; ZHANG, Y.M. Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, v.60, n.2, p.260-273, 2006.

ANEXO A – Cópia do documento Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
 - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B – Cópia da ficha do aluno

Fenixweb

Página 1 de 2



Universidade de São Paulo
BRASIL

Usuário - 1122335
Fabio Luiz Camacho Pacheco

Ficha Aluno

Pós-Graduação

Sistema Janus

Apresentação

Ajuda

Período de matrícula

Disciplinas oferecidas

Catálogo de disciplinas

Orientadores

Acesso Restrito

Alterar Senha

Alterar Email

Pré-matrícula

Solicitar matrícula de

acompanhamento

Ficha do aluno

Cancelamento de matrícula

Carteira USP

Sair

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

9139 - 1122335/1 - Fabio Luiz Camacho Pacheco

Email: fabiopacheco@usp.br

Data de Nascimento: 23/06/1975

Cédula de Identidade: RG - 23.323.326-X - SP

Local Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico - Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 1999

Curso: Mestrado em Fármaco e Medicamentos

Área: Produção e Controle Farmacêuticos

Data da Matrícula: 12/02/2007

Início da Contagem de Prazo: 12/02/2007

Data Limite: 12/08/2009

Orientador(es): Prof(a). Dr(a). Terezinha de Jesus Andreoli Pinto - 12/02/2007 a -- E.Mail: tjapinto@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 12/02/2007

Exame de Qualificação: Aprovado em 15/12/2008

Data do Depósito do Trabalho:

Data máxima para aprovação da Banca:

Título do Trabalho:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Ocorrência: Última matrícula em 14/02/2009

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
FBF5779-1	Preparo de artigos científicos na área de farmácia	01/03/2007	02/05/2007	90	6	100.00	A	N	Concluída
FBF5777-1	Seminários Gerais	12/03/2007	24/06/2007	45	3	93.00	A	N	Concluída
FBC5759-1	Estudo de proteínas de interesse diagnóstico pela aplicação de técnicas de biologia molecular e estrutural	08/05/2007	19/06/2007	60	4	92.00	A	N	Concluída
EDM5791-4	Metodologia do Ensino Superior	15/08/2007	06/11/2007	120	8	75.00	A	N	Concluída
BMM5829-1	Estudo do envoltório celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	22/10/2007	03/12/2007	60	4	90.00	A	N	Concluída

<https://sistemas.usp.br/fenixweb/fexFichaAluno?cmd=D&codmnu=00>

12/05/2009

ANEXO B (cont.) – Cópia da ficha do aluno

Fenixweb

Página 2 de 2

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	25	25	Disciplinas:	25
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0
Total:	25	25		25

