



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Biblioteca de perfis moleculares de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF, com sistema de Qualidade

Flávia Porto Carreiro Araújo Bezerra

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Orientadora: **Profa. Dra. Marlene Teixeira De-Souza**

Co-orientador: **Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva**

Brasília, junho de 2015.

Ao Dr Fritz Kahn, sem o qual eu jamais teria retomado os estudos acadêmicos, por seu estímulo, carinho e paciência.

Agradecimentos

Serei eternamente grata a minha mãe Célia, por seu amor, pela ajuda estratégica e apoio incondicional às minhas decisões. Obrigada, Ulisses, meu filho, por seu amor e pelo apoio intelectual em áreas do conhecimento que me são desconhecidas. Ao Franz Georg, meu companheiro, agradeço de coração todos os gestos de compreensão e estímulo.

À Dra Izabel Cristina R. da Silva e ao farmacêutico Leonardo Sisinno, meus amigos queridos e parceiros insubstituíveis em estimulantes discussões científicas!

Aos meus veteranos de laboratório, Juliana e Danilo, pela cordialidade e auxílio em momentos delicados e, a todos os colegas de equipe, pela responsabilidade e alegria compartilhadas neste período; entre eles o Paulo Henrique e o Roberto.

À Maria Gomes dos Anjos e Adélia Batista Soares, pela gentileza e suporte laboratorial sem o qual pesquisa alguma se desenvolve.

Aos professores Alex P. Leite, Beatriz Magalhães, Nádia Parachin e Élide G. Campos agradeço o apoio e as contribuições inestimáveis a este projeto.

Ao professor Luciano Paulino, meu orientador na técnica, por seu exemplo de humanidade, pela atenção e ensinamentos. Agradeço especialmente à minha orientadora, professora Marlene, pela preciosa oportunidade do mestrado, pela confiança e dedicação incansável à qualidade do nosso trabalho.

Resumo

Bactérias aeróbias formadoras de endósporos (Bafes) possuem a capacidade de se diferenciarem em esporos notavelmente resistentes e apresentarem grande diversidade fisiológica, características que conferem importância ambiental, biotecnológica e sanitária, entre outras. A Coleção de Bafes (CBafes) compreende 154 linhagens (SDF) selvagens de Bafes isoladas do solo do Distrito Federal, Brasil, analisadas segundo abordagem polifásica, que envolve a caracterização fenotípica, genotípica, complementada por análises filogenética. Pela capacidade de resolução em nível de espécies, a espectrometria de massa MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry*) foi, recentemente, adotada pelo Laboratório de Bafes (LaBafes) como técnica adicional na identificação e comparação de linhagens SDF. O presente projeto foi desenvolvido com a finalidade de estabelecer bases organizacionais e metodológicas, abalizadas em um sistema de Qualidade, para a construção de um banco de dados de perfis moleculares (biblioteca) suplementar à plataforma padrão de microrganismos do programa *MALDI-Biotyper* (Bruker Daltonics). A construção da biblioteca foi motivada pelos resultados iniciais da análise de doze estirpes por MALDI-TOF IC (do inglês: *intact cell*) MS e *MALDI-Biotyper*, que não apresentaram segura identificação em nível de espécie. A obtenção dos perfis de massa molecular foi realizado utilizando o extrato proteico de 55 linhagens, incluindo as doze iniciais. Apesar de ter ocorrido uma falha na aquisição dos perfis moleculares de dez estirpes, para a maioria obteve-se uniformidade de cultivos e boa reprodutibilidade dos espectros. Foram encontrados 30 picos correspondentes entre os perfis de massa de sete estirpes obtidos por ambas as técnicas. O objetivo de adquirir 24 espectros com elevação da linha de base inferior a 30%, para o cálculo do espectro principal, não foi alcançado para nenhuma das estirpes, contudo, as variáveis interferentes foram identificadas. De 46 estirpes SDF analisadas pelo *MALDI-Biotyper*, 26 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus* ou *Paenibacillus*. Os resultados foram corroborados por resultados obtidos em paralelo por nosso grupo, tais como aqueles baseados em sequências de rDNA 16S de estirpes SDF. Porém, as análises fenotípicas, incluindo estudos da ultraestrutura de esporos, revelam maior diversidade intraespecífica. As etapas pré-analíticas foram estabelecidas, embora ainda necessitem de pequenos ajustes e estudos adicionais, que serão implementados, futuramente, para possibilitar a resolução de estirpes estreitamente relacionadas por MALDI-TOF MS.

Abstract

Aerobic endospore-forming bacteria (AEFB) are capable of differentiating into remarkably resilient spores and have great physiological diversity, which provides environmental, biotechnology and health importance. The AEFB Collection (AEFBC) comprises 154 wild-type lineages isolated from soil of the Federal District, Brazil, which are being inspected on polyphasic approach involving phenotypic, genotypic, and phylogenetic characterization. For the resolution capability at species level, MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption / ionization - time of flight mass spectrometry) was recently adopted by Aerobic endospore-forming bacteria Laboratory (LaBafes) as an additional technique in identification and comparison between SDF strains. This project was developed in order to establish organizational and methodological bases authoritative in a Quality Assurance System, for the construction of a supplementary molecular profiles database (library) to the standard platform of microorganisms of MALDI-Biotyper program containing about 6,000 species of microorganisms (Bruker Daltonics), motivated by the initial results of twelve strains analyzed by IC (intact cell) MALDI-TOF MS and MALDI-Biotyper, with no secure identification at the species level. The attainment of the molecular weight profiles of the library was performed using the protein extract 55 strains, including the initial twelve strains. However, no molecular profiles for ten strains could be obtained. However, it was obtained uniformity of crops and reproducible spectra for most of the strains. Thirty peaks, obtained by both techniques, were found among the mass profiles of seven strains. The goal of obtaining 24 spectrums with elevated baseline less than 30% relative intensity has not been reached for any of the strains. Nevertheless, interfering variables were identified. From 46 SDF strains analyzed by MALDI-Biotyper, 26 were identified as belonging to the genus *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, or *Paenibacillus*. These results were corroborated by our results based on 16S rDNA sequences of SDF strains. However, the phenotypic analyzes, including spores ultrastructure studies reveal greater intraspecific diversity. The pre-analytical steps of this study were established, requiring minor adjustments. Further studies will be implemented to enable the resolution of closely related strains by MALDI-TOF MS for future approaches.

Índice

Abreviaturas	6
I. Introdução	8
1. Filo <i>Firmicutes</i>	8
2. Bactérias aeróbias formadoras de esporos	9
2.1. A esporulação	10
2.2. Taxonomia de Bafes	11
Figura 1. Estágios de formação do endósporo	12
2.3. Principais grupos de bactérias aeróbias formadoras de esporos	13
3. O gênero <i>Bacillus</i>	14
3.1. Grupo do <i>B. subtilis</i> sensu lato	15
3.2. Grupo do <i>B. cereus</i> sensu lato	16
4. Relevância científica e tecnológica de Bafes	17
Tabela I. Relevância científica e tecnológica de algumas linhagens de Bafes	19
5. Espectrometria de massa MALDI-TOF	20
6. Identificação de microrganismos por MALDI-TOF MS	22
7. Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de esporos	25
8. Garantia da Qualidade e Controle de qualidade	26
II. Justificativa	27
III. Objetivos	29
1. Geral	29
2. Específicos	29
III. Material e métodos	30
1. Estirpes	30
2. Crescimento	30
3. Preparo das amostras para MALDI-TOF MS	31
3.1. Célula Intacta	31
3.2. Extrato proteico	32
4. Variantes experimentais	33
4.1. Ensaio preliminar	33
4.2. Ensaio definitivo	33
4.3. Ensaio de qualidade	34
4.4. Ensaio de validação	35

5. Aquisição dos espectros e tratamento dos dados	36
Tabela 2. Significado dos valores de pontuação (escores) atribuídos pelo programa MALDI <i>Biotyper</i> ao ensaio de identificação de microrganismos contra a base de dados pré-estabelecida.	37
6. Padronização experimental	37
IV. Resultados	39
1. Conformidade experimental e documental	39
Figura 2. Planilha Inventário da CBafes	39
Figura 3. Fluxograma de trabalho	40
Figura 4. Registro de procedimento (RP) preenchido	41
2. Perfis de massa	42
Tabela III. Resultados de MALDI–TOF MS para análise de célula intacta (CI) e extrato proteico (EP) de estirpes SDF.	44
SDF0001	44
SDF0002	45
SDF0003	46
SDF0004	46
SDF0005	47
SDF0006	48
SDF0007	49
SDF0008	50
SDF0009	51
SDF0010	51
SDF0011	51
SDF0012	51
SDF0013	52
SDF0014	52
SDF0015	53
SDF0016	53

SDF0017	54
SDF0018	54
SDF0021	55
SDF0022	56
SDF0023	56
SDF0024	57
SDF0025	58
SDF0026	58
SDF0027	59
SDF0028	59
SDF0029	60
SDF0030	61
SDF0033	62
SDF0034	62
SDF0035	62
SDF0036	62
SDF0038	63
SDF0041B	63
SDF0042	63
SDF0043A	63
SDF0043B	64
SDF0044	64
SDF0046	64
SDF0048	64
SDF0050	65
SDF0051A	65
SDF0051B	65

SDF0052	65
SDF0053	66
SDF0055A	66
SDF0055B	66
SDF0057	66
SDF0058	66
SDF0060	66
SDF0061	67
SDF0064	67
SDF0065	67
SDF0066	67
SDF0067	67
3. Variáveis interferentes	68
Tabela IV. Reanálise de amostras na mesma placa analisadora com 48 horas.	69
Figura 5. Ensaio de qualidade com a SDF0006	71
4. Correspondência de padrões	72
Figura 6. SDF0001 – Correspondência entre padrões de massa de CI e EP	73
Figura 7. SDF0002 – Correspondência entre padrões de massa de CI e EP	74
Figura 8. SDF0005 – Correspondência entre padrões de massa de CI e EP	75
Figura 9. SDF0007 – Correspondência entre padrões de massa de CI e EP	76
Figura 10. SDF0008 – Correspondência entre padrões de massa de CI e EP	77
Tabela V. Correspondência entre picos de maior intensidade	78
5. Resultados do <i>MALDI-Biotyper</i>	79
Tabela VI. Resultados de identificação dos espectros de CI e EP contra o banco de dados Bruker <i>MALDI-Biotyper</i>	79
V. Discussão	82
1. Sistema de qualidade	83
Figura 11. Etapas de desenvolvimento do sistema de qualidade	85
2. Cultivos e espectros de massa	85

3. Biblioteca suplementar utilizando <i>MALDI–Biotyper</i>	87
4. Identificação de estirpes na plataforma padrão <i>MALDI–Biotyper</i>	88
Tabela VII. Comparação entre resultados do <i>MALDI–Biotyper</i> e filogenia apresentada por Orem (2014) para algumas estirpes SDFs.	91
Figura 12. Sobreposição dos perfis de massa das estirpes SDF0021; SDF0029; SDF0038; SDF0041B; SDF0050; SDF0055A e SDF0065	92
Tabela VIII. Diferenças fenotípicas entre estirpes relacionadas com <i>B. megaterium</i> pelo programa <i>MALDI–Biotyper</i>	93
Figura 13. Colônias de <i>B. megaterium</i> em <i>Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology</i>	95
Figura 14. Cultivos de estirpes SDF	96
VI. Conclusão	97
VII. Referências	98
Anexo I.....	1
I. Introdução ao conceito de Qualidade e Controle de qualidade	2
Figura 1. A trilogia Juran	5
II. Parâmetros de qualidade para plataforma suplementar de perfis de massa de microrganismos obtidos por <i>MALDI–TOF MS</i>	5
1. Delineamento experimental	6
2. Espectro de proteínas	7
3. Variáveis experimentais	8
4. Métodos de preparação de amostras	9
5. Matriz, laser, modo de ionização	9
6. Análise espectrométrica	11
III. Referências	13

Abreviaturas

α -CHCA – ácido α -ciano-4-hidroxi cinâmico

α -HCCA – Do inglês: *α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid*

AcN – acetonitrila

AF – ácido fórmico **TFA** – ácido trifluoroacético

AS – Do inglês: *averaged spectra*

Bafes – Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

CBafes – Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

CI – Célula Intacta, significando o ensaio de MALDI-TOF ICMS

Cneg – Controle negativo

CQ – Controle de qualidade

CQM – Controle de qualidade microbiológico

CSB – Capela de segurança biológica

EM – Espectro médio

EP – Extrato proteico

EPC – Equipamento de proteção coletiva

EPI – Equipamento de proteção individual

MALDI-TOF ICMS – espectrometria de massa de célula intacta por ionização e dessorção a laser assistida por matriz com análise de tempo de voo. Do inglês: *Intact cell matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight, mass spectrometry*

LaBafes – Laboratório de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos

MALDI-TOF – técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz com análise de tempo de voo. Do inglês: *Matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight*

MALDI-TOF MS – espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz com análise de tempo de voo. Do inglês: *Matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight, mass spectrometry*

MCF – Microscopia de contraste de fase

MSPs – *Main spectra projections*

MT – como alusão a MALDI-TOF: código aplicado aos procedimentos operacionais padrão (POPs) pertencentes ao manual da biblioteca de perfis moleculares obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF

PAS – do inglês: *principal averaged spectra*

POP – Procedimento operacional padrão

RP – Registro de procedimento operacional padrão

SDF – código alfabético aplicado às estirpes ambientais da Coleção Bafes isoladas de solo do Distrito Federal

t_c – tempo de crescimento das colônias bacterianas, correspondente ao tempo de incubação

s. l. – *sensu lato*

s. s. – *sensu stricto*

I. Introdução

1. Filo *Firmicutes*

De importância central para este trabalho, o filo *Firmicutes* é composto por quatro classes, *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia* e, a recentemente proposta, *Negativicutes*, que aloca 26 famílias e 223 gêneros (Galperin *et al.*; 2013; De Vos *et al.*, 2009; Logan, 2009; Fritze, 2004). Diferentemente do que ocorre em outros filios do domínio *Bacteria*, existe um consenso relativo entre os sistemas sobre a origem evolutiva das linhagens de *Firmicutes* divergindo de ramos da árvore filogenética de *Bacteria* em estágios evolucionários bem iniciais. A classificação fenotípica e genotípica também é mais consensual que em outros filios, no que concerne à análise genômica comparativa, análise filogenética baseada em rDNA 16S e genes das subunidades da RNA polimerase, além da filoproteômica (Galperin *et al.*; 2013; De Vos *et al.*, 2009; Logan, 2009; Fritze, 2004).

As características universais do filo são células Gram positivas, podendo apresentar-se como Gram variáveis, possuindo também representantes Gram negativos alocados em *Negativicutes*. O baixo conteúdo de bases citosina (C) e guanina (G) (percentual de G+C; <50%) é uma regra geral, porém há representantes com percentual G+C > 60%. Em *Firmicutes* também são encontradas algumas similaridades com representantes de outros filios, como *Thermotogae* e *Fusobacteria*, sugerindo possíveis eventos de transferência horizontal de genes durante a evolução (Galperin *et al.*; 2013; Logan e Halket, 2011; Logan *et al.*, 2009; Logan, 2009). As células vegetativas podem apresentar morfologia esférica, curvada, helicoidal, linear, motilidade ou não, assim como características bioquímicas variadas. Podem ser aeróbias, facultativas ou anaeróbias. Algumas linhagens são termofílicas ou halofílicas (Galperin *et al.*, 2013; Logan, 2009; De Vos *et al.*, 2009).

Uma propriedade específica do filo, encontrada em espécies aeróbias e anaeróbias, é a capacidade de formação de endósporos. Contudo, esta característica não é comum a todos os representantes de *Firmicutes* (Galperin *et al.*, 2013; Mckenney *et al.*, 2013; Logan e Halket, 2011; Maughan e Van der Auwera, 2011; Logan, 2009; De Vos *et al.*, 2009; Fritze, 2004). Existem linhagens para as quais este processo de diferenciação celular não foi comprovado, embora tais representantes do filo possuam o arcabouço genético necessário para a ativação do processo. Em adição, outras linhagens são defectivas para genes específicos de formação do endósporo (Galperin *et al.*, 2013; De Vos *et al.*, 2009; Logan,

2009). Supõe-se que a perda da capacidade de formação de endósporos (os quais deste ponto em diante serão referidos apenas como esporos) por algumas linhagens seja uma evolução adaptativa a ambientes ricos e a um modo de vida saprófita. Alguns exemplos são linhagens de estreptococos, lactobacilos e ruminococos, além de espécies do gênero *Listeria* (Galperin *et al.*; 2013).

Por apresentarem mecanismo de endoesporulação (deste ponto em diante será referido apenas como esporulação) evolucionariamente conservado, dois *taxa* se destacam dentro do filo *Firmicutes*: a família *Bacillaceae*, com representantes aeróbios, e a classe *Clostridia*, constituída por espécies anaeróbias (Mckenney *et al.*, 2013). O gênero *Clostridium*, atualmente alocado na classe *Clostridia*, família *Costridiaceae*, ordem *Clostridiales*, está intimamente relacionado ao gênero *Bacillus*, até a segunda edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, e assim como o gênero *Bacillus*, pertencia à família *Bacillaceae*. Esses dois gêneros eram diferenciados pelo formato do esporângio (deformado pelo esporo em *Clostridium* e não deformado em *Bacillus*), pela morfologia do pré-esporo (oval para *Bacillus* e esférica para *Clostridium*) e, principalmente, pela tolerância ao oxigênio sendo, o gênero *Clostridium*, anaeróbio. Claramente, a alocação do gênero *Clostridium* na família *Bacillaceae*, mostrou-se inadequada. (Logan e Halket, 2011; De Vos *et al.*, 2009). A espécie tipo para estudo das características taxonômicas do gênero é *C. butyricum* (De Vos *et al.*, 2009). O *C. difficile* é uma espécie anaeróbia formadora de esporos que possui o genoma completamente sequenciado e constitui o principal modelo de esporulação em organismos anaeróbios (Hilbert e Piggot, 2004).

Com destaque para o gênero *Bacillus*, as linhagens aeróbias formadoras de esporos encontradas em *Firmicutes* estão descritas abaixo.

2. Bactérias aeróbias formadoras de esporos

Linhagens de Bactérias aeróbias formadoras de esporos (deste ponto em diante serão referidas simplesmente como **Bafes**) é um termo utilizado frequentemente na literatura para designar linhagens do gênero *Bacillus* e outros gêneros filogeneticamente relacionados, onde a produção de esporos na presença de oxigênio é bem caracterizada (Galperin *et al.*, 2013; Logan e Halket, 2011; Maughan e Van der Auwera, 2011; De Vos *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2009; Fritze, 2004).

Inicialmente, todas as espécies de Bafes eram alocadas no gênero *Bacillus*. Porém, entre os anos de 1990 e 2008, 35 novos gêneros de Bafes foram propostos (Galperin *et al.*, 2013; Logan e Halket, 2011; De Vos *et al.*, 2009; Logan, 2009; Fritze, 2004). Atualmente, 40 gêneros e sete famílias da ordem *Bacilales* (classe *Bacilli*) alocam espécies de Bafes: *Bacillaceae*, *Alicyclobacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae*, *Pasteuriaceae*, *Sporolactobacillaceae* e *Thermoactinomycetacea*. Os gêneros que acomodam o maior número de espécies são: *Bacillus* (153 espécies), *Paenibacillus* (110), *Alicyclobacillus* (20), *Virgibacillus* (18), *Halobacillus* (16), *Geobacillus* (16) e *Brevibacillus* (16) (Logan e Halket, 2011; De Vos *et al.*, 2009; Fritze, 2004).

As linhagens de Bafes são ubíquas, podendo ser encontradas em solos de regiões desérticas até a Antártica, com acidez e umidade variadas, ambientes aquáticos de água doce ou salina, dentre outros (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Logan e Halket, 2011; Maughan e Van der Auwera, 2011). Frequentemente, as linhagens estudadas são originárias de amostras de solo ou sedimentos associados. Como saprófitas, essas linhagens participam dos ciclos de transformação de matéria e energia, como o ciclo do carbono e nitrogênio e, embora muito da diversidade e ecologia seja pouco conhecida, é indubitável a importância das Bafes para a microbiota do solo. A distribuição geográfica ampla é favorecida pela forma esporulada que pode ser suspensa na poeira e aerossóis originários do solo, sendo largamente difundida pelo vento, água e outros veículos diversos, tais como humanos, outros animais vertebrados, insetos e nematódeos (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Logan e Halket, 2011; Maughan e Van der Auwera, 2011).

2.1. A esporulação

A endoesporulação, ou formação do endósporo, é a estratégia de sobrevivência de uma espécie que resulta em maior longevidade e resistência a agentes externos. O processo de endoesporulação demanda gasto energético alto sendo o último recurso de sobrevivência adotado pela célula vegetativa em condições ambientais desfavoráveis. Isto foi observado em populações ou comunidades sésseis de *Bacillus subtilis* onde as células vegetativas se empenham em estratégias, tais como a transformação e canibalismo antes de recorrerem à esporulação (Mirouze e Dubnau, 2013).

Em ambiente laboratorial, a esporulação é induzida, principalmente, pela alta densidade populacional e carência de nutrientes, notadamente carbono e nitrogênio (Logan e Halket, 2011). Em *B. subtilis* — e, provavelmente, nas demais espécies de Bafes — a opção

em esporular é estimulada por circunstâncias ambientais adversas como a depleção de nutrientes e o aumento da população, e envolve a ativação de uma série de vias de transdução de sinal em respostas do tipo *quorum sensing*. Estas respostas evidenciam a importância da comunicação célula-célula como determinante para a esporulação (Galperin *et al.* 2013; Mirouze e Dubnau, 2013; De Vos *et al.*, 2009; Fritze, 2004).

O processo de esporulação é coordenado, temporal e espacialmente, pela expressão ordenada de uma série de genes específicos desse evento de diferenciação celular (Mckenney *et al.*, 2013; Hilbert e Piggot, 2004). O produto final, um esporo maduro, é uma célula dormente e altamente diferenciada, resistente ao tempo, agentes físicos e químicos e diversos outros tipos de pressões ambientais (Galperin *et al.* 2013; Logan e Halket, 2011; De Vos *et al.*, 2009; Hilbert e Piggot, 2004). A figura 1, adaptada de Hilbert e Piggot (2004), apresenta um esquema da formação do endósporo, didaticamente dividido em sete estágios (I-VII).

Embora não possua metabolismo detectável, o esporo é capaz de monitorar o meio externo, percebendo as condições favoráveis ao crescimento vegetativo, e disparando o mecanismo de germinação segundos após a exposição a agentes germinantes (Mckenney *et al.*, 2013). Os agentes germinantes compreendem pequenas moléculas, tais como, aminoácidos, carboidratos de baixa massa molecular, dodecilaminas ou mesmo um aumento da pressão hidrostática. A quebra da dormência pode também ser induzida em laboratório por um choque térmico a temperaturas elevadas, porém, não letais (Logan e Halket, 2011).

2.2. Taxonomia de Bafes

A sistemática de procaríotos tem por desafio encontrar um sistema de classificação adequado, que reconcilie o desacerto atual entre dados ecológicos e fenotípicos e os dados moleculares em que está fundamentada, para alcançar classificação com sentido biológico (Maughan e Van der Auwera, 2011). As divergências observadas ocorrem principalmente quando as diferenças estabelecidas por análise de sequenciamento do gene 16S de RNA ribossomal (rRNA 16S) são mínimas, apesar das variações fenotípicas serem patentes (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Maughan e Van der Auwera, 2011; Logan *et al.*, 2009; Logan, 2009).

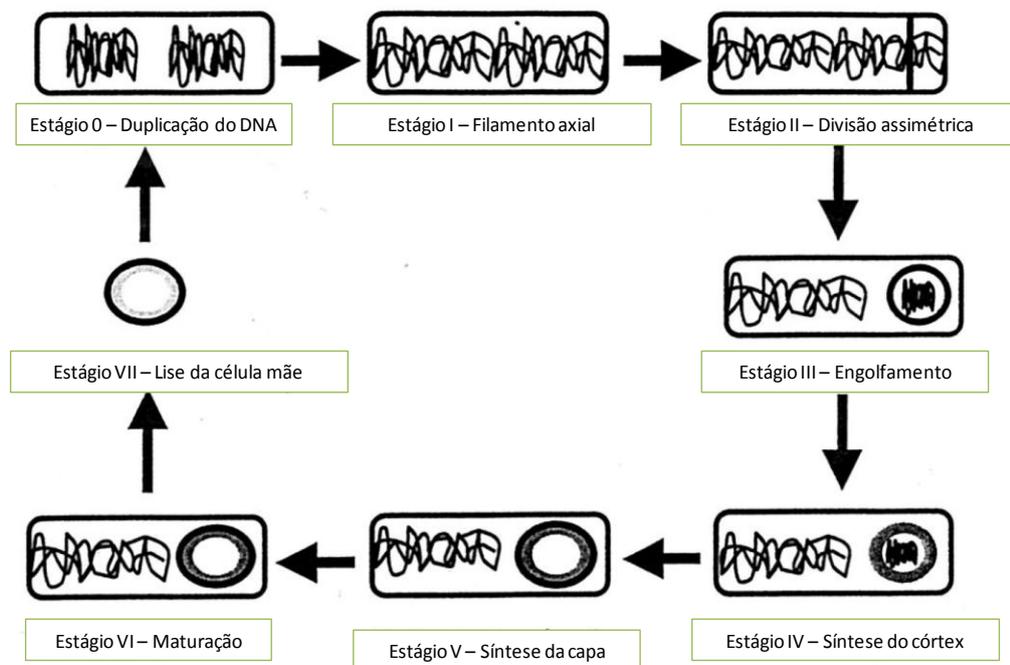


Figura 1. Estágios de formação do endósporo. Estágio 0: duplicação do genoma da célula vegetativa. **Estágio I:** formação do filamento axial, uma estrutura contínua que se estende ao longo da célula em diferenciação, denominada esporângio. **Estágio II:** divisão assimétrica do esporângio em dois compartimentos: o maior, da célula mãe, e o menor, do pré-esporo. Durante a formação do septo de divisão apenas 30% do genoma se encontra no compartimento do pré-esporo sendo, o restante, arrastado por uma DNA translocase. **Estágio III:** o pré-esporo é completamente engolfado pela membrana celular e passa a ser um protoplasto livre na célula mãe, envolvido por duas membranas. **Estágio IV:** entre as membranas que revestem o núcleo (ou citoplasma) do pré-esporo é sintetizada uma camada denominada córtex, constituída de peptideoglicano, porém com menor teor de ligações cruzadas quando comparada a uma parede celular típica de células vegetativas. **Estágio V:** formação da capa de proteção, constituída de camadas proteicas em torno do núcleo e membranas do pré-esporo. Durante a formação do córtex e da capa, o pré-esporo é desidratado adquirindo uma aparência refringente representada como um núcleo claro. A desidratação é resultante da deposição de dipicolinato de cálcio no citoplasma do pré-esporo. **Estágio VI:** ocorre a maturação do endósporo que adquire propriedades de resistência apesar de não haver mudanças morfológicas perceptíveis. **Estágio VII:** lise do esporângio liberando o esporo maduro para o meio ambiente. (Adaptado de Hilbert e Piggot, 2004)

Como será comentada adiante, a grande diversidade intraespecífica de Bafes, desencadeou o agrupamento de várias linhagens como subgrupos de uma linhagem típica, sem dispensar os métodos clássicos baseados em cultivo como importantes ferramentas de detecção, identificação e validação das análises moleculares (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Maughan e Van der Auwera, 2011; Logan *et al.*, 2009; De Vos *et al.*, 2009; Fritze, 2004).

A descrição de uma linhagem e a proposição de novos *taxa* em bacteriologia deve ser orientada por uma série de quesitos mínimos, observados e executados por diversos grupos de pesquisa (Logan e Halket, 2011; Maughan e Van der Auwera, 2011; De Vos *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2009). O *Subcommittee on the Taxonomy of the Genus Bacillus and Related Organisms*, integrante do *International Committee on Systematics of Prokaryotes* e publicações como *Recommendation 30b of the Bacteriological Code* (Logan *et al.*, 2009 *apud* Lepage *et al.*, 1990) orienta a utilização de métodos que representem, adequadamente, a diversidade do *taxon*, viabilizando o reconhecimento e distinção de outros *taxa*. É enfaticamente recomendado que todos os detalhes das condições experimentais para qualquer tipo de análise sejam meticulosamente registrados e que as descrições fenotípicas não sejam tratadas como “meros coadjuvantes” das análises filogenéticas (Logan e Halket, 2011; Maughan e Van der Auwera, 2011; Logan *et al.*, 2009; De Vos *et al.*, 2009). As descrições devem ser criteriosas, bem documentadas e seguir protocolos laboratoriais bem estabelecidos. As análises devem ser reproduzíveis, inclusive as genéticas, e a abordagem, polifásica, realizadas com uma extensa investigação da informação genotípica e fenotípica.

Comparações diretas com linhagens tipo — ou de referência — são mais confiáveis que a correlação teórica entre dados e descrições da literatura, muitas vezes incomparáveis, por não existir padronização experimental entre laboratórios de pesquisa (Logan *et al.*, 2009; Fritze, 2004). Amostras de linhagens bem caracterizadas de *Bacillus* devem ser utilizadas como controle em alguns testes. Por exemplo, enquanto *B. cereus* e *B. subtilis* são indicados como controle positivo e negativo, respectivamente, na observação da formação de corpúsculos de inclusão em células vegetativas de cultivos em meio sólido ágar-glicose, o *B. thuringiensis* é recomendado como modelo para a observação de corpúsculos parasporais de natureza proteica (Logan *et al.*, 2009). Na caracterização de bactérias formadoras de esporos, descrições detalhadas sobre o procedimento adotado para induzir a esporulação; ocorrência de deformação do esporângio; posição do endósporo (central, apical ou subterminal); formato do esporângio (cilíndrico, esférico, elipsoidal) e presença de corpos parasporais, são indispensáveis (Logan *et al.*, 2009).

2.3. Principais grupos de bactérias aeróbias formadoras de esporos

Até os anos 1990, todas as Bafes estavam alocadas no gênero *Bacillus*. O gênero ainda contém a maior parte das linhagens, 153 espécies, seguido por *Paenibacillus* com 110 espécies (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; De Vos *et al.*, 2009; Logan, 2009). Dentro de

Bacillus, dois grupos se destacam por possuírem linhagens tipo muito bem caracterizadas e utilizadas como modelos para estudos taxonômicos e moleculares: os grupos do *B. cereus sensu lato* e *B. subtilis sensu lato* (Galperin *et al.*, 2012; Logan e Halket, 2011; Maughan *et al.*, 2011; Fritze, 2004).

3. O gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus*, da família *Bacillaceae*, ordem *Bacillales*, classe *Bacilli* foi proposto em 1872, por Ferdinand Cohn, que incluiu *B. anthracis* e *B. subtilis*, pelo critério único de morfologia celular (Galperin *et al.*, 2013; De Vos *et al.*, 2009). Em 1992 as características dos representantes do gênero foram delineadas como sendo bactérias aeróbias, Gram positivas e formadoras de endósporos. Nessa ocasião, todas as Bafes foram alocadas nesse gênero (Galperin *et al.*, 2013; De Vos *et al.*, 2009; Logan, 2009). Porém, em 1995, uma linhagem termófilo-halotolerante, estritamente anaeróbia e aparentemente não esporulante foi proposta para o gênero. Essa linhagem foi designada *B. infernus* (Logan, 2009; Boone *et al.*, 1995).

A publicação dessa nova espécie, *B. infernus* foi um marco que resultou em uma série de subdivisões e proposições de novos *taxa*, estreitamente relacionados, mas que fugiam às características estabelecidas inicialmente para o gênero, até então delineado por um grupo de padrões fenotípicos chaves (Galperin *et al.*, 2013; Maughan e Van der Auwera, 2011; De Vos *et al.*, 2009; Logan, 2009; Fritze, 2004). Com o desenvolvimento tecnológico, a ciência se aprofundou em estudos estruturais e fisiológicos, novas abordagens surgiram justificando uma série de reposicionamentos de *taxa* e a caracterização fenotípica passou a ser formalizada em compêndios taxonômicos como o manual de Bergey's (Galperin *et al.*, 2013; Maughan e Van der Auwera, 2011; Logan, 2009; Fritze, 2004). Quando as análises por similaridade de sequências gênicas de rRNA 16S e por hibridização DNA-DNA tornaram-se amplamente aceitas, novamente, diversas linhagens foram realocadas dentro e fora do gênero *Bacillus* (Galperin *et al.*, 2013; De Vos *et al.*, 2009; Logan, 2009; Fritze, 2004).

Atualmente estão inseridas no gênero *Bacillus* espécies estritamente anaeróbias, não esporulantes e com morfologia esférica (coco) (Logan e Halket, 2011), ainda que para o gênero as características padrão sejam: bactérias aeróbicas, Gram positivas, de forma bacilar, com motilidade, formadoras de esporos e produtoras de catalase (Maughan e Van der Auwera, 2011).

Segundo Fritze (2004), atualmente *Bacillus* é o único de uma série de gêneros de Bafes que compreende números crescentes de espécies publicadas e validadas, porque as descrições destes gêneros e espécies estão fundamentadas em uma abordagem variada de características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e quimiotaxonômicas e em resultados de várias técnicas de genética molecular. Em um estudo sobre a importância da caracterização fenotípica em análises de agrupamento dentro de *Bacillus*, Maughan e Van der Auwera (2011) realizaram um levantamento de 7.510 sequências de rDNA 16S obtidas em bancos de dados genômicos de amostras cultivadas ou sequenciamento direto de amostras ambientais. Efetuando o alinhamento destas sequências com um ponto de corte de 97% de identidade, somente 116 espécies de *Bacillus* estariam ali representadas. O resultado desse estudo sugeriu a existência de aspectos fundamentais da intradiversidade em *Bacillus* ainda pouco conhecidos.

Atualmente, entre as linhagens de Bafes que foram realocadas em outros gêneros e as que são consideradas como *Bacillus*, contam-se 346, cujas classificações foram formalizadas pelo *Subcommittee on the Taxonomy of the Genus Bacillus and Related Organisms* (De Vos *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2009; Logan, 2009). O gênero *Bacillus*, dentre outros 17 gêneros da família *Bacillaceae*, possui mais de 150 espécies sendo metade das respectivas linhagens originárias de solo (Logan e Halket, 2011; Logan, 2009). Grande parte das espécies está dividida em subespécies. Cada grupo de subespécies dentro de uma espécie é designado pelo nome do representante típico, por exemplo: grupo do *B. cereus sensu lato* (*s. l.*) e grupo do *B. subtilis s. l.*. Estes, inclusive, são os grupos de maior relevância como modelos para experimentos comparados e serão comentados a seguir.

3.1. Grupo do *B. subtilis sensu lato*

O *B. subtilis stricto sensu* (*s. s.*) é um representante típico do gênero *Bacillus*, notório por apresentar estratégias adaptativas diversificadas tais como motilidade, formação de biofilmes, esporulação, canibalismo, competência e populações bimodais (respostas ambientais diferentes célula a célula), sendo, por isto, um interessante modelo de estudo do metabolismo evolutivo tanto sob aspectos determinísticos quanto estocásticos (probabilísticos) (Mirouze e Dubnau, 2013). Além disto, foi a primeira espécie para a qual foi observada a existência da forma dormente (esporos) sendo ainda hoje o principal modelo para estudos de endoesporulação (Mckenney *et al.*, 2013; Logan e Halket, 2011).

Além do *B. subtilis* s. s., o grupo apresenta dois representantes estreitamente relacionados: as espécies *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis* (De Vos *et al.*, 2009; Logan, 2009; Fritze, 2004). A organização taxonômica deste grupo, menos consensual que em *B. cereus* s. l., tem sofrido uma série de proposições conflitantes de novas *taxa* e divisões baseadas em homologia de DNA, pequenas diferenças fenotípicas – como o perfil de ácidos graxos – perfil enzimático multilocus e resistência à transformação. Desta forma foram propostas, entre outras, as espécies *B. atrophaeus*, *B. mojavenensis*, *B. vallismortis*, *B. subtilis* subespécies *spizizenii* e *subtilis*, *B. axarquiensis* e *B. malacitensis* sendo, as duas últimas, consideradas atualmente como heterotipos de *B. mojavenensis* (Logan e Halket, 2011; De Vos *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2009; Fritze, 2004).

3.2. Grupo do *B. cereus* sensu lato

Oito espécies pertencem ao grupo *B. cereus* s. l.: *B. cereus* s. s., *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* e *B. toyonensis* (LPSN, 2015).

B. cereus s. s., *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis*, anteriormente alocadas independentemente em *Bacillus*, revelaram-se muito próximas nas análises de rDNA 16S e foram as primeiras linhagens a serem reunidas como um subgrupo de *B. cereus* pela sistemática taxonômica vigente (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Jiménez *et al.*, 2013; Maughan e Van der Auwera, 2011). Algumas linhagens patogênicas, como *B. anthracis*, *B. cereus* s. s. e *B. thuringiensis*, estão estreitamente relacionadas e são consideradas, por muitos autores, como patovares de uma espécie única (Logan, 2009). As diferenças existentes no conteúdo de informação genética são de natureza extra cromossomal e se explicam, pelo menos em grande parte, pela transferência horizontal de genes, já demonstrada em solo, rizosferas, alimentos, mamíferos e insetos (Logan e Halket, 2011; De Vos *et al.*, 2009; Fritze, 2004). Entre essas linhagens, a similaridade genética é tão grande que, em havendo cura total de plasmídeos, as espécies tornam-se indistinguíveis. É aceito, pois, em termos taxonômicos, referir-se a *B. anthracis* e *B. thuringiensis* como variedades de *B. cereus*: *B. cereus* var. *anthracis* e *B. cereus* var. *thuringiensis* (LPSN, 2015).

O grupo do *B. cereus* possui grande relevância ecológica, industrial, em saúde pública, incluindo biodefesa, e econômica: o *B. anthracis*, identificado primeiramente por Koch, em 1876, é um importante patógeno causador do antraz em humanos e outros animais; o *B.*

thuringiensis tem importância comercial como bioinseticida e o *B. cereus s. s.* é um patógeno humano oportunista causador de distúrbios gastrointestinais severos, infecções oculares, infecções em lesões epiteliais, sistêmicas e endocardite, entre outras (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Fritze, 2004).

Apesar de se tratar de um grupo de espécies mesófilas, o *B. mycoides* e *B. weihenstephanensis* são psicrotolerantes, menos patogênicos que as espécies citadas acima, mas podem crescer em alimentos sob refrigeração (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013). O *B. cytotoxicus*, um termotolerante, foi descrito recentemente como sétima espécie do grupo *B. cereus s. l.* e potencial causador de intoxicações alimentares (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Logan e Halket, 2011; Maughan e Van der Auwera, 2011).

O mais recente e oitavo representante do grupo é *B. toyonensis*, isolado em 1966 no Japão, foi comercializado como probiótico em nutrição animal durante 30 anos com a designação de *B. cereus var. toyoi*. A espécie foi proposta e aceita como novo *taxon* no ano de 2013 (Jiménez *et al.*, 2013).

Em razão dos diferentes potenciais de risco e à extrema diversidade intraespecífica, a identificação rápida e confiável destas linhagens ainda é um importante desafio científico e tecnológico (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013).

4. Relevância científica e tecnológica de Bafes

Desde a primeira descrição de *Vibrio subtilis* por Christian Ehrenberg em 1835 – atualmente *B. subtilis* (Cohn, 1872) – bactérias aeróbias formadoras de endósporos têm despertado o interesse científico em torno da capacidade de sobreviver sob condições ambientais adversas e/ou extremas e por longos períodos de tempo (Logan e Halket, 2011; Fekete, 2009). O gênero *Bacillus*, e espécies relacionadas de Bafes possuem grande importância histórica em bacteriologia. No século XVIII, os estudos de células vegetativas e esporos de *B. subtilis* por Cohn proporcionaram as evidências necessárias para contradizer a antiga crença da geração espontânea, e os estudos de Koch (1876) com o *B. anthracis* pontuaram o início da bacteriologia clínica (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Verbaendert e De Vos, 2011; Logan e Halket, 2011). Sendo uma das espécies de bactérias mais pesquisadas historicamente, *B. subtilis* tornou-se um modelo universal para estudo da endoesporulação, estando, atualmente, entre as células mais conhecidas depois da Gram negativa não esporulante *E. coli* (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Logan e Halket, 2011;

Fekete, 2009). Em virtude da alta diversidade de propriedades bioquímicas, as Bafes continuam sendo alvo de grande interesse biotecnológico e comercial (Galperin *et al.*, 2013; Mckenney *et al.*, 2013; Logan e Halket, 2011).

O principal habitat das Bafes é o solo, como citado anteriormente, de todos os tipos, onde possuem relevante importância ambiental, interagindo com a flora, outros microrganismos, insetos e nematoides (Logan e Halket, 2011). A maior parte das espécies são reconhecidamente saprófitas, ocorrendo também linhagens fixadoras de nitrogênio, importantes como modelos de estudo para compreensão da diversidade bacteriana em rizosferas (Logan e Halket, 2011). No campo da medicina, além do importante patógeno *B. anthracis* citado anteriormente, diversas linhagens de *Bacillus spp* são patógenos animais – inclusive humanos – oportunistas ou obrigatórios, responsáveis por quadros de intoxicação alimentar e outras infecções de gravidade clínica variável (Logan e Halket, 2011; Fekete, 2009). O controle da contaminação por esporos multirresistentes na indústria alimentícia representa grande desafio tecnológico. Os estudos de avaliação de risco são adicionalmente dificultados pela grande biodiversidade intraespecífica de Bafes contaminantes de alimentos, adicionalmente a outros formadores de endósporos não-aeróbios (Eijlander *et al.*, 2014; Augustin, 2011).

Conforme Galperin *et al.* (2013, *apud* Pruitt *et al.*, 2012; Pagani *et al.*, 2012), devido à importância das Bafes em diversas áreas do conhecimento, em 2012 já existiam cerca de 500 genomas completos sequenciados de estirpes do filo *Firmicutes* e mais de 3.000 projetos de sequenciamento, grande parte voltada para espécies patogênicas ou bem caracterizadas de *Bacillus*, principalmente *B. subtilis*, *B. anthracis* e o patógeno de insetos *Bacillus thuringiensis*. Atualmente, sabe-se que as características de interesse biotecnológico, toxicológicas e outras singularidades das Bafes, variam muito entre subtipos de uma mesma espécie e, muitas vezes, estão associadas a fenótipos expressos por plasmídeos. A grande semelhança entre o conteúdo cromossomal de linhagens fenotipicamente diferentes é frequentemente observada, e esta característica vem corroborando o desenvolvimento de técnicas com potencial de identificação rápida e acurada de Bafes em nível de subespécies (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013; Fekete, 2009). Para ilustrar a diversidade de aplicações tecnológicas das Bafes, a tabela I apresenta algumas linhagens – algumas já referidas anteriormente – e sua importância no contexto sanitário, industrial e ambiental; nas áreas clínica, de saúde, na pesquisa básica e em biossegurança.

Tabela I. Relevância científica e tecnológica de algumas linhagens de Bafes

Linhagem		Importância	Referência
<i>B. subtilis</i>	Industrial Pesquisa Saúde	Espécie típica do gênero, modelo para estudo da endoesporulação, espécie hospedeira para expressão heteróloga de proteínas de uso industrial, antibióticos, vitaminas, produção de vacinas e biossurfactantes.	Eijlander <i>et al.</i> , 2014 Ferreira <i>et al.</i> , 2005 Liu <i>et al.</i> , 2013
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Ambiental	Fixadoras de nitrogênio, estudos da diversidade bacteriana em rizosferas.	Logan e Halket, 2011
<i>B. mojavensis</i>	Ambiental	Fixadoras de nitrogênio, estudo da diversidade bacteriana em rizosferas.	Logan e Halket, 2011
<i>B. licheniformis</i>	Industrial Saúde	Probiótico de uso humano	Xie <i>et al.</i> , 2015
<i>B. atrophaeus</i>	Pesquisa Saúde	Esporos inativados testados como adjuvantes em vacinas	Oliveira-Nascimento <i>et al.</i> , 2012
<i>B. cereus s. s.</i>	Industrial Pesquisa Saúde	Espécie típica do grupo <i>B. cereus s. l.</i> ; contaminante de alimentos, patógeno oportunista causador de distúrbios gastrointestinais, infecções oculares e em lesões cutâneas, endocardites e bacteremia	Ehling-Schulz <i>et al.</i> , 2004 Bottone, 2010 Augustini, 2011
<i>B. anthracis</i>	Ambiental Biossegurança Pesquisa Saúde	Patógeno causador do antraz, doença infecciosa fatal em humanos e outros animais, associado a atos de bioterrorismo; promotor do crescimento em plantas	Mock e Fouet, 2001 Ganz <i>et al.</i> , 2014
<i>B. thuringiensis</i>	Industrial Pesquisa Saúde	Bioinseticida natural, biopesticida agrícola, possível causador de surtos de infecção alimentar, infecções oculares e lesões cutâneas, infecções pulmonares	Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013 (<i>apud</i> Jackson <i>et al.</i> , 1995; Callegan <i>et al.</i> , 2006) Bravo <i>et al.</i> , 2011 Hernandez <i>et al.</i> , 1998
<i>B. mycoides</i>	Industrial Saúde	Psicrotolerante, contaminante de alimentos, patógeno causador de infecções leves	Guinebrière <i>et al.</i> , 2008 Guinebrière <i>et al.</i> , 2010
<i>B. weihenstephanensis</i>	Industrial Saúde	Psicrotolerante, contaminante de alimentos, patógeno causador de infecções leves	Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013
<i>B. cytotoxicus</i>	Industrial Saúde	Termotolerante, contaminante de alimentos	Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013 Guinebrière <i>et al.</i> , 2013
<i>B. toyonensis</i>	Industrial	Probiótico animal	Jiménez <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ambiental Pesquisa	Agente denitrificante presente no solo, uso potencial em estações de tratamento de água	Verbaendert e De Vos, 2011
<i>B. circulans</i>	Ambiental	Agente denitrificante presente no solo	Verbaendert e De Vos, 2011

(continua)

Linhagem		Importância	Referência
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Ambiental	Agente denitrificante presente em solos salinos	Verbaendert e De Vos, 2011 Márquez <i>et al.</i> , 2011
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Ambiental	Agente denitrificante presente no solo	Verbaendert e De Vos, 2011

5. Espectrometria de massa MALDI-TOF

Devido à complexidade da taxonomia de procaríotos *per se* e às dificuldades encontradas na distinção e identificação de estirpes bacterianas, este campo do conhecimento vem requisitando maior agilidade e poder crescente de resolução por parte das tecnologias de análise molecular, principalmente em nível de subespécies (Maughan e Van der Auwera, 2011). Nesse contexto, a espectrometria de massa foi inserida na Microbiologia como excelente ferramenta analítica para a determinação de perfis moleculares e identificação de compostos químicos, incluindo biomoléculas (Hijazin *et al.*, 2012; Speicher, 2000). Possuindo diversas funcionalidades, a técnica agrega qualidades de análise molecular fenotípica e genotípica concomitantes, é rápida, simples, precisa, sensível, robusta e confiável (Usbeck *et al.*, 2014; Sandrin *et al.*, 2012; Mellmann *et al.*, 2008; Hoffmann e Stroobant, 2007). Os resultados podem ser aplicados a análises evolutivas, que frequentemente se apresentam coerentes com a filogenia baseada em sequenciamento do rDNA 16S (Anderson *et al.*, 2014; Dušková *et al.*, 2012; Schleifer, 2009). O custo do material de consumo varia conforme requisitos do espectrômetro e da profundidade da análise, sendo, em geral, inferior àqueles de técnicas genéticas (Anderson *et al.*, 2014; Sandrin *et al.*, 2012; Kruppa, 2009; Fenselau e Demirev, 2001).

Na década de 1980 a espectrometria de massa se expandiu rapidamente, sendo aplicada a diversas áreas do conhecimento (Sandrin *et al.*, 2012; Hillenkamp e Peter-Katalinic', 2007; Tanaka, 2002), mas a análise de biomoléculas com massas moleculares altas representava um desafio. Partindo-se de um meio de diluição, a questão era: como isolar, ionizar e volatilizar biomoléculas com massas acima de 500 ou 1.000 Da sem que ocorresse fragmentação excessiva e irregular nos tubos de análise de voo dos espectrômetros (Hossain *et al.*, 2010; Hillenkamp e Peter-Katalinic', 2007). A solução foi desenvolvida ainda no início dos anos 1980 por Koichi Tanaka e cols. e divulgada pela primeira vez em maio de 1987 na *Annual Conference of the Japan Mass Spectrometry Society*, em Kyoto, Japão. A tecnologia de ionização e dessorção a laser assistida por matriz foi patenteada pela Shimadzu

Corporation (Japão) e rendeu o Prêmio Nobel de Química em 2002 a Tanaka. Diversos estudos desencadearam o aperfeiçoamento da dessorção assistida por matriz, especialmente Hillenkamp, Karas e cols. com dezenas de publicações na área. (Hossain *et al.*, 2010; Hillenkamp e Peter-Katalinic', 2007; Hillenkamp *et al.*, 1991; Hillenkamp *et al.*, 1988).

Na modalidade espectrométrica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz com análise por tempo de voo (MALDI-TOF), as macromoléculas são submetidas a uma ionização suave por uma substância matriz, que absorve a energia laser e favorece a dessorção da amostra a partir de um suporte sólido (placa analisadora), para a fase gasosa, sem fragmentação. A aquisição dos valores de massa/carga (m/z) é feita por análise do tempo de voo em um tubo analisador. Os sinais são emitidos para um computador e apresentados como um espectro de picos que correlaciona intensidades de sinal com razões m/z moleculares (Cole, 2010; Cunha *et al.*, 2006; Tanaka, 2002; Hillenkamp *et al.*, 1988). No caso de análises microbiológicas, o espectro obtido é típico para cada estirpe microbiana analisada, tal qual uma impressão digital. Em razão disto, tais perfis moleculares são também denominados *fingerprints* celulares (Kruppa, 2009; Fenselau e Demirev, 2001). A posterior identificação molecular de picos significantes é possível por técnicas de reanálise espectrométrica (espectrometria em *tandem*), como TOF-TOF ou MS-MS, em associação com técnicas auxiliares ou não como a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese bidimensional (Sandrin *et al.*, 2012; Cole, 2010; Aebersold e Mann, 2003).

A então denominada espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz com análise de tempo de voo, MALDI-TOF MS (do inglês: *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight, mass spectrometry*), difundiu-se rapidamente nas décadas seguintes alavancada pelo melhoramento das tecnologias afins como, por exemplo, a tecnologia de laser (Bohme *et al.*, 2013; Sandrin *et al.*, 2012; Freiwald e Sauer, 2009; Hillenkamp e Peter-Katalinic', 2007; Hoffmann e Stroobant, 2007; Tanaka, 2002). Como adventos, a elaboração de espectrômetros novos, aperfeiçoamento dos analisadores, desenvolvimento de instrumentos híbridos, técnicas de processamento, algoritmos de tratamento de dados, programas de bioinformática, equipamentos comerciais de fácil manuseio, custo de análise baixo e aumento da velocidade de obtenção de resultados. A associação a cromatógrafos gasosos, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e outras técnicas moleculares e, finalmente, a disponibilidade de bancos de dados de espectros em bases privadas e públicas, também, teve papel relevante no sucesso do método (Bohme *et*

al., 2013; Sandrin *et al.*, 2012; Freiwald e Sauer, 2009; Hillenkamp e Peter-Katalinic', 2007; Hoffmann e Stroobant, 2007; Tanaka, 2002).

Nos últimos 25 anos, a MALDI-TOF MS foi incorporada à análise de rotina em diversos setores da Microbiologia Aplicada, tais como: Biossegurança, Clínica Médica, Ciência Forense, análise de proteínas, análise de oligonucleotídeos, análise de polímeros sintéticos e grandes compostos inorgânicos controle de qualidade e monitoramento de processos industriais, controle de poluição, produção de alimentos, prospecção e controle de qualidade de produtos naturais, (Bohme *et al.*, 2013; Sandrin *et al.*, 2012; Hoffmann e Stroobant, 2007; Speicher, 2000). Ragoussis *et al.*, em uma revisão de 2006, apresentaram o estado da arte para a MALDI-TOF MS aplicada à análise de genomas, características epigenéticas, estudos de alelos, análise quantitativa e qualitativa da expressão gênica, mostrando a eficácia e o sucesso em relação às tecnologias de microarranjos, sequenciamento Sanger, eletroforese capilar e em análises clínicas.

6. Identificação de microrganismos por MALDI-TOF MS

A identificação segura de microrganismos em nível de estirpe representa um desafio para a taxonomia (Chalupová *et al.*, 2014; Nagy *et al.*, 2014; Maughan e Van der Auwera, 2011; Mazzeo *et al.*, 2006; Aebersold e Mann, 2003). Nesta empreitada estão envolvidas diversas áreas do conhecimento científico, como a Genética, a Proteômica e a Bioinformática. No contexto da espectrometria de massa, a tentativa de identificação dos *taxa* tem recebido dois tipos de abordagem: a estratégia baseada em bibliotecas (*library-based*) ou viabilizada por bioinformática (*bioinformatics-enabled*) (Sandrin *et al.*, 2012). Cada abordagem comporta diferentes níveis de profundidade na análise dos resultados (Chalupová *et al.*, 2014; Sandrin *et al.*, 2012; Alm *et al.*, 2005). Na abordagem baseada em bibliotecas, escolhida para esse estudo, os perfis moleculares devem ser reconhecidos contra uma base de dados pré-estabelecida (Nagy *et al.*, 2014; Bohme *et al.*, 2013; Carbonnelle *et al.*, 2012; Sandrin *et al.*, 2012; Freiwald *et al.*, 2009). Tal base de dados, ou plataforma, pode ser comercial, contendo organismos já identificados e classificados; poderá ser confeccionada como um banco de dados personalizado contendo os espectros característicos de espécimes em estudo (Mazzeo *et al.*, 2008; Bright *et al.*, 2002), ou, ainda, ser uma combinação dos dois tipos (Agustini *et al.*, 2014; Calderaro *et al.*, 2014; Chalupová *et al.*, 2014).

As plataformas comerciais existentes atualmente para identificação de microrganismos são programas computacionais, geralmente, adquiridos juntamente com os espectrômetros de massa MALDI-TOF e produzidos pelos próprios fabricantes dos equipamentos ou empresas relacionadas a eles. Os espectros alocados no banco de dados resultam de uma sequência de experimentos padronizados para a obtenção dos perfis moleculares, produzidos repetidas vezes para cada linhagem (Freiwald *et al.*, 2009; Mellmann *et al.*, 2008). Em seguida, a sequência de *fingerprints* obtidos para uma determinada linhagem é condensada em um só espectro por métodos estatísticos. O resultado é um espectro representativo da linhagem – espectro médio ou principal – contendo as características de massa mais significativas para a estirpe. Os desenvolvedores das plataformas comerciais utilizam diferentes critérios de cálculo e denominações para o espectro representativo da linhagem pelos (Carbonnelle *et al.*, 2012; Sandrin *et al.*, 2012; Freiwald *et al.*, 2009). As vantagens das plataformas comerciais são: análises de alta eficiência, utilização de algoritmos de estatística avançada e alta porcentagem de correta identificação. Alguns autores citam taxas acima de 95% de identificação correta em nível de espécie (Anderson *et al.*, 2014; Bader, 2013; Bille *et al.*, 2012; Mellmann *et al.*, 2008). Além disso, permitem ao usuário a geração de espectros de referência suplementares para personalizar a plataforma comercial (Bille *et al.*, 2012; Bohme *et al.*, 2013; Sandrin *et al.*, 2012; Freiwald *et al.*, 2009; Mellmann *et al.*, 2008).

As plataformas comerciais, *The Spectral Archive and Microbial Identification System* (Saramis™ AnagnosTec, Potsdam, Alemanha) e *Microbe Lynx Bacterial Identification System* (Waters Corporation, Manchester, Reino Unido) possuem mais de 500 linhagens microbianas. O *MALDI Biotyper* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) possui a maior e mais elaborada base de dados, contando com mais de 6.000 linhagens microbianas, a maioria bactérias. Alguns estudos apresentam comparações entre estes sistemas, normalmente resultando pequena vantagem em robustez para o *MALDI Biotyper* (Almeida Jr. *et al.*, 2014; Nagy *et al.*, 2014; Bader, 2013; Lohmann *et al.*, 2013).

Em revisão ao estado da arte, foram encontradas duas plataformas em formato *web* de acesso livre: **i)** Mazzeo *et al.* (2006) desenvolveram uma base de dados de acesso livre com 24 espécies bacterianas contaminantes de alimentos (http://bioinformatica.isa.cnr.it/Descr_Bact_Dbase.htm), porém o trabalho foi descontinuado. **ii)** Böhme *et al.* (2012) desenvolveram a Spectra-Bank Database (www.usc.es/gl/investigacion/grupos/lhica/spectrabank; www.spectrabank.org;

www.spectrabank.eu; www.spectrabank.es) com 70 espécies e 200 linhagens de contaminantes de alimentos. Nenhuma plataforma de acesso livre para reconhecimento de estirpes ambientais foi encontrada.

Atualmente, a MALDI-TOF MS vem sendo reconhecida como uma técnica confiável em abordagens do tipo biblioteca e, rapidamente, está se tornando um dos métodos básicos empregados em estudos de taxonomia bacteriana (Usbeck *et al.*, 2014; Dušková *et al.*, 2012; Maughan e Van der Auwera, 2011). Incorporada aos métodos laboratoriais, é utilizada com sucesso como técnica coadjuvante na identificação, caracterização e categorização e de isolados ambientais (Agustini *et al.*, 2014; Chalupová *et al.*, 2014; Sedo *et al.*, 2013; Sandrin *et al.*, 2012; Kruppa, 2009). Aparentemente, o aspecto que mais contribui para esta aceitação é a facilidade de validação da técnica por outros métodos de caracterização taxonômica, como descrito em Chalupová *et al.* (2014) e Nagy *et al.* (2014).

A abordagem do tipo biblioteca também se aplica aos campos da Filogenia e Filoproteômica. As estirpes representadas em um banco de perfis moleculares, ainda que totalmente desconhecidas ou em fase de caracterização, podem ser submetidas a análises de agrupamento (*clusters*) e distribuídas em árvores filoproteômicas, orientadas evolutivamente por grupos externos e internos de referência (Usbeck *et al.*, 2014; Freiwald *et al.*, 2009). Os resultados normalmente apresentam-se coerentes com aqueles obtidos na filogenia do rDNA 16S – muitas vezes revelando detalhes não perceptíveis por esta técnica – e podem ser confrontados a título de validação (Anderson *et al.*, 2014; Nagy *et al.*, 2014; Usbeck *et al.*, 2014; Dušková *et al.*, 2012). Contudo, a despeito da confiabilidade, a análise de perfis moleculares ainda é utilizada com certa parcimônia na taxonomia, sendo adotada, mais frequentemente, como análise complementar e/ou auxiliar a filogenia do rDNA 16S. Ocorre que a taxa de sucesso nos ensaios de identificação não é a mesma para todos os *taxa*: o percentual de resultados positivos em nível de espécie frequentemente mostra-se espécie dependente, havendo necessidade de validação da técnica para cada grupo taxonômico ou, até mesmo, para cada subtipo em estudo (Lau *et al.*, 2015; Sandrin *et al.*, 2013; Dušková *et al.*, 2012). Na área comercial, alguns autores sugerem que o melhoramento das plataformas de perfis moleculares possa melhorar o reconhecimento de estirpes e promover uma futura inversão de atribuições, com a aplicação da análise de sequenciamento do gene rDNA 16S como método complementar à MALDI-TOF MS em casos específicos de difícil resolução (Chalupová *et al.*, 2014; Nagy *et al.*, 2014; Scola *et al.*, 2011; Mellmann *et al.*, 2008).

7. Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de esporos

O grupo de pesquisa do Laboratório de Bactérias aeróbias formadoras de esporos (LaBafes), sob a coordenação da Profa. Dra. Marlene Teixeira De-Souza, dedica-se ao isolamento e à caracterização taxonômica de linhagens bacterianas oriundas de solo do Distrito Federal, onde as amostras são coletadas em pontos aleatórios e georreferenciados. Posteriormente, as amostras foram selecionadas por choque térmico (80°C) e analisadas quanto a características morfológicas de colônia, célula vegetativa, esporângio e esporo para a obtenção de linhagens de Bafes, que são continuamente adicionadas à Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de esporos (CBafes) do LaBafes. As linhagens obtidas são acondicionadas à temperatura ambiente na forma de esporos secos, devidamente identificadas por um código alfa numérico onde as letras representam uma abreviação do local de origem e os números de quatro dígitos, a sequência de trabalho. As linhagens de solo (S) do Distrito Federal (DF) são designadas SDF. Detalhes desta metodologia podem ser encontrados em Cavalcante (2014).

Atualmente a coleção possui um acervo catalogado de 190 linhagens. Destas, 154 linhagens ambientais (SDF0001 – SDF0154) e diversos recombinantes de *B. thuringiensis* e *B. circulans* que expressam uma proteína de fluorescência verde (GFP), construídos pelo nosso grupo de pesquisa. O acervo inclui, também, a linhagem termotolerante *B. cereus* FT9, isolada de fontes termais no estado de Goiás com genoma completamente sequenciado (Alencar *et al.*, 2014). Diversas linhagens tipo e hospedeiras para expressão heteróloga, oriundas de coleções nacionais e internacionais completam o acervo atual da CBafes.

As linhagens da CBafes são caracterizadas continuamente por nosso grupo de pesquisa segundo uma abordagem polifásica: **i)** a caracterização de colônias, por inspeção visual; **ii)** caracterização morfológica de células, esporângios e esporos por microscopia de contraste de fase (MCF); **iii)** ensaios de atividade hemolítica; **iv)** crescimento em condições variadas de pH e temperatura; **v)** resposta à coloração de Gram; **vi)** caracterização da ultraestrutura de esporos por microscopia eletrônica de transmissão (MET); **vii)** purificação de biomoléculas oriundas de culturas esporuladas; **viii)** análise de termorresistência de esporos; **ix)** análise de proteínas oriundas de capa de esporos; **x)** análise de rRNA 16S e perfil plasmidial e, mais recentemente como parte do presente estudo, **xi)** análise filoproteômica por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. Além disso, a CBafes está sendo ampliada, estruturada e um

banco de dados digitais está sendo construído e implementado. Novas coletas de amostras de solo para a ampliação e consolidação do acervo estão em andamento.

8. Garantia da Qualidade e Controle de qualidade

A Qualidade tornou-se uma área do conhecimento humano e da administração técnica das empresas que estuda, desenvolve e aplica estratégias de monitoramento e controle de processos, com a finalidade de aprimorar e prevenir desvios ao padrão estabelecido pela empresa para determinado produto (bem ou serviço): o **padrão de qualidade**. O Controle de Qualidade é a mais importante ferramenta da Garantia da Qualidade. Consiste em um conjunto de testes de verificação direta ou indireta de fatores que comprometem a qualidade de um produto – bem ou serviço. Esses conceitos podem e devem ser aplicados a muitas áreas do conhecimento, setor produtivo e pesquisa científica (Andreolli Pinto *et al.*, 2015; Sterner, 1999; Juran, 1988). O Anexo I apresenta esclarecimentos adicionais sobre estes conceitos e principais parâmetros de qualidade para a espectrometria de massa MALDI–TOF.

II. Justificativa

Embora a principal característica das Bafes seja a capacidade de diferenciação em esporos, notavelmente resistentes, a grande diversidade fisiológica entre esses organismos, também, constitui uma ferramenta importante para a classificação. Enquanto algumas dessas bactérias são conhecidas pelas doenças que causam, como o antraz e intoxicações alimentares, a importância das Bafes não se limita à patogenicidade, e um número crescente de linhagens têm sido exploradas com propósitos biotecnológicos. Apesar da importância dessas espécies, a Biologia de outros membros diferentes dos modelos, *B. subtilis* e linhagens do grupo do *B. cereus*, permanece pouco estudada. Para ampliar nosso conhecimento sobre a diversidade dessas bactérias, criamos a Coleção de Bafes (CBafes), compreendendo 154 linhagens (SDF) selvagens isoladas do solo do Distrito Federal, Brasil, selecionando esporos por choque térmico a 80 °C. As linhagens SDF vêm sendo analisadas utilizando uma abordagem polifásica, que envolve a caracterização genotípica, fenotípica e filogenética.

Na caracterização de microrganismos por MALDI-TOF MS em abordagens do tipo biblioteca, como adotada neste trabalho, é importante destacar que os perfis moleculares obtidos não revelam qualquer informação acerca da composição química (identidade molecular) da amostra. Sequer a intensidade dos íons (picos) é representativa da concentração na amostra, posto que diversos fatores, além deste, contribuem para a quantidade detectada de uma molécula específica ionizada. No contexto da taxonomia, não obstante serem insuficientes como análise descritiva, os padrões de massa molecular são extremamente úteis na diferenciação e identificação de estirpes (Logan *et al.*, 2009). Além disso, a MALDI-TOF MS é introdutória ao estudo de possíveis biomarcadores específicos de uma linhagem em particular, sendo o primeiro passo para uma identificação subsequente em nível molecular (Sandrin *et al.*, 2013). Neste caso, os resultados podem ser incluídos na descrição da estirpe como informação quimiotaxonômica, inclusive para identificação de microrganismos ou proposição de novos *taxa* (Logan *et al.*, 2009).

Outro estudo extremamente útil é a análise de agrupamentos a partir dos perfis de massas moleculares, com a utilização de grupos externos e internos de referência. Como dito anteriormente, as distribuições resultantes são comparáveis à análise filogenética do rDNA 16S, e podem auxiliar na revelação de estirpes muito próximas filogeneticamente. Alguns autores consideram que a filoproteômica baseada em perfis moleculares merece

maior credibilidade, uma vez que a MALDI-TOF MS pode ser mais sensível a diferenças entre subgrupos que as análises genéticas (Sedo *et al.*, 2013; Dušková *et al.*, 2012; Sandrin *et al.*, 2012; Scola *et al.*, 2011; Kruppa, 2009). Adicionalmente, existem ressalvas quanto à utilização do *locus* 16S rDNA como única fonte de dados para a sistemática e, embora seja amplamente aceito que esta deva ser a base da taxonomia moderna (Maughan e Van der Auwera, 2011), a abordagem polifásica é altamente recomendada e a fenotipagem ainda é uma ferramenta essencial em taxonomia de procariotos.

A importância da utilização da MALDI-TOF MS para caracterização do perfil de íons resultantes de proteínas provenientes de isolados ambientais em nosso estudo se justifica pelos argumentos apresentados sobre a pertinência da técnica a este campo de pesquisa e pela relevância científica do estudo de Bafes.

III. Objetivos

1. Geral

Estabelecer as bases para a construção e ampliação de uma biblioteca de perfis moleculares de linhagens ambientais da Coleção Bafes (CBafes) isoladas de solo do Distrito Federal (SDF) por espectrometria de massa MALDI-TOF.

2. Específicos

- i)** Obter 24 espectros de massa individuais para cada estirpe SDF, com qualidade adequada à construção de uma base de dados (biblioteca de perfis moleculares);
- ii)** Estabelecer um padrão de continuidade para a biblioteca, pela elaboração de procedimentos operacionais e registros padronizados;
- iii)** Validar experimentalmente os espectros padrão de cada estirpe SDF;
- iv)** Comparar e harmonizar os dados obtidos por outras técnicas de pesquisa;
- v)** Realizar estudos de distribuição filoproteômica comparados à filogenia baseada em sequências de rDNA 16S;
- vi)** Estudar o potencial da técnica como ferramenta de caracterização, categorização e identificação taxonômica com finalidade filoproteômica.

III. Material e métodos

1. Estirpes

As estirpes utilizadas neste trabalho pertencem ao acervo de estirpes ambientais selvagens da CBafes (SDF0001 a SDF0154). As estirpes da CBafes foram coletadas aleatoriamente dentro do território do DF e georreferenciados com GPS (Garmin GPS III). Imediatamente após a coleta, as amostras foram estocadas a 4 °C e, posteriormente, submetidas a tratamento por choque térmico (80 °C). Os microrganismos presentes foram analisados quanto às características morfológicas de colônia, célula vegetativa, esporângio e esporo para a obtenção de estirpes de Bafes. As estirpes selecionadas foram acondicionadas em criotubos, à temperatura ambiente, na forma de esporos secos aderidos a pequenas tiras de papel filtro. Os criotubos foram devidamente identificados por um código alfa numérico: SDF – significando solo do DF – seguido por 4 algarismos que representam a ordem de trabalho. Maiores detalhes desta metodologia são descritos por Cavalcante (2014).

Suspensões aquosas de esporos, aqui denominadas suspensões estoque, foram preparadas a partir do estoque de esporos da CBafes pela simples transferência de uma tira de papel de filtro contendo os esporos secos da estirpe para um tubo eppendorf com 1.800 µL de água ultrapura (*Cascade LS mk2-Water Purification System*, Pall Corporation). Somente foram aproveitadas suspensões estoque aprovadas no controle de qualidade microbiológico (CQM) da água de preparação. As suspensões de trabalho, por sua vez, foram obtidas por aliquotagem das suspensões estoque, distribuídas aos membros da equipe de pesquisa e utilizadas como inóculos para todas as análises laboratoriais, além das análises espectrométricas para a obtenção dos perfis de massa molecular da biblioteca. As suspensões estoque utilizadas neste trabalho foram aprovadas no CQM.

2. Crescimento

Os cultivos foram obtidos pela inoculação de 10 µL das suspensões de trabalho com alças de transferência em placas de Petri descartáveis estéreis (J.Prolab, 90 mm) contendo 40 mL do meio complexo Luria-Bertani (LB) sólido (extrato de levedura 5%; NaCl 10%; peptona de caseína 10% + 1,8% de ágar) e incubando a 28 °C por tempo adequado à obtenção de colônias isoladas. Os cultivos que apresentaram pelo menos quatro colônias

isoladas foram utilizados para as análises por MALDI-TOF MS de Célula Intacta (CI) ou Extrato Protéico (EP). As colônias destinadas ao procedimento de extração de proteínas foram selecionadas também pelo diâmetro aproximado de 2 mm. As placas de Petri foram fotografadas, registrando-se as características morfológicas das colônias, antes e após a transferência das amostras para a placa analisadora do espectrômetro de massa utilizado.

3. Preparo das amostras para MALDI-TOF MS

Uma placa analisadora de aço inoxidável polido, modelo MTX-96, marca Bruker Daltonics, contendo 96 poços, foi utilizada como suporte físico para análise de todas as amostras no espectrômetro de massa. Como matriz de desorção para todas as análises foi utilizado o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -HCCA – matriz para MALDI-TOF MS, Bruker, ref. 8255344) em solução. A solução de matriz foi preparada na concentração final de 10 mg/mL de α -CHCA diluído em uma solução aquosa de acetonitrila a 70% (V/V) (AcN 80%, PA – J. T. Baker, CAS nº 75-05-8), água ultrapura e ácido trifluoroacético diluído a 3% (V/V) (TFA 99%, PA – Mallinckrodt Chemicals), na proporção de 5:4:1 (AcN:água:TFA).

3.1. Célula Intacta

Das 55 estirpes SDFs em estudo, 12 foram também analisadas por MALDI-TOF MS de célula intacta ou, MALDI-TOF ICMS (do inglês: *Intact cell matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry*), aqui brevemente referida como análise de célula intacta (CI): SDF0001; SDF0002; SDF0005; SDF0007; SDF0008; SDF0009; SDF0013; SDF0015; SDF0021; SDF0024; SDF0029; SDF0030. Cada placa de Petri inoculada contendo número de colônias isoladas maior que quatro, foi incluída no ensaio de CI. O número de placas de Petri inoculadas por estirpe foi variável, assim como o tempo de incubação, geralmente maior que 24 horas, com o objetivo de observar características de crescimento e conformação de colônias.

Para cada estirpe foram escolhidas quatro colônias isoladas por placa de Petri, das quais foram retiradas pequenas porções das bordas ou quatro colônias completas – quando estas apresentavam tamanho entre 2 e 3 mm. As colônias foram transferidas para a placa analisadora conforme seguinte procedimento: com o auxílio de um palito estéril retirou-se a primeira colônia espalhando-a uniformemente no primeiro poço da placa analisadora, A1. O restante da amostra retida no palito foi aplicada no poço A2 e, consecutivamente, no poço

A3, obtendo-se assim uma redução gradativa da quantidade de amostra depositada em cada poço. Com outro palito retirou-se uma nova colônia para aplicar nos poços A4, A5 e A6 e assim sucessivamente de forma que cada linha da placa analisadora recebeu quatro colônias por placa de Petri ou seja, foi analisada uma placa de Petri por linha. Os poços contendo amostras foram recobertos com 1 μ L da matriz.

3.2. Extrato proteico

As amostras de extrato proteico (vide Anexo I, Seção II, item 2) também denominado simplesmente **extrato**, foram obtidas a partir do conteúdo celular de colônias bacterianas das estirpes SDFs. O método de extração de proteínas celulares foi adaptado de Agustini *et al.* (2014), exceto pela ordem de utilização dos solventes de extração (acetronitrila – AcN e ácido fórmico – AF). Para todas as análises de EP foram escolhidos cultivos frescos com colônias entre 2 e 3 mm de diâmetro, de cada qual foram coletadas quatro colônias isoladas para o procedimento de extração. Os tempos de crescimento até a obtenção de colônias com tamanho mínimo para a coleta foi variável para cada estirpe SDF (vide Seção IV.2, tabela III). Cada colônia foi transferida para um tubo eppendorf de 2 mL contendo 300 μ L de água ultrapura e homogeneizada em agitador tipo vórtice. Células resistentes à dispersão em água foram homogeneizadas vigorosamente com auxílio de uma micropipeta. Depois as amostras foram inativadas com 900 μ L de etanol [96 % (V/V); Chemco], agitadas em vórtice e centrifugadas a 13.000 x *g* por 2 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados (ppt) ressuspensos em 30 μ L de solução aquosa de acetonitrila a 70% e agitados em vórtice. As células resistentes à dissolução em acetonitrila foram ressuspensas vigorosamente com o auxílio de uma micropipeta. Em seguida foram adicionados 30 μ L de solução aquosa de ácido fórmico a 70% (AF 85% – Sigma Aldrich, cat. W290017). A mistura final foi agitada em vórtice e centrifugada por 2 minutos a 13.000 x *g*. Do sobrenadante de cada amostra, contendo as proteínas extraídas, foi aplicado 1 μ L nos poços da placa analisadora e deixado secar naturalmente. Depois aplicou-se 1 μ L da solução matriz sobre cada amostra, deixando secar a temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado no LaBafes até a homogeneização das amostras na solução hidroalcoólica ou no ácido fórmico (vide Seção IV.2, tabela III). Neste ponto ocorreu interrupção para transporte das amostras ao Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) onde foi concluído o procedimento de extração e preparo da placa analisadora.

4. Variantes experimentais

Neste trabalho foram testadas quatro variações das técnicas de preparo de amostras para a MALDI-TOF MS, relacionadas aos objetivos experimentais: **i)** ensaio preliminar, **ii)** ensaio definitivo, **iii)** ensaio de qualidade e, **iv)** ensaio de validação. As amostras destinadas à biblioteca foram analisadas pelo método de extração de proteínas e em duas instâncias: um ensaio preliminar e um ensaio definitivo, pretendendo-se, com esta abordagem, a obtenção de 24 espectros de qualidade aceitável para a composição do espectro representativo de cada estirpe na biblioteca. Amostras preparadas com outras finalidades como, ensaio de qualidade ou validação, foram preparadas conforme descrito nos tópicos a seguir.

4.1. Ensaio preliminar

O ensaio preliminar foi realizado com as 59 estirpes SDFs destinadas à construção da biblioteca, sendo preparado apenas um cultivo por estirpe com a finalidade de coletar dados sobre o crescimento bacteriano e observar a qualidade dos espectros obtidos. Neste ensaio, a morfologia das colônias, foi registrada e os cultivos foram fotografados, com a finalidade de harmonizar dados laboratoriais. As amostras foram submetidas ao procedimento de extração de proteínas, descrito anteriormente e, subsequente, à análise de EP, obtendo-se 4 espectros para cada estirpe. Estirpes cujas suspensões de esporos que apresentaram algum tipo de inconformidade ou suspeita de contaminação no controle de qualidade microbiológico foram excluídas do estudo; isto ocorreu com as SDF0062; SDF0059; SDF0054 e SDF0032.