Créditos Atribuídos à Dissertação : 71

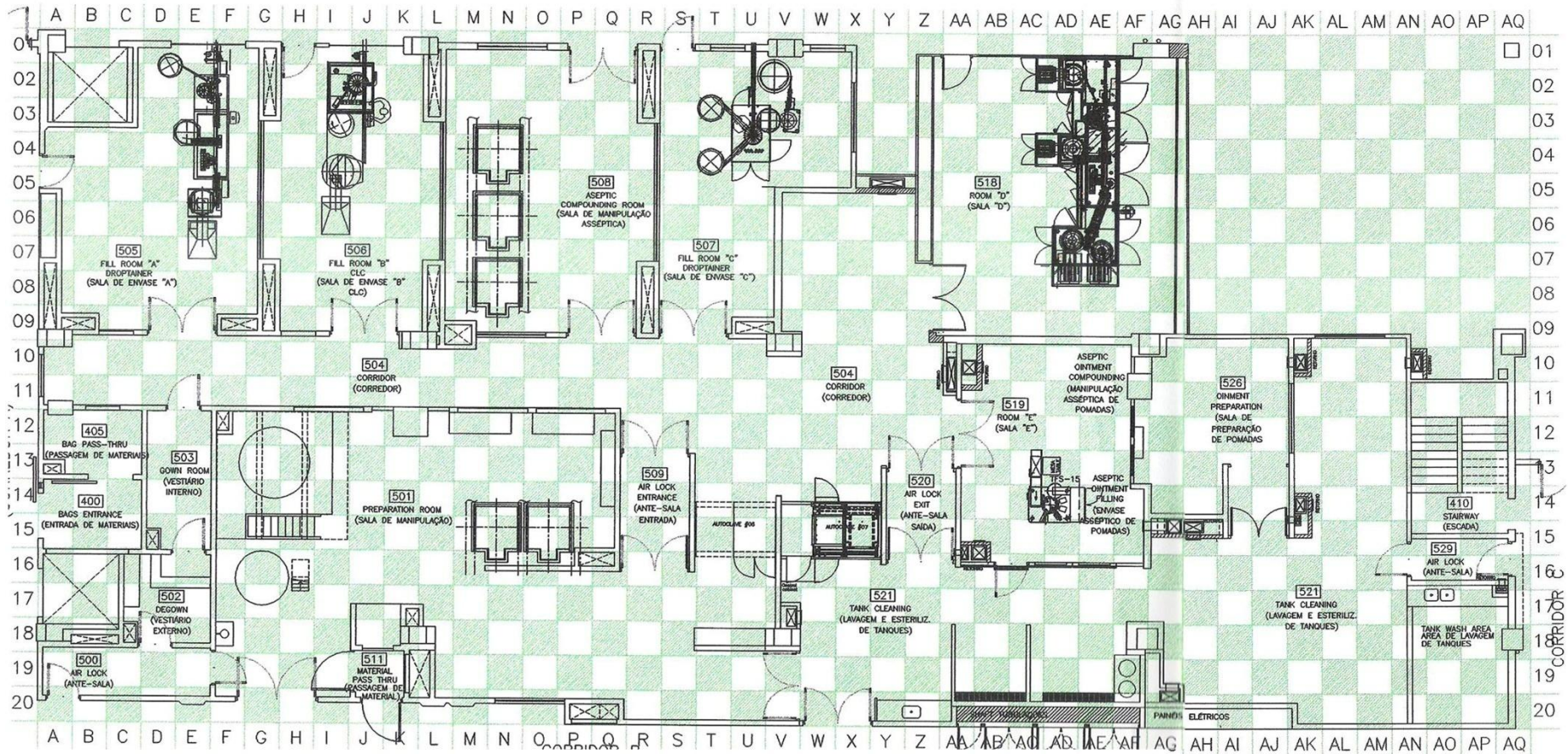
<p>Conceito até 31/12/1996: A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.</p> <p>Conceito a partir de 02/01/1997: A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.</p> <p>Um(1) crédito equivale a (15) horas de atividade programada.</p>