4.2. Ensaio definitivo

Subsequente ao ensaio preliminar, o ensaio definitivo foi realizado com nove estirpes SDF anteriormente submetidas ao ensaio preliminar, com a finalidade única de obter 24 espectros de qualidade aceitável para a composição dos espectros de referência da biblioteca. Os ensaios definitivos foram realizados com 9 estirpes: SDF0001; SDF0002; SDF0003; SDF0004; SDF0005; SDF0006; SDF0007; SDF0008 e SDF0009. Para tanto foram inoculados seis cultivos por estirpe e as amostras foram submetidas ao procedimento de extração de proteínas e subsequente análise de EP, obtendo-se, tipicamente, 24 espectros

para cada estirpe, exceto aquelas que apresentaram crescimento insuficiente: SDF0005 e SDF0007.

4.3. Ensaio de qualidade

No contexto desse estudo, **ensaios de qualidade** foram aqueles realizados para observar o efeito de certas variáveis sobre a qualidade dos espectros e estabelecer novos parâmetros para o controle de qualidade. O parâmetro adotado para avaliação da qualidade dos espectros foi o efeito de distorção e elevação da linha de base na intercepção com o eixo das ordenadas (intensidades relativas) ou região próxima (valores m/z abaixo de 3.000), onde foi frequente a presença de picos de alta intensidade. A investigação foi efetuada nas fases pré-analíticas em razão da insistência deste efeito nos espectros adquiridos, apesar dos parâmetros analíticos estarem em conformidade com os protocolos adotados. As variáveis observadas foram: **i)** tempo de exposição das amostras biológicas aos solventes de extração, **ii)** ponto de interrupção do procedimento para transporte das amostras ao laboratório de espectrometria de massa (interrupção após homogeneização da amostra em solução hidroalcoólica – 52% etanol, diluído em água ultrapurificada (Item 3.2) – ou após dissolução em ácido fórmico); **iii)** tempo decorrido entre a aplicação da matriz e momento da aquisição no espectrômetro de massa MALDI–TOF.

i) Tempo de exposição das amostras biológicas aos solventes de extração

A estirpe SDF0006 foi inoculada em três placas de Petri; seis colônias foram coletadas em cada placa para a preparação dos extratos em microtubos separados conforme descrito no item 3.2. Foram obtidos assim, 24 extratos em 24 microtubos. De cada microtubo foram retiradas 4 amostras de extrato, cada uma depositada em um poço da placa analisadora, totalizando 72 poços contendo amostras que foram recobertas com a matriz de α -CHCA, conforme metodologia descrita no item 3.2. Todas as amostras foram preparadas em um período de 6 horas, a intervalos de 5 min e, após finalização do procedimento de extração, foram aplicadas rapidamente na placa analisadora, sendo recobertas pela matriz após secagem, como descrito no item 3.2. A preparação das amostras durou 6 horas, desta maneira, o tempo de exposição da primeira amostra depositada no poço a1 foi de 5 h e 55 min. A segunda amostra, depositada no poço a2, permaneceu no sistema solvente por 5 h e 50 min; a terceira amostra, no poço a3, por 5 h e 45 min, e assim subsequentemente, até a

última amostra, depositada no poço f12 da placa analisadora de 96 poços (Seção III, item 4.4) que foi imediatamente aplicada na placa analisadora. Ao final, foram obtidos 72 espectros em uma linha de tempo de exposição das amostras aos reagentes de extração. Os espectros foram observados quanto ao aumento de elevação da linha de base.

ii) Ponto de interrupção do procedimento de extração

Nos Registros de Procedimento padronizados (RPs) para as análises preliminares e definitivas com EP, foram reservados campos para anotação dos tempos de exposição das amostras aos solventes e ponto de interrupção do procedimento para transporte das amostras. Para algumas amostras, o procedimento foi interrompido para transporte após homogeneização em solução hidroalcoólica 52% (Item 3.2) enquanto outras foram transportadas em solução de extração AcN com AF (50:50). Após o transporte, o procedimento de extração foi completado em ambiente adequado no laboratório de espectrometria de massa, sendo dado início imediato à análise espectrométrica (Item 3.2). Os espectros obtidos foram comparados observando-se padrões de elevação das linhas de base somente em relação ao tipo de solvente, pois as informações sobre tempo de exposição foram consideradas insuficientes para uma análise confiável.

iii) Tempo decorrido entre aplicação da matriz e análise de MALDI-TOF MS

Sete estirpes: SDF0021; SDF0022; SDF0026; SDF0027; SDF0028; SDF0029 e SDF0030 foram reanalisadas na mesma placa analisadora, 48 h após a primeira aquisição em movimento de varredura automático diferenciado (zigue-zague) e os espectros adquiridos nos dois momentos foram comparados.

4.4. Ensaio de validação

Consideramos ensaios de validação aqueles não padronizados, com finalidade de obter espectros por diferentes métodos para validar a testar a robustez dos espectros principais da biblioteca. (Item 3.1). As análises não foram sistematizadas quanto ao tempo de crescimento dos organismos, número de cultivos, registros documentais e controles de qualidade típicos do sistema de qualidade (vide Seção V, item 2), sendo armazenadas para posterior ensaio de validação dos MSPs. Dentre essas, os perfis de massa das estirpes

SDF0001; SDF0002; SDF0005; SDF0007 e SDF0008 foram utilizados para o estudo de **correspondência de padrões** entre espectros adquiridos por ambas as técnicas, EP e CI.

5. Aquisição dos espectros e tratamento dos dados

As análises por meio de espectrometria de massa foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Cenargen. Todos os espectros foram adquiridos no espectrômetro de massa MALDI-TOF da marca Bruker Daltonics, modelo MicroFlex, e analisados com os programas *FlexAnalysis 3.3* e *MALDI-Biotyper 3.0* (Bruker Daltonics). O espectrômetro foi calibrado com extrato padronizado de proteínas ribossomais de *Escherichia coli* (*Bruker Bacterial test standard for mass spectrometry, Part. N. 8255343*). As análises transcorreram no modo de aquisição automático, linear, positivo, frequência laser de 60 Hz, 240 disparos de laser por espectro, faixa de variação para os valores m/z selecionada entre 2 e 20 kDa, modo de movimentação do laser em espiral, exceto para amostras reanalisadas na mesma placa (Item 4.3.iii) em que o movimento de varredura foi alterado para que os disparos atingissem áreas intactas.

Os espectros obtidos por análise de CI foram comparados ao banco de dados do programa MALDI Biotyper (versão 3.0), contendo cerca de 4.000 espécies de microrganismos para identificação. Os espectros obtidos por análise de EP foram comparados a uma versão atualizada do mesmo programa, contendo cerca de 6.000 microrganismos. As estirpes identificadas no banco de dados MALDI Biotyper foram categorizadas por um sistema logarítmico de pontuação intrínseco ao programa, que atribui um grau de confiabilidade (escore) ao resultado. Baseado na faixa de variação dos valores de pontuação, a identificação da estirpe pode ser interpretada como mostrado na tabela 2, gerada pelo output do programa e adaptada. Cores e símbolos atribuídos aos intervalos de confiança auxiliam na interpretação rápida do resultado e também serão adotados nas tabelas de resultados apresentadas adiante neste trabalho.

Tabela 2. Significado dos valores de pontuação (escores) atribuídos pelo programa MALDI *Biotyper* ao ensaio de identificação de microrganismos contra a base de dados pré-estabelecida.

Pontuação	Descrição	Símbolo	Cor
2.300 ... 3.000	Alta probabilidade de identificação da espécie	(+++)	verde
2.000 ... 2.299	Segura identificação de gênero, provável identificação da espécie	(++)	verde
1.700 ... 1.999	Provável identificação do gênero	(+)	amarela
0.000 ... 1.699	Sem identificação confiável	(-)	vermelha

(+++) Resultado confirmatório em nível de espécie.

(++) Resultado consistente em nível de espécie, confirmatório em nível de gênero.

(+) Resultado consistente em nível de gênero.

(-) Resultado inconsistente.

O programa livre *mMass*, versão 5.5 (Martin Strohal; www.mMass.org) foi utilizado para a visualização e edição dos espectros. O espectro médio (*averaged spectra*) foi calculado com a função *math operations*, abrindo-se todos os espectros da mesma estirpe e escolhendo *average all visible*. Os espectros individuais que apresentaram mais de 30% de elevação da linha de base foram excluídos do cálculo do espectro médio. Os limites de intensidade relativa foram ajustados para 0,5% e 100% para altura de picos. Os limites para razão sinal/ruído e intensidade absoluta foram mantidos em 0%.

6. Padronização experimental

Os primeiros ensaios espectrométricos foram realizados com 12 estirpes SDF por análise de CI, ainda sem padronização experimental, exceto pelo número de colônias coletadas em cada placa de Petri cultivada. Os espectros obtidos em cada análise independente foram condensados em um espectro médio e estão apresentados na Tabela III (Seção IV – Resultados) junto com os espectros adquiridos a partir de extratos proteicos para cada estirpe.

A metodologia de extração de proteínas foi escolhida para obtenção dos espectros destinados à implantação da biblioteca suplementar, e os ensaios de MALDI–TOF MS com EP foram padronizados desde os primeiros passos de preparação das amostras biológicas até o

momento do ensaio espectrométrico. A partir dos protocolos selecionados e relatórios experimentais foram gerados procedimentos padronizados, gerando-se os seguintes documentos, fundamentados nos Manuais de Boas Práticas e Biossegurança do LaBafes: **i)** Fluxograma de trabalho; **ii)** Procedimentos Operacionais Padrão (POPs); **iii)** formulários de registro de procedimentos (RPs). Além dos procedimentos essenciais, no fluxograma de trabalho foram inseridos sistemas de controle de qualidade microbiológico (CQM) padronizados para as suspensões de esporos e cultivos.

IV. Resultados

1. Conformidade experimental e documental

A produção de documentos para orientação e controle experimental teve início na segunda fase deste trabalho, com as análises de extratos proteicos por MALDI-TOF MS e objetivo de estabelecer padrões experimentais satisfatórios para obtenção dos perfis de massa molecular para a biblioteca. A partir deste momento, todos os procedimentos foram realizados segundo critérios de Qualidade e formalizados como será explicado a seguir. A seção V deste trabalho aborda considerações sobre as circunstâncias que levaram à elaboração de uma base documental para a biblioteca e as consequências desta iniciativa.

O primeiro passo documental para construção da biblioteca foi a conferência e registro das condições físicas do acervo de esporos da CBafes, com o quê foi criada uma planilha protegida (em *Excel*) contendo dados atualizados sobre as amostras e registros de retirada e devolução de alíquotas. Este documento também foi gerado para possibilitar a rastreabilidade dos experimentos, e o inventário foi repassado a todos os membros do grupo de pesquisa do LaBafes. Parte do documento gerado é apresentada na figura 2.

1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
2	Inventário das alíquotas de esporos da CBafes									
3	Linhagem SDF	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5	1/4	2/4	3/4	4/4
91	0084	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
92	0085	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
93	0086	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
94	0087	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
95	0088	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
96	0089	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
97	0090	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
98	0091	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
99	0092	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
100	0093	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
101	0094	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
102	0095	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando
103	0096	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
104	0097	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
105	0098	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
106	0099	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando
107	0100	Faltando	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
108	0101	Faltando	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
109	0102	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
110	0103	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
111	0104	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
112	0105	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
113	0106	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
114	0107	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
115	0108	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
116	0109	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
117	0110	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
118	0111	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando	Faltando
119	0112	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
120	0113	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
121	0114	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
122	0115	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
123	0116	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
124	0117	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
125	0118	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
126	0119	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
127	0120	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
128	0121	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
129	0122	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
130	0123	Contaminada/descartada	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
131	0124	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
132	0125	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
133	0126	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-
134	0127	Devolvida	No estoque	No estoque	No estoque	No estoque	-	-	-	-

Figura 2. Planilha Inventário da CBafes. Visualização de parte do documento gerado para controle do estoque de alíquotas de esporos secos da CBafes.

O segundo passo foi esboçar um fluxograma geral de atividades, desde a preparação das suspensões de esporos primárias (suspensões estoque) até as análises espectrométricas de MALDI-TOF MS. Para cada etapa experimental do fluxograma foram desenvolvidos procedimentos operacionais padrões (POPs). **Ensaio de controle de qualidade microbiológico (CQM)** foram elaborados, incluídos nos procedimentos sensíveis a eventos de contaminação e inseridos no fluxograma. Os POPs relacionados à manipulação de amostras biológicas e ensaios de CQM foram associados a formulários de registro de procedimento (RPs).

O fluxograma resultante é apresentado na figura 3, mostrando as atividades principais (Figura 3A) e ensaios paralelos de CQM (Figuras 3B).

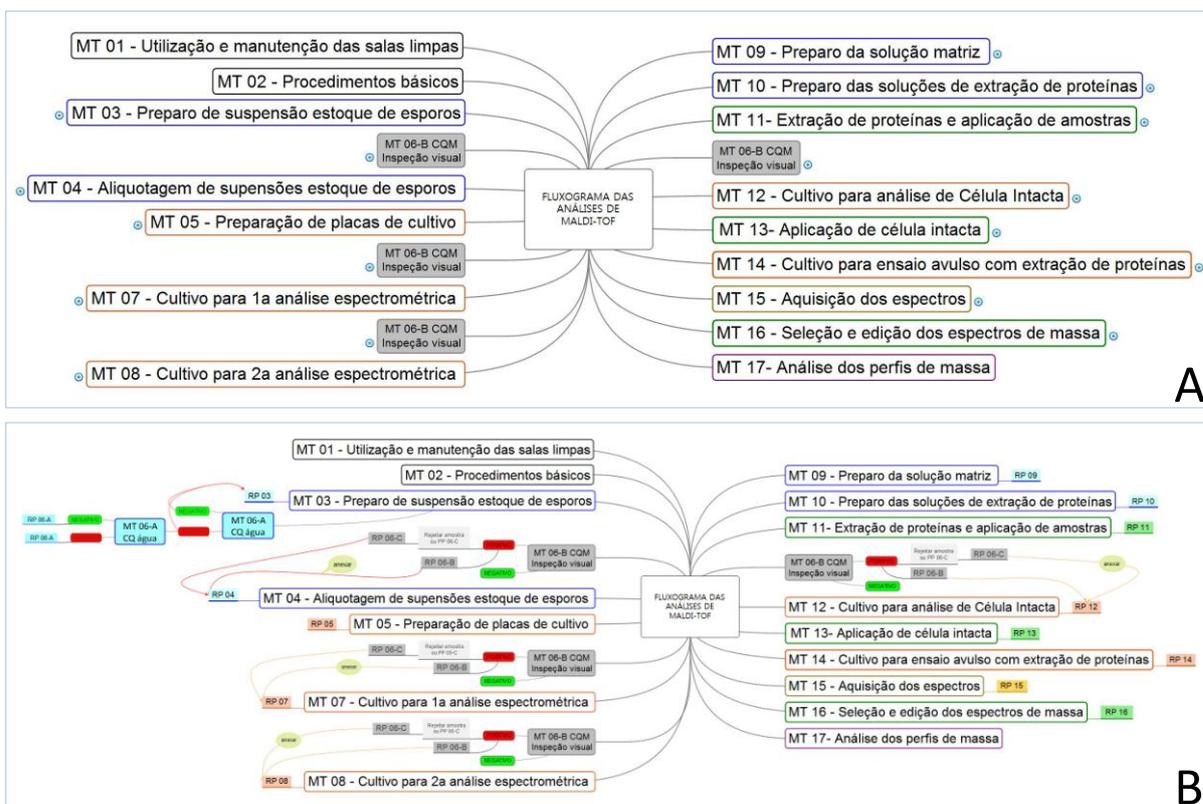


Figura 3. Fluxograma de trabalho. A) Fluxograma contendo os POPs de preparação de amostras para a MALDI-TOF MS e análise de resultados espectrométricos. Os MT 01 e MT 02 contêm orientações sobre procedimentos laboratoriais relacionados em complementaridade ao Manual de Boas Práticas do LaBafes. **B)** Atividades de controle de qualidade microbiológico (CQM) realizadas paralelamente aos ensaios principais, com objetivo de monitorar a condição de pureza das amostras, rastrear e prevenir a ocorrência de contaminação. As setas do fluxograma mostram a interligação de resultados determinantes para a continuidade no fluxo de trabalho ou repetição da etapa experimental. Todos os itens possuem hiperligações para a abertura do respectivo documento em formato PDF. O último procedimento, MT 17, incluso no fluxograma, deverá ser revisado na continuidade desse estudos. Documento gerado no aplicativo aberto *MindMaple Lite v1.65* para Windows 8.

Cada etapa experimental corresponde a um procedimento padrão identificado pela sigla MT (referência a MALDI-TOF), um número de dois dígitos que corresponde à ordem de trabalho, e título. A cada tópico de atividade foi indexado um link para o respectivo arquivo de texto com finalidade de agilizar a consulta aos procedimentos, impressão de formulários etc. O último procedimento, MT 17 – Análise dos perfis de massa não consta no Suplemento desse estudo. Em razão dos resultados experimentais este procedimento será revisado na continuidade desse estudo.

Os RPs foram adotados a partir dos primeiros ensaios de preparação de amostras de extrato proteico (Figura 4), embora tenham sofrido várias adaptações neste íterim. Os primeiros RPs preenchidos apresentam-se defectivos quanto a detalhes experimentais que foram inseridos durante o aperfeiçoamento da metodologia. Os POPs gerados e os respectivos modelos de RPs, são apresentados no Suplemento deste trabalho. Os registros documentais foram arquivados no LaBafes ficando sob responsabilidade da orientação do projeto ou pessoa delegada.

Manual da Biblioteca Filoproteômica da CBafes PÁGINA: /

Registro de Procedimento

RP 11 - Extração de proteínas e aplicação

Responsível: Isabela Porto Casanova Data: 08. set. 2014

RPs de referência: RP 07 Data: 07. set RP 08 Data: / /

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Linagem	0031	0033	0036	0037	0038	0039	0030					
Hora de retirada (h:min)	9	9	9	9	9	9	9					
Tempo de crescimento (horas)	21	21	21	21	20	21	21					
Tamanho médio (mm)	2	3	3	2	confundido	2	3					
Suspeita de contaminação? (sim/não)	não	não	não	não	não	não	não					
Nº de placas s/cresc. ¹	-	-	-	-	-	-	-					
Nº de placas < 4 col. ²	6	6	6	6	4	6	6					
Total de replicatas ³ <i>replicatas</i>	-	-	-	-	4	-	-					
Desvio de protocolo? (sim/não)	não	não	não	não	sim*	não	não					
Início do procedimento de extração (h:min)	10	10	10	10	10	10	10					
Dificuldade de dissolver em água?	não	não	não	não	sim	não	não					
Dificuldade de dissolver em ácido fórmico?	não	não	não	não	sim	não	não					
Obteve boa dissolução em acetonitrila?	não	não	não	não	sim	não	não					
Tempo da extração até aplicação em placa (h:min)	~8	~8	~8	~8	~8	~8	~8					
Data e hora da análise (dia/h:min)	8/10/14	8/10/14	8/10/14	8/10/14	8/10/14	8/10/14	8/10/14					

**Pacote de crescimento depositado na estufa de estocagem estocada.*

RPs de referência: RP 07 Data: / / RP 08 Data: / /

Figura 4. Registro de procedimento (RP) preenchido. Todos os ensaios espectrométricos realizados com a finalidade de gerar dados para a biblioteca foram formalmente registrados em formulários padronizados, assinados e arquivados.

2. Perfis de massa

Foram realizadas 101 análises espectrométricas com 59 estirpes SDF. Destas, as suspensões de trabalho das amostras SDF0062; SDF0059; SDF0054 e SDF0032 apresentaram inconformidades com suspeita de contaminação após a realização do controle de qualidade microbiológico, sendo desconsiderados os respectivos resultados espectrométricos. Para as 55 estirpes consideradas nesse estudo foram realizadas 97 análises independentes, sendo 73 de EP incluindo ensaios de qualidade, análises preliminares e análises definitivas (Tabela III). As 55 estirpes em estudo foram submetidas a um ensaio preliminar (Seção III, item 4.1) com extrato proteico. Nas análises de EP, ocorreu falha na aquisição dos perfis de massa de 10 estirpes: SDF0010; SDF0011; SDF0013; SDF0055B; SDF0057; SDF0058; SDF0061; SDF0064; SDF0066 e SDF0067. Os perfis de massa adquiridos para todas as estirpes são apresentados na tabela III. Os ensaios definitivos foram realizados com 9 estirpes: SDF0001; SDF0002; SDF0003; SDF0004; SDF0005; SDF0006; SDF0007; SDF0008 e SDF0009, porém as amostras SDF0005 e SDF0007 apresentaram crescimento insuficiente em 3 placas de cultivo, para as quais, portanto, foram obtidos apenas 12 espectros no ensaio definitivo em vez dos 24 pretendidos. Apenas 2 espectros adquiridos no ensaio definitivo da SDF0009 foram satisfatórios (Tabela III, espectro C).

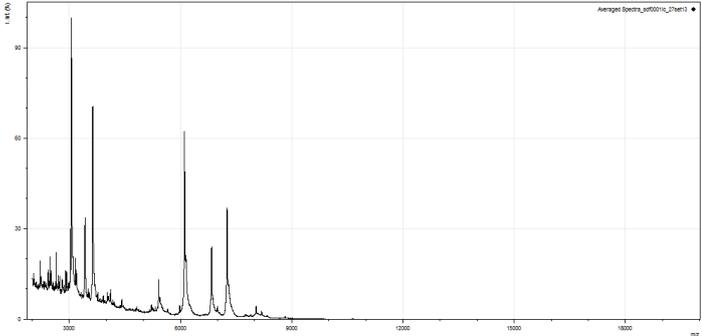
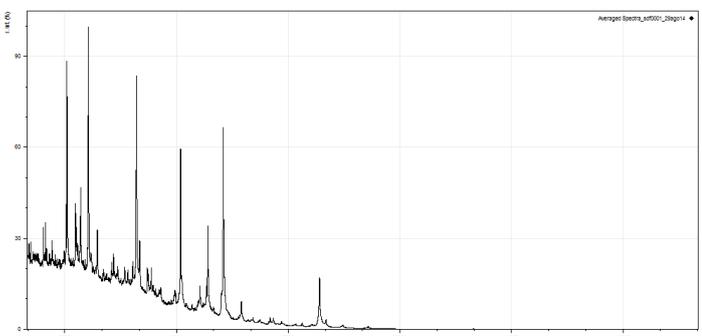
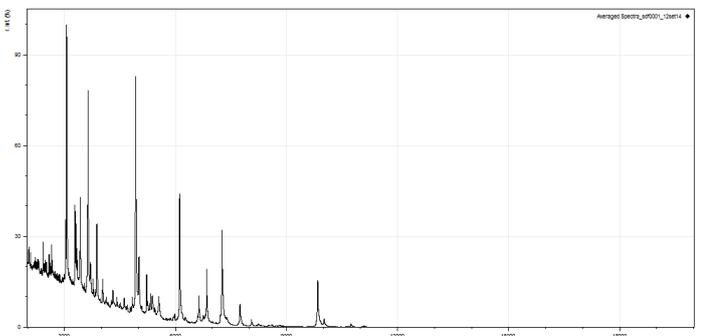
Doze estirpes foram analisadas por MALDI-TOF ICMS em 24 análises independentes: SDF0001; SDF0002; SDF0005; SDF0007; SDF0008; SDF0009; SDF0013; SDF0015; SDF0021; SDF0024; SDF0029; SDF0030 (Tabela III).

Foram gerados relatórios de análise contendo os espectros obtidos para cada estirpe, no programa *mMass*, apresentados no Suplemento deste trabalho. Cada relatório de análise contém referência à origem da amostra e às condições experimentais variáveis; considerando-se outras condições experimentais como constantes. Um espectro médio (AS – do inglês: *averaged spectra*) foi calculado para cada análise, a partir das aquisições individuais, excluindo-se os perfis de massa que apresentaram elevação da linha de base igual ou superior a 30% da intensidade relativa. Os espectros que apresentaram tal distorção foram identificados com a expressão “excluído” nos relatórios de análise (vide Suplemento). Para estirpes que não apresentaram nenhum espectro adequado, foram gerados AS de espectros excluídos com finalidade meramente ilustrativa; estes aparecem assinalados com um X vermelho na Tabela III.

Nas análises de EP, as condições experimentais que não puderam ser controladas foram observadas quanto à influência na elevação da linha de base dos espectros: **i)** tempo de exposição das amostras aos solventes de extração (t_e); **ii)** ponto de interrupção do procedimento de extração (Pt) para transporte das amostras do LaBafes ao Laboratório de Espectrometria de Massa e, **iii)** qualidade de dissolução das amostras nos solventes de extração – considerada subjetivamente como Boa ou Ruim. A tabela III relaciona o espectro médio calculado para cada estirpe em análises independentes de CI e EP com o tempo de incubação (t_c) dos cultivos e as condições experimentais em estudo. Os espectros da tabela III estão apresentados em ordem cronológica de aquisição para cada estirpe.

Tabela III. Resultados de MALDI-TOF MS para análise de célula intacta (CI) e extrato proteico (EP) de estirpes SDF.

SDF0001

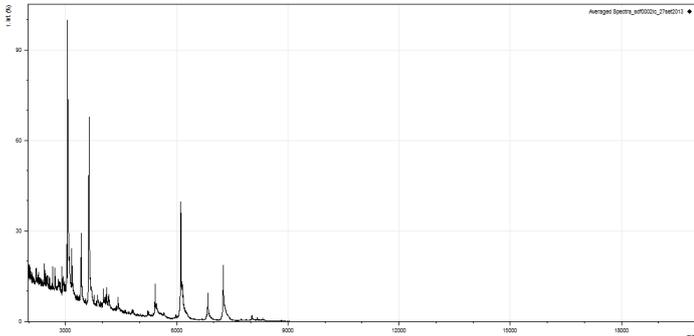
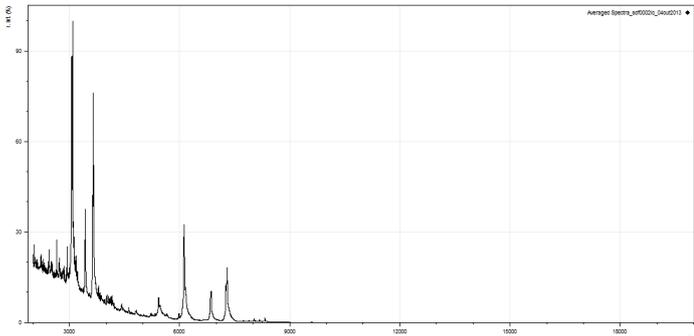
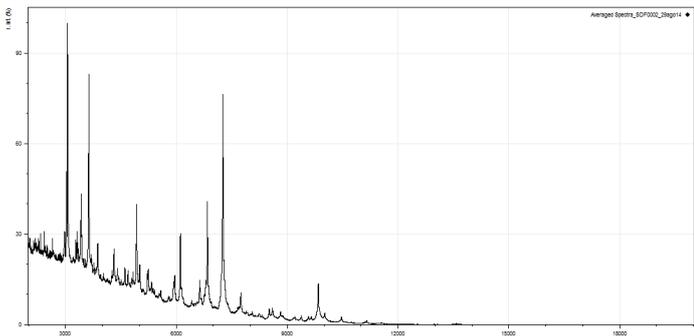
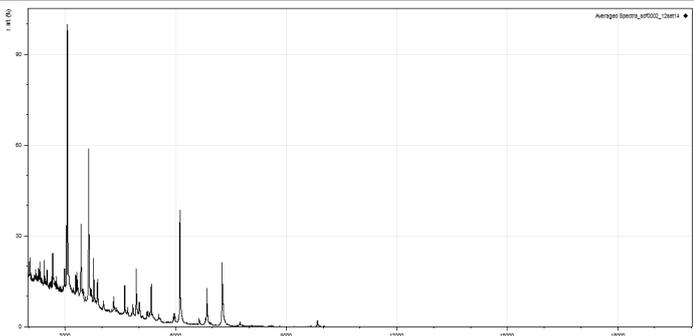
	Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		11						
		/	46	-	-	-	-	-
		12						
CI		Ensaio não padronizado						
B		4						
		/	36	8	Et	R	R	R
		4						
EP		Ensaio preliminar						
C		22						
		/	36	10	AF	-	B	B
		24						
EP		Ensaio definitivo						

(continua)

Espectros médios assinalados com um **X vermelho** foram calculados a partir de espectros com elevação da linha de base $\geq 30\%$ da intensidade relativa. **Letras em azul** na primeira coluna identificam cada espectro individualmente. **CI**: ensaio com células intactas. **EP**: ensaio com extrato proteico. **N**: número de espectros aproveitados para cálculo do espectro médio/número de espectros adquiridos. **tc**: tempo de crescimento ou incubação. **te**: tempo de extração – tempo de exposição das amostras aos reagentes de extração de proteínas. **Pt**: ponto de interrupção do procedimento de extração para transporte das amostras ao Laboratório de espectrometria de massa. **Dissolução**: qualidade de dissolução obtida para as amostras nos reagentes de extração, sendo **B** (boa) ou **R** (ruim). **ag**: água ultrapura. **AcN**: acetonitrila. **AF**: ácido fórmico. Os traços indicam dado não disponível ou não aplicável ao tipo de análise. **Tipo de ensaio** indicado na parte direita inferior da tabela: **Ensaio de CI**: não foram padronizados para o número de cultivos. **Ensaio preliminar**: realizados com extratos proteicos e 4 cultivos por estirpe. **Ensaio definitivo**: realizados com extratos proteicos, 6 cultivos por estirpe, 24 espectros; algumas análises parciais apresentam 3 cultivos e 12 espectros. **Análise repetida**: reanálise da mesma placa analisadora com 48 horas e reposicionamento dos pontos de incidência do laser. Espectros e imagens gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

Tabela III. (continuação)

SDF0002

		tc N	te (h)	Pt	Dissolução		
Espectro médio					ag	AcN	AF
A		3					
		/ 12	46	-	-	-	-
		Ensaio não padronizado					
B		9					
		/ 24	44	-	-	-	-
		Ensaio não padronizado					
C		3					
		/ 4	13	8	Et	R	R
		Ensaio preliminar					
D		22					
		/ 24	36	10	AF	-	B
		Ensaio definitivo					

(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0003

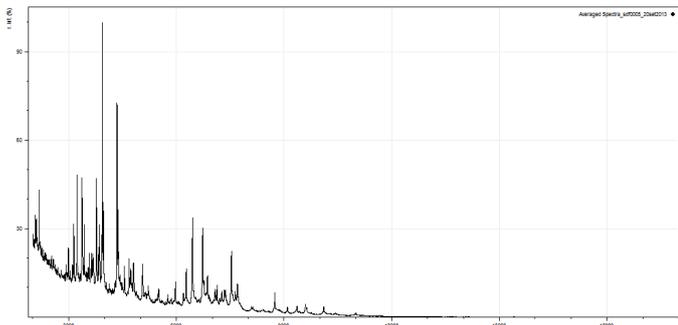
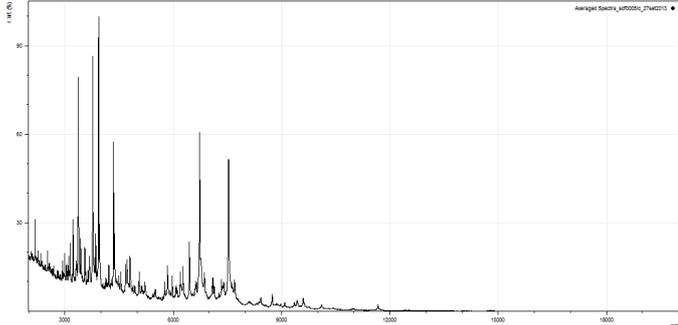
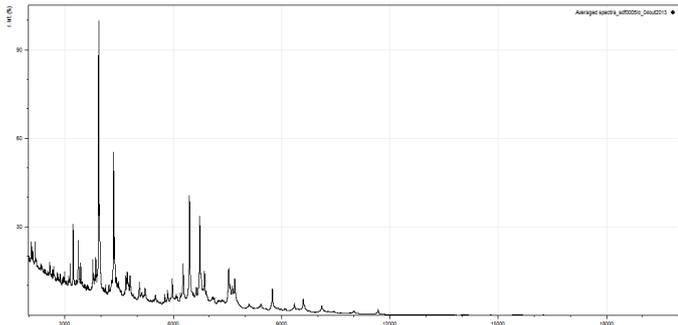
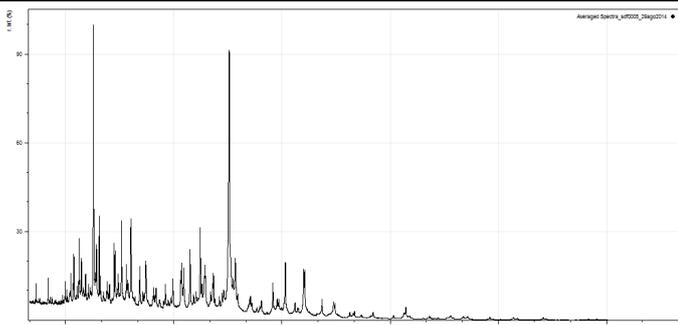
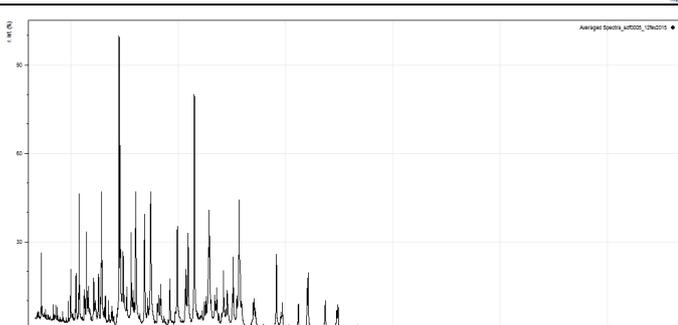
		Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
							ag	AcN	AF
A	EP		3	36	8	Et	-	R	-
			/						
			4						
Ensaio preliminar									
B	EP		13	36	10	AF	-	B	B
			/						
			24						
Ensaio definitivo									

SDF0004

A	EP		1	36	8	Et	-	R	-
			/						
			4						
Ensaio preliminar									
B	EP		16	36	10	AF	-	B	B
			/						
			24						
Ensaio definitivo									

(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0005

		Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução			
							ag	AcN	AF	
A	CI		8	48	-	-	-	-	-	
			/							
			24	Ensaio não padronizado						
B	CI		11	46	-	-	-	-	-	
			/							
			24	Ensaio não padronizado						
C	CI		15	44	-	-	-	-	-	
			/							
			24	Ensaio não padronizado						
D	EP		4	13	8	Et	-	R	-	
			/							
			4	Ensaio preliminar						
E	EP		12	41	4	AF	B	B	B	
			/							
			12	Ensaio definitivo						

(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0006

Espectro médio		N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		49						
		/ 72	24	-	Et	-	-	-
EP		Ensaio de qualidade (Efeito do tempo de exposição aos solventes aos solventes de extração)						
B		4						
		/ 4	36	8	Et	-	R	-
EP		Ensaio preliminar						
C		23						
		/ 24	37	7	AF	B	B	B
EP		Ensaio definitivo						

(continua)

Espectros médios assinalados com um **X vermelho** foram calculados a partir de espectros com elevação da linha de base $\geq 30\%$ da intensidade relativa. **Letras em azul** na primeira coluna identificam cada espectro individualmente. **CI**: ensaio com células intactas. **EP**: ensaio com extrato proteico. **N**: número de espectros aproveitados para cálculo do espectro médio/número de espectros adquiridos. **tc**: tempo de crescimento ou incubação. **te**: tempo de extração – tempo de exposição das amostras aos reagentes de extração de proteínas. **Pt**: ponto de interrupção do procedimento de extração para transporte das amostras ao Laboratório de espectrometria de massa. **Dissolução**: qualidade de dissolução obtida para as amostras nos reagentes de extração, sendo **B** (boa) ou **R** (ruim). **ag**: água ultrapura. **AcN**: acetonitrila. **AF**: ácido fórmico. Os traços indicam dado não disponível ou não aplicável ao tipo de análise. **Tipo de ensaio** indicado na parte direita inferior da tabela: **Ensaio de CI**: não foram padronizados para o número de cultivos. **Ensaio preliminar**: realizados com extratos proteicos e 4 cultivos por estirpe. **Ensaio definitivo**: realizados com extratos proteicos, 6 cultivos por estirpe, 24 espectros; algumas análises parciais apresentam 3 cultivos e 12 espectros. **Análise repetida**: reanálise da mesma placa analisadora com 48 horas e reposicionamento dos pontos de incidência do laser. Espectros e imagens gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

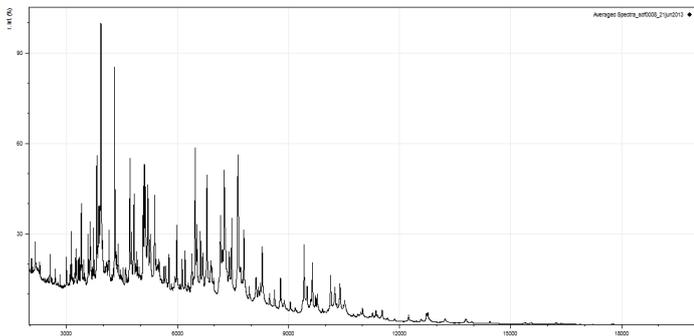
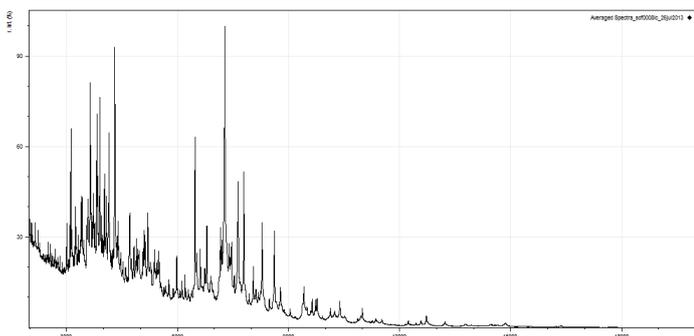
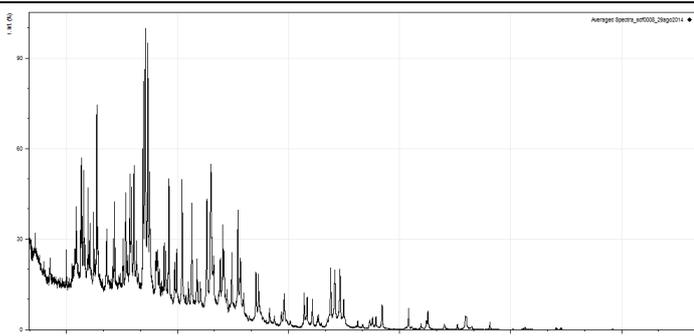
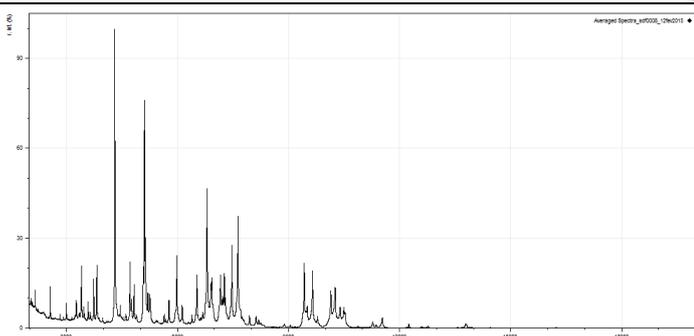
Tabela III. (continuação)
SDF0007

Espectro médio		N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		19						
		/	46	-	-	-	-	-
CI		24						
Ensaio não padronizado								
B		3						
		/	49	3	AF	B	R	B
EP		4						
Ensaio preliminar								
C		6						
		/	41	4	AF	B	R	R
EP		12						
Ensaio definitivo								

(continua)

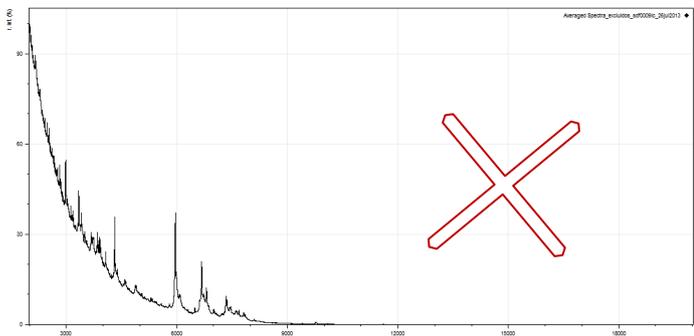
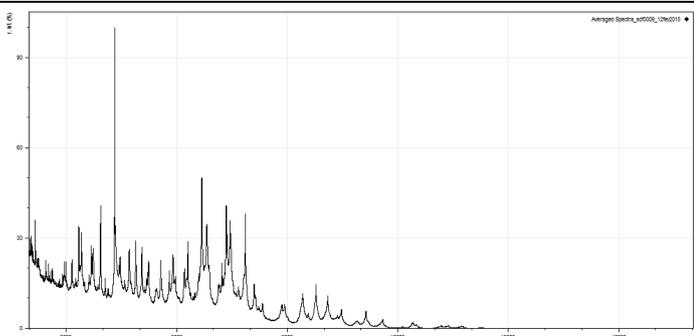
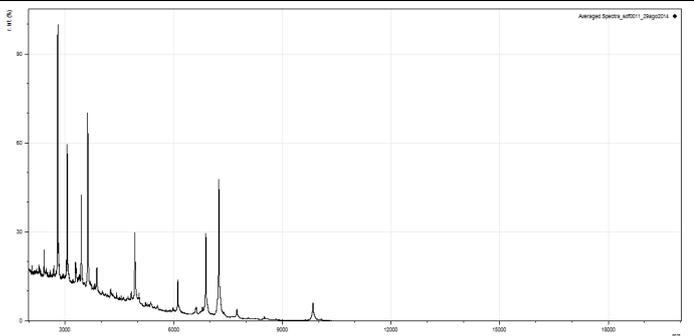
Espectros médios assinalados com um **X vermelho** foram calculados a partir de espectros com elevação da linha de base $\geq 30\%$ da intensidade relativa. **Letras em azul** na primeira coluna identificam cada espectro individualmente. **CI**: ensaio com células intactas. **EP**: ensaio com extrato proteico. **N**: número de espectros aproveitados para cálculo do espectro médio/número de espectros adquiridos. **tc**: tempo de crescimento ou incubação. **te**: tempo de extração – tempo de exposição das amostras aos reagentes de extração de proteínas. **Pt**: ponto de interrupção do procedimento de extração para transporte das amostras ao Laboratório de espectrometria de massa. **Dissolução**: qualidade de dissolução obtida para as amostras nos reagentes de extração, sendo **B** (boa) ou **R** (ruim). **ag**: água ultrapura. **AcN**: acetonitrila. **AF**: ácido fórmico. Os traços indicam dado não disponível ou não aplicável ao tipo de análise. **Tipo de ensaio** indicado na parte direita inferior da tabela: **Ensaio de CI**: não foram padronizados para o número de cultivos. **Ensaio preliminar**: realizados com extratos proteicos e 4 cultivos por estirpe. **Ensaio definitivo**: realizados com extratos proteicos, 6 cultivos por estirpe, 24 espectros; algumas análises parciais apresentam 3 cultivos e 12 espectros. **Análise repetida**: reanálise da mesma placa analisadora com 48 horas e reposicionamento dos pontos de incidência do laser. Espectros e imagens gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

Tabela III. (continuação)
SDF0008

	Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		37 / 48	51	-	-	-	-	-
CI								Ensaio não padronizado
B		17 / 24	75	-	-	-	-	-
CI								Ensaio não padronizado
C		1 / 4	36	8	Et	-	R	-
EP								Ensaio preliminar
D		21 / 24	40	5	AF	B	B	B
EP								Ensaio definitivo

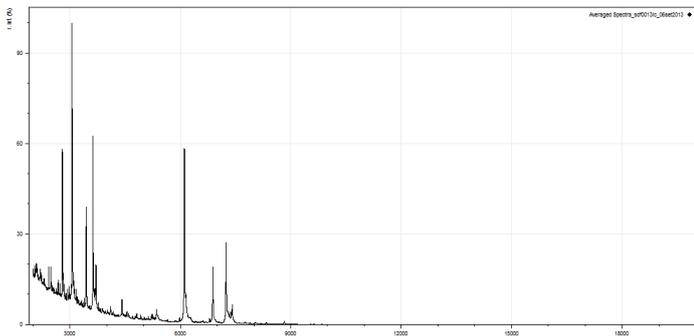
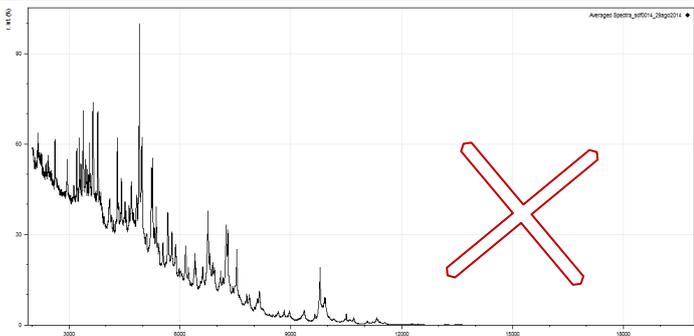
(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0009

		tc		Dissolução			
		(h	te	Pt	ag	AcN	AF
Espectro médio)	(h)				
		N					
A		9					
CI		/ 36	48	-	-	-	-
		Ensaio não padronizado					
B	SEM AQUISIÇÃO	0					
EP		/ 4	36	8	Et	-	R
C		2					
EP		/ 24	37	6	AF	B	R
		Ensaio definitivo					
SDF0010							
A	SEM AQUISIÇÃO	0					
EP		/ 4	36	8	Et	-	R
SDF0011							
A		4					
EP		/ 4	36	8	Et	-	R
		Ensaio preliminar					
SDF0012							
A	SEM AQUISIÇÃO	0					
EP		/ 4	36	8	Et	-	R

(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0013

		tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução			
Espectro médio					N	ag	AcN	AF
A		22 / 24	40	-	-	-	-	-
CI		Ensaio não padronizado						
B		0						
EP	SEM AQUISIÇÃO	36 / 4	8	Et	-	R	-	-
SDF0014								
A		3 / 4	36	8	Et	-	R	-
EP		Ensaio preliminar						

(continua)

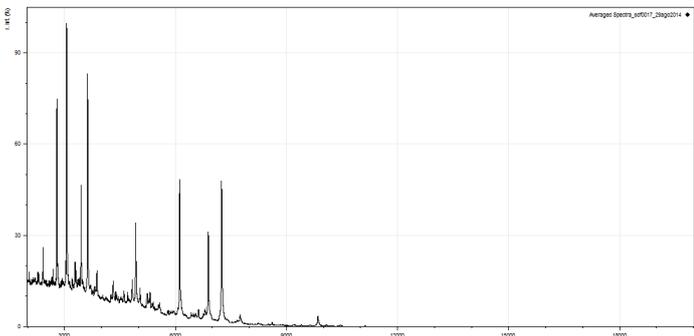
Espectros médios assinalados com um **X vermelho** foram calculados a partir de espectros com elevação da linha de base $\geq 30\%$ da intensidade relativa. **Letras em azul** na primeira coluna identificam cada espectro individualmente. **CI**: ensaio com células intactas. **EP**: ensaio com extrato proteico. **N**: número de espectros aproveitados para cálculo do espectro médio/número de espectros adquiridos. **tc**: tempo de crescimento ou incubação. **te**: tempo de extração – tempo de exposição das amostras aos reagentes de extração de proteínas. **Pt**: ponto de interrupção do procedimento de extração para transporte das amostras ao Laboratório de espectrometria de massa. **Dissolução**: qualidade de dissolução obtida para as amostras nos reagentes de extração, sendo **B** (boa) ou **R** (ruim). **ag**: água ultrapura. **AcN**: acetonitrila. **AF**: ácido fórmico. Os traços indicam dado não disponível ou não aplicável ao tipo de análise. **Tipo de ensaio** indicado na parte direita inferior da tabela: **Ensaio de CI**: não foram padronizados para o número de cultivos. **Ensaio preliminar**: realizados com extratos proteicos e 4 cultivos por estirpe. **Ensaio definitivo**: realizados com extratos proteicos, 6 cultivos por estirpe, 24 espectros; algumas análises parciais apresentam 3 cultivos e 12 espectros. **Análise repetida**: reanálise da mesma placa analisadora com 48 horas e reposicionamento dos pontos de incidência do laser. Espectros e imagens gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

Tabela III. (continuação)
SDF0015

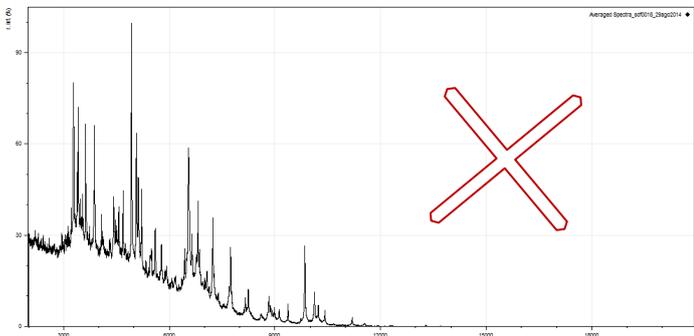
Espectro médio		N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		36						
		/	51	-	-	-	-	-
		36						
CI								Ensaio não padronizado
B		24						
		/	75	-	-	-	-	-
		24						
CI								Ensaio não padronizado
C		1						
		/	36	8	Et	-	R	-
		4						
EP								Ensaio preliminar
SDF0016								
A		4						
		/	36	8	Et	-	R	-
		4						
EP								Ensaio preliminar

(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0017

		tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
Espectro médio					N	ag	AcN
A		4					
		/	36	8	Et	-	R
EP		4					
Ensaio preliminar							

SDF0018

A		1					
		/	36	8	Et	-	R
EP		4					
Ensaio preliminar							

(continua)

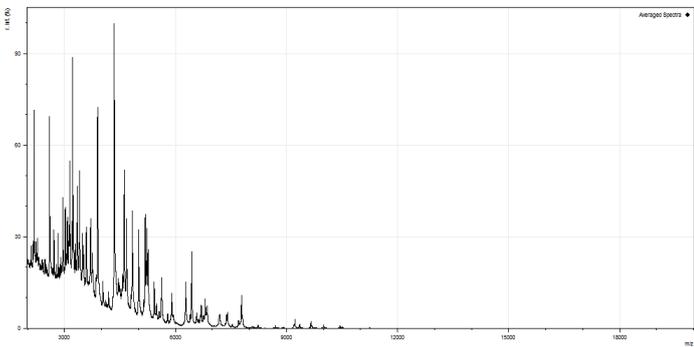
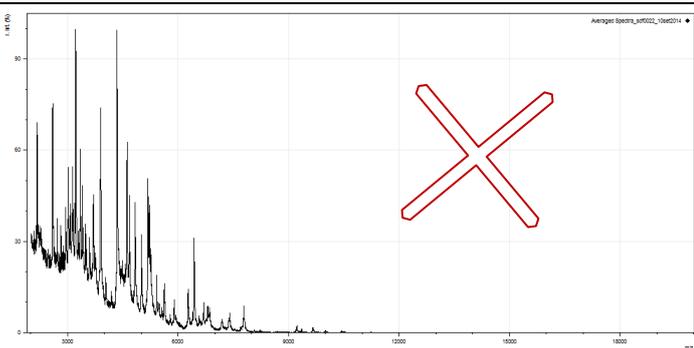
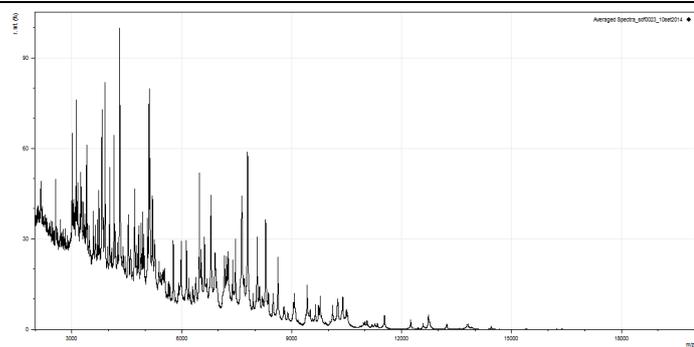
Espectros médios assinalados com um **X vermelho** foram calculados a partir de espectros com elevação da linha de base $\geq 30\%$ da intensidade relativa. **Letras em azul** na primeira coluna identificam cada espectro individualmente. **CI**: ensaio com células intactas. **EP**: ensaio com extrato proteico. **N**: número de espectros aproveitados para cálculo do espectro médio/número de espectros adquiridos. **tc**: tempo de crescimento ou incubação. **te**: tempo de extração – tempo de exposição das amostras aos reagentes de extração de proteínas. **Pt**: ponto de interrupção do procedimento de extração para transporte das amostras ao Laboratório de espectrometria de massa. **Dissolução**: qualidade de dissolução obtida para as amostras nos reagentes de extração, sendo **B** (boa) ou **R** (ruim). **ag**: água ultrapura. **AcN**: acetonitrila. **AF**: ácido fórmico. Os traços indicam dado não disponível ou não aplicável ao tipo de análise. **Tipo de ensaio** indicado na parte direita inferior da tabela: **Ensaio de CI**: não foram padronizados para o número de cultivos. **Ensaio preliminar**: realizados com extratos proteicos e 4 cultivos por estirpe. **Ensaio definitivo**: realizados com extratos proteicos, 6 cultivos por estirpe, 24 espectros; algumas análises parciais apresentam 3 cultivos e 12 espectros. **Análise repetida**: reanálise da mesma placa analisadora com 48 horas e reposicionamento dos pontos de incidência do laser. Espectros e imagens gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

Tabela III. (continuação)
SDF0021

Espectro médio		N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		9 / 24	44	-	-	-	-	-
CI								Ensaio não padronizado
B		7 / 36	22	-	-	-	-	-
CI								Ensaio não padronizado
C		1 / 4	21	8	AF	B	R	B
EP								Ensaio preliminar
D		4 / 4	21	8	AF	B	R	B
EP								Análise C repetida

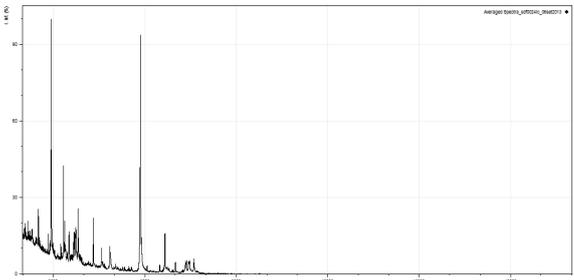
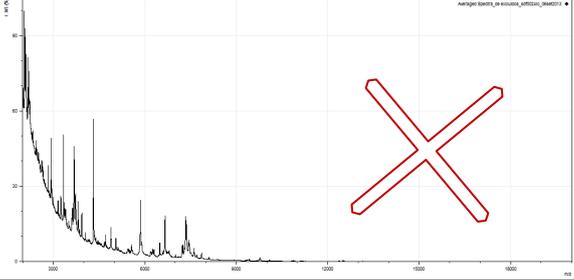
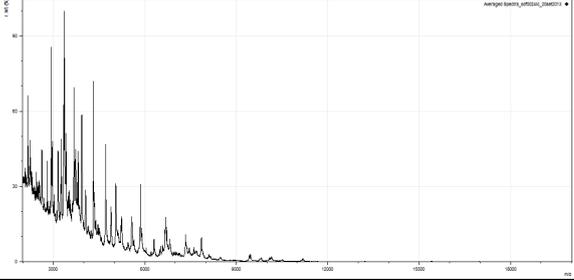
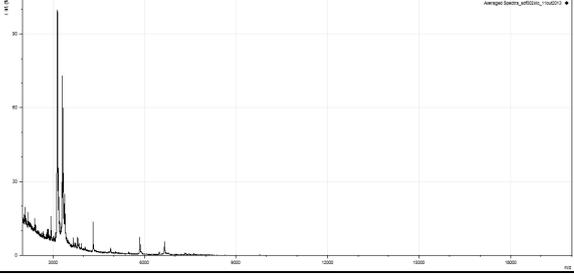
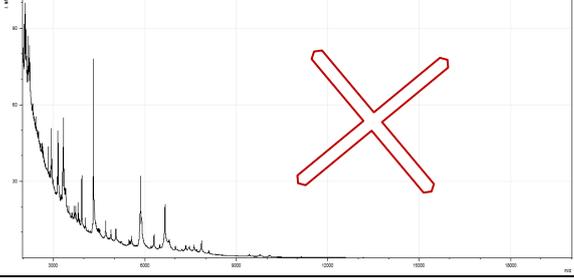
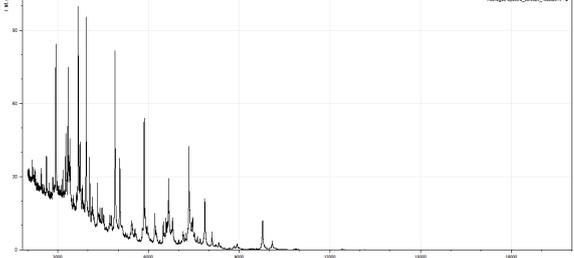
(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0022

Espectro médio		N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		4	21	8	AF	B	R	B
B		1	21	8	AF	B	R	B
SDF0023								
A		2	49	3	AF	R	B	R

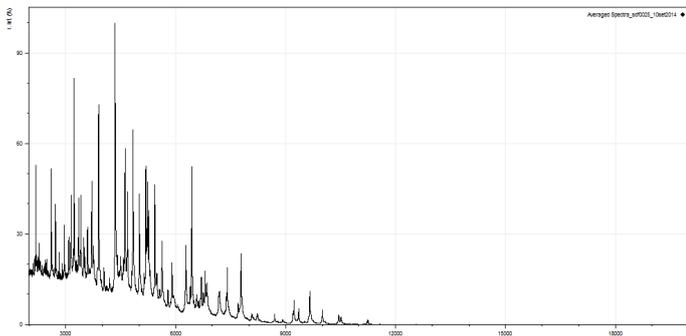
(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0024

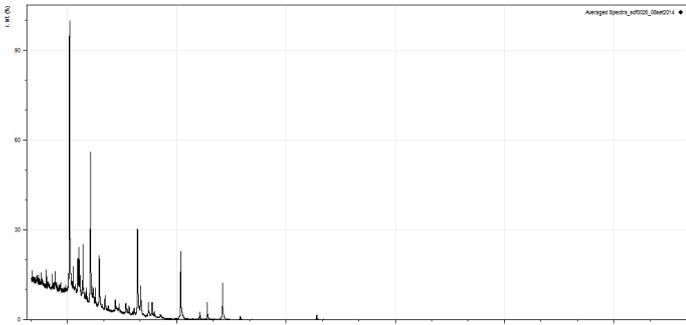
Espectro médio		N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		3 / 12	22	-	-	-	-	-
CI								Ensaio não padronizado
B		20 / 24	22	-	-	-	-	-
CI								Ensaio não padronizado
C		7 / 24	50	-	-	-	-	-
CI								Ensaio não padronizado
D		3 / 24	46	-	-	-	-	-
CI								Ensaio não padronizado
E		16 / 24	32	-	-	-	-	-
CI								Ensaio não padronizado
F		1 / 4	49	3	AF	B	R	B
EP								Ensaio preliminar

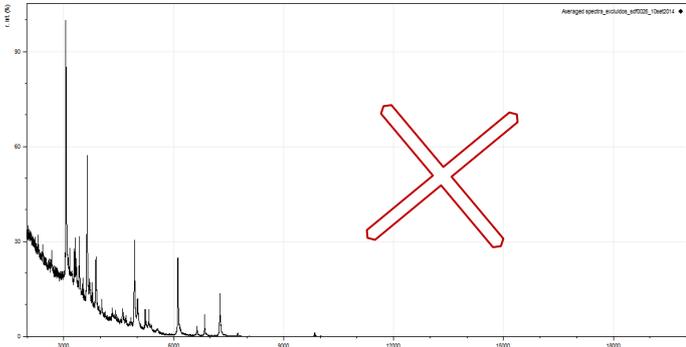
(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0025

Espectro médio		N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		3 / 4	49	3	AF	B	R	B
EP		Ensaio preliminar						

SDF0026

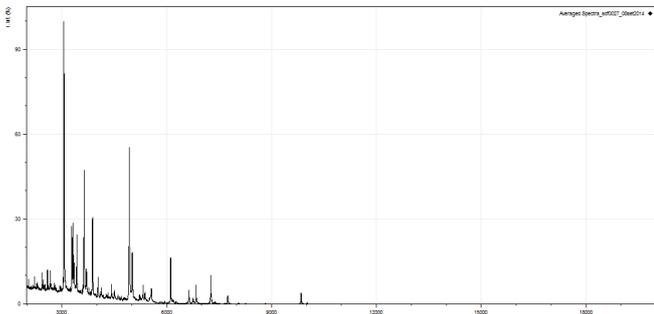
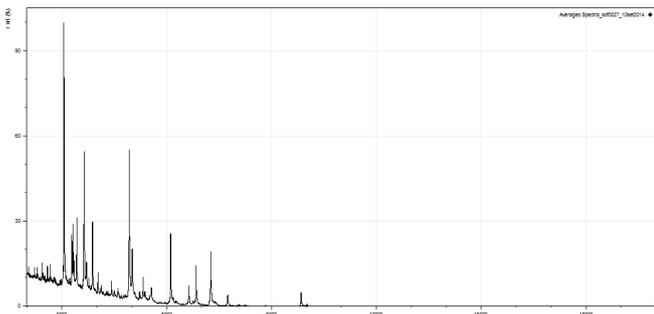
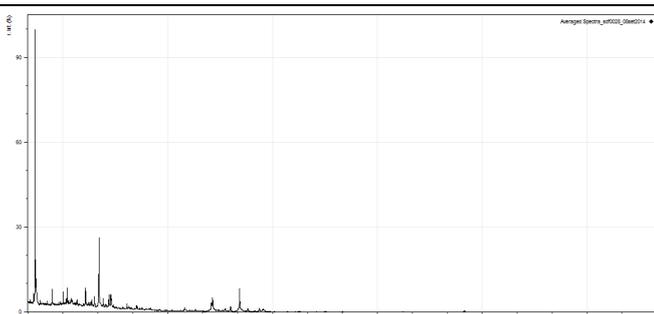
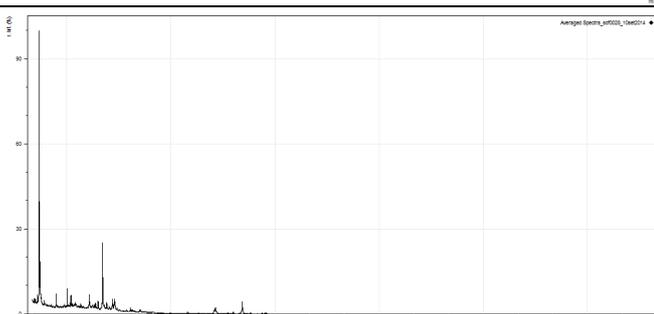
A		1 / 4	21	8	AF	B	R	B
EP		Ensaio preliminar						

B		1 / 4	21	8	AF	B	R	B
EP		Análise A repetida						

(continua)

Espectros médios assinalados com um **X vermelho** foram calculados a partir de espectros com elevação da linha de base $\geq 30\%$ da intensidade relativa. **Letras em azul** na primeira coluna identificam cada espectro individualmente. **CI**: ensaio com células intactas. **EP**: ensaio com extrato proteico. **N**: número de espectros aproveitados para cálculo do espectro médio/número de espectros adquiridos. **tc**: tempo de crescimento ou incubação. **te**: tempo de extração – tempo de exposição das amostras aos reagentes de extração de proteínas. **Pt**: ponto de interrupção do procedimento de extração para transporte das amostras ao Laboratório de espectrometria de massa. **Dissolução**: qualidade de dissolução obtida para as amostras nos reagentes de extração, sendo **B** (boa) ou **R** (ruim). **ag**: água ultrapura. **AcN**: acetonitrila. **AF**: ácido fórmico. Os traços indicam dado não disponível ou não aplicável ao tipo de análise. **Tipo de ensaio** indicado na parte direita inferior da tabela: **Ensaio de CI**: não foram padronizados para o número de cultivos. **Ensaio preliminar**: realizados com extratos proteicos e 4 cultivos por estirpe. **Ensaio definitivo**: realizados com extratos proteicos, 6 cultivos por estirpe, 24 espectros; algumas análises parciais apresentam 3 cultivos e 12 espectros. **Análise repetida**: reanálise da mesma placa analisadora com 48 horas e reposicionamento dos pontos de incidência do laser. Espectros e imagens gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

Tabela III. (continuação)
SDF0027

Espectro médio		N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução			
						ag	AcN	AF	
A		3 / 4	21	8	AF	B	R	B	
									EP
B		3 / 4	21	8	AF	B	R	B	
									EP
SDF0028									
A		4 / 4	70	8	AF	R	B	R	
									EP
B		4 / 4	70	8	AF	R	B	R	
									EP
C		4 / 4	49	3	AF	R	B	R	
									EP

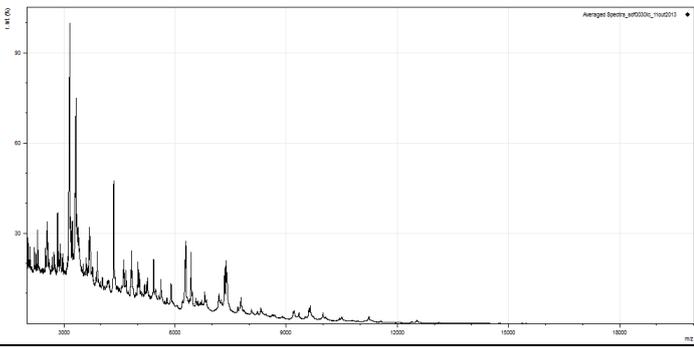
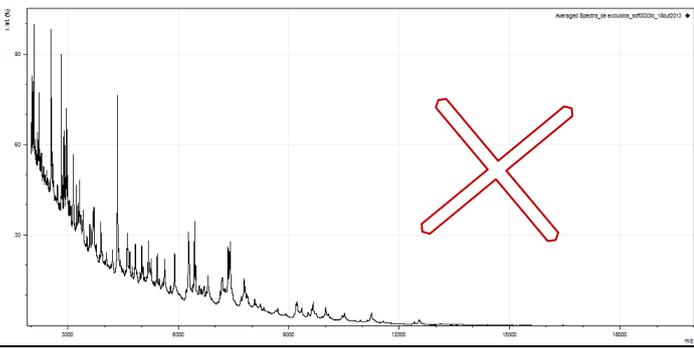
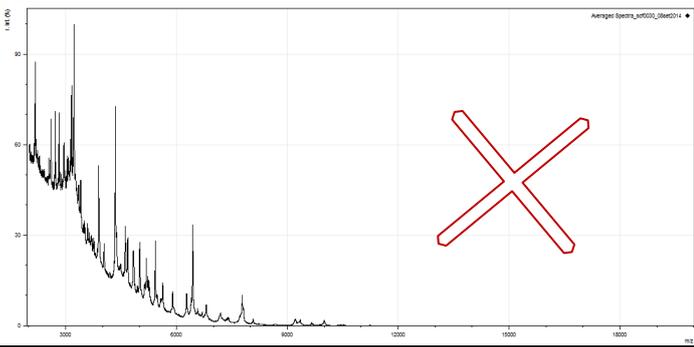
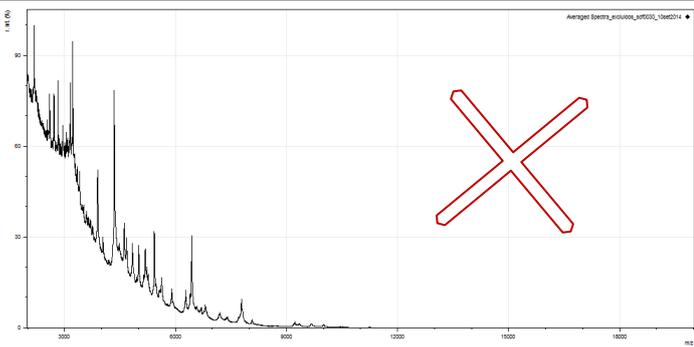
(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0029

		Especetro médio				Dissolução		
						ag	AcN	AF
N	tc (h)	te (h)	Pt					
A	4	/	40	-	-	-	-	
								24
CI	Ensaio não padronizado							
B	24	/	44	-	-	-	-	
								36
CI	Ensaio não padronizado							
C	1	/	21	8	AF	B	R	
								4
EP	Ensaio preliminar							
D	1	/	21	8	AF	B	R	
								4
EP	Análise C repetida							

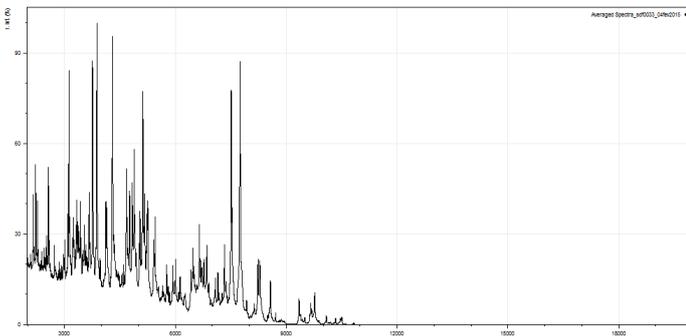
(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0030

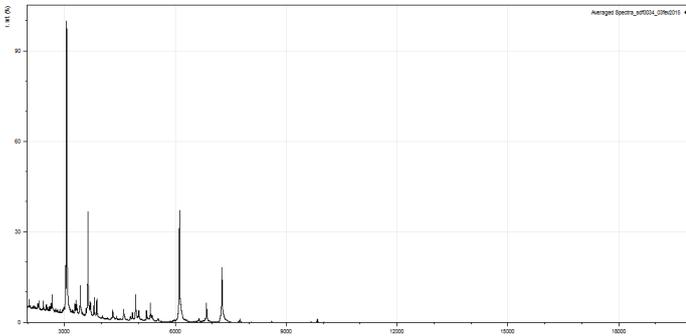
Espectro médio		N	tc (h)	te (h)	Dissolução			
					Pt	ag	AcN	AF
A		19 / 36	46	-	-	-	-	-
CI								Ensaio não padronizado
B		23 / 24	46	-	-	-	-	-
CI								Ensaio não padronizado
C		4 / 4	21	8	AF	B	R	B
EP								Ensaio preliminar
D		4 / 4	21	8	AF	B	R	B
EP								Análise C repetida

(continua)

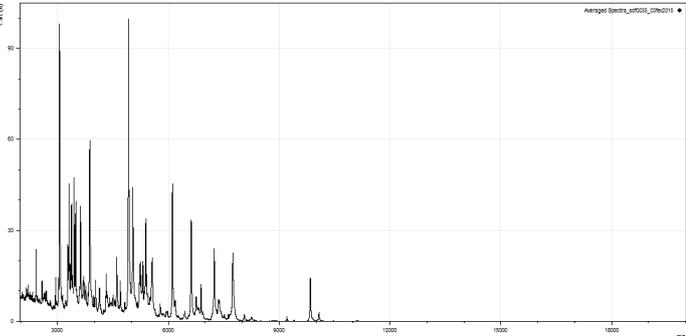
Tabela III. (continuação)
SDF0033

	Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		7	57	4	AF	B	B	B
EP		/						
		8	Ensaio preliminar (1 cultivo extra)					

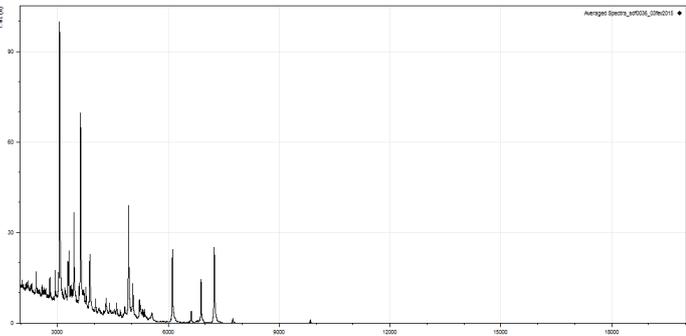
SDF0034

A		2	34	7	AF	R	B	B
EP		/						
		4	Ensaio preliminar					

SDF0035

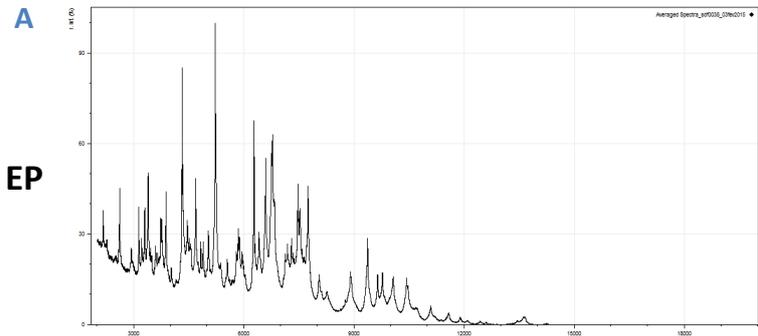
A		3	34	7	AF	R	B	B
EP		/						
		4	Ensaio preliminar					

SDF0036

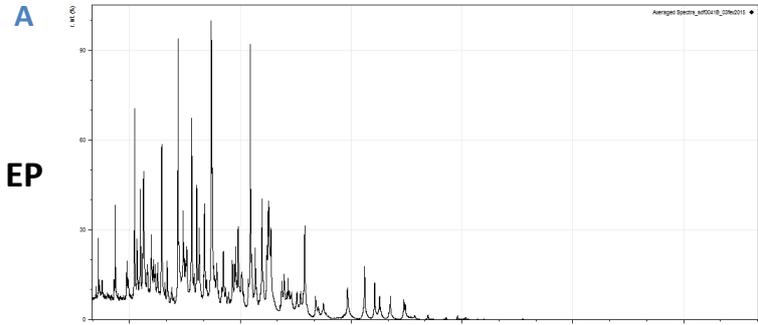
A		3	33	8	AF	R	B	B
EP		/						
		4	Ensaio preliminar					

(continua)

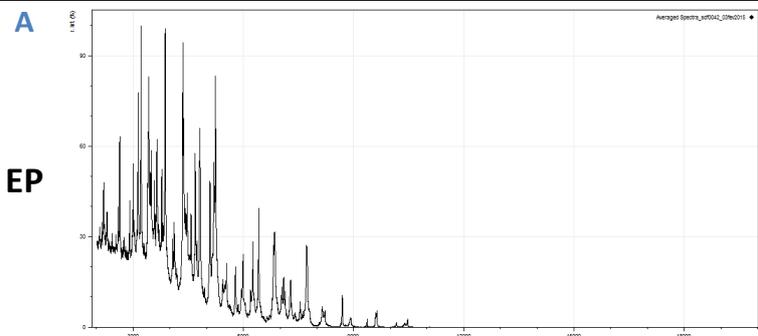
Tabela III. (continuação)
SDF0038

	Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		1	34	6	AF	B	B	B
EP		/						
		4	Ensaio preliminar					

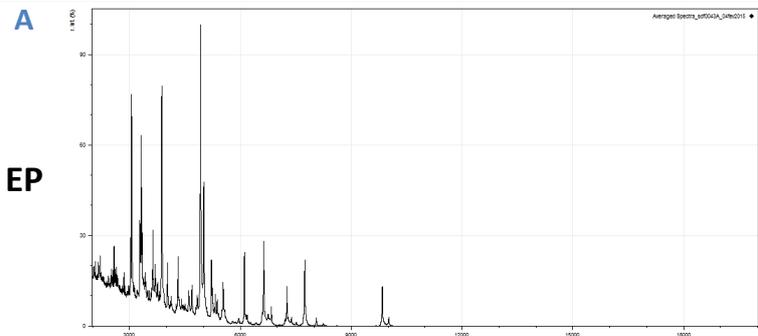
SDF0041B

	Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		4	31	9	AF	B	R	B
EP		/						
		4	Ensaio preliminar					