Situação em: 12/05/2009 19:07

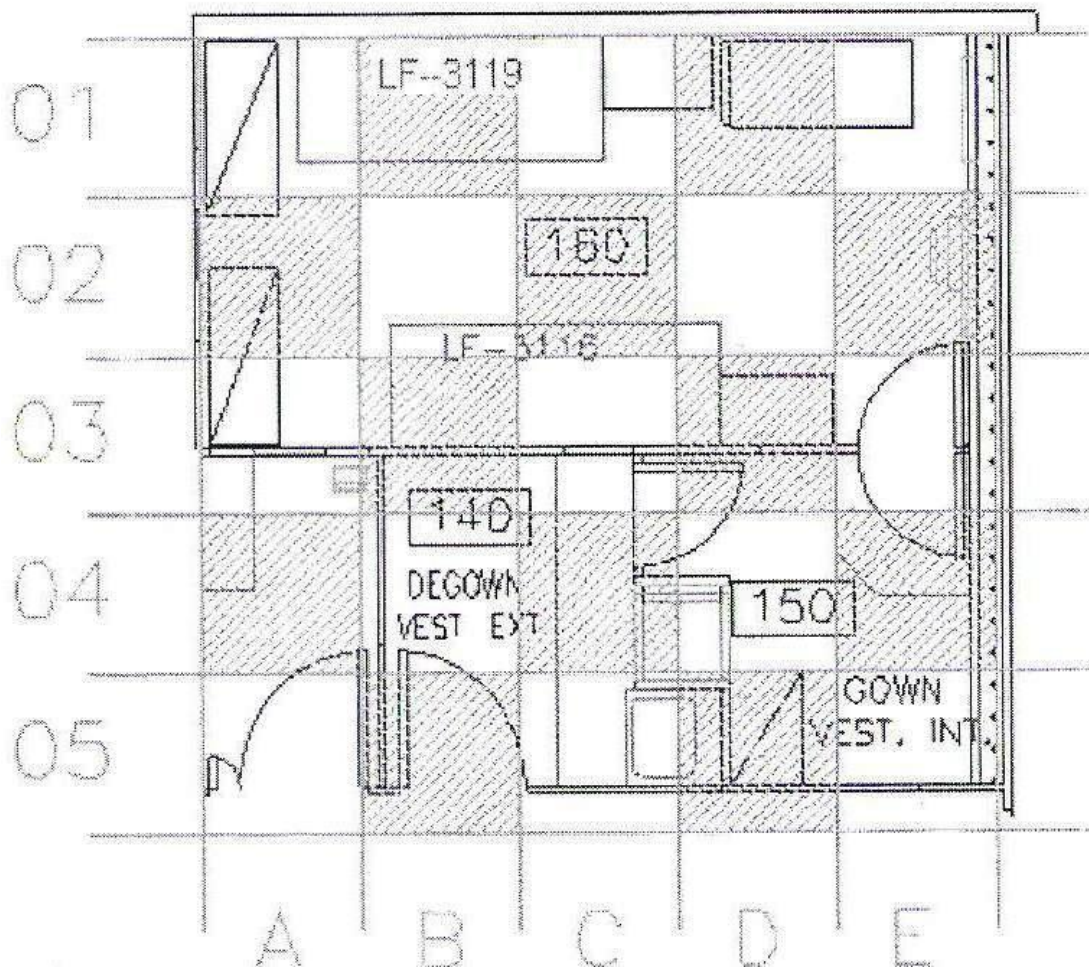
Créditos | Fale conosco

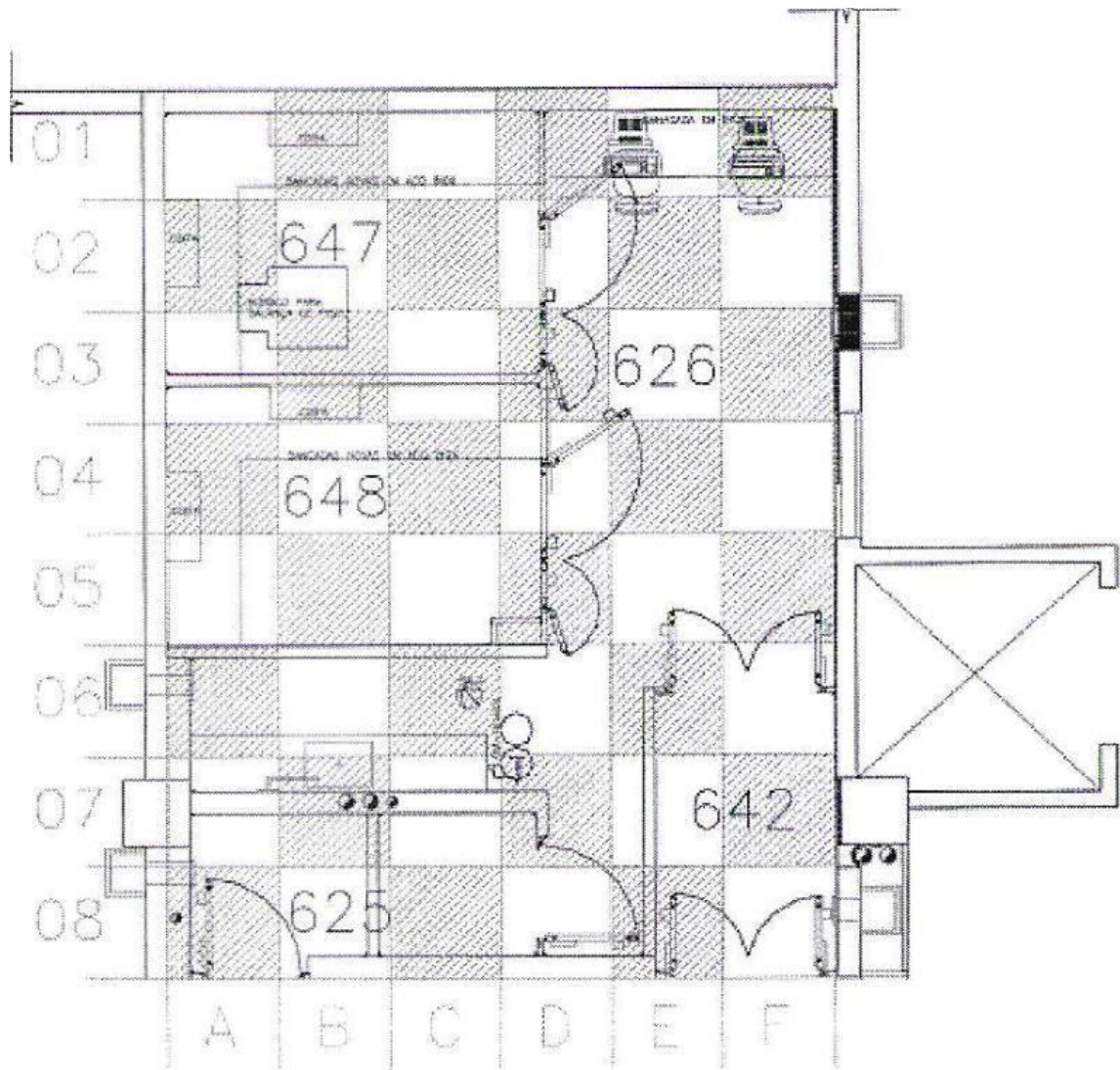
© 1999 - 2007 - Departamento de Informática da Codage/USP