SDF0042

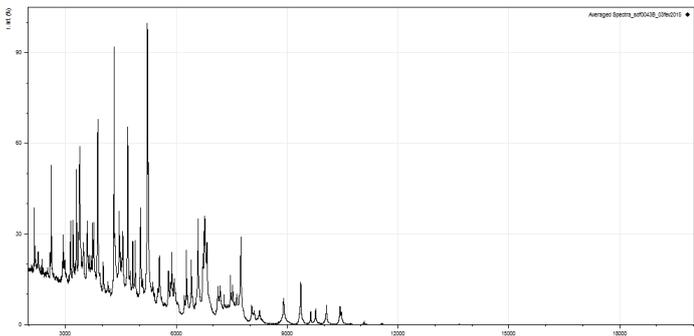
	Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		1	32	8	AF	B	B	B
EP		/						
		4	Ensaio preliminar					

SDF0043A

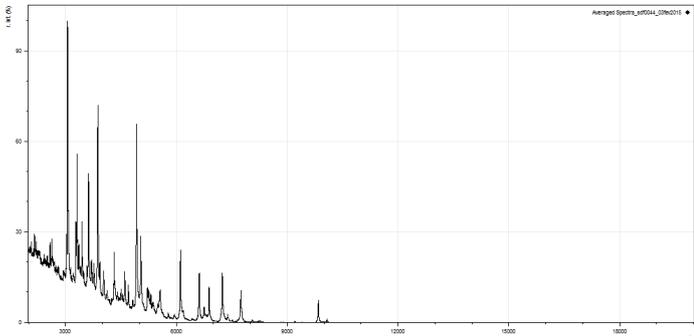
	Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		3	57	4	AF	R	R	R
EP		/						
		4	Ensaio preliminar					

(continua)

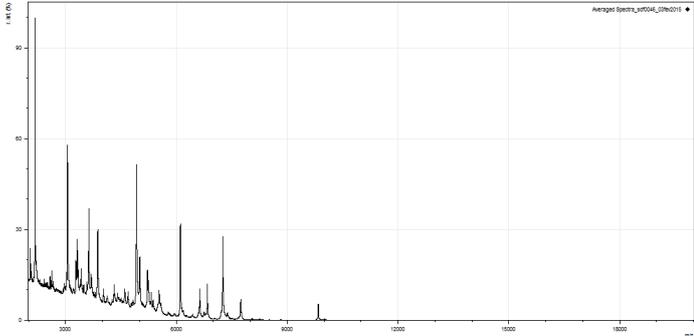
Tabela III. (continuação)
SDF0043B

	Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		3 / 4	31	9	AF	B	B	B
EP								
Ensaio preliminar								

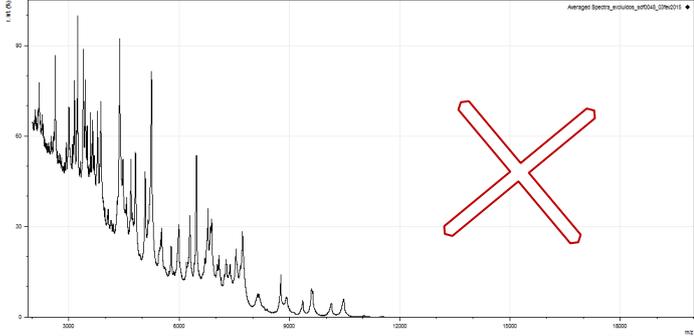
SDF0044

A		3 / 4	32	9	AF	R	B	B
EP								
Ensaio preliminar								

SDF0046

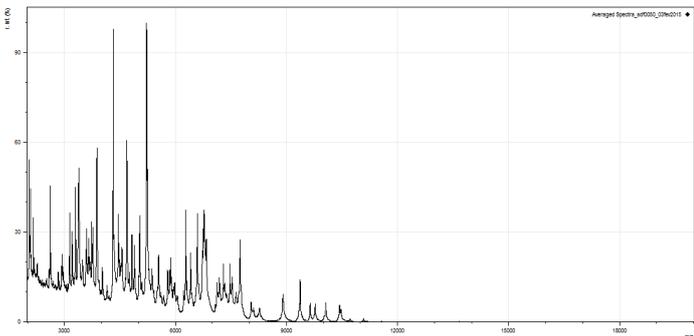
A		2 / 4	32	8	AF	R	R	B
EP								
Ensaio preliminar								

SDF0048

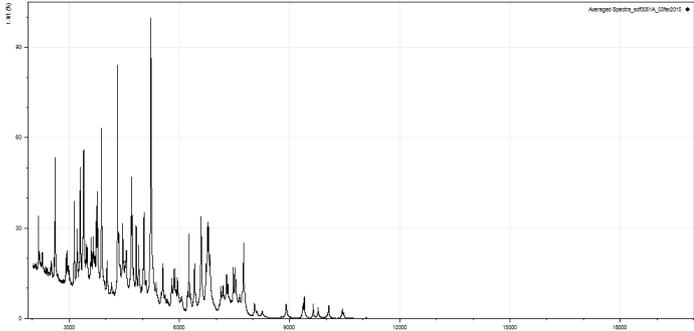
A		4 / 4	32	8	AF	B	B	B
EP								
Ensaio preliminar								

(continua)

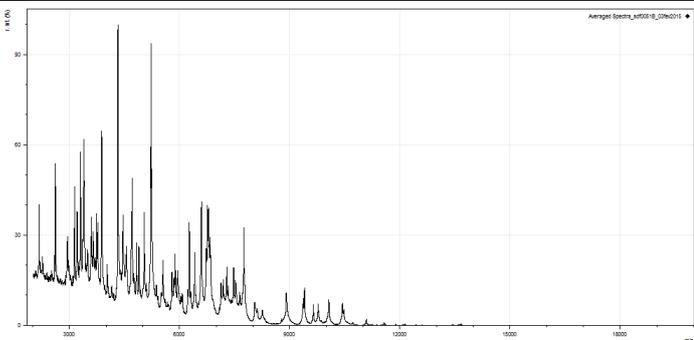
Tabela III. (continuação)
SDF0050

	Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		4						
EP		/	32	9	AF	B	B	B
Ensaio preliminar								

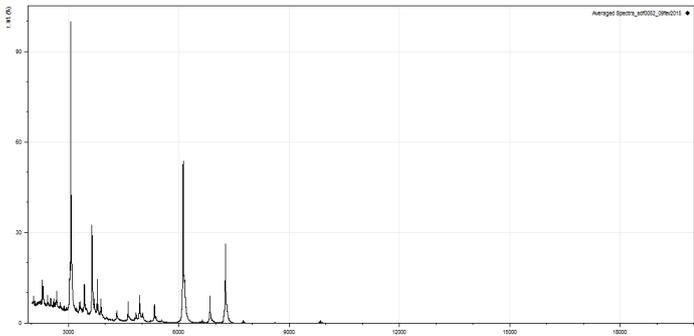
SDF0051A

A		3						
EP		/	34	6	AF	B	B	B
Ensaio preliminar								

SDF0051B

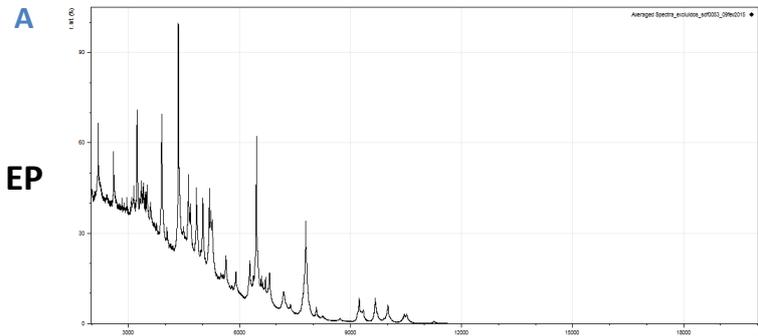
A		3						
EP		/	32	8	AF	B	B	B
Ensaio preliminar								

SDF0052

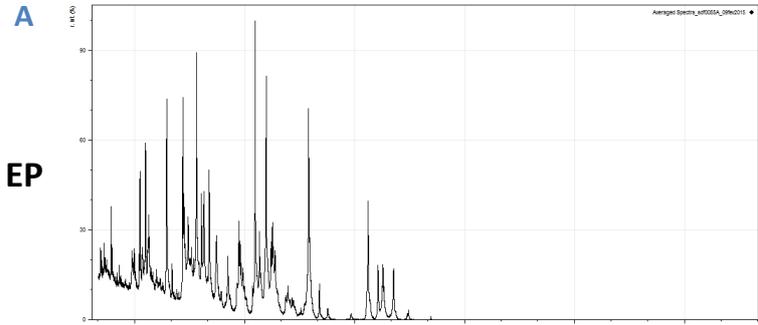
A		1						
EP		/	27	7	AF	R	R	B
Ensaio preliminar								

(continua)

Tabela III. (continuação)
SDF0053

		tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução			
Espectro médio					N	ag	AcN	AF
A		2	27	7	AF	B	B	B
EP		/						
		4	Ensaio preliminar					

SDF0055A

A		1	30	5	AF	B	B	B
EP		/						
		3	Ensaio preliminar					

SDF0055B

A	SEM AQUISIÇÃO	0	29	5	AF	R	B	R
EP		/						
		4						

SDF0057

A	SEM AQUISIÇÃO	0	28	6	AF	B	B	B
EP		/						
		4						

SDF0058

A	SEM AQUISIÇÃO	0	30	5	AF	B	R	R
EP		/						
		4						

SDF0060

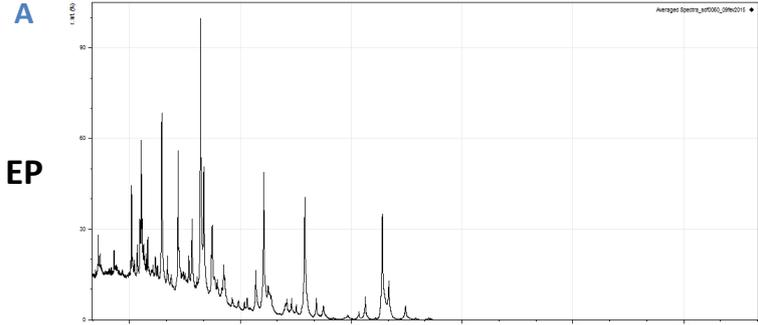
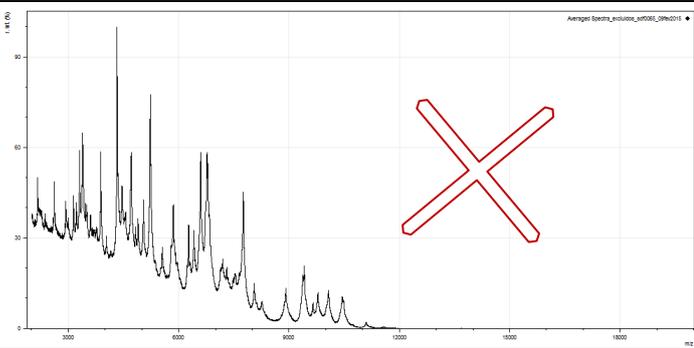
A		3	27	8	AF	B	R	B
EP		/						
		4	Ensaio preliminar					

Tabela III. (continuação)
SDF0061

	Espectro médio	N	tc (h)	te (h)	Pt	Dissolução		
						ag	AcN	AF
A		0						
EP	SEM AQUISIÇÃO	/	28	6	AF	B	R	B
		4						
SDF0064								
A		0						
EP	SEM AQUISIÇÃO	/	29	6	AF	B	B	B
		4						
SDF0065								
A								
EP		1	29	7	AF	B	B	B
		4						
SDF0066								
A		0						
EP	SEM AQUISIÇÃO	/	29	5	AF	B	R	R
		4						
SDF0067								
A		0						
EP	SEM AQUISIÇÃO	/	30	5	AF	B	B	B
		4						

Espectros médios assinalados com um **X vermelho** foram calculados a partir de espectros com elevação da linha de base $\geq 30\%$ da intensidade relativa. **Letras em azul** na primeira coluna identificam cada espectro individualmente. **CI**: ensaio com células intactas. **EP**: ensaio com extrato proteico. **N**: número de espectros aproveitados para cálculo do espectro médio/número de espectros adquiridos. **tc**: tempo de crescimento ou incubação. **te**: tempo de extração – tempo de exposição das amostras aos reagentes de extração de proteínas. **Pt**: ponto de interrupção do procedimento de extração para transporte das amostras ao Laboratório de espectrometria de massa. **Dissolução**: qualidade de dissolução obtida para as amostras nos reagentes de extração, sendo **B** (boa) ou **R** (ruim). **ag**: água ultrapura. **AcN**: acetonitrila. **AF**: ácido fórmico. Os traços indicam dado não disponível ou não aplicável ao tipo de análise. **Tipo de ensaio** indicado na parte direita inferior da tabela: **Ensaio de CI**: não foram padronizados para o número de cultivos. **Ensaio preliminar**: realizados com extratos proteicos e 4 cultivos por estirpe. **Ensaio definitivo**: realizados com extratos proteicos, 6 cultivos por estirpe, 24 espectros; algumas análises parciais apresentam 3 cultivos e 12 espectros. **Análise repetida**: reanálise da mesma placa analisadora com 48 horas e reposicionamento dos pontos de incidência do laser. Espectros e imagens gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

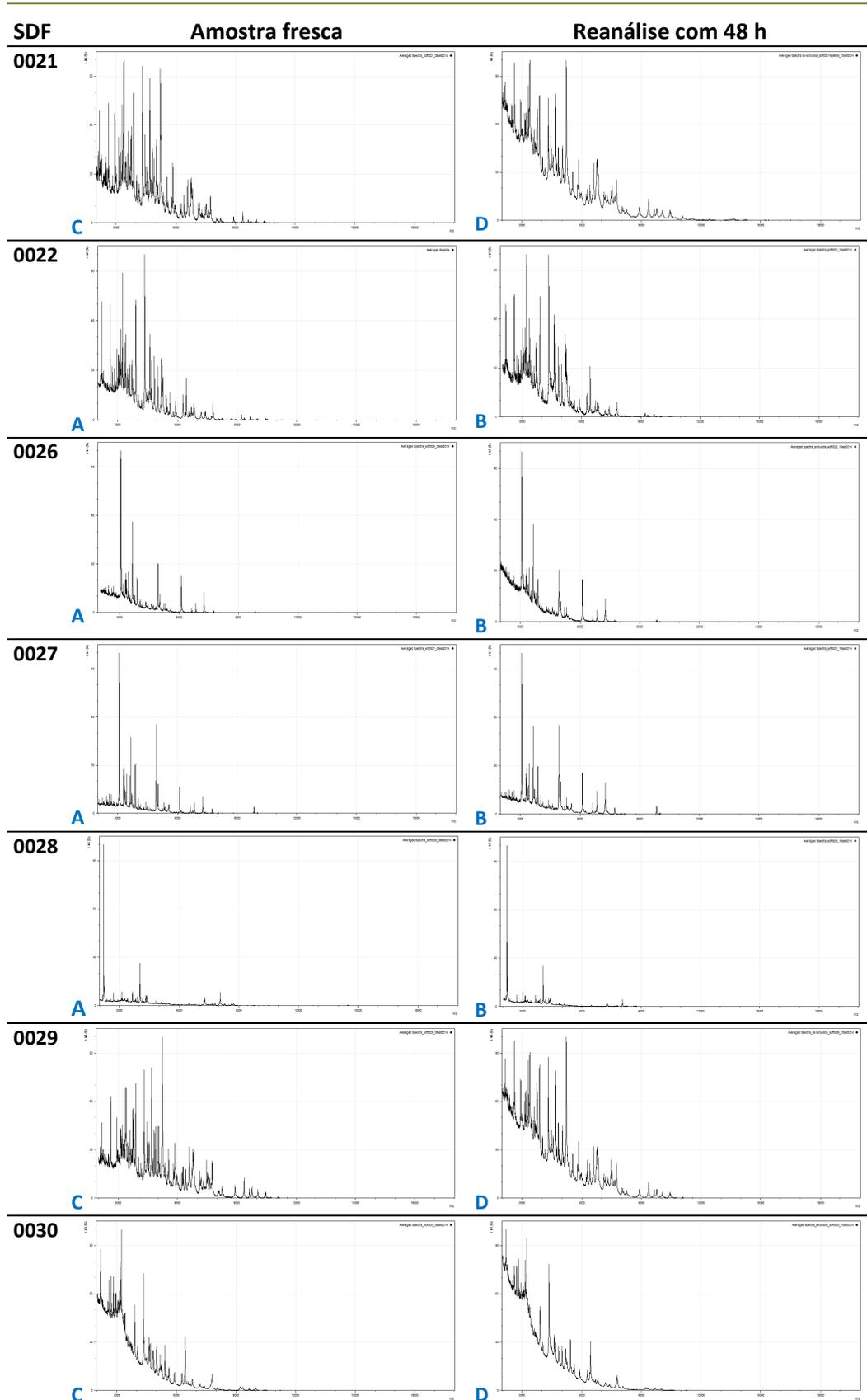
3. Variáveis interferentes

Em ensaios independentes, sete estirpes foram submetidas a dois pontos de interrupção do procedimento de extração: interrupção após dissolução da amostra no etanol (Et) e após dissolução em ácido fórmico (AF). As estirpes e os respectivos espectros (Tabela III) foram: SDF0001 (A e B); SDF0002 (C e D); SDF0003 (A e B); SDF0004 (A e B); SDF0006 (B e C); SDF0007 (B e C); SDF0008 (C e D). A interrupção do procedimento mostrou-se uma variável interferente, e todas as aquisições apresentaram menor distorção da linha de base quando o procedimento foi interrompido após o AF. A interrupção do procedimento após o ácido fórmico mostrou-se menos danosa que após o etanol.

Diversas amostras se caracterizaram pela difícil dispersão em água, formando aglomerados imiscíveis mesmo após a mistura do etanol. Quanto à dissolução em AcN e AF, de 55 estirpes analisadas, apenas 18 (aproximadamente 1/3) resultaram boa dissolução, porém não foi possível estabelecer uma correlação confiável entre este dado e a qualidade dos espectros. De 11 análises sem aquisição, 8 amostras apresentaram dissolução ruim em AcN e/ou AF: SDF0009 (B); SDF0010 (A); SDF0012 (A); SDF0013 (B); SDF0055 (A); SDF0058 (A); SDF0061 (A) e SDF0066 (A).

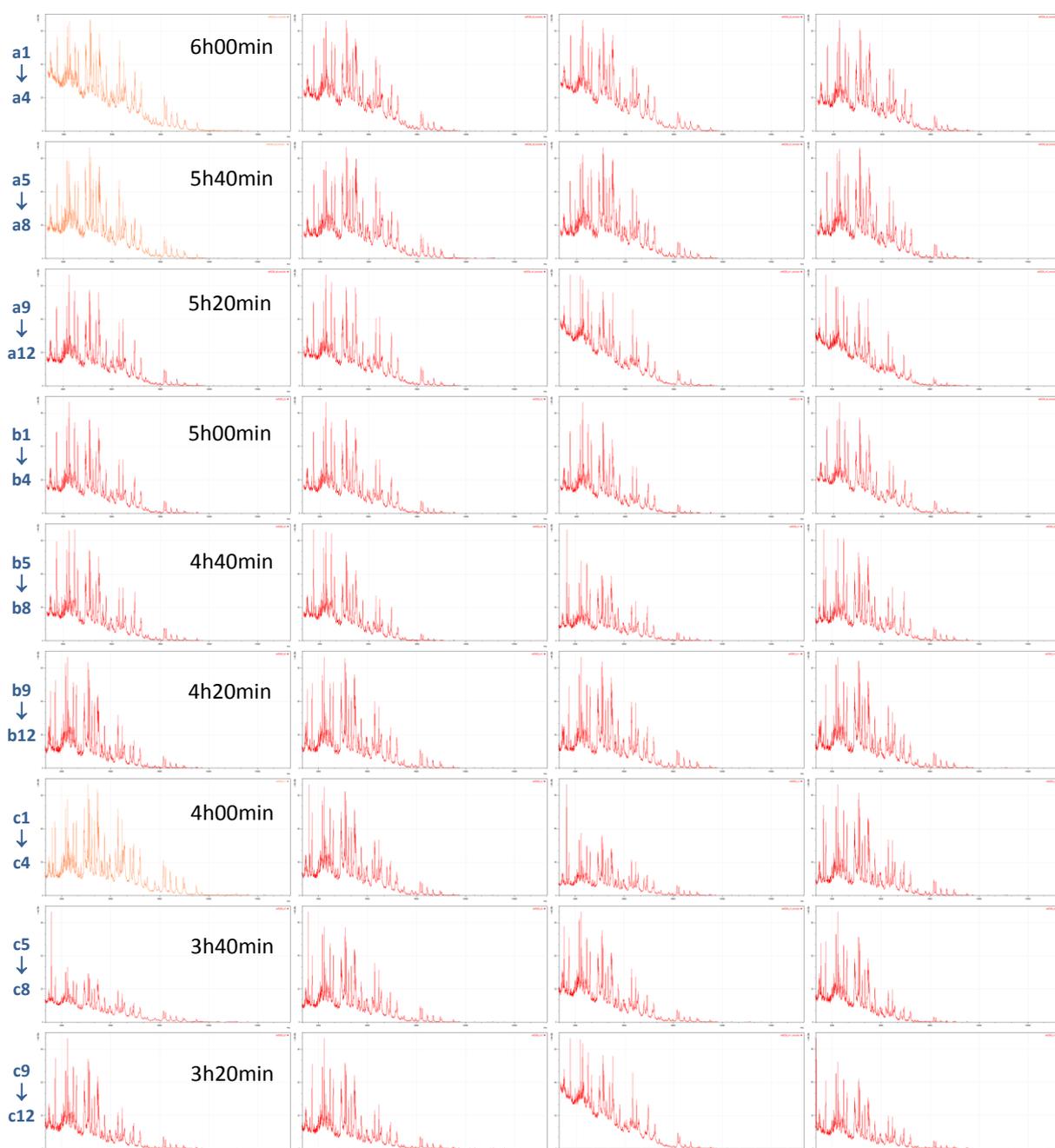
Um ensaio de qualidade foi realizado com EP das estirpes SDF0021; SDF0022; SDF0026; SDF0027; SDF0028; SDF0029; SDF0030, para observar alguma possível alteração na qualidade dos espectros em função do tempo decorrido entre a aplicação da matriz e o momento da aquisição no espectrômetro de massa. Para tanto, os poços da placa analisadora contendo as amostras, foram submetidos a duas sessões de espectrometria com 48 horas de diferença. O efeito resultante para todos os espectros – exceto SDF0028 – foi uma maior elevação das linhas de base. Ainda não foram realizados estudos para avaliação de possíveis alterações na correspondência entre os padrões de distribuição dos valores de m/z . Os espectros obtidos constam na tabela III e são rerepresentados na tabela IV lado a lado.

Tabela IV. Reanálise de amostras na mesma placa analisadora com 48 horas.



As letras correspondem aos espectros médios resultantes de cada análise independente apresentado na tabela III para cada estirpe. Espectros e imagem gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

O resultado do ensaio de qualidade para avaliação de possível interferência do tempo de exposição das amostras ao sistema solvente, realizado com a estirpe SDF0006, é apresentado nas imagens da figura 5, com os 72 espectros adquiridos, ordenados da direita para a esquerda na linha do tempo. Não foi observado qualquer padrão de distorção das linhas de base associado ao tempo de exposição das amostras ao sistema solvente. Os espectros adquiridos foram identificados contra a plataforma *MALDI-Biotyper*. Os maiores escores, resultaram em provável identificação de gênero (1,700 – 1,999) e são apresentados em cor de laranja na figura 5. Espectros em vermelho correspondem a escores menores que 1,700: sem identificação confiável.



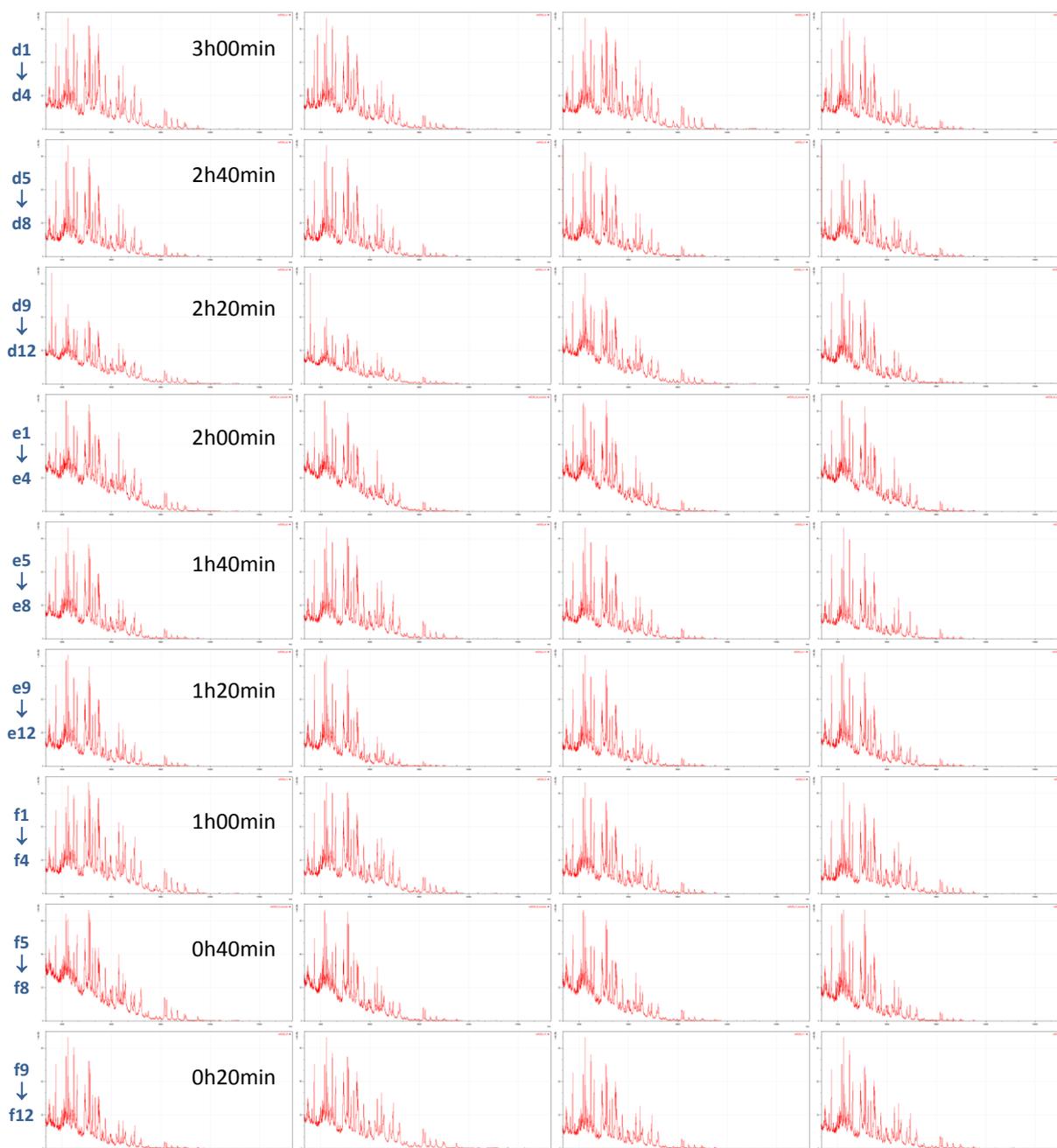


Figura 5. Ensaio de qualidade com a SDF0006. A distorção/elevação das linhas de base *versus* tempo de exposição aos solventes de extração de proteínas foi avaliada para 72 espectros de amostras bacterianas tratadas com **AcN e AF** (Seção III, item 3.2). Cada linha corresponde ao extrato proteico de uma única colônia bacteriana aplicado em 4 poços consecutivos da placa analisadora – coordenadas indicadas à direita das linhas. **Os extratos proteicos foram preparados a intervalos de 5 min.** Um micro litro do 1º extrato proteico foi aplicado no poço a1, depois a2, a3 e a4. O 2º extrato, no poço a5 e assim consecutivamente até f12, após o que, foram distribuídos imediatamente na placa analisadora. Os **tempos de exposição** de cada amostra ao sistema solvente estão indicados no início de cada linha de espectros e fazem referência aos 4 poços da linha. **Espectros em cor de laranja** indicam provável identificação de gênero no programa *MALDI-Biotyper*, e **espectros em vermelho** indicam nenhuma identificação confiável. **Eixo de ordenadas:** intensidades relativas. **Eixo de abscissas:** amplitudes m/z entre 2 e 20 kDa (Seção III, item 5). Nenhum padrão de distorção das linhas de base, ou da qualidade de identificação no *Biotyper*, em relação ao tempo de exposição das amostras ao sistema solvente, foi observado. Espectrômetro de massa MicroFlex Analysis (Bruker Daltonics, German). Espectros e imagem gerados no programa mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool.

4. Correspondência de padrões

Para analisar a correspondência de padrões entre as análises de CI e EP, novos espectros médios de EP foram calculados para as estirpes SDF0001; SDF0002; SDF0005; SDF0007 e SDF0008, diferentes daqueles apresentados na tabela III, reunindo-se os espectros de todas as análises independentes de EP para cada estirpe. Por exemplo: a SDF0001 foi submetida a um ensaio preliminar onde foram obtidos 4 espectros em conformidade (Tabela III, espectro B) e depois, a um ensaio definitivo quando foram adquiridos 22 espectros em conformidade (espectro C). O novo espectro médio de cada estirpe foi calculado a partir dos 26 adquiridos nas 2 análises de EP e denominado espectro médio principal (PAS – do inglês: *principal averaged spectra*). No cálculo do PAS foram excluídos os espectros com elevação da linha de base igual ou superior a 30% da intensidade relativa. A SDF0009 não foi incluída nessa avaliação porque os espectros de CI apresentaram elevação extrema das linhas de base, comprometendo a resolução dos picos em todas as aquisições. Os relatórios de análise contendo os espectros individuais constam no Suplemento deste trabalho. Os espectros médios (AS) de CI dessas estirpes foram então comparados aos PAS de EP (Figuras 6 a 10) e os picos correspondentes de maior intensidade foram anotados na tabela V. A apresentação em estilo gel acima das figuras 6 a 10 mostra a sobreposição e correspondência dos picos entre os AS de CI e os PAS de EP para cada estirpe.

As SDF0001; SDF0002; SDF0005 e SDF0008 apresentaram correspondência entre picos de maior intensidade com tolerâncias para as diferenças de m/z variando entre 0,11 e 6,05 Da. Vinte e sete por cento apresentaram diferença menor que 1 Da e, aproximadamente 73% apresentaram diferença de valor m/z menor que 3 Da. O PAS da SDF0007 apresentou elevação da linha de base superior a 30% da intensidade relativa e baixa correspondência entre os perfis, com apenas um pico comparável com erro de 0,61 Da. Os resultados da comparação pico a pico para os valores m/z de maior intensidade e as amplitudes de aquisição estão apresentados na tabela V.

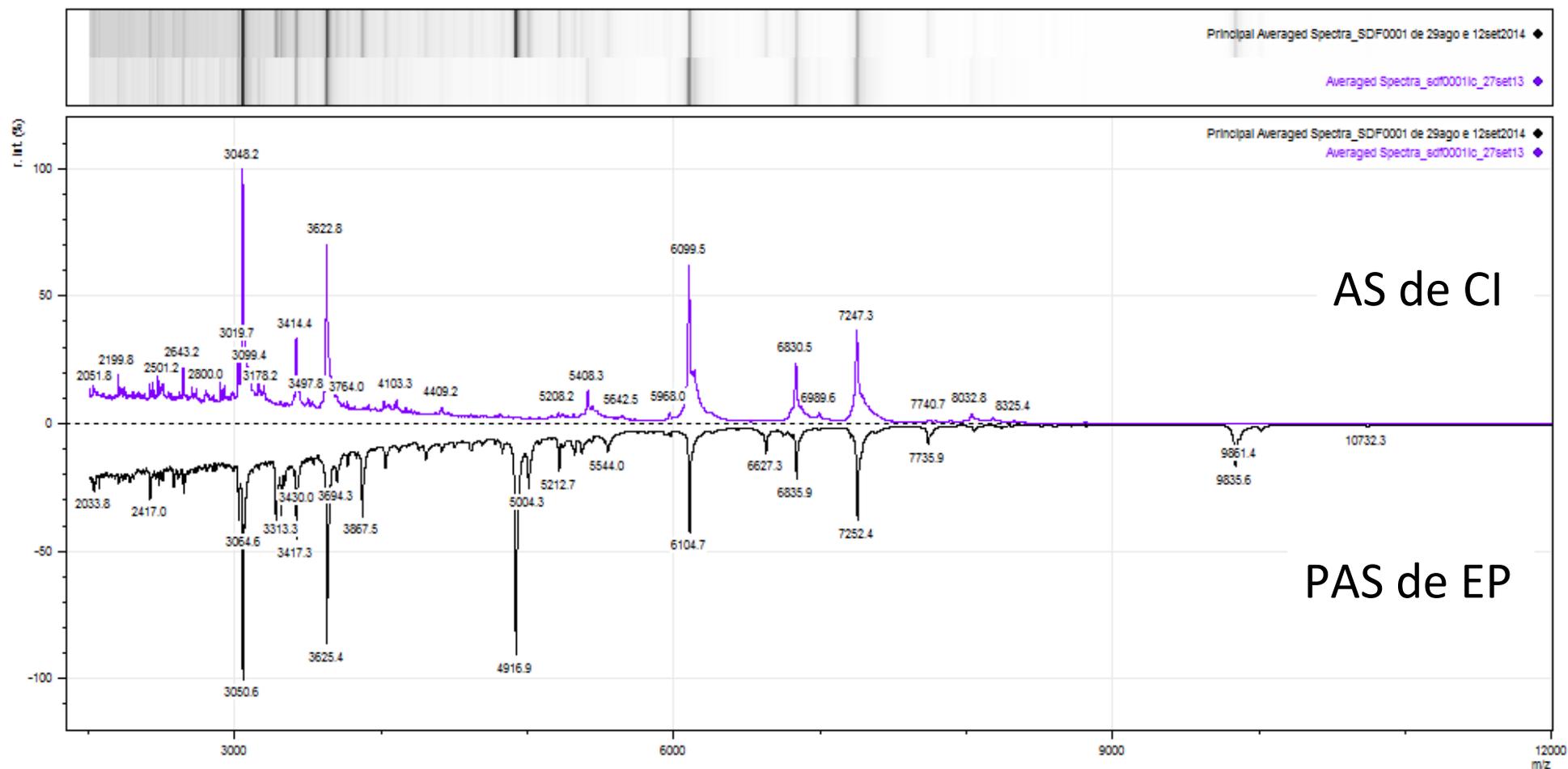


Figura 6. SDF0001 – Correspondência entre padrões de massa de CI e EP. PAS de 24 espectros de EP. O espectro médio de 11 espectros de CI apresentado corresponde ao SDF0001 – A (Tabela III). Os picos correspondentes e respectivas tolerâncias são apresentados na Tabela V. Amplitude máxima de aquisição de m/z , aproximadamente 10.700 Da para o PAS e 8.300 Da para o espectro médio de CI. Faixa de m/z de 2 a 12 kDa. Limite razão sinal/ruído igual a 3,0. Espectros e imagem gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

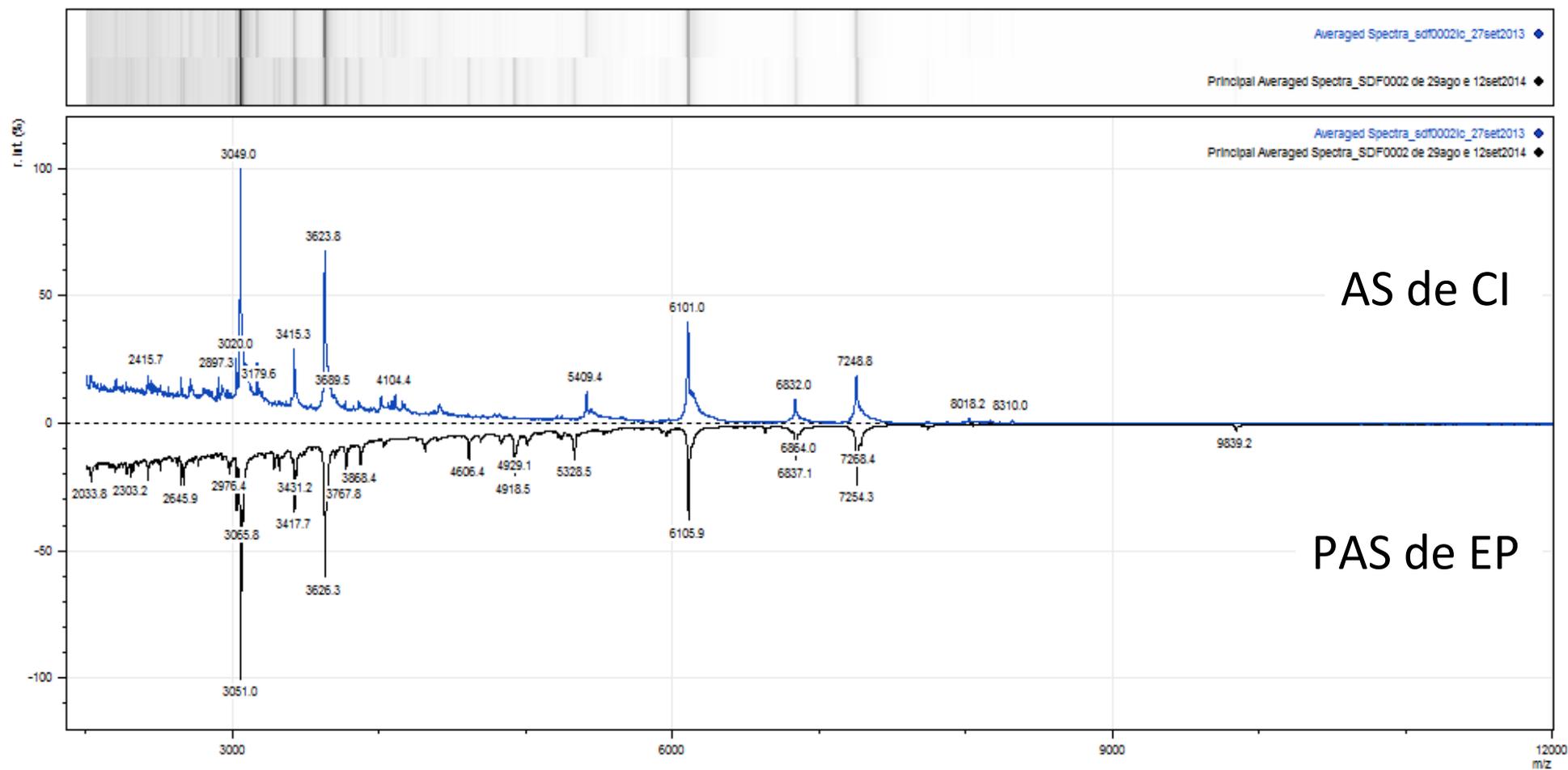


Figura 7. SDF0002 – Correspondência entre padrões de massa de CI e EP. PAS de 23 espectros de EP. O espectro médio de 3 espectros de CI apresentado corresponde ao SDF0002 – A (Tabela III). Os picos correspondentes e respectivas tolerâncias são apresentados na Tabela V. Amplitude máxima de aquisição de m/z , aproximadamente 9800 Da para o PAS e 8300 Da para o espectro médio de CI. Faixa de m/z de 2 a 12 kDa. Limite razão sinal/ruído igual a 3,0. Espectros e imagem gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

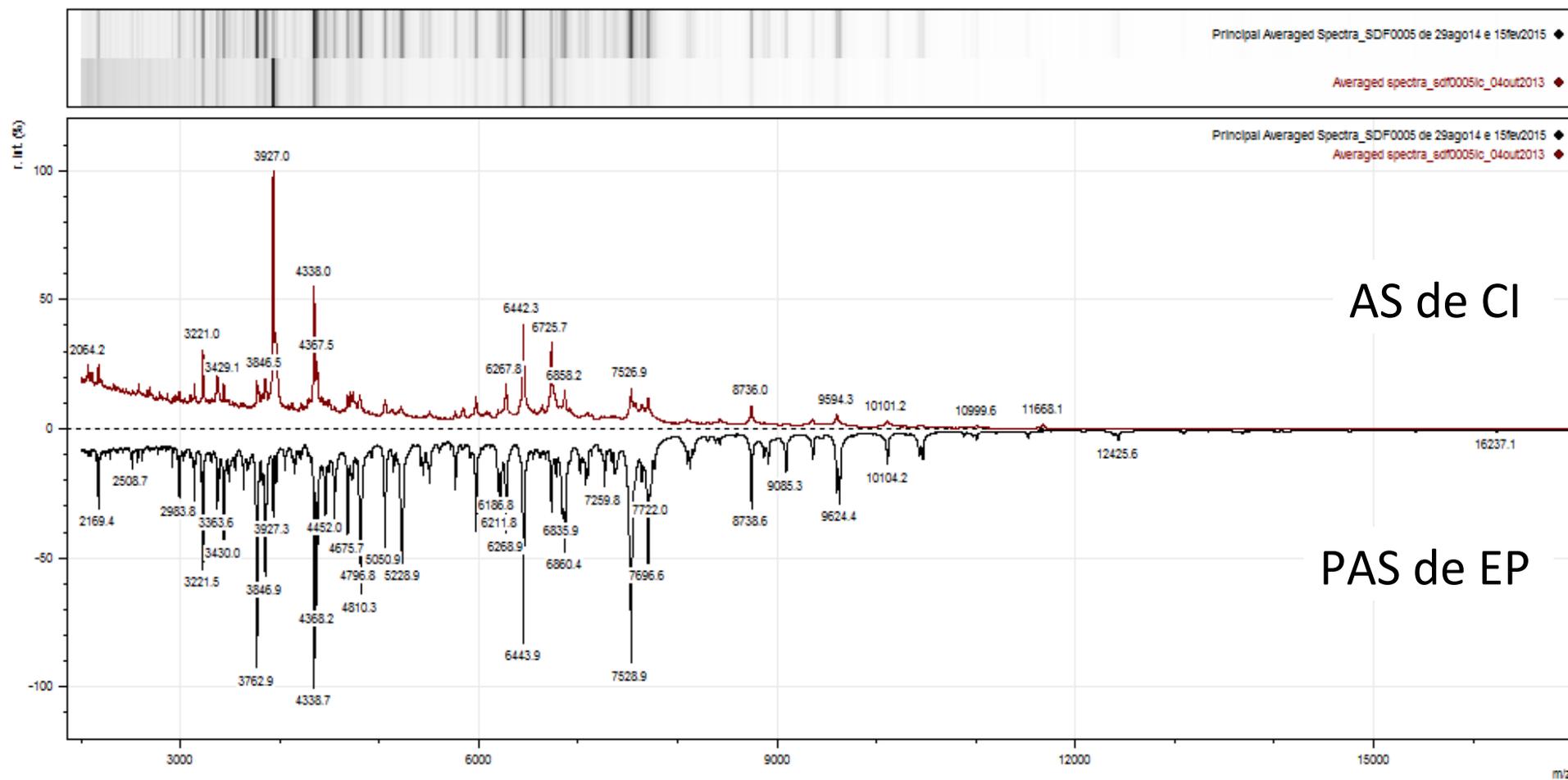


Figura 8. SDF0005 – Correspondência entre padrões de massa de CI e EP. PAS de 16 espectros de EP. O espectro médio de 15 espectros de CI apresentado corresponde ao SDF0005 – C (Tabela III). Os picos correspondentes e respectivas tolerâncias são apresentados na Tabela V. Amplitude máxima de aquisição de m/z aproximadamente 11.700 Da para o PAS e espectro médio de CI. Faixa de m/z de 2 a 12 kDa. Limite razão sinal/ruído igual a 3,0. Espectros e imagem gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

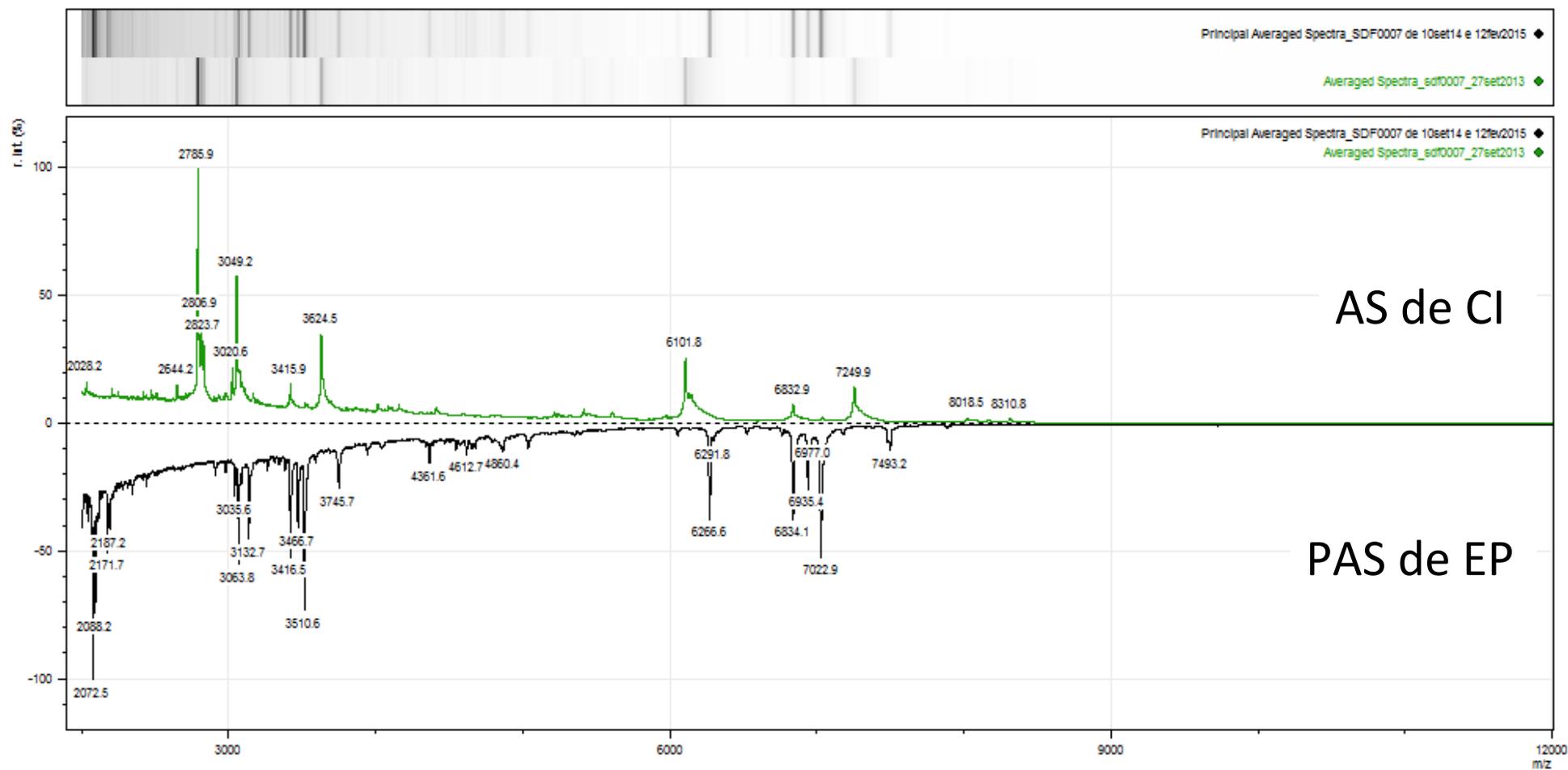


Figura 9. SDF0007 – Correspondência entre padrões de massa de CI e EP. PAS de 9 espectros de EP apresentando elevação da linha de base acima de 30% da intensidade relativa. Pouca correspondência entre os perfis, os picos correspondentes e respectivas tolerâncias são apresentados na Tabela V. O espectro médio de 19 espectros de CI apresentado corresponde ao SDF0007 – A (Tabela III). Amplitude máxima de aquisição de m/z aproximadamente 18.700 Da para o PAS e 8.300 Da para o espectro médio de CI. Faixa de m/z de 2 a 12 kDa. Limite razão sinal/ruído igual a 3,0. Espectros e imagem gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

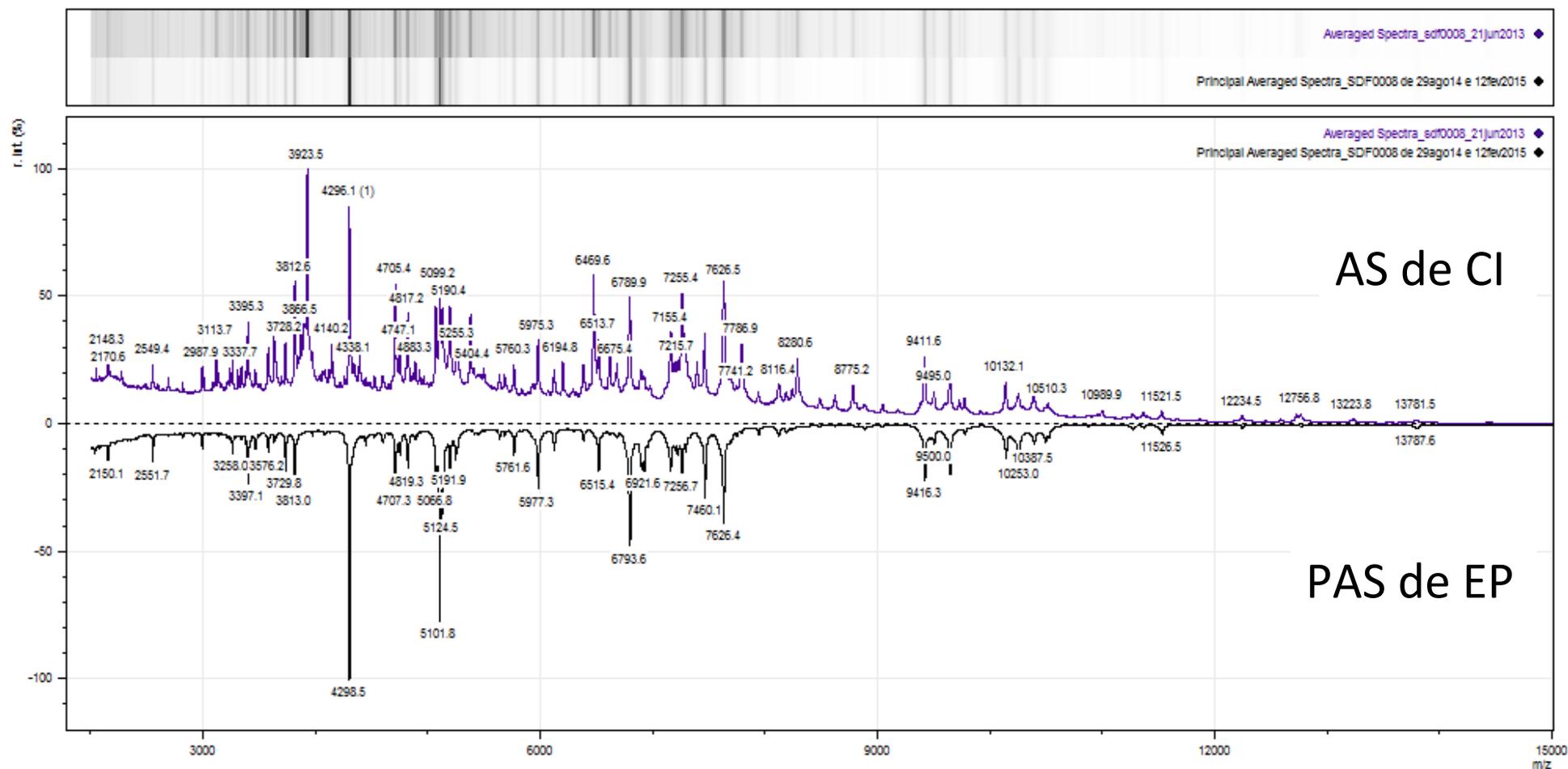


Figura 10. SDF0008 – Correspondência entre padrões de massa de CI e EP. PAS de 22 espectros de EP. O espectro médio de 37 espectros de CI apresentado corresponde ao SDF0008 – A (Tabela III). Os picos correspondentes e respectivas tolerâncias são apresentados na Tabela V. Amplitude máxima de aquisição de m/z aproximadamente 13.800 Da para o PAS e espectro médio de CI. Faixa de m/z de 2 a 12 kDa. Limite razão sinal/ruído igual a 3,0. Espectros e imagem gerados no programa *mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool*.

Tabela V. Correspondência entre picos de maior intensidade

SDF	PAS – EP		AS – CI		Tolerância (Da)
	m/z	Int. rel.	m/z	Int. rel.	
0001	3050,64	pico base	3048,18	pico base	2,46
	3625,43	87,10	3622,82	69,96	2,61
	6104,74	46,15	6099,52	66,34	5,22
	6835,90	22,72	6830,52	24,69	5,38
	7252,44	42,38	7247,27	39,03	5,17
	10732,31	1,02	8325,41	0,60	Amplitude
0002	3051,04	pico base	3048,98	pico base	2,06
	3626,30	57,61	3623,78	67,28	2,52
	6105,87	40,30	6101,01	42,42	4,86
	7254,29	25,93	7248,81	19,74	5,48
	9867,15	0,87	8309,98	0,94	Amplitude
	0005	3221,53	49,54	3221,01	9,5
3927,47		26,18	3927,05	pico base	0,42
4338,57		pico base	4337,97	51,94	0,6
4368,22		64,64	4367,55	20,35	0,67
6268,90		35,88	6267,80	13,40	1,1
6444,08		83,01	6442,30	39,20	1,78
6860,20		44,34	6858,24	11,31	1,96
7527,69		92,94	7526,90	13,30	0,79
8738,29		29,28	8736,04	7,13	2,25
16236,22		0,61	11668,08	1,48	Amplitude
0007		2072,53	pico base	–	–
	–	–	2785,94	pico base	–
	3416,47	52,57	3415,86	9,39	0,61
	18653,44	0,00	8310,80	1,42	Amplitude
0008	3813,03	21,56	3812,59	47,29	0,44
	–	–	3923,52	pico base	–
	4298,47	pico base	4296,37	82,49	2,1
	4707,27	21,85	4705,39	46,42	1,88
	5191,87	13,92	5190,43	36,65	1,44
	5761,63	8,89	5760,25	10,49	1,38
	5977,34	22,72	5975,33	22,55	2,01
	6515,45	16,14	6513,70	24,04	1,75
	7626,37	37,69	7626,48	52,44	-0,11
	9416,30	21,27	9411,58	24,57	4,72
	9499,98	6,71	9495,04	8,20	4,94
	13787,55	1,43	13781,50	0,78	6,05
	13796,05	1,39	13781,50	0,78	Amplitude

Cálculos com aproximação de 2 algarismos significativos.

(Int. rel.) Intensidade relativa do pico.

(–) Sem valor m/z correspondente.

5. Resultados do MALDI–Biotyper

Todas as estirpes analisadas foram comparadas ao banco de espectros de massa de microrganismos Bruker *Biotyper*. Nove estirpes não foram identificadas por falta de aquisição: SDF0010; SDF0012; SDF0055B; SDF0057; SDF0058; SDF0061; SDF0064; SDF0066 e SDF0067. Os resultados para as 46 estirpes restantes são apresentadas na tabela VI, com destaque para as análises de CI que apresentaram resultado coerente com as análises de EP. Apenas as pontuações (escores) acima de 1,700 são apresentadas. Resultados abaixo deste valor estão representados por um asterisco (*) e, análises não realizadas, por um travessão (-).

Tabela VI. Resultados de identificação dos espectros de CI e EP contra o banco de dados Bruker MALDI–Biotyper

CI			EP
SDF	Pontuação	<i>Linhagem Biotyper</i>	Pontuação
0001	*	<i>Bacillus altitudinis</i> CS 542_4 BRB	2,019
0002	*	<i>Bacillus pumilus</i> DSM 354 DSM	1,779
0003	–	<i>Bacillus subtilis</i> ssp <i>subtilis</i> DSM 10T DSM	1,789
0004	–	<i>Bacillus safensis</i> CIP 109412 CIP	1,781
0005	2,011	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> DSM 30621 DSM	2,238
0006	–	<i>Bacillus cereus</i> DSM 31T DSM	2,299
0007	*	*	*
0008	*	*	*
0009	*	<i>Bacillus simplex</i> CS 206_1aI BRB	2,155
0011	–	*	*
0013	*	*	–
0014	–	<i>Brevibacillus borstelensis</i> DSM 6347T DSM	1,889
0015	2,084	<i>Bacillus oleronius</i> DSM 9356T DSM	1,940
0016	–	<i>Bacillus simplex</i> CS 206_1aI BRB	1,932
0017	–	*	*
0018	–	*	*
0021	2,073	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32T DSM	2,113
0022	–	<i>Bacillus cereus</i> DSM 31T DSM	2,258
0023	–	*	*

(continua)

CI			EP
SDF	Pontuação	<i>Linhagem Biotyper</i>	Pontuação
0024	2,052	<i>Bacillus simplex</i> CS 206_1aI BRB	*
0025	–	<i>Bacillus cereus</i> DSM 31T DSM	2,234
0026	–	*	*
0027	–	<i>Bacillus altitudinis</i> CS 809_1 BRB	1,787
0028	–	*	*
0029	2,179	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32T DSM	2,273
0030	2,243	<i>Bacillus cereus</i> DSM 31T DSM	2,205
0033	–	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> DSM 11747T DSM	1,961
0034	–	*	*
0035	–	*	*
0036	–	*	*
0038	–	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32T DSM	2,097
0041B	–	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32T DSM	2,116
0042	–	*	*
0043A	–	<i>Bacillus altitudinis</i> CS 542_4 BRB	1,703
0043B	–	*	*
0044	–	*	*
0046	–	*	*
0048	–	*	*
0050	–	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32T DSM	1,886
0051A	–	*	*
0051B	–	*	*
0052	–	*	*
0053	–	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048T DSM	1,845
0055A	–	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32T DSM	1,973
0060	–	<i>Bacillus altitudinis</i> CS 809_1 BRB	1,856
0065	–	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32T DSM	1,705

Linhas em destaque para resultados coerentes entre CI e EP.

(*) Resultados com pontuação menor que 1,700. estão representados por um asterisco e por um

(–) Análises não realizadas.

Valores de 0,000 a 1,699; sem identificação confiável. De 1,700 a 1,999 (cor de laranja); provável identificação de gênero. De 2,000 a 2,299 (verde); segura identificação de gênero, provável identificação de espécie. De 2,300 a 3,000 (verde); alta probabilidade de identificação da espécie. Parâmetros do programa MALDI-TOF *Biotyper* - Bruker Daltonics.

De 46 estirpes analisadas no *MALDI-Biotyper*: **i)** 13 resultaram em provável identificação de gênero (escores entre 1,700 e 1,999); **ii)** apenas 13 estirpes resultaram em segura identificação de gênero e provável identificação de espécie; **iii)** 20 estirpes não foram reconhecidas ou a identificação foi classificada como não confiável pelo programa; **iv)** nenhuma identificação segura de espécie foi encontrada.

V. Discussão

O LaBafes possui uma coleção de 154 estirpes bacterianas ambientais oriundas de solo do Distrito Federal (DF), Brasil, intitulada Coleção de Bafes (CBafes). A equipe de pesquisa dedica-se à caracterização contínua desses achados em uma abordagem polifásica, que compreende a caracterização fenotípica, genética e molecular. Em virtude do tratamento térmico de 80 °C aplicado às amostras de terra para a eliminação de células vegetativas e seleção de esporos, não se pode afirmar que essas estirpes selvagens de Bafes, embora representativas da biodiversidade, possuam vida vegetativa no ambiente em que foram coletadas. As características de longevidade dos esporos e a facilidade com que são disseminados nos ambientes, sendo essencialmente ubíquos, não nos permitem esse tipo de inferência sem que seja realizado um estudo de cunho tipicamente ecológico.

Em razão da grande diversidade intraespecífica (Ehling-Schulz e Messelhäusser, 2013) e do desafio taxonômico representado pela resolução destas linhagens em nível de subespécies, recentemente foi adotada a espectrometria de massa MALDI-TOF, numa abordagem baseada em biblioteca (Sandrin *et al.*, 2012), como ferramenta auxiliar na identificação e comparação de Bafes. O espectrômetro de massa MicroFlex (Bruker Daltonics), utilizado para realização das análises, foi disponibilizado pelo Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargem). O equipamento trabalha em série com um sistema informatizado capaz de gerar os espectros de massa característicos das estirpes (programa *FlexAnalysis 3.3*) e apresentá-los a uma base de dados de perfis moleculares de microrganismos (programa *MALDI-Biotyper* – Bruker Daltonics), estabelecendo comparações e níveis de confiança para os resultados de identificação. A plataforma padrão atual do *MALDI-Biotyper* apresenta cerca de 6.000 espécies publicadas e validadas de microrganismos, sendo predominantemente constituída por espécies oriundas de isolados clínicos (Agustini *et al.*, 2014) e contaminantes de alimentos (Pavlovic *et al.*, 2014).

As primeiras análises das estirpes SDF, de origem ambiental, resultaram em pouca correspondência com a plataforma do *MALDI-Biotyper*, revelando a necessidade de ampliação da plataforma padrão pela criação de uma biblioteca suplementar personalizada. Sendo assim, o presente projeto de pesquisa foi proposto, com a finalidade de estabelecer as bases organizacionais e metodológicas para construção de um banco de dados de perfis

moleculares (biblioteca) fundamentado em um sistema de qualidade, de forma a garantir a padronização, registro documental e ampliação contínua da biblioteca.

1. Sistema de qualidade

Os primeiros ensaios espectrométricos com 12 estirpes SDF por IC MALDI–TOF foram realizados a partir de protocolos experimentais e registrados em cadernos de laboratório, procedimento comum em pesquisa acadêmica. Porém a comparação de resultados era dificultada pela quantidade de variáveis experimentais. Realizar esta tarefa com anotações manuais não rendeu resultados satisfatórios. Então foi desenvolvido um modelo digital de relatório para as análises de CI. Ainda assim, as descrições experimentais eram extensas, repetitivas, e os dados originais, como fotos e resultados espectrométricos (espectros e escores), ficavam dispersos em arquivos individualizados. A tentativa de compilar os dados resumidos em planilhas de Excel para uma visão geral dos resultados foi satisfatória até certo ponto, porque muitos detalhes experimentais eram significativos e as planilhas tornavam-se extensas, lentas de serem visualizadas e perdiam o caráter de resumo desejado. Além disso, este formato não contribuiu para a padronização do trabalho de bancada. A constatação da necessidade de padronização experimental para rastrear causas de contaminação e prevenir a reincidência destes eventos, ocorreu durante a preparação das primeiras suspensões de esporos a partir dos esporos secos da CBafes. Na ocasião, todas as suspensões produzidas foram contaminadas (154) e não foi possível rastrear a causa específica da ocorrência. Algumas providências baseadas em empirismo foram tomadas, pois, detalhes experimentais, alguns intrínsecos à técnica, não tinham como ser registrados a cada manipulação de amostras. Encerrando estas questões e facilitando enormemente o trabalho de registro experimental, comparação de resultados, rastreamento de causas de contaminação, e identificação das variáveis significativas ao processo de preparação de amostras, foi importado e adaptado o conceito de Qualidade utilizado em Farmácia Industrial, que envolveu mudanças na rotina laboratorial, o estudo exaustivo dos protocolos, criação de documentos – POPs e RPs (vide Suplemento), organização de compras, treinamento de alunos e auxiliares de pesquisa, adequação de espaços e qualificação de equipamentos.

Uma unidade operacional difusa – conjunto de instalações, equipamentos e pessoal necessário para conduzir o estudo (Anvisa, 2001) – é característica frequente em projetos de pesquisa acadêmicos em razão da interdisciplinaridade do conhecimento científico e é um fator de enriquecimento da pesquisa. Contudo, representa um desafio para a aplicação de ações de Qualidade a projetos de pesquisa, assim como a rotatividade de alunos, durante o desenvolvimento do projeto, e o variável grau de comprometimento com as atividades laboratoriais.

Cientes de que possuíamos uma unidade operacional difusa envolvendo quatro Laboratórios de pesquisa – três situados no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília e um na Embrapa/Cenargem, Brasília, DF – foi desenvolvido um sistema de qualidade simplificado abrangendo somente as operações, equipamentos e pessoal, diretamente ligados ao projeto de construção da biblioteca. Determinadas características pré-existentes no LaBafes que complementaríamos as ações de qualidade foram facilitadoras do processo, como: laboratório com Nível de biossegurança 1 (NB1), instalações físicas facilmente adequáveis, equipe de pesquisa qualificada, treinamentos alicerçados nas Boas Práticas Laboratoriais (BPL), existência de manuais de utilização do laboratório, Manual de Biossegurança e de equipamentos, manutenção rotineira de equipamentos, calibrações, qualificações e certificações, atribuição de responsabilidades específicas aos membros da equipe de pesquisa e auxiliares de laboratório e, principalmente, apoio gerencial. Teoricamente, o conceito de qualidade pode ser aplicado à produção de bens ou serviços em empresas de qualquer porte, contudo, a implantação e a manutenção de sistemas de qualidade dependem, inevitavelmente, da incorporação destes conceitos por todos os participantes e, principalmente, pela alta gerência (Andreolli Pinto *et al.*, 2015).

A metodologia de trabalho, esquematizada no diagrama da figura 11, exigiu que o tempo dedicado ao estudo das etapas pré-analíticas do projeto fosse priorizado, considerando-se que a qualidade de cada etapa organizacional se fundamenta na qualidade estabelecida para a etapa anterior (vide Seção IV.1 – Conformidade experimental e documental, Anexo I, e Suplemento, parte I). Além disso, os primeiros resultados espectrométricos remeteram a uma reanálise das etapas de preparação de amostras e reavaliação da qualidade do processo a partir das bases da pirâmide, indicando a necessidade de ajustes experimentais imediatos e alguns previstos para uma próxima abordagem desse estudo.

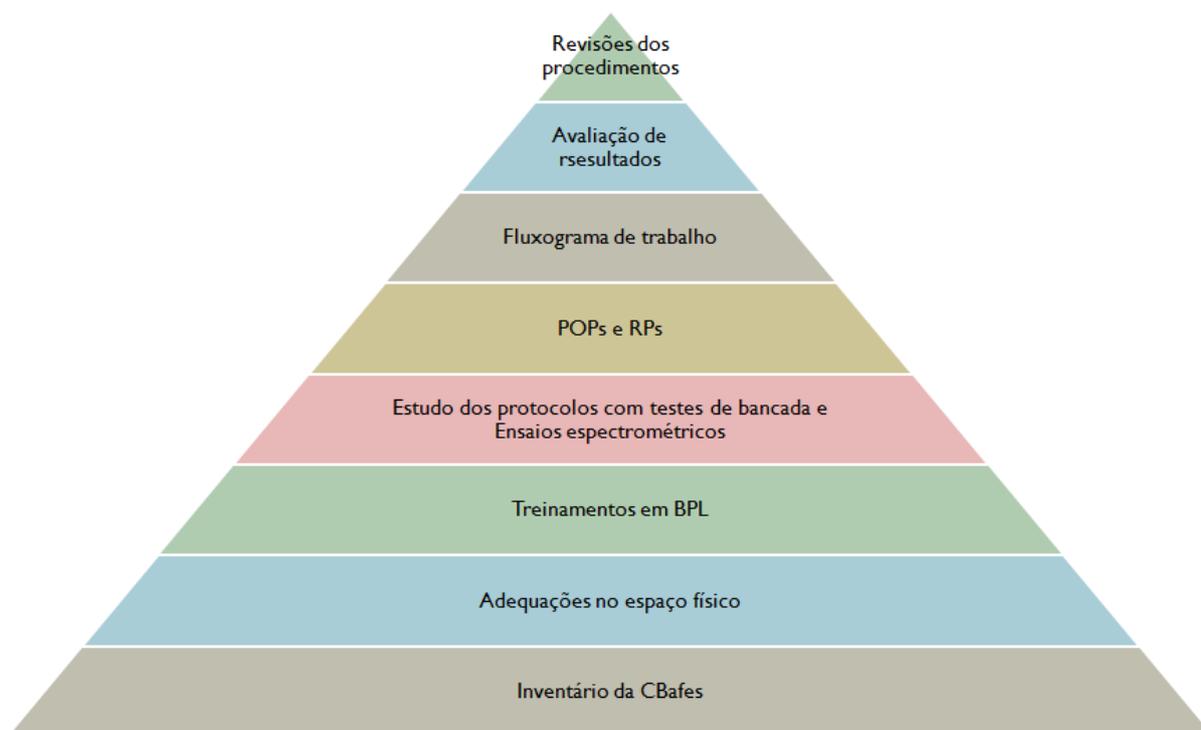


Figura 11. Etapas de desenvolvimento do sistema de qualidade. A pirâmide representa a importância relativa das tarefas realizadas para a adaptação do sistema de qualidade à construção da biblioteca de perfis moleculares por MALDI–TOF MS. O fluxograma de trabalho (Seção IV, Figura 3B,) incluiu os pontos de controle de qualidade microbiológico para a fase pré-analítica. A revisão dos procedimentos remeteu aos passos anteriores. O tamanho da área do diagrama relativa a cada fase é alusiva à importância da tarefa no contexto.

2. Cultivos e espectros de massa

A inoculação de cultivos a partir das suspensões de esporos resultou em padrões de crescimento suficientemente uniformes para a coordenação dos ensaios espectrométricos com extratos proteicos, porém o tempo de crescimento das colônias em meio sólido mostrou-se variável entre 12 e 48 h, tendo sido registradas, minuciosamente, as condições de crescimento para cada estipe e características de colônia antes e após os ensaios espectrométricos. As instruções do fabricante do espectrômetro (Bruker Daltonics) aconselham a utilização de colônias pequenas com até 24 h de crescimento, porém, em se tratando de isolados ambientais pouco conhecidos, o ajuste do tempo de crescimento adequado para coleta das células requer observação individual.

O estudo das variáveis interferentes (Seção IV.3) revelou que a interrupção do procedimento de extração influenciou a qualidade das aquisições, tendo sido utilizado como parâmetro de avaliação, o efeito de elevação da linha de base dos espectros. O estudo de qualidade para o tempo decorrido entre a aplicação da matriz e a MALDI–TOF MS

demonstrou que este tempo, também influencia a elevação das linhas de base nos espectros. Entretanto, o estudo sobre o efeito do tempo de exposição das amostras aos solventes de extração realizado com a SDF0006 não revelou qualquer correlação entre a linha do tempo e a qualidade dos espectros (Seção IV, item 3, figura 5). Em abordagem futura, as mesmas amostras serão preparadas sem interrupção até o momento de aplicação na placa analisadora e cobertura pela matriz. Fixando-se estas variáveis, outros fatores como influência dos tempos de incubação e dificuldade de dissolução das amostras no sistema de solventes de extração, poderão ser avaliados.

A partir dos RPs de extração de proteínas, foi possível selecionar informações sistemáticas sobre os procedimentos e selecionar variáveis interferentes no método de extração porque a obtenção das amostras foi realizada em conformidade com procedimentos padronizados. As análises de CI foram realizadas antes da padronização destes documentos, sendo impossível estabelecer correlações entre a qualidade dos espectros adquiridos e as variáveis experimentais. Contudo, os resultados das análises de CI foram coerentes com os resultados obtidos posteriormente para EP das mesmas estirpes, atestando a uniformidade dos cultivos e reprodutibilidade da técnica.

Em nosso estudo, o número de aquisições com qualidade adequada para a geração de MSPs no sistema *MALDI-Biotyper* (24 espectros por estirpe) não foi suficiente para nenhuma das estirpes. Contudo os espectros médios gerados no programa *mMass* auxiliaram na apresentação de um panorama das aquisições e espelham a uniformidade dos resultados obtidos por estirpe (Tabela III) em análises independentes.

A avaliação da correspondência de padrões de massa entre análises de CI e EP para as estirpes SDF0001; SDF0002; SDF0005; SDF0007 e SDF0008 (Seção IV. 4) revelou 30 picos correspondentes com intensidades relativas acima de 5% e aparentemente boa reprodutibilidade dos espectros, com alguns valores de m/z candidatos a estudos posteriores de identificação de biomarcadores.

Alguns pesquisadores testaram com sucesso diversos protocolos de extração de proteínas com o objetivo de ampliar a faixa de detecção dos picos, aumentando assim, o poder de resolução dos espectros (Fenselau e Demirev, 2001; Dickinson *et al.*, 2004; Sedo *et al.*, 2013). Essa estratégia pode ser considerada em uma próxima abordagem desse estudo para a resolução dos espectros obtidos para algumas estirpes SDF muito próximas, como aquelas identificadas como *B. cereus* e *B. megaterium* pelo programa *MALDI-Biotyper*. Em nosso estudo, sessenta e nove espectros adquiridos apresentaram uma faixa de detecção

inferior a 15.000 Da e mesmo as aquisições com maior amplitude raramente apresentaram picos com intensidades acima de 3% na região de maior m/z . Segundo Sandrin *et al.* (2012), a ampliação da faixa de aquisição é favorável a uma abordagem de biblioteca. Contudo Sedo *et al.*, (2013) relatam que a variação dos solventes de extração de proteínas, ao proporcionarem ampliação da faixa de detecção, em contrapartida ocasionaram uma diminuição na reprodutibilidade dos espectros, não sendo esta uma qualidade desejável à construção de uma base de dados.

Sogawa *et al.* (2011) publicaram o resultado de um estudo em que células de *Prevotella buccae* e *Clostridium perfringens* foram analisadas com um e três dias de crescimento em meio sólido e produziram espectros perfeitamente sobrepostos. Na espectrometria de células intactas, também, observamos pouca variação espectral entre colônias analisadas em dias diferentes, sendo mais notada a variação na intensidade dos picos (Tabela III). Não obstante, assim como apresentado por Fenselau e Demirev (2001) em um exemplo de robustez interlaboratorial, nossos resultados retornaram padrões de massa similares para uma mesma estirpe em análises independentes e mesmo entre espectros obtidos por diferentes técnicas de preparação de amostras, como observado para as estirpes SDF0001; SDF0002; SDF0005 e SDF0008 (Seção IV, item 4; Figuras 6, 7, 8 e 10). Contudo, consideramos necessária a realização de ensaios adicionais e um maior número de aquisições para a confirmação destes resultados em uma abordagem posterior.

3. Biblioteca suplementar utilizando MALDI–Biotyper

Para gerar os espectros da base de dados, o programa *MALDI-Biotyper* processa previamente vários perfis de massa adquiridos de uma determinada estirpe (Freiwald e Sauer, 2009), aplicando um tratamento matemático padrão para condensar múltiplos espectros em um único espectro de referência, denominado principal projeção espectral (em inglês: *main spectra projections* – MSP). No cálculo do MSP, os dados espectrais são normalizados e 100 picos de massa são selecionados com um limite de 0,001, na faixa de massas de 3.000 a 15.000 Da e sinais de massa com razões sinal/ruído igual a 3 (Freiwald e Sauer, 2009). Durante a análise são selecionados 75 sinais de massa existentes em pelo menos 25% dos espectros com um desvio de massa de 200 ppm.

O reconhecimento de espécies experimentais é efetuado pela comparação com a plataforma de espectros representativos, utilizando algoritmos de correspondência de

padrões, que calculam valores m/z calibrados, intensidades médias e distribuições de frequência para cada sinal de massa em diferentes medições (Freiwald e Sauer, 2009). Um nível de confiabilidade é atribuído aos resultados por valores em escala logarítmica. A tabela VI (Seção IV, item 5) apresenta os valores de pontuação atribuídos às análises do *MALDI-Biotyper*. Pontuações logaritmas iguais a 3,000 são obtidas para a comparação entre espectros iguais. Em contrapartida, a resolução de linhagens estreitamente relacionadas requer a utilização de recurso informatizado adicional, o qual atribui pesos diferentes aos sinais de massa mais significativos e conservados entre subespécies bacterianas (Freiwald e Sauer, 2009).