ANEXO C – Planta baixa das salas limpas destinadas à manipulação e envase dos produtos farmacêuticos



ANEXO D – Planta baixa das salas limpas destinadas ao teste de esterilidade dos produtos farmacêuticos



ANEXO E – Planta baixa das salas de pesagem de matérias-primas

ANEXO F – Plano de amostragem das salas limpas para envase de produtos farmacêuticos

AMOSTRA	LOCAL	Sala 505	Sala 506	Sala 507	Sala 519	CLASSE	FREQÜÊNCIA	LIMITE DE ALERTA (LA)	LIMITE DE AÇÃO (LAC)
ar-viáveis	envase	F04	I02	U04	AD14	A	D	> ou = 0,4 CFU/m ³	> ou = 1 CFU/m ³
ar-viáveis	conexão	X	X	X	X	A	D	> ou = 0,4 CFU/m ³	> ou = 1 CFU/m ³
ar-viáveis	sala	C05	H05	T07	AC11	B	D	> ou = 3 CFU/m ³	> 10 CFU/m ³
superfície em contato	elevador de frascos	F07	I06			A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	vibrador de tampas	D02	I03	T03		A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	vibrador de buchas	E03		T04		A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	canaleta de tampas	E02	I02	U03		A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	canaleta de buchas	E03		U04		A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	reservatório de frascos	E06	I06			A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	vibrador de frascos			Y02		A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	bomba de envase	F04	J02	U04		A	D	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	disco centrífugo	E06				A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	disco classificador		I04			A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	posicionador de bisnagas				AD14	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	alimentador de bisnagas				AC13	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	esteira de bisnagas				AC14	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície em contato	funil interno				AD13	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
acessório	pinça	X	X	X	X	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
acessório	ferramenta crítica	X	X	X	X	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
acessório	ferramenta não crítica	X	X	X	X	B	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	parafuso suporte funil				AD13	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não contato	dobra de bisnagas				AE14	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não contato	máquina	E04	J02	U03	AD14	A	S	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não contato	cortina interna	D02		S04	AD10	A	S	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não contato	janela de frascos-interna		I06			A	S	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não contato	chão	E08	J08	T08	AB12	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	parede	F03	G07	S07	AA14	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	tanque	D05	K04	U06		B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	prateleira	F09	G07	S07	AA15	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	porta máquina				AD15	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	mesa bisnagas				AD15	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	caneta	A06	H09	U09	AF15	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	amostrador de ar-envase	F04	I02	U04	AD14	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	contador de partículas	F04	I02	U04	AD14	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	MBR	A06	H09	U09	AF15	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	saco plástico	T/F/B	F/Y	T/F/B	bisnaga	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	mesa	A06	H09	U01	AF15	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	cadeira	D03/F03	G05/K03	U01/W03	AA15	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não contato	maçaneta	E09	J09	S09	AB12	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
partículas não-viáveis	envase	E03	I02	U04	AD14	A	D	> ou = 2.450/m ³ (T0/p<3)> ou = 0,5 µm > 20/m ³ (NA)> ou = 5,0 µms	> 3.520/m ³ (100/p<3)> ou = 0,5 µm > 20/m ³ (NA)> ou = 5,0 µms
partículas não-viáveis	sala	C05	H05	T07	AC11	B	S	> ou = 245.000/m ³ (2.000/p<3)> ou = 0,5 µm =1400/m ³ ; > ou =5,0 µm	> 352.000/m ³ (10.000/p<3)> ou igual a 0,5 µm >> 2.300/m ³ (57/p<3)> ou = 5,0 µm
desinfetantes	desinfetantes em uso	X	X	X	X		S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
luvas	10 dedos	X	X	X	X	B	D	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
luvas	10 dedos-conexão-troca de bomba	X	X	X	X	B	D	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
roupa	antebraço	X	X	X	X	B	D	> ou = 3 CFU/placa	> 5 CFU/placa
roupa	costas / peito / ombro	X	X	X	X	B	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 5 CFU/placa
plaqueamento	envase	F03/E02	I02	U04/U02	AD14	A	D	> ou = 1 CFU/placa/4h	> ou = 1 CFU/placa/4h
plaqueamento	sala	B09	L07	U09	AC10	B	D	> ou = 3 CFU/placa/4h	> 5 CFU/placa/4h

D= Diário D rotativo = Diário rotativo S= Semanal

As coordenadas do ponto de amostragem, indicadas nas respectivas colunas de cada sala, são referentes ao mapa do Anexo C.

ANEXO F (cont.) – Plano de amostragem das salas limpas para envase de produtos farmacêuticos

AMOSTRA	LOCAL	Sala 518	CLASSE	FREQUÊNCIA	LIMITE DE ALERTA (LA)	LIMITE DE AÇÃO (LAC)
ar-viáveis	próximo da colocação de buchas	AE04	A	D	> ou = 0,4 CFU/m ³	> ou = 1CFU/m ³
ar-viáveis	conexão	X	A	D	> ou = 0,4 CFU/m ³	> ou = 1CFU/m ³
ar-viáveis	próximo da porta da embalagem	AA01	B	D	> ou = 3 CFU/m ³	> 10 CFU/m ³
ar-viáveis	canto da sala próximo à porta de entrada	AA09	B	D	> ou = 3 CFU/m ³	> 10 CFU/m ³
superfície em contato	alimentador de buchas-interno	AC04	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	escorregador de buchas	AD04	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	alimentador de tampas-interno	AC02	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	escorregador de tampas	AD02	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	escorregador de frascos 1	AD07	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	escorregador de frascos 2	AE07	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	alimentador de frascos 1-interno	AD08	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	alimentador de frascos 2-interno	AE08	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	bomba de envase	AE05	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	posicionador de frascos 1	AE05	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	posicionador de frascos 2	AE05	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	vibrador de frascos 1-interno	AD07	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	vibrador de frascos 2-interno	AE07	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	alimentador de buchas canto inferior-interno	AC04	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	canaleta de buchas	AE04	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	posicionador de buchas	AE04	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	vibrador de buchas-interno	AD04	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	alimentador de tampas canto inferior-interno	AC02	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	vibrador de tampas-interno	AD02	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	canaleta de tampas	AE02	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	alimentador de frascos 1-canto inferior interno	AD08	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície em contato	alimentador de frascos 2-canto inferior interno	AE08	A	D	> ou = 1CFU/placa	> ou = 1CFU/placa
superfície não-contato	descida de frascos	AE05	A	D	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	suporte de bombas	AE05	A	D	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	porta da máquina interna-alimentador de frascos 1	AD08	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	porta da máquina interna-alimentador de frascos 2	AE08	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	porta da máquina interna-alimentador de tampas	AC02	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	porta da máquina interna-atrás das bombas	AD05	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	porta da máquina interna-alimentador de buchas	AC04	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	porta da máquina interna-estação de envase	AD05	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	porta da máquina interna-saída de frascos de amostragem	AF03	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	porta da máquina interna-lateral do vibrador de tampas	AD02	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	porta da máquina interna-em frente da esteira inicial de frascos	AC07	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	base da máquina-debaixo da estação de envase	AE05	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	base da máquina-entre vibrador de frascos e descida de frascos	AE08	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	base da máquina-debaixo do torquímetro	AE03	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	base da máquina-entre vibrador de tampas e esteira de saída	AE02	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	chão-abaixo do alimentador de buchas	AC04	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	chão-abaixo do alimentador de tampas	AC02	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	chão-abaixo dos alimentadores de frascos	AD08	A	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície não-contato	Amostrador de ar - envase	AD03	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	bacia de hipoclorito-próximo ao envase	AG03	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	bacia de hipoclorito-próximo ao alimentador de frascos	AD09	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	prateleira	AA06	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	cadeira	AG02	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	chão-próximo ao alimentador de frascos	AE08	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	chão-próximo à estação de envase	AF05	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	tanque	AC06	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	Contador de partículas	AD03	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	carrinho dos amostradores	AD03	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	chão-próximo ao alimentador de buchas	AC04	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa

D= Diário

D rotativo = Diário rotativo

S= Semanal

As coordenadas do ponto de amostragem, indicadas nas respectivas colunas de cada sala, são referentes ao mapa do Anexo C.

ANEXO F (cont.) – Plano de amostragem das salas limpas para envase de produtos farmacêuticos