As estratégias de tratamento dos dados espectrométricos conferem robustez à biblioteca suplementar e pretendem diminuir a sensibilidade do método a variações intraespecíficas e relativas ao preparo das amostras experimentais. Contudo, assim como relatado por De Carolis *et al.* (2014), Sauer e Kliem (2010), Barwick *et al.* (2006) e outros autores já citados, sobre a importância da padronização experimental na preparação de amostras para as análises com *MALDI-Biotyper*, nossos resultados comprovaram a necessidade de padronização experimental principalmente nas etapas pré-analíticas de desenvolvimento da biblioteca suplementar. Nesse estudo pretendeu-se calcular o espectro representativo de cada estirpe, para composição da biblioteca suplementar, a partir de 24 espectros em conformidade experimental. Dentro deste critério, não foram obtidos resultados suficientes para a geração dos MSPs no *MALDI-Biotyper*, contudo, os procedimentos pré-analíticos e analíticos ficaram bem estabelecidos, possibilitando a retomada imediata desta etapa experimental em uma abordagem futura.

4. Identificação de estirpes na plataforma padrão MALDI-Biotyper

Hijazin *et al.* (2012) apresentam um ensaio de identificação de linhagens laboratoriais contra o banco de dados MALDI Biotyper 2.0, assim como procedemos para as estirpes SDF, contudo os escores alcançados para espécies dos gêneros *Arcanobacterium* e *Trueperella* possibilitaram a identificação em nível de subespécie, o que não ocorreu em nossos ensaios. Os autores concluíram que a técnica é confiável, além de reprodutível, em diferentes condições de cultivo, considerando, entretanto, a necessidade de estudos para analisar o potencial da MALDI-TOF MS na identificação de subespécies desses gêneros.

As análises de identificação das linhagens SDF com o banco de dados padrão *MALDI-Biotyper*, foram aparentemente inconclusivas em nível de espécie para a maioria das linhagens SDF. De 46 estirpes analisadas, somente 13 obtiveram pontuação relativa à segura identificação de gênero e provável identificação da espécie (escores entre 2,000 e 2,299) e 20 estirpes não encontraram correspondência no banco de dados. Estes resultados confirmaram a necessidade de criação de um banco de dados suplementar, como relatado anteriormente. Não obstante os maiores escores atribuídos às amostras analisadas (Tabela IV) não indicarem segura identificação de espécie, todas as estirpes reconhecidas foram classificadas pelo *MALDI-Biotyper* em *taxa* do filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* e ordem *Bacillales*, distribuídas nas famílias *Bacillaceae* e *Paenibacillaceae*, reconhecidamente contentoras da maior parte das Bafes com taxonomia validada. Apenas 2 estirpes SDF foram reconhecidas nos gêneros *Brevibacillus* e *Paenibacillus*, como provável identificação de gênero (escores entre 1,700 e 1,999).

Embora os espectros de CI tenham apresentado maior riqueza de picos (vide relatórios de análise no Suplemento), as correspondências mais confiáveis foram obtidas com amostras de EP. Parte deste resultado pode ser atribuída à padronização experimental da fase pré-analítica a partir de protocolos do fabricante da plataforma comercial *MALDI-Biotyper*, também, desenvolvida por método semelhante de extração de proteínas. Por exemplo, as culturas utilizados para análises de EP eram constituídas de células em fase inicial de cultivo, tanto quanto possível, o que não ocorreu para as amostras analisadas pelo método de CI (Tabela III). A SDF0024, que apresentou pontuação inferior na análise de EP em relação à identificação de CI, apresentou resistência à dissolução em AcN. Além disso, proporcionalmente, foram adquiridos 108 espectros de CI contra 4 espectros de EP para essa estirpe, aumentando matematicamente as chances de correta identificação de CI pelo programa *MALDI-Biotyper*.

A SDF0030 e SDF0015 obtiveram maior pontuação para análises de CI, embora com diferenças menores: 2,243 (CI) contra 2,205 (EP) a primeira, e 2,084 (CI) contra 1,940 (EP) a última. Todos os espectros de EP (oito) da SDF0030 apresentaram elevação excessiva das linhas de base – maior que 50% da intensidade relativa – e dissolução ruim em AcN. Não obstante, foram adquiridos 19 espectros de CI em conformidade para esta estirpe, favorecendo a identificação com maior nível de confiança. Para a SDF0015 também foi adquirido um número predominante de espectros por CI: 60 contra 4 de EP. Todos os

espectros de CI apresentaram boa qualidade de aquisição e, entre os de EP, apenas um em conformidade (elevação da linha de base < 30%).

Assim como referido por Anderson *et al.* (2014), Dušková *et al.* (2012) e Schleifer (2009), nossos resultados corroboraram àqueles obtidos em análises filogenéticas pelo grupo de pesquisa do LaBafes (Orem, 2014), sendo que os resultados do MALDI–Biotyper, apresentaram-se mais precisos, indicando somente uma estirpe correspondente para cada SDF nas identificações com pontuações acima de 2,000 (segura identificação de gênero e provável identificação de espécie).

A tabela VII compara os resultados do *Biotyper* com resultados obtidos por Orem (2014) para as mesmas estirpes, pela análise do gene rDNA 16S. São apresentadas na cor verde as estirpes da plataforma padrão do *MALDI–Biotyper* para as quais foram obtidos resultados com segura identificação de gênero e provável identificação da espécie (escores entre 2,000 e 2,299) e, na cor de laranja, aquelas com provável identificação de gênero (1,700 a 1,999).

A estirpe SDF0001 foi associada a *B. altitudinis*, em ambas as técnicas. *B. altitudinis* também foi relacionada à SDF0027 no *Biotyper*, com provável identificação de gênero, mas os resultados de Orem (2014) apontam para *B. safensis* e *B. pumilus*.

Com provável identificação de gênero pelo *Biotyper* (escores entre 1,700 e 1,999), as estirpes SDF0002; SDF0003; SDF0015; SDF0016; SDF0050 e SDF0065, também encontraram correspondências com *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. oleronius*, *B. simplex* e *B. megaterium*, respectivamente, nas análises de rDNA 16S apresentadas por Orem (2014). As SDF0021 e SDF0029 resultaram em provável identificação da espécie *B. megaterium* pelo *Biotyper* coerentemente com os resultados da filogenia. A SDF0030, com provável identificação da espécie *B. cereus s. s.* e a SDF0005 com provável identificação da espécie *Lysinibacillus fusiformis*, também corroboram os resultados de Orem (2014).

Apesar da coerência entre resultados do *Biotyper* e filogenia apresentada por Orem (2014), outros resultados do grupo de pesquisa do LaBafes, como análise da morfologia de esporos, características quimiotaxonômicas, morfologia celular e de colônias, revelam diferenças fenotípicas entre essas estirpes, apontando a necessidade de aprofundamento no estudo dos perfis de massa caso a caso e a busca por marcadores específicos de subtipos.

Tabela VII. Comparação entre resultados do MALDI–Biotyper e filogenia apresentada por Orem (2014) para algumas estirpes SDFs.

Espécies mais relacionadas			Gênero	Família Classe <i>Bacilli</i> Ordem <i>Bacillales</i>
(MALDI–Biotyper)	SDF	Orem (2014) Filogenia		
<i>B. altitudinis</i>	0001	<i>B. altitudinis</i> (<i>B. safensis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. stratosphericus</i> e <i>B. aerofilus</i>)	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillaceae</i>
<i>B. altitudinis</i>	0027	(<i>B. safensis</i> , <i>B. pumilus</i>)		
<i>B. pumilus</i>	0002	<i>B. pumilus</i> (<i>B. safensis</i>)		
<i>B. subtilis ssp subtilis</i>	0003	<i>B. subtilis</i>		
<i>B. safensis</i>	0004	–		
<i>B. oleronius</i>	0015	<i>B. oleronius</i>		
<i>B. simplex</i>	0016	<i>B. simplex</i>		
<i>B. simplex</i>	0024	–		
	0009	–		
	0021	<i>B. megaterium</i>		
<i>B. megaterium</i>	0029	–		
	0038	–		
	0041B	–		
	0050	<i>B. megaterium</i>		
<i>B. megaterium</i>	0055A	–		
	0065	<i>B. megaterium</i>		
	0022	–		
	0025	–		
<i>B. cereus s.s.</i>	0030	<i>B. cereus</i> <i>B. thuringiensis</i>		
	0006	–		
<i>B. mycoides</i>	0053	–		
<i>L. fusiformis</i>	0005	<i>L. fusiformis</i> (<i>L. sphaericus</i>)	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Paenibacillaceae</i>
<i>B. borstelensis</i>	0014	–	<i>Brevibacillus</i>	
<i>P. amylolyticus</i>	0033	–	<i>Paenibacillus</i>	

Entre parênteses outras estirpes correspondentes encontradas por filogenia de rDNA 16S (Orem, 2014).

(–) Indica ausência de análise genética para a estirpe SDF.

Valores de 0,000 a 1,699; sem identificação confiável. De 1,700 a 1,999 (cor de laranja); provável identificação de gênero. De 2,000 a 2,299 (verde), segura identificação de gênero, provável identificação de espécie. Parâmetros do programa MALDI-TOF *Biotyper* - Bruker Daltonics.

Por exemplo, os espectros das estirpes SDF0021; SDF0029; SDF0038; SDF0041B; SDF0050; SDF0055A e SDF0065, são apresentados com imagens sobrepostas na figura 12 e a visualização em gel proporciona a visualização da sobreposição de diversos picos. Essas estirpes, identificadas como *B. megaterium* no *MALDI-Biotyper* e algumas confirmadas por filogenia do rDNA 16S (Orem, 2014), apresentam diferenças fenotípicas que sugerem a existência de diversidade em nível de subespécies.

Como citado anteriormente, a maior parte das espécies no gênero *Bacillus* está classificada em subgrupos representados por espécies típicas (Ludwig *et al.*, 2009). *B. megaterium* é uma bactéria não patogênica Gram positiva, isolada de alimentos e solo, pertencente ao subgrupo do *B. asahii*, junto com *B. simplex*, *B. bataviensis*, *B. benzoovorans*, *B. circulans*, *B. cohnii*, *B. firmus*, *B. flexus*, *B. fumarioli*, *B. infernus*, *B. jeotgali*, *B. luciferensis*, *B. methanolicus*, *B. niacini*, *B. novalis*, *B. psychrosaccharolyticus*, *B. soli* e *B. vireti*. As células vegetativas possuem tipicamente tamanhos entre 1,2 e 1,5 por 2,0 e 5,0 μm , motilidade e presença de flagelos peritríquios, podendo apresentar corpúsculos de inclusão e cápsula composta por polissacarídeos e polipeptídios. O esporângio é não deformado com esporo esférico tendendo a elipsoidal, subterminal/terminal, com presença de inclusões parasporais (Ludwig *et al.*, 2009).

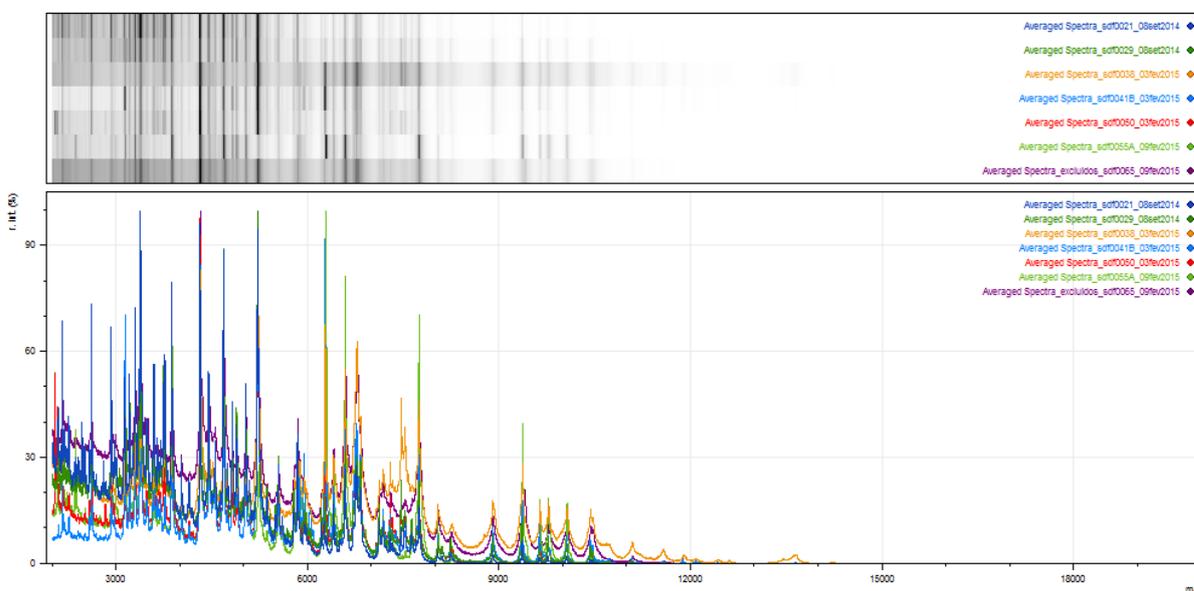


Figura 12. Sobreposição dos perfis de massa das estirpes SDF0021; SDF0029; SDF0038; SDF0041B; SDF0050; SDF0055A e SDF0065. As estirpes foram identificadas como *B. megaterium* pelo programa *MALDI-Biotyper* e as SDF0021; SDF0029; SDF0050 e SDF0065 tiveram identificação confirmada na análise do rDNA 16S por Orem (2014). Observar o padrão de distribuição de massas semelhante e a sobreposição de picos na visualização em gel.

Cavalcante (2014) apresenta um estudo da morfologia e ultra estrutura dos esporos e perfil proteico de estirpes SDF, com dados sobre formato e posição dos esporos, presença de cristais parasporais, motilidade observada por microscopia de contraste de fase (MCF) e coloração de Gram. A tabela VIII apresenta os resultados de Cavalcante (2014) e as características morfológicas de colônia das estirpes SDF classificadas como provável espécie *B. megaterium* no MALDI-Biotyper.

Tabela VIII. Diferenças fenotípicas entre estirpes relacionadas com *B. megaterium* pelo programa MALDI-Biotyper

SDF	Morfologia de colônias	Forma e posição do endósporo	Presença de cristais parasporais	Motilidade (MCF)	Gram
0021	·Cerosa ·Circular com afunilamento nos polos ·Umbilicada ·Concêntrica	Oval Subterminal	Sim	Não observada	Positiva
0029	·Brilhante ·Circular ·Umbilicada com invaginação central ·Concêntrica	Esférico Terminal	Sim	Sim	Variável
0038	·Brilhante ·Circular ·Convexa ·Lisa	Esférico Terminal	Não observada	Não observada	Positiva
0041B	·Brilhante ·Circular ·Umbilicada ·Concêntrica	–	–	–	–
0050	·Brilhante ·Circular ·Convexa ·Concêntrica	Esférico Subterminal	Sim	Sim	Variável
0055A	·Cerosa ·Circular ·Umbilicada ·Concêntrica	–	–	–	–
0065	·Cerosa ·Circular ·Achatada ·Concêntrica	Oval Terminal	Sim	Não observada	Variável

(–) Indica informação desconhecida.

Em destaque vermelho a estirpe SDF0021 que apresentou reconhecimento triplo como *B. megaterium*.

Conforme Cavalcante (2014), as estirpes que apresentam esporos com morfologia típica de *B. megaterium* são a SDF0015; SDF0021; SDF0047 e SDF0049. Destas, somente a

SDF0021 foi relacionada a tal espécie na análise do *MALDI-Biotyper* – resultado corroborado pela filogenia do rDNA 16S apresentado por Orem (2014).

No estudo de Cavalcante (2014), a estirpe SDF0029 apresenta esporos bem diferenciados de *B. megaterium*, com estrutura externa estrelada similar ao relatado para *Paenibacillus*, entretanto, a SDF0029 também foi reconhecida com segura identificação de gênero e provável espécie encontrando correspondência com as análises filogenéticas de Orem (2014). Ocorre que a caracterização de esporos é extremamente relevante e oferece informações úteis para a distinção entre estirpes de Bafes próximas filogeneticamente (Cavalcante, 2014; Dybwad *et al.*, 2013; Mckenney *et al.*, 2013; LOGAN *et al.*; 2009; Dickinson *et al.*, 2004; Fritze, 2004)

A SDF0038 difere das restantes pela morfologia das colônias, forma e posição do endósporo no esporângio, sendo assim para as estirpes SDF0041B; SDF0050; SDF0055A e SDF0065. A morfologia de colônias para as estirpes em questão pode ser visualizada na figura 13 do Manual de Bergey's (Ludwig *et al.*, 2009) – mostrando um cultivo de *B. megaterium* – e na figura 14, mostrando imagens de cultivos das estirpes apresentadas na tabela VII.

Esses resultados são sugestivos de que os resultados do *MALDI-Biotyper* e a filogenia do rDNA 16S (Orem, 2014) para as estirpes SDF não revelaram diferenças em nível de subespécie. Em uma abordagem futura serão necessárias análises aprofundadas dos perfis de massa das estirpes SDF para a identificação de picos biomarcadores e a utilização de recursos bioinformatizados adicionais para a resolução das espécies estreitamente relacionadas.

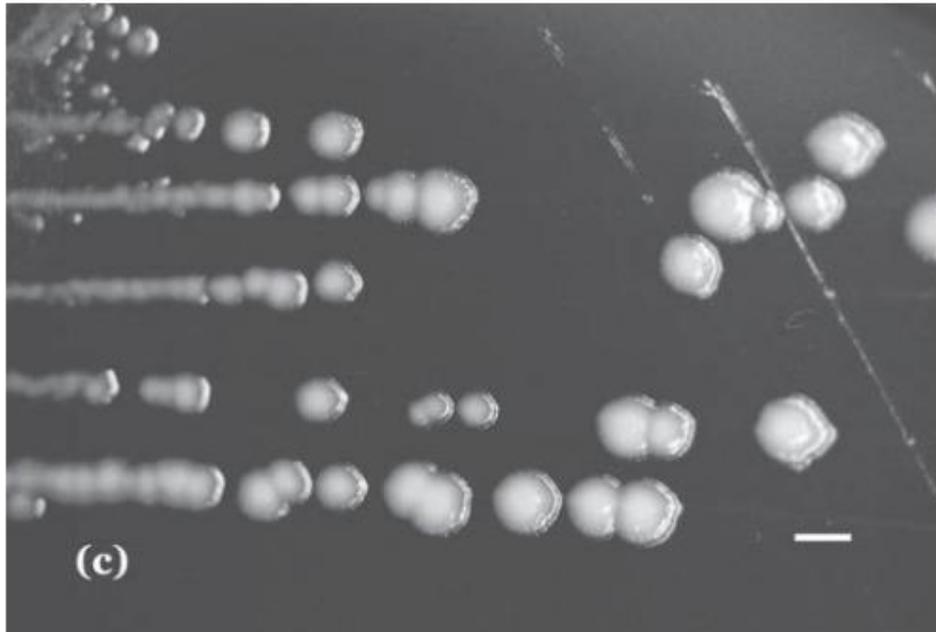


Figura 13. Colônias de *B. megaterium* em *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Cultivo em água sangue a 37 °C com 24 – 36 h de crescimento. Colônias brilhantes, redondas tendendo a irregulares com margens onduladas. Retirado de *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2th Edition, v. 3, *The Firmicutes*, Fig. 9c, pág. 27. *Genus I – Bacillus*. Ludwig *et al.*, 2009.

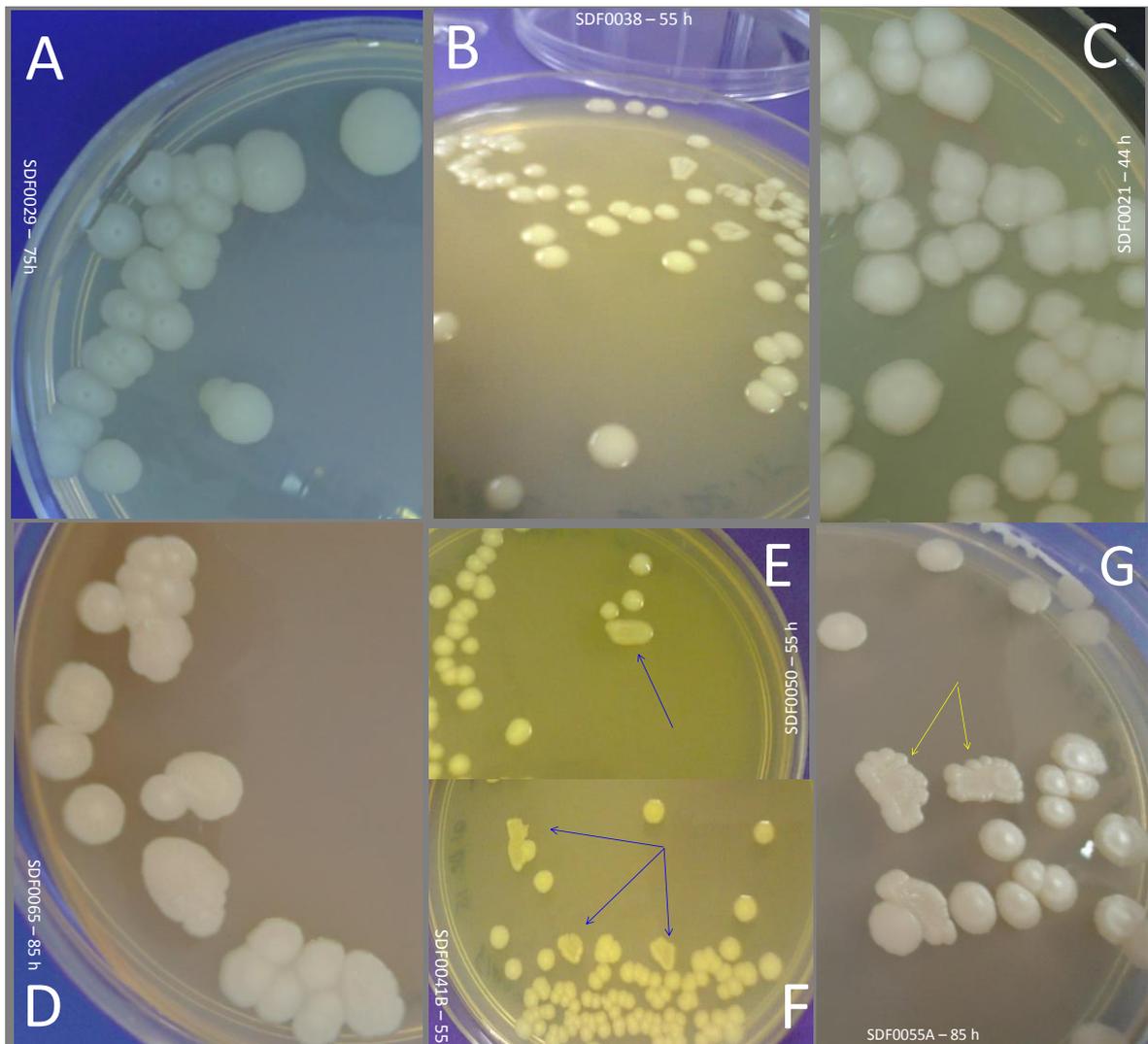


Figura 14. Cultivos de estirpes SDF. A) SDF0029 com 75 h de crescimento. **B)** SDF0038 com 55 h **C)** SDF0021 com 44 h. **D)** SDF0065 com 85 h. **E)** SDF0050 com 55 h. **F)** SDF0041B com 55 h. **G)** SDF0055A com 85 h. Todas estas estirpes SDFs foram identificadas como *B. megaterium* na plataforma *MALDI-Biotyper* em análises de CI e EP. Os cultivos ficaram em observação após a coleta de células para a espectrometria de massa (MT 07 – Cultivo para a 1ª análise espectrométrica) e as setas indicam pontos de crescimento diferenciado onde as colônias foram retiradas.

VI. Conclusão

O estudo de estirpes ambientais de Bafes não é uma tarefa trivial. Não obstante o objetivo de adquirir espectros em número suficiente e conformidade para a criação da biblioteca suplementar não ter sido alcançado, consideramos que o objetivo principal deste trabalho foi atingido com o estabelecimento da metodologia pré-analítica e analítica para a MALDI-TOF MS, obtenção dos espectros iniciais, obtenção de correspondência entre os padrões de massa de estirpes analisadas por ambas as técnicas de MALDI-TOF MS – análise de extrato proteico e análise de células intactas, elaboração e implantação do sistema de Qualidade.

Os resultados experimentais indicam que a metodologia foi bem estabelecida para a fase pré-analítica (preparação das amostras microbiológicas) necessitando pequenos ajustes que envolvem, basicamente, o estudo da concentração dos reagentes para melhorar o procedimento de extração de proteínas. Aspectos intrínsecos às espécies em estudo parecem influenciar os resultados espectrométricos, como a dificuldade de dissolução das amostras no sistema solvente. Uma estratégia de controle de qualidade não realizada nesse estudo, certamente incrementada em uma próxima abordagem, será a utilização de uma cepa padrão de *Bacillus sp.* como controle interno nas análises de MALDI-TOF.

O reconhecimento das estirpes na plataforma padrão de microrganismos do *MALDI-Biotyper* indica que é possível revelar diferenças taxonômicas entre as estirpes SDFs por espectrometria de massa MALDI-TOF, contudo, devido à grande intradiversidade de Bafes em nível de espécie, acreditamos que estudos utilizando algoritmos adicionais sofisticados sejam necessários para incrementar o poder de resolução desta técnica em nível de estirpe e/ou possibilitar a identificação de picos biomarcadores cepa específicos.

VII. Referências

- AEBERSOLD, R.; MANN, M..** Mass spectrometry based proteomics. *Nature*. V. 422; 13. March (2003)
- AGUSTINI, B. C.; SILVA, L. P.; BLOCH JR., C.; BONFIM, T. B.; DA SILVA, G. A..** Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. *Applied Microbial And Cell Physiology* 98:5645 – 5654. (2014)
- ALENCAR, T. R.; DE-SOUZA, M. T.; OLIVEIRA, J. V. A.; SILVA, H. S. I. L.; OREM, J. C.; CAVALCANTE, D. A.; ALMEIDA JR, N. F.; TELLES, G. P.; SETUBAL, J. C.; BRIGIDO, M. M.; TORRES, F. A. G.; STADLER, P. S.; WALTER, M. E. M. T.; MORAES, L. M. P..** Draft genome sequence of FT9, a novel *Bacillus cereus* strain isolated from a Brazilian thermal spring. *Genome Announc.* 2(5):e01027-14. doi:10.1128/genomeA.01027-14. N (2014)
- ALMASOUD, N.; XU, Y.; NICOLAOU, N.; GOODACRE, R..** Optimization of matrix assisted desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) for the characterization of *Bacillus* and *Brevibacillus* species. *Analytica Chimica Acta*, 840, 49-57 (2014)
- ANDERSON, A. C.; SANUNU, M.; SCHNEIDER, C.; CLAD, A.; KARYGIANNI, L.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A..** Rapid species-level identification of vaginal and oral *Lactobacilli* using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiology*, 14:312 (2014)
- AUGUSTIN, JEAN-CHRISTOPHE.** Challenges in risk assessment and predictive microbiology of foodborne spore-forming bacteria. *Food Microbiology*, 28: 209–213 (2011)
- BADER, OLIVER.** MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, 13, 788-799 (2013)
- BARWICK, V.; LANGLEY, J.; MALLET, T.; STEIN, B.; WEBB, K..** Best practice guide for generating mass spectra. LGC Limited (2006)
- BILLE, E.; DAUPHIN, B.; LETO, J.; BOUGNOUX, M.-E.; BERETTI, J.-L.; LOTZ, A.; SUAREZ, S.; MEYER, J.; JOIN-LAMBERT, O.; DESCAMPS, P.; GRALL, N.; MORY, F.; DUBREUIL, L.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; FERRONI, A..** MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus spp.* and positive blood cultures *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 1117-1125 (2012)
- BOHME, K.; FERNÁNDEZ, I. C.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; GALLARDO, J. M. ; CANAS, B.; CALOMATA, P..** Spectra Bank: An open access tool for rapid microbial identification by MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis Journal*, 33, 2138–2142 (2013)
- BOONE, D. R.; LIU, Y.; ZHAO, ZHONG-JU; BALKWILL, D. L.; DRAKE, G. R.; STEVENS, T. O.; ALDRICH, H. C..** *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *International Journal of Systematic Bacteriology*, July (1995), p. 441-448. International Union of Microbiological Societies.
- BOTTONE, E. J..** *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 382–438 (2010)
- BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M..** *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423–431. (2011)

- BRIGHT, J. J.; CLAYDON, M. A.; SOUFIAN, M.; GORDON, D. B.** Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *Journal of Microbiological Methods* 48 127–138 (2002)
- CALDERARO, A.; PICCOLO, G.; GORRINI, C.; MONTECCHINI, S.; BUTTRINI, M.; ROSSI, S.; PIERGIANNI, M.; De CONTO, F.; ARCANGELETTI, M. C.; CHEZZI, C.; MEDICI, M. C.** *Leptospira* species and serovars identified by MALDI-TOF mass spectrometry after database implementation. *BMC Research Notes*, 7:330 and *PLoS ONE* 9(2): e88895 (2014)
- CALLEGAN, M. C.; COCHRAN, D. C.; KANE, S. T.; RAMADAN, R. T.; CHODOSH, J.; MCLEAN, C. et al.** Virulence factor profiles and antimicrobial susceptibilities of ocular *Bacillus isolates*. *Curr. Eye Res.* 31, 693–702 (2006)
- CARBONNELLE, E.; GROHS, P.; JACQUIER, H.; DAY, N.; TENZA, S.; DEWAILLY, A.; VISSOUARN, O.; ROTTMAN, M.; HERRMANN, J.L.; PODGLAJEN, I.; RASKINE, L.** Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *Journal of Microbiological Methods* 89, 133–136 (2012)
- CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J. L.; FERRONI, A.; GUTMANN, L.; NASSIF, X.** MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory *Clinical Biochemistry* 44, 104-109 (2011)
- CAVALCANTE, DANILO DE ANDRADE.** Ultraestrutura e termorresistência de esporos e identificação de proteínas de bactérias aeróbias de solo do Distrito Federal. 2014. v, 100 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana). Universidade de Brasília, Brasília (2014)
- CHALUPOVÁ, J.; RAUS, M.; SEDLÁŘOVÁ, M.; ŠEBELA, M.** Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances* 32, 230-241 (2014)
- CHON, J. W.; KIM, J. H.; LEE, S. J.; HYEON, J. Y.; SEO, K. H.** Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik. *Food Microbiol.* 32, 217–222. (2012).
- COHN, FERDINAND JULIUS.** Untersuchungen über Bakterien. *Beitr. Biol. Pflanz*, 1:127–244 (1872)
- COLE, RICHARD B.** Electrospray and MALDI mass spectrometry. *Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*. 2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2010)
- CROXATTO, A.; PROD’HOM, G.; GREUB, G.** Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 380-407 (2012)
- CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W.** Espectrometria de massa de proteínas. O papel chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. Ano IX. Nº 36. Jan/jun (2006)
- DE CAROLIS, E.; VELLA, A.; VACCARO, L.; TORELLI, R.; POSTERARO, P.; RICCIARDI, W.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.** Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry-based yeast identification using a fast protein extraction procedure. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 52; 5 p. 1453–1458 (2014)

- DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, KARL-HEINZ; WHITMAN, W. B.** Revised road map to the phylum *Firmicutes*; Phylum XIII. *Firmicutes* (2009)
- DICKINSON, D. N.; LA DUC, M.T.; HASKINS, W.E.; GORNUSHKIN, I.B.; WINEFORDNER, J.D.; POWELL, D.H.; VENKATESWARAN, K.** Species differentiation of a diverse suite of *Bacillus* spores using mass spectrometry based protein profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 475–482 (2004)
- DUŠKOVÁ, M.; ŠEDO, O.; KŠICOVÁ, K.; ZDRÁHAL, Z.; KARPÍŠKOVÁ, R.** Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International Journal of Food Microbiology*, 159 (2012) 107–114.
- EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S.** *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food borne illness. *Mol. Nutr. Food Res.* 48, 479–487. (2004)
- EHLING-SCHULZ, M.; KNUTSSON, R.; SCHERER, S.** “*Bacillus cereus*” in Genomes of Food– and Water–Borne Pathogens, eds **S. KATHARIOU, P. FRATAMICO, Y. LIU**. Washington, DC: ASM Press, 147–164 (2011)
- EHLING-SCHULZ, M.; MESSELHÄUSSER, U.** *Bacillus* “next generation” diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. *Frontiers in Microbiology* (2013)
- EIJLANDER, R. T.; DE JONG, A.; KRAWCZYK, A. O.; HOLSAPPEL, S.; KUIPERS, O. P.** SporeWeb: an interactive journey through the complete sporulation cycle of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, Vol. 42, Database issue D685–D691 (2014)
- FEKETE, THOMAS.** *Bacillus* species (not anthracis). *Clinical Microbiology Newsletter*, 31:12 (2009)
- FENSELAU, C.; DEMIREV, P. A.** Characterization of intact microorganism by Maldi mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 20, 157– 171 (2001).
- FERREIRA, LUÍS C. S.; FERREIRA, R. C. C.; SCHUMANN, W.** *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77(1): 113-124 (2005)
- FRAGA, H. C. J. R.; FUKUTANI, K. F.; CELES, F. S.; BARRAL, A. M. P.; OLIVEIRA, C. I.** Avaliação da implementação de um sistema de qualidade em um laboratório de pesquisa básica: viabilidade e impactos. *Einstein*: 10(4):491-7 (2012)
- FREIWALD, A.; SAUER, S.** Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols*, vol.4, nº 5 (2009)
- FRITZE, DAGMAR.** *Bacillus spp.* Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. The Nature and Application of Biocontrol Microbes. DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg1b, 38124. Braunschweig, Germany (2004)
- GALPERIN, MICHAEL Y.** Genome diversity of spore-forming *Firmicutes*. *Microbiol Spectrum* 1(2): TBS-0015-2012 (2013)
- GANZ, H. H.; TURNER, W. C.; BRODIE, E. L.; KUSTERS, M.; SHI, Y.; SIBANDA, H.; TOROK, T.; GETZ, W. M.** Interactions between *Bacillus anthracis* and plants may promote anthrax transmission. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(6): e2903 (2014)

- GUINEBRETIERE, M. H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; DE SARRAU, B.; DE BUYSER, M. L.; LAMBERET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E.; LERECLUS, D.; DE VOS, P.; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN, A.** *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 6: 31–40 (2013)
- GUINEBRETIERE, M. H.; VELGE, P.; COUVERT, O.; CARLIN, F.; DEBUYSER, M. L.; NGUYEN-THE, C.** Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3388–3391 (2010)
- GUINEBRETIERE, M.-H.; THOMPSON, F. L.; SOROKIN, A.; NORMAND, P.; DAWYNDT, P.; EHLING-SCHULZ, M.; SVENSSON, B.; SANCHIS, V.; NGUYEN-THE, C.; HEYNDRICKX, M.; De Vos, P.** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ. Microbiol.* 10, 851e865 (2008)
- HERNANDEZ, E.; RAMISSE, F.; DUCOUREAU, J. P.; CRUEL, T.; CAVALLO, J. D.** *Bacillus thuringiensis subsp. konkukian* (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2138-2139 (1998)
- HIJAZIN, M.; HASSAN, A. A.; ALBER, J.; LAMMLER, C.; TIMKE, M.; KORTZEWA, M.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; ZSCHOCK, M.** Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for species identification of bacteria of genera *Arcanobacterium* and *Trueperella*. *Veterinary Microbiology* 157 (2012) 243–245.
- HILBERT, D. W., PIGGOT, P. J.** Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 68(2): 234-262. (2004)
- HILLENKAMP, F., KARAS, M.** Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10,000 Daltons. *Analytical Chemistry*, Vol. 60, Nº. 20, pgs. 2301-2303. October, 15 (1988)
- HILLENKAMP, F., KARAS, M.; BEAVIS, R. C.; CHAIT, B. T.** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Analytical Chemistry*, v. 63, p. 1193A–1203A (1991)
- HILLENKAMP, F.; PETER-KATALINIC', J.** MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2007)
- HOFFMANN, EDMOND de.; STROOBANT, VINCENT.** *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3th Edition. John Wiley & Sons, Ltd (2007)
- HOSSAIN, M.; LIMBACH, P. A.** A Comparison of MALDI Matrices. *In: Electropray and MALDI mass Spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications.* COLE, RICHARD B., editor. 2nd Ed. Ch. 7: 215-244. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2010)
- JACKSON, S. G.; GOODBRAND, R. B.; AHMED, R.; KASATIYA, S.** *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 103–105 (1995)
- JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; KÄMPFER, P.; KOLSTØ, A. B.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J. F.; CODOÑER, F. M.;**

- ROSSELLÓ-MÓRA, R.** Systematic and description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Applied Microbiology*, 36, 383–391 (2013)
- JURAN, J. M.; GODFREY, A. B.** Juran's Quality Handbook. 5th ed. Ch 2: 2.1-2.18. Appendix IV: AIV.1. McGraw-Hill (1998)
- KOSTRZEWA, MARKUS.** Importance of Quality Control when creating own Libraries for identification of microorganisms with MALDI-TOF MS. Apresentação: Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany.
- KRUPPA, GARY.** Microbial Identification for the 21st Century. The MALDI Biotyper. Bruker-Daltonics. Protocol (2009). Fonte: <http://www.pda.org/Chapters/North-America-cont/Southeast/Presentations/Microbial-Identification-for-the-21st-Century-The-MALDI-Biotyper.aspx> (acessado em 12/dez/2013)
- LAPAGE, S. P.; SNEATH, P. H. A.; LESSEL, E. F.; SKERMAN, V. B. D.; SEELIGER, H. P. R.; CLARK, W. A.** International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990 Revision. Washington (DC), ASM Press; 1992. Citado por Logan *et al.* (2009). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8817>.
- LAU, S. K. P.; TANG, B. S. F.; TENG, J. L. L.; CHAN, T. M.; CURREEM, S. O. T.; FAN, R. Y. Y.; NG, R. H. Y.; CHAN, J. F. W.; YUEN, K. Y.; WOO, P. C. Y.** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of clinically significant bacteria that are difficult to identify in clinical laboratories. *J Clin. Pathology*, 67:361-366 (2014)
- LIU, L.; LIU, Y.; SHIN, H. D.; CHEN, R. R.; WANG, N. S.; LI, J.; DU, G. G.; JIAN, C.** Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:6113 – 6127 (2013)
- LOGAN, N. A.; BERGE, O.; BISHOP, A. H.; BUSSE, H.-J.; DE VOS, P.; FRITZE, D.; HEYNDRIKX, M.; KA"MPFER, P.; RABINOVITCH, L.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.; SELDIN, L.; VENTOSA, A.** Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2114–2121 (2009).
- LOGAN, N. A.; HALKET, G.** Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-forming Bacteria. In: **LOGAN, N. A.; DE VOS, PAUL.** Endospore-forming Soil Bacteria. *Soil Biology*, vol. 27; Ch 1: 1–29. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2011)
- LOGAN, NIAL A.** An introduction to the taxonomy of aerobic, endospore-forming bacteria. On behalf of Subcommittee on the Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Organisms of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2114–2121. Supplement (2009)
- LOHMANN, C.; SABOU, M.; MOUSSAOUI, W.; PRÉVOST, G.; DELARBRE, J. M.; CANDOLFI, E.; GRAVET, A.; LETSCHER-BRU, V.** Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS Systems for Yeast Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 51, N. 4, p. 1231–1236. April (2013)