AMOSTRA	LOCAL	Sala 518	CLASSE	FREQÜÊNCIA	LIMITE DE ALERTA (LA)	LIMITE DE AÇÃO (LAC)
superfície não-contato	interfone	AG02	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	parede leste-em frente aos alimentadores de frascos	AE08	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	parede norte-terceiro painel da divisória	AG07	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	parede sul-ao lado da porta de entrada	Z07	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
acessório	pinça	X	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
acessório	ferramenta crítica	X	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
acessório	ferramenta não crítica	X	B	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	plataforma base-alimentador de frascos	AD08	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	plataforma base-alimentador de buchas	AC04	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	plataforma base-alimentador de tampas	AC02	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	suporte do ponto de ar comprimido	AA06	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	porta de entrada-maçaneta	AA08	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	porta de entrada-centro	AA08	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	suporte da bacia-próximo ao envase	AG03	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	suporte da bacia-próximo ao alimentador de frascos	AD09	B	S rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	saco plástico-tampa	X	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	saco plástico-bucha	X	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície não-contato	saco plástico-frasco	X	B	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
partículas não-viáveis	próximo da colocação de buchas	AE04	A	D	> ou = 2.450/m ³ (70/pé3); > ou = 0,5 µm	> 20/m ³ (NA); > ou = 5,0 µms
partículas não-viáveis	próximo da porta da embalagem	AA01	B	D	> ou =245.000/m ³ (2.000/pé3); > ou = 0,5 µm > ou =1.400/m ³ ; > ou =5,0 µm	> 352.000/m ³ (10.000/pé3) > ou igual a 0,5 µm > 2.900/m ³ (57/pé3) > ou = 5,0 µm
partículas não-viáveis	canto da sala próximo à porta de entrada	AA09	B	D	> ou =245.000/m ³ (2.000/pé3); > ou = 0,5 µm > ou =1.400/m ³ ; > ou =5,0 µm	> 352.000/m ³ (10.000/pé3) > ou igual a 0,5 µm > 2.900/m ³ (57/pé3) > ou = 5,0 µm
luvas	10 dedos	X	B	D	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
luvas	10 dedos - conexão - troca de bomba	X	B	D	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
roupa	antebraço	X	B	D	> ou = 3 CFU/placa	> 5 CFU/placa
roupa	costas / peito / ombro	X	B	D rotativo	> ou = 3 CFU/placa	> 5 CFU/placa
desinfetantes	desinfetantes em uso	X		S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
plaqueamento	próximo aos vibradores de frascos	AE06	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa/4h	> ou = 1 CFU/placa/4h
plaqueamento	entre estação de envase e canaleta de buchas	AE04	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa/4h	> ou = 1 CFU/placa/4h
plaqueamento	entre canaleta de buchas e torqueador	AE04	A	D	> ou = 1 CFU/placa/4h	> ou = 1 CFU/placa/4h
plaqueamento	entre torqueador e canaleta de tampas	AE03	A	D	> ou = 1 CFU/placa/4h	> ou = 1 CFU/placa/4h
plaqueamento	sob esteira de frascos abertos	AE06	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa/4h	> ou = 1 CFU/placa/4h
plaqueamento	entre alimentador de buchas e vibrador de buchas	AD04	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa/4h	> ou = 1 CFU/placa/4h
plaqueamento	entre alimentador de tampas e vibrador de tampas	AD02	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa/4h	> ou = 1 CFU/placa/4h
plaqueamento	entre vibrador de tampas e saída de frascos	AE02	A	D rotativo	> ou = 1 CFU/placa/4h	> ou = 1 CFU/placa/4h
plaqueamento	parede próxima ao alimentador de frascos	AD09	B	D	> ou = 3 CFU/placa/4h	> 5 CFU/placa/4h
plaqueamento	parede próxima à saída de frascos	AG01	B	D	> ou = 3 CFU/placa/4h	> 5 CFU/placa/4h

D= Diário

D rotativo = Diário rotativo

S= Semanal

As coordenadas do ponto de amostragem, indicadas nas respectivas colunas de cada sala, são referentes ao mapa do Anexo C.

ANEXO G – Plano de amostragem dos fluxos laminares de manipulação de produtos farmacêuticos

AMOSTRA	LOCAL	Fluxo 508	Fluxo 519	Fluxo móvel	FREQUÊNCIA	LIMITE DE ALERTA (LA)	LIMITE DE AÇÃO (LAC)
ar-viáveis	interior fluxo	N04/N08	AE12		D	> ou = 0,4 CFU/m ³	> ou = 1 CFU/m ³
superfície	chão	N03/N07	AE11		S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície	cortina interna	O05/O08	AD10		S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície	saco plástico MP	X	X		S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície	copo do blender	N04			S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
superfície	prateleira	N04/N08			S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície	tanque	N04/N08	AD12		S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície	carrinho moinho		AF10		S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície	moinho externo		AE10		S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície	base			X	S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície	parede lateral			X	S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
superfície	tesoura	X	X		S	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 5 CFU/placa
luvas	10 dedos	X	X		D	> ou = 1 CFU/placa	> ou = 1 CFU/placa
roupa	pulso	X	X		D	> ou = 3 CFU/placa	> 5 CFU/placa
roupa	braço	X	X		D	> ou = 3 CFU/placa	> 5 CFU/placa
partículas não-viáveis	interior fluxo	N04/N08	AE12	X	D	> ou = 2.450/m ³ (70/pé3); > ou = 0,5 µm	> 3.520/m ³ (100/pé3); > ou = 0,5 µm
plaqueamento	interior fluxo	N04/N08	AE12		D	> ou = 1 CFU/placa/4h	> 20/m ³ (NA); > ou = 5,0 µm

D= Diário S= Semanal

As coordenadas do ponto de amostragem, indicadas nas respectivas colunas de cada sala, são referentes ao mapa do Anexo C.

ANEXO H – Plano de amostragem das salas limpas de classe B, não destinadas ao envase

AMOSTRA	LOCAL	Sala 503	Sala 504	Sala 508	Sala 509	Sala 520	Fuxo 405	FREQÜÊNCIA	LIMITE DE ALERTA (LA)	LIMITE DE AÇÃO (LAC)
ar-viáveis	sala	D12	E10/P10/W10/X08	P05	R14	Z14	A12	S	> ou = 3 CFU/m ³	> 10 CFU/m ³
part. não-viáveis	sala	D12	E10/P10/W10/X08	P05	R14	Z14		S	> ou = 245.000/m ³ (2.000/pé3); > ou = 0,5 µm > ou = 1.400/m ³ ; > ou = 5,0 µm	> 352.000/m ³ (10.000/pé3) > ou = 0,5 µm > 2.900/m ³ (57/pé3) > ou = 5,0 µm
part. não-viáveis	fluxo laminar						A12	S	> = 2.450/m ³ (70/pé3); > = 0,5 µm	> 3.520/m ³ (100/pé3); > = 0,5 µm > 20/m ³ (NA); > ou = 5,0 µm
superfície	chão	D12	P10/W11/Z11/Y09/X08/Z08	Q07	R14	Z14		S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	parede	E12	B11/P11/V10/X05	R04	S14	AA14		S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	porta	D11	Q09/Z08		R13	Y15		S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	maçaneta		E11	Q09				S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	nicho		K11					S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	prateleira	D14	C11/Y06	R07				S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	saco plástico		B10					S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	base do blender			R05				S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	caneta			R07				S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	MBR			R07				S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
plaqueamento	sala			R08				D	> ou = 3 CFU/placa	> 5 CFU/placa
plaqueamento	fluxo laminar						A12	D	> ou = 3 CFU/placa	> 5 CFU/placa
superfície	cortina						A12	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	mesa		Y07	R07			A12	S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	escada	D13						S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	amostrador de ar		X	X				S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	cadeira			X				S	> ou = 3 CFU/placa	> 25 CFU/placa

D= Diário S= Semanal

As coordenadas do ponto de amostragem, indicadas nas respectivas colunas de cada sala, são referentes ao mapa do Anexo C.

ANEXO I – Plano de amostragem das salas limpas de classe C

AMOSTRA	LOCAL	Sala 500	Sala 502	Sala 501	Sala 521	Sala 526	Sala 405	FREQÜÊNCIA	LIMITE DE ALERTA (LA)	LIMITE DE AÇÃO (LAG)
ar-viáveis	sala	D19	E17	N13/T16	Z18/AK18	AJ13	C12	S	> ou = 30 CFU/m ³	> 100 CFU/m ³
part.não-viáveis	sala	D19	E17	N13	Z18/AK18	AJ13	C12	S	> ou = 2.450.000/m ³ (4.000/pé3): > ou = 0,5 µm >ou =14.000/m ³ (100/pé3):> ou igual a 5,0 µm	> 3.520.000/m ³ (100.000/pé3): > ou = 0,5 µm > 29.000/m ³ (570/pé3):> ou Iguar a 5,0 µm
superfície	chão	D19	D16	K13	X19	AJ13	C12	S	> ou = 12 CFU/placa	> 100 CFU/placa
superfície	parede	C19	E16	J11/G15	AK12/V16	AJ14	A13	S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	porta	D18	E16		X20	AJ14		S rotativo	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	maçaneta				X20	AJ14		S rotativo	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	mesa			O11				S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	interfone					AG12		S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	prateleira		C16			AJ10	D12	S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	painel de utilidades					AG12		S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	bancada							S	> ou = 12 CFU/placa	> 100 CFU/placa
superfície	balança							S	> ou = 12 CFU/placa	> 100 CFU/placa
superfície	cortina interna							S	> ou = 12 CFU/placa	> 100 CFU/placa
superfície	banco	C19	D16					S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície contato	tanque 55			G16				S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície contato	tanque 87			G13				S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa

S= Semanal S rotativo = Semanal rotativo

As coordenadas do ponto de amostragem, indicadas nas respectivas colunas de cada sala, são referentes ao mapa do Anexo C.

ANEXO J – Plano de amostragem das salas limpas de classe D

AMOSTRA	LOCAL	Sala 511	Sala 529	FREQÜÊNCIA	LIMITE DE ALERTA (LA)	LIMITE DE AÇÃO (LAC)
ar-viáveis	sala	J19	AO16	M	> ou = 30 CFU/m ³	> 200 CFU/m ³
superfície	chão	J19	AO16	M	> ou = 12 CFU/placa	NA
superfície	parede	J18	AO15	M	> ou = 12 CFU/placa	> 50 CFU/placa
superfície	porta	J19	AN16	M	> ou = 12 CFU/placa	> 50 CFU/placa
superfície	maçaneta		AN16	M	> ou = 12 CFU/placa	> 50 CFU/placa
partículas não-viáveis	sala	J19	AO16	M	> ou = 2.450.000/m ³ (4.000/pé3): > ou = 0,5 µm >ou =14.000/m ³ (100/pé3):> ou igual a 5,0 µm	> 3.520.00/m ³ (100.000/pé3): > ou = 0,5 µm > 29.000/m ³ (570/pé3):> ou igual a 5,0 µm

M = Mensal

As coordenadas do ponto de amostragem, indicadas nas respectivas colunas de cada sala, são referentes ao mapa do Anexo C.

**ANEXO K – Plano de amostragem do fluxo laminar destinado à amostragem de
matérias-primas**

AMOSTRA	LOCAL	Fluxo MP	FREQÜÊNCIA	LIMITE DE ALERTA (LA)	LIMITE DE AÇÃO (LAC)
ar-viáveis	interior fluxo	X	S	> ou = 30 CFU/m ³	> 100 CFU/m ³
superfície	cortina interna	X	S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	bancada	X	S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	balança	X	S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa

S= Semanal

ANEXO L – Plano de amostragem das salas limpas de classe C, destinadas ao fracionamento e pesagem de matérias-primas

AMOSTRA	LOCAL	Sala 626	Sala 647	Sala 648	FREQÜÊNCIA	LIMITE DE ALERTA (LA)	LIMITE DE AÇÃO (LAC)
ar-viáveis	sala	E03	C02	C04	S	> ou = 30 CFU/m ³	> 100 CFU/m ³
part.não-viáveis	sala	E03	C02	C04	S	> ou = 2.450.000/m ³ (4.000/pé3); > ou = 0,5 µm >ou =14.000/m ³ (100/pé3);> ou igual a 5,0 µm	> 3.520.000/m ³ (100.000/pé3); > ou = 0,5 µm > 29.000/m ³ (570/pé3);> ou igual a 5,0 µm
superfície	chão	F05	B02	B04	S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	parede	E07	A01	A04	S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	porta	D02	D02	D04	S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	utensílio de pesagem	X	X	X	S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	bancada		C01	C03	S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa
superfície	balança		B01	B03	S	> ou = 12 CFU/placa	> 25 CFU/placa

S= Semanal

As coordenadas do ponto de amostragem, indicadas nas respectivas colunas de cada sala, são referentes ao mapa do Anexo E.

ANEXO M – Plano de amostragem das salas limpas de classe D, destinadas ao fracionamento e pesagem de matérias-primas

AMOSTRA	LOCAL	Sala 625	Sala 642	FREQÜÊNCIA	LIMITE DE ALERTA (LA)	LIMITE DE AÇÃO (LAC)
ar-viáveis	sala	C08	F07	M	> ou = 30 CFU/m ³	> 200 CFU/m ³
superfície	sacos plásticos	D08	F08	TM	> ou = 12 CFU/placa	> 50 CFU/placa
superfície	sacos plásticos AMCOR	D08	F08	TM	> ou = 12 CFU/placa	> 50 CFU/placa
superfície	bombonas	D08	F08	TM	> ou = 12 CFU/placa	> 50 CFU/placa
superfície	chão	D08	F08	M	> ou = 12 CFU/placa	> 50 CFU/placa
superfície	parede	C07	E07	M	> ou = 12 CFU/placa	> 50 CFU/placa
superfície	porta	D08	E06	M	> ou = 12 CFU/placa	> 50 CFU/placa
luvas	operadores	X	X	M	informativo	informativo
roupas	operadores	X	X	M	informativo	informativo
partículas não-viáveis	sala	C08	F07	M	> ou = 2.450.000/m ³ (4.000/pé3); > ou = 0,5 µm > ou = 14.000/m ³ (100/pé3); > ou igual a 5,0 µm	> 3.520.00/m ³ (100.000/pé3); > ou = 0,5 µm > 29.000/m ³ (570/pé3); > ou igual a 5,0 µm

M = Mensal TM = Trimestral

As coordenadas do ponto de amostragem, indicadas nas respectivas colunas de cada sala, são referentes ao mapa do Anexo E.