- LPSN** – *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. Consulta: (<http://www.bacterio.net/bacillus.html#r>) em 27 de abril (2015)
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H.; WHITMAN, W. B.**. Revised road map to the phylum Firmicutes. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2th Edition, v. 3, *The Firmicutes*, pp. 1-13. Springer (2009)
- MÁRQUEZ, M. C.; SÁNCHEZ-PORRO, C.; VENTOSA, A.**. Halophilic and haloalkaliphilic, aerobic endospore-forming bacteria in soil. In: **LOGAN, N. A.; DE VOS, PAUL**. Endospore-forming Soil Bacteria. *Soil Biology*, vol. 27, ch.16: 309-339. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2011)
- MAUGHAN, H.; VAN DER AUWERA, G.**. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution* 11, pgs 789-797 (2011)
- MAZZEO, M. F.; SORRENTINO, A.; GAITA, M.; CACACE, G.; Di STASIO, M.; FACCHIANO, A.; COMI, G.; MALORNI, A.; SICILIANO, R. A.**. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for the Discrimination of Food-Borne Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 2, p. 1180-1189. Feb. (2006)
- MCKENNEY, P. T.; DRIKS, A.; EICHENBERGER, P.**. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews, Microbiology*. Vol. 11; January, 2013/33. Macmillan Publishers Limited (2013)
- MELLMANN, J. C.; MAIER, T.; KECKEVOET, U.; RAMMINGER, I.; IWEN, P.; DUNN, J.; HALL, G.; WILSON, D.; LASALA, P.; KOSTRZEWA, M.; HARMSEN, D.**. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 46, No. 6, p. 1946–1954. June (2008)
- MIROUZE, N.; DUBNAU, D.**. Chance and necessity in *Bacillus subtilis* development. *Microbiol Spectrum* 1(1): TBS-0004-2012. (2013)
- MOCK, M.; FOUET, A.**. Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 647–671 (2001)
- NAGY, ELIZABETH.** Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new possibility for the identification and typing of anaerobic bacteria. *Future Microbiology* 9(2), 217–233 (2014)
- OLIVEIRA, J. V. A.; RAIOL, T.; FARIAS N. C.; ALMEIDA, N. F.; TELLES G. P.; SETUBAL J. C.; TORRES F. A.; DEMARCO, J.; BRIGIDO, M. M.; WALTES, M. E. M. T.; DE-SOUZA, M. T.; PEPE L. M.**. Genome sequence of a novel *Bacillus* strain of the *B. cereus* group isolated from a thermal spring. The international Conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus* & *B. thuringiensis* (Bact 2013) Victoria – Canada, 01-06 de agosto (2013).
- OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; CARICATI, A.T.P.; ABDULACK-LOPES, F.; NEVES, L.C.M.; PENNA, C.P.; STEPHANO, T.C.V.; CARICATI, M.A.; CARICATI, M.A.** *Bacillus atrophaeus* inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary rabies vaccine. *Vaccine*, Vol.30: 3351-3354 (2012)
- OREM, JULIANA CAPELLA de.** Filogenia e perfil plasmidial de bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas de solo. 2014. iii, 61 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana). Universidade de Brasília, Brasília (2014)

- PAGANI, I.; LIOLIOS, K.; JANSSON, J.; CHEN, I. M.; SMIRNOVA, T.; NOSRAT, B.; MARKOWITZ, V. M.; KYRPIDES, N. C.** The Genomes OnLine Database (GOLD) v.4: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Res* 40:D571–D579 (2012)
- PAVLOVIC, M.; MEWES, A.; MAGGIPINTO, M.; SCHMIDT, W.; MESSELHÄUßER, U.; BALSLEIEMKE, J.; HÖRMANSDORFER, S.; BUSCH, U.; HUBER, I.** MALDI-TOF MS based identification of food-borne yeast isolates. *Journal of Microbiological Methods*, 106; 123–128 (2014)
- PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T.; BROWN, G. R.; MAGLOTT, D. R.** NCBI. Reference Sequences – RefSeq: current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic Acids Res* 40:D130–D135 (2012)
- RAGOUSSIS, J.; ELVIDGE, G. P.; KAUR, K.; COLELLA, S.** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry in Genomics Research. *PLoS Genet*, v.2, 1553-7390 (Print), 1553-7404 (Electronic). (2006)
- SANDRIN, T. R.; GOLDSTEIN, J. E.; SCHUMAKER, S.** MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrometry Reviews*, 2013, 32 , 188–217 (2012)
- SAUER, SASCHA; KLIEM, MAGDALENA.** Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews, Microbiology*, V. 874, January (2010)
- SCHLEIFER, K. H.** Gibbons and Murray 1978, 5 (*Firmacutes* [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2th Edition, v. 3, The *Firmicutes*, pp. 19-1317. Springer (2009)
- SCOLA, B. LA; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D.** Burden of emerging anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era. *Anaerobe, Clinical Microbiology*, 17, 106-112 (2011)
- SEDO, O.; NEMEC, A.; KRÍZOVÁ, L.; KACALOVÁ, M.; ZDRÁHAL, Z.** Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *Systematic and Applied Microbiology* 36, 572-578 (2013)
- SHIVAJI, S.; CHATURVEDI, P.; SURESH, K.; REDDY, G. S. N.; DUTT, C. B. S.; WAINWRIGHT, M.; NARLIKAR, J. V.; BHARGAVA, P. M.** *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, 56, 1465-1473
- SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A.** (editors): Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1980) 30, 225-420. MEYER, A.; GOTTHEIL, O.. In: GOTTHEIL, O.. Botanische beschreibung einiger bodenbakterien. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II, 7, 680-691 (1901)
- SOGAWA, K.; WATANABE, M.; SATO, K.; SEGAWA, S.; ISHII, C.; MIYABE, A.; MURATA, S.; SAITO, T.; NOMURA, F.** Use of the MALDI BioTyper system with Maldi-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400:1905 – 1911 (2011)
- SPEICHER, DAVID W.** Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry. *Current Protocols in Protein Science* (2000) 16.0.1-16.0.2

- STERNER, RAY T.** Quality assurance and the scientific method. The Journal of the: Of the: Rocky Mountain Regional Chapter of the Society Of Quality Assurance. Volume VII; (2):S-7 (1999)
- TANAKA, KOICHI.** The origin of macromolecule ionization by laser irradiation. Nobel Lecture, December, 8 (2002). Citando: **TANAKA, K.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.** Presented at the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry (abstract). Osaka, Japan. Sept 15-18 (1987)
- USBECK, J. C; WILDE, C.; BERTRAND, D.; BEHR, J.; VOGEL, R. F.** Wine yeast typing by MALDI-TOF MS. Applied Microbiology Biotechnology, 98:3737 – 3752 (2014)
- VERBAENDERT, I.; De Vos, P.** Studying denitrification by aerobic endospore-forming bacteria in soil. *In:* **LOGAN, N. A.; DE VOS, PAUL.** Endospore-forming Soil Bacteria. Soil Biology, vol. 27, ch.14: 271-285. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2011)
- XIE, C.; LI, J.; WANG, K.; LI, Q.; CHEN, D.** Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in older patients: A systematic review. Travel Medicine and Infectious Disease, 13: 128-134 (2015)

Biblioteca de perfis moleculares de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF, com sistema de Qualidade.

Anexo I

Flávia Porto Carreiro Araújo Bezerra

Informações adicionais requisitadas pela banca de avaliação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado em Biologia Microbiana.

Orientadora: **Profa. Dra. Marlene Teixeira De-Souza**

Co-orientador: **Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva**

Brasília, julho de 2015.

Índice

I. Introdução ao conceito de Qualidade e Controle de qualidade	3
II. Parâmetros de qualidade para plataforma suplementar de perfis de massa de microrganismos obtidos por MALDI–TOF MS	5
1. Delineamento experimental	6
2. Espectro de proteínas	7
3. Variáveis experimentais	8
4. Métodos de preparação de amostras	9
5. Matriz, laser, modo de ionização	9
6. Análise espectrométrica	11
III. Referências	13

I. Introdução ao conceito de Qualidade e Controle de qualidade

Joseph Moses Juran (1904 – 2008), um dos pioneiros na área de planejamento da Qualidade e autor das principais referências internacionais sobre qualidade, argumentou a dificuldade de uma definição concisa – uma frase curta – que descrevesse este conceito de forma mundialmente consensual. Não obstante, o autor explica qualidade dentro do contexto produtivo, como um conjunto das características de desempenho de um produto, decisivas para a satisfação do usuário, em contraponto à ausência de deficiências, que resultariam em prejuízos decorrentes da insatisfação dos clientes (Juran, 1988).

No contexto do setor produtivo e sanitário, qualidade é um termo técnico que define a conformidade de um produto, ou serviço, ao longo das etapas de produção ou execução (Brasil, 2010). Dentro da definição sanitária, qualidade não corresponde exatamente ao conceito de bom ou ruim. Está mais relacionada àquilo que é adequado, ou satisfatório, dentro de parâmetros pré-determinados pela empresa para um produto. Normalmente o perfil de qualidade de um produto é delineado considerando-se vários parâmetros como, nível de exigência do consumidor, utilização final, custo, legislação pertinente e outros (Juran, 1992; Andreolli Pinto *et al.*, 2015). Neste trabalho, a palavra será utilizada com inicial maiúscula quando fizer referência à área do conhecimento ou de gerenciamento técnico.

Idealmente, os **padrões de qualidade** devem ser delineados por diversas áreas do conhecimento, envolvendo a administração da empresa, corpo técnico e colaboração de todo o quadro funcional (Feigenbaum, 1994; Andreolli Pinto *et al.*, 2015). Isto porque, a garantia da qualidade de um produto, depende de cada detalhe relacionado, direta ou indiretamente, à sua produção, incluindo ações adequadas na área de Gestão de Pessoas (Andreolli Pinto *et al.*, 2015). Uma vez estabelecidos os padrões de qualidade, surge o conceito de **garantia da qualidade**, definido por Juran (1998) como um conjunto de atividades planejadas e sistemáticas, validadas e implementadas através de um **sistema de qualidade**, para prover a confiança desejada a um produto. Nas empresas, todos estes fatores devem ser integrados por um gestor da Qualidade, ou setor de Garantia da Qualidade (Feigenbaum, 1994).

Um **sistema de qualidade** consiste em um tipo de estrutura organizacional que envolve processos, procedimentos e recursos necessários para garantir a qualidade – padronização – de um produto (Juran e Godfrey, 1998). Na prática, um conjunto de estratégias documentadas de monitoramento e controle do processo produtivo e produto

final, fundamentadas cientificamente, que garantem a reprodutibilidade das características desejadas e forneçam informações para a melhoria dos processos.

Conforme Juran (1992), a implantação de um sistema de qualidade se inicia no **planejamento da qualidade**, denominado **primeiro processo**. Após isto, os planos são passados para a equipe de produção e executados de acordo com o planejamento. Nesta fase, inevitavelmente, surgem problemas crônicos, desperdícios e necessidade de retrabalho, devido a deficiências no planejamento inicial da qualidade. O **segundo processo** é o **controle de qualidade**, que através de ensaios pontuais revela falhas e desvios à qualidade, servindo como uma ferramenta para a aplicação de soluções imediatas, que evitem a colocação no mercado de um produto final fora do padrão de qualidade. O **terceiro processo** da trilogia, denominado **desenvolvimento da qualidade**, analisa as falhas reveladas pelo controle de qualidade e aperfeiçoa o planejamento da qualidade. Como consequência, os custos de produção sofrem redução, os limites do controle de qualidade são ajustados para uma janela mais estreita de variação na conformidade do produto a cada operação, e a qualidade final é melhorada. A figura 1 apresenta um gráfico ilustrativo do raciocínio de Juran (1992).

O Controle de Qualidade é a mais importante ferramenta da Garantia da Qualidade. Consiste em um conjunto de testes de verificação direta ou indireta de fatores que comprometem a qualidade de um produto – bem ou serviço. Esta avaliação deve ser sistemática e aplicada às etapas críticas do processo. As especificações do produto e faixas de tolerância devem ser definidas e documentadas, assim como a metodologia que será aplicada, permitindo a manutenção da qualidade mesmo entre operadores diferentes. (Andreolli Pinto *et al.*, 2015). Os parâmetros e limites são estabelecidos pela Garantia da Qualidade e, retroativamente, os resultados do controle de qualidade orientam as ações da Garantia da Qualidade na adequação e melhoramento dos processos, pois o controle de qualidade exacerba aspectos da metodologia que podem ser melhorados, revela falhas nos procedimentos, fontes de contaminação de amostras biológicas e fornece dados para melhoramento dos protocolos adotados.

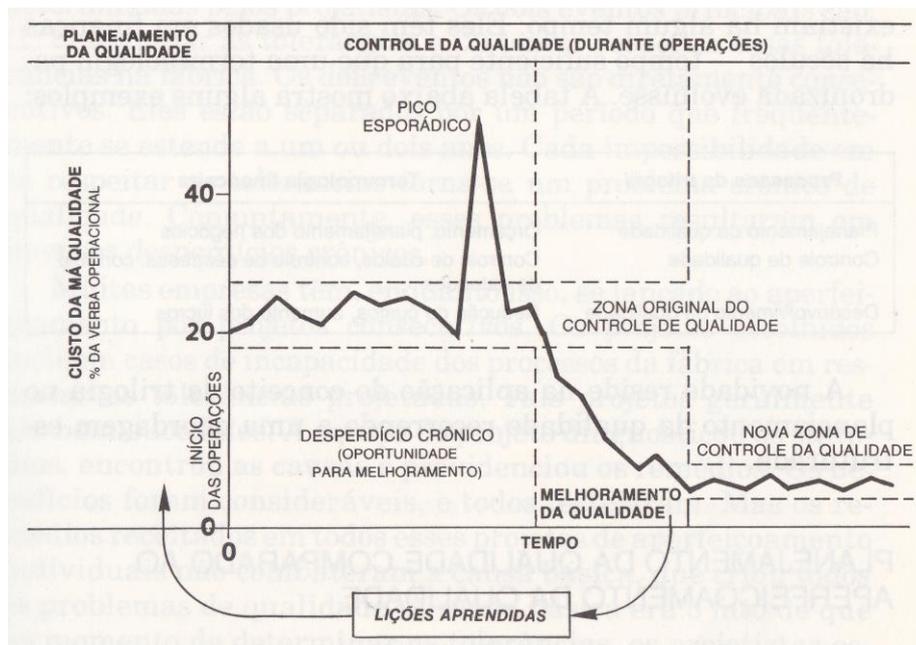


Figura 1. A trilogia Juran. Os três processos interrelacionados que possibilitam o gerenciamento da qualidade são: **planejamento da qualidade, controle de qualidade e desenvolvimento da qualidade**. A primeira fase do gráfico – após o tempo zero – apresenta o desempenho produtivo em função do tempo após a implantação de um **planejamento de qualidade**, mostrando a variação de conformidade do produto dentro dos limites do controle de qualidade e um **pico esporádico** representando um desvio de qualidade. Na segunda fase do gráfico, a curva descendente representa o processo de desenvolvimento contínuo da qualidade, através das **lições aprendidas** no estudo de soluções para as falhas de produção. Na terceira fase observa-se o estreitamento da janela de variação da qualidade do produto com melhoria da qualidade. Cada uma das fases compromete diferentemente a verba operacional da empresa, representada no eixo das ordenadas em valores percentuais. Fonte: JURAN, J. M. Juran on Planning for Quality. Tradução brasileira por Csillag, C. e Csillag, J. M.. Juran, Planejando para a Qualidade. 2a ed. Figura 1.2, pg 13. Livraria Pioneira Editora, São Paulo (1992)

II. Parâmetros de qualidade para plataforma suplementar de perfis de massa de microrganismos obtidos por MALDI–TOF MS

A plataforma de perfis de massa de microrganismos obtidos por MALDI–TOF MS se presta à identificação de estirpes desconhecidas que estejam ali representadas; seja em nível de gênero, espécie ou, mais desejável, subespécie (Sauer e Klien, 2010).

Como citado anteriormente, a análise de identificação de estirpes desconhecidas contra a plataforma se dá pela comparação estatística entre os espectros representativos desta, e o espectro da amostra desconhecida, por intermédio de programas bioinformatizados dotados de algoritmos de identificação e classificação de padrões de massa de (Sandrin *et al.*, 2013; Bohme *et al.*, 2013; Sauer e Kliem, 2010). Os espectros representativos de uma base de dados podem ser obtidos por diversas técnicas de

preparação e a partir de variados tipos de amostras microbianas: vírus (Calderaro *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2010) células vegetativas bacterianas (Sedo *et al.*, 2013; Freiwald e Sauer, 2009; Arnold *et al.*, 1999), esporos bacterianos (Dickinson *et al.*, 2004; Fenselau e Demirev, 2001), fungos (Agustini *et al.*, 2014; Lohmann *et al.*, 2013), células intactas (Sogawa *et al.*, 2011; Madonna *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 1999) ou extratos orgânicos (De Carolis *et al.*, 2014; Sedo *et al.*, 2013; Dybwad *et al.*, 2013).

1. Delineamento experimental

Os critérios de escolha das amostras, técnicas de preparação do analito, do tipo de análise espectrométrica e tratamento dos dados pós-análise, dependem dos objetivos da pesquisa. Contudo, para a construção de uma base de dados de perfis de massa de microrganismos, *a priori* deve-se considerar, dentro do objetivo final, qual tipo de tratamento será aplicado aos dados espectrométricos. Esta consideração servirá para orientar a escolha dos parâmetros de qualidade das fases pré-analítica e analítica à MALDI-TOF MS (vide: Wiangnon e Cramer, 2015; Sandrin *et al.*, 2013; Sauer e Kliem, 2010; Barwick *et al.*, 2006). Por exemplo, em abordagens do tipo biblioteca (Sandrin *et al.*, 2013), duas estratégias principais – não necessariamente interexcludentes – são utilizadas para aumentar o poder de resolução da análise comparativa entre os padrões de massa: a investigação de biomarcadores – picos específicos da estirpe – (Sandrin *et al.*, 2013; Donohue *et al.*, 2006; Holland *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 1999) e/ou aumento da amplitude de aquisição dos valores m/z detectados (Sedo *et al.*, 2013; Sandrin *et al.*, 2013; Madonna *et al.*, 2000). A estratégia escolhida para tratamento dos dados espectrais pós-análise deve ser considerada ainda na fase pré-analítica, porque as características de amplitude de aquisição, número de picos, poder de resolução e relação sinal–ruído (S/N, do inglês: *signal to noise*) são fortemente influenciadas pelo tratamento químico aplicado à amostra antes da análise espectrométrica (Wiangnon e Cramer, 2015; Sedo *et al.*, 2013; Sogawa *et al.*, 2011; Dickinson *et al.*, 2004; Fenselau e Demirev, 2001). Além disso, a metodologia utilizada para obtenção dos espectros representativos terá de ser validada *in house* para cada espécie em estudo (Lau *et al.*, 2015; De Carolis *et al.*, 2014; Dušková *et al.*, 2012).

Os protocolos disponíveis na literatura para a construção de bibliotecas de perfis de massa são extremamente variados, mas, em se tratando da implementação de uma base de dados a uma plataforma preexistente, os parâmetros experimentais devem ser similares

àqueles que foram adotados para criação da plataforma original (Freiwald e Sauer, 2009). Se as plataformas comerciais referidas anteriormente, por exemplo, foram construídas com amostras de proteínas extraídas do conteúdo celular de colônias microbianas crescidas em laboratório sob determinadas condições e utilizando-se protocolos específicos de extração de proteínas, estes parâmetros devem ser utilizados para obtenção das amostras. Neste caso, os protocolos são indicados pelos fabricantes dos equipamentos e cabe ao laboratório a adequação dos parâmetros às particularidades das espécies em estudo (vide: Wiangnon e Cramer, 2015; Agustini *et al.*, 2014; Lohmann *et al.*, 2013; Freiwald e Sauer, 2009; Dickinson *et al.*, 2004).

2. Espectro de proteínas

Teoricamente os valores de m/z observados em um espectro microbiano obtido por MALDI-TOF MS poderiam ser atribuídos a qualquer macromolécula existente no metaboloma celular, especialmente no caso de amostras não submetidas a tratamento químico específico para extração ou detecção de determinados grupos moleculares (Dreisewerd, 2014). Contudo, observa-se que espectros de bactérias intactas são constituídos predominantemente por picos correspondentes a proteínas e, muito frequentemente, proteínas ribossomais (Sauer e Klien, 2010; Freiwald e Sauer, 2009; Arnold *et al.*, 1999). Parte desta característica dos perfis de massa se explica pelas razões entre cada grupo biomolecular e o conteúdo seco total de uma célula vegetativa bacteriana: 5 a 8% de lipídios polares; 50% de proteínas (200 a 6000 variedades em uma célula vegetativa bacteriana); 0,01% de RNA (em esporos aproximadamente 1%) e cerca de 40% correspondente a outras categorias como glicídios e DNA (Fenselau e Demirev, 2001). Por conseguinte, a detecção predominante de proteínas em uma amostra microbiana intacta, aparentemente é facilitada por sua profusão no conteúdo celular (Fenselau e Demirev, 2001). De fato, estudos de identificação de proteínas têm demonstrado que a grande maioria dos picos detectados em amostras bacterianas por MALDI-TOF MS são de origem proteica e, muito frequentemente ribossomal (Sauer e Klien, 2010; Freiwald e Sauer, 2009; Schaller *et al.*, 2006; Holland *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 1999).

Em análises de células intactas, fatores relacionados à técnica de preparação de amostras também irão contribuir ou não para a predominância de picos de proteínas nos espectros (Dreisewerd, 2014). Vários estudos, como Holland *et al.*, (1999) e Arnold *et al.*,

1999, confirmam a predominância de picos de proteínas no espectro de células intactas. Os primeiros isolaram proteínas detectadas em HPLC, e as identificaram baseados nas massas espectrais e sequência parcial de amino ácidos utilizando o método de Edman. Arnold *et al.* (1999), obtiveram a eliminação de todos os picos do espectro de massa ao tratarem previamente as amostras com tripsina. Em relação à predominância de conteúdo ribossomal, entretanto, um estudo realizado por Schaller *et al.* (2006) com extrato de proteínas da membrana externa de subespécies de *Moraxella catarrhalis*, geraram perfis moleculares notavelmente similares aos perfis de células intactas, sugerindo que a grande maioria dos picos obtidos por MALDI–TOF ICMS em suas amostras eram originários da membrana externa.

A metodologia adotada atualmente para construção de plataformas de perfis de massa de microrganismos, incluindo as plataformas comerciais, envolve métodos de extração de proteínas celulares, com a utilização de solventes químicos para ruptura das estruturas de parede celular e membranas, e a solubilização das proteínas, aumentando a concentração destas no analito. Os métodos também facilitam a detecção de proteínas básicas, como as ribossomais (De Carolis *et al.*, 2014; Lohmann *et al.*, 2013; Sauer e Klien, 2010; Freiwald e Sauer, 2009). O delineamento experimental pode ser deveras facilitado pela grande quantidade de informações técnicas, protocolos e estudos disponibilizados na literatura.

3. Variáveis experimentais

É consenso entre autores da área que diversos parâmetros experimentais afetam a reprodutibilidade dos padrões de massa de proteínas detectados em microrganismos, influenciando a reprodutibilidade e confiabilidade do método (Wiangnon e Cramer, 2015; Lohmann *et al.*, 2013; Sauer e Kliem, 2010; Freiwald e Sauer, 2009; Shroff *et al.*, 2009; Fenselau e Demirev, 2001; Wang *et al.*, 1998). Conforme Zenobi e Knochenmuss (1998), um espectro de massa pode ser observado como uma função de várias variáveis, as mais relevantes sendo: **i)** tipo de matriz, **ii)** propriedades físicas e químicas do analito, **iii)** concentrações, **iv)** métodos de preparação de amostras, **v)** características do laser, **vi)** condições ambientais e, **vii)** método de obtenção de íons. Estes parâmetros afetam o espectro de massa através do processo de formação de íons e determinam a qualidade da análise de MALDI–TOF (Dreisewerd, 2014; Dreisewerd, 2014 *apud* Knochenmuss, 1999; Barwick *et al.*, 2006; Zenobi e Knochenmuss, 1998).

4. Métodos de preparação de amostras

Uma vez selecionados os protocolos adequados ao tipo de investigação e organismo em estudo, os procedimentos de preparação de amostras, desde a fase de cultivo ao momento da análise por MALDI-TOF MS, necessitam fina padronização para garantir a reprodutibilidade dos resultados (Sauer e Kliem, 2010). Estudos comprovam que uma mesma espécie pode produzir espectros de massa diferenciados quando utilizadas diferentes condições de cultivo ou quando as colônias são coletadas em diferentes fases do crescimento vegetativo. (Sauer e Kliem, 2010; Freiwald e Sauer, 2009; Fenselau e Demirev, 2001; Arnold *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998). Conforme Arnold *et al.* (1999), os espectros podem variar qualitativamente – variação na intensidade do pico, e quantitativamente – picos presentes em dado tempo de crescimento podem estar ausentes em outros momentos. Atualmente, o tratamento estatístico dos dados pós-análise por intermédio de algoritmos bioinformatizados tende a minimizar estas variações experimentais, contudo, Freiwald e Sauer (2009) consideram que o não controle das condições de preparação da amostra, fase do crescimento microbiano, condições de cultivo e estocagem, prejudicam, principalmente, a identificação em nível de subespécie. Os autores atribuem pouco comprometimento de desempenho da análise identificatória entre diferentes instrumentos de MALDI-TOF.

Na análise de organismos intactos, tratamentos com ácidos orgânicos fortes, alcoóis e métodos físicos podem ser utilizados para derruir paredes celulares de esporos bacterianos e fungos ou lisar vírus, aumentando a exposição do conteúdo orgânico à ação da matriz (Madonna *et al.*, 2000; Fenselau e Demirev, 2001). A composição e concentração dos solventes utilizados com esta finalidade ou para obtenção de extratos peptídeos a partir do conteúdo celular apresentam efeito significativo sobre o padrão de massa adquirido. Variações no protocolo de extração de proteínas podem gerar diferentes espectros de massa para uma mesma estirpe (Wang *et al.*, 1998).

5. Matriz, laser, modo de ionização

A escolha da matriz de dessorção está relacionada ao tipo de amostra, grupo molecular alvo – propriedades físicas e químicas do analito, tipo de espectrômetro que será utilizado e características do laser (Barwick *et al.*, 2006; Koubenakis *et al.*, 2004; Cohen e

Chait, 1996). As propriedades físico-químicas da matriz determinam a extensão da cocristalização e codesorção com o analito na placa analisadora, da eficiência de ionização do analito durante a aplicação do pulso de luz laser, dos limites de detecção do analito e discriminação de massas (Wiangnon e Cramer, 2015; Shroff *et al.*, 2009; Barwick *et al.*, 2006; Cohen e Chait, 1996).

Entre as matrizes de MALDI disponíveis comercialmente, as mais utilizadas para a análise de proteínas são: o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), ácido sinapínico, ou sinápico (SA), e o ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB). Tipicamente são ácidos carboxílicos com funções aromáticas que devem apresentar as propriedades de co-cristalizar com o analito de interesse, absorver eficientemente a energia laser, produzir espécies iônicas reativas para ionização do analito – protonação, desprotonação e ou formação de aduto com íons alcalinos e ou halógenos. Além destas, diversas outras matrizes são utilizadas com finalidades específicas como análise de lipídeos e complexos não-covalentes (Dreisewerd, 2014). Outro aspecto relevante a ser considerado no delineamento experimental é a interrelação entre a metodologia de preparação da amostra, escolha da placa analisadora e desempenho da matriz, demonstrado no estudo realizado por Wiangnon e Cramer (2015).

Conforme Zenobi e Knochenmuss (1998) e Dreisewerd (2014), outros parâmetros particularmente importantes em espectrometria de massa MALDI, são o comprimento de onda do laser, a duração do pulso e profundidade de penetração na matriz cristalizada. O comprimento de onda mais utilizado é 337 nm, relativo ao laser de nitrogênio (N₂), com energia do fóton correspondente a 85 kcal/mol ou 3,68 eV, e largura de pulso típica de aproximadamente 1 ns.

Dreisewerd (2014) afirma não haverem diferenças significativas de desempenho da MALDI relativas à variação de duração do pulso laser, entre lasers do mesmo tipo. Resultados não desejáveis relacionados ao ajuste de parâmetros do laser, são: formação de íons de cargas múltiplas, fragmentação excessiva da amostra e formação de adutos (Dreisewerd, 2014).

A qualidade dos espectros obtidos também depende da escolha do modo de ionização – polaridade positiva ou negativa do campo elétrico – podendo ocorrer falha de aquisição ou má qualidade dos espectros com a utilização da polaridade inadequada. A escolha do **modo de ionização** se baseia nas informações sobre polaridade, massa molecular e estabilidade térmica do analito (Barwick *et al.*, 2006). O modo de ionização positivo é o mais utilizado em análises de misturas de proteínas, contudo, a polaridade negativa pode favorecer a

estabilidade de moléculas carregadas negativamente e fornecer informações complementares ao perfil de massa da estirpe (Dreisewerd, 2014; Barwick *et al.*, 2006; Fenselau e Demirev, 2001).

6. Análise espectrométrica

A análise espectrométrica deve ser precedida pela aferição do instrumento e calibração da escala de m/z com uma amostra padronizada que produz íons com razões m/z conhecidas, tipicamente misturas peptídicas, cepa padrão ou albumina de soro bovino, indicadas pelo fabricante do equipamento. A amostra padrão é analisada conforme protocolo padrão, servindo como referência para ajuste da escala de m/z com obtenção de valores corretos para os picos de calibração, além disso, os padrões de calibração devem fornecer valores de m/z além da amplitude de aquisição do analito (Wiangnon e Cramer, 2015; Freiwald e Sauer, 2009; Barwick *et al.*, 2006). Conforme Barwick *et al.*, 2006, a frequência de calibração irá depender do instrumento e dos objetivos da análise, observando-se que a calibração de massa é um parâmetro crítico para a precisão dos picos e confiabilidade dos espectros.

É recomendada uma pré-aquisição com o analito teste, preparado conforme protocolo padrão, para avaliar a qualidade do espectro e performance do equipamento. A aquisição de um espectro de fundo antes das análises principais, é útil para identificar a presença de contaminantes no equipamento pela detecção de íons de fundo (Barwick *et al.*, 2006). Na obtenção de perfis de massa para biblioteca suplementar, uma cepa típica do gênero em estudo pode ser utilizada como padrão interno de controle de qualidade, idealmente, uma cepa com representatividade na plataforma original (Wiangnon e Cramer, 2015; Freiwald e Sauer, 2009; Barwick *et al.*, 2006).

Referenciando técnicas de análise espectrométrica e equipamentos variados, Barwick *et al.* (2006), apresentam os principais aspectos a serem observados sobre a qualidade de aquisição dos espectros, aferição do equipamento e conferência dos espectros, tais como: razões sinal-ruído, valores de resolução de picos, reprodutibilidade, procedimentos de controle de qualidade espectrométrico, a necessidade de Boas Práticas de Laboratório e registro adequado dos dados adquiridos. Zenobi e Knochenmuss (1998) e Dreisewerd (2014) elucidam estes conceitos e sua aplicabilidade no contexto da espectrometria de massa MALDI-TOF. Barwick *et al.* (2006) sugerem que os documento de registro dos resultados

espectrométricos devam conter, minimamente, as seguintes informações: **i)** modo de ionização e polaridade utilizada; **ii)** data da análise e tipo de instrumento; **iii)** tratamento químico aplicado, tipo de amostra e concentrações de trabalho; **iv)** tratamento de dados pós-aquisição; **v)** rotulagem de áreas ampliadas com referência ao grau de ampliação e intervalo pertinente; **vi)** outras informações essenciais e; **vii)** localização do arquivo de dados.

III. Referências

- AEBERSOLD, R.; MANN, M.** Mass spectrometry based proteomics. *Nature*. V. 422; 13. March (2003)
- ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária.** Critérios para a Habilitação de Laboratórios Segundo os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL). Procedimento GGLAS 02/BPL. Revisão 00. Procedimentos Operacionais da REBLAS – Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública. 1.ed. Brasília (2001)
- ARNOLD R. J.; KARTY, J. A.; ELLINGTON, A. D.; REILLY, J. P.** Monitoring the growth of a bacteria culture by MALDI-MS of whole cells. *Anal. Chem.* 71, 1990 – 1996 (1999)
- BARWICK, V.; LANGLEY, J.; MALLET, T.; STEIN, B.; WEBB, K.** Best practice guide for generating mass spectra. LGC Limited (2006)
- BRASIL.** Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.
- CALDERARO, A.; ARCANGELETTI, M. C.; RODIGHIERO, I.; BUTTRINI, M.; GORRINI, C.; MOTTA, F.; GERMINI, D.; MEDICI, M. C.; CHEZZI, C.; DE CONTO, F.** Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Scientific Reports*, 4 : 6803 (2014)
- DE CAROLIS, E.; VELLA, A.; VACCARO, L.; TORELLI, R.; POSTERARO, P.; RICCIARDI, W.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.** Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry-based yeast identification using a fast protein extraction procedure. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 52; 5 p. 1453–1458 (2014)
- COHEN, S. L.; CHAIT, B. T.** Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins. *Analytical Chemistry*. Vol. 68;1, p. 31 - 37 (1996)
- CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W.** Espectrometria de massa de proteínas. O papel chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. Ano IX. Nº 36. Jan/jun (2006)
- DYBWAD, M.; VAN DER LAAKEN, A. L.; BLATNY, J. M.; PAAUW, A.** Rapid identification of *Bacillus anthracis* spores in suspicious powder samples by using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 79; 17, p. 5372–5383 (2013)
- DICKINSON, D. N.; LA DUC, M.T.; HASKINS, W.E.; GORNUSHKIN, I.B.; WINEFORDNER, J.D.; POWELL, D.H.; VENKATESWARAN, K.** Species differentiation of a diverse suite of *Bacillus* spores using mass spectrometry based protein profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 475–482 (2004)
- DREISEWERD, KLAUS.** Recent methodological advances in MALDI mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406:2261 – 2278 (2014)
- FEIGENBAUM, ARMAND V.** Total Quality Control. 4th Ed. Vol.I, McGraw Hill (1991)
- FENYO, D.; BEAVIS, R. C.** Informatics development: challenges and solutions for MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 27; 1– 19 (2008)

- FRANCO, C. F.; MELLADO, M. C. M.; ALVES, P. M.; COELHO, A. V.** Monitoring virus-like particle and viral protein production by intact cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Talanta*, 80; 1561–1568 (2010)
- HOLLAND, R. D.; DUFFY, C. R.; RAFII, F.; SUTHERLAND, J. B.; HEINZE, T. M.; HOLDER, C. L.; VOORHEES, K. J.; LAY Jr, J. O.** Identification of bacterial proteins observed in MALDI-TOF mass spectra from whole cells. *Analytical Chemistry*, Vol. 71; 15, 3226 – 3230 (1999)
- HOLLAND, R. D.; RAFII, F.; HEINZE, T. M.; SUTHERLAND, J. B.; VOORHEES, K. J.; LAY JR, J. O.** Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric detection of bacterial biomarker proteins isolated from contaminated water, lettuce and cotton cloth. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14;911-917 (2000)
- JURAN, JOSEPH MOSES.** *Juran on Planning for Quality*. The Free Press, 341 pgs (1988)
- JURAN, JOSEPH MOSES.** *Juran on Quality by Design*. The new steps for planning quality into goods and services. The Free Press, 538 pgs (1992)
- JURAN, J. M.; GODFREY, A. B.** *Juran's Quality Handbook*. 5th ed. Ch 2: 2.1-2.18. Appendix IV: AIV.1. McGraw-Hill (1998)
- KOUBENAKIS, A.; FRANKEVICH, V.; ZHANG, J.; ZENOBI, R.** Time-resolved surface temperature measurement of MALDI matrices under pulsed UV laser irradiation. *J. Phys. Chem. A*, Vol. 108, No. 13 (2004)
- MADONNA, A. J.; BASILE, F.; FERRER, I.; MEETANI, M. A.; REES, J. C.; VOORHEES, K. J.** On-probe sample pretreatment for the detection of proteins above 15 KDa from whole cell bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 14, 2220–2229 (2000)
- SAUER, SASCHA; KLIEM, MAGDALENA.** Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews, Microbiology*, V. 874, January (2010)
- SCHALLER, A.; TROLLER, R.; MOLINA, D.; GALLATI, S.; AEBI, C.; STUTZMANN, M. P.** Rapid typing of *Moraxella catarrhalis* subpopulations based on outer membrane proteins using mass spectrometry. *J. Proteomics* 6:172–180 (2006)
- SHROFF, R.; RULISEK, L.; DOUBSKY, J.; SVATOS, A.** Acid–base-driven matrix-assisted mass spectrometry for targeted metabolomics. *PNAS*, Vol. 106; 25, p. 10092–10096 (2009)
- SOGAWA, K.; WATANABE, M.; SATO, K.; SEGAWA, S.; ISHII, C.; MIYABE, A.; MURATA, S.; SAITO, T.; NOMURA, F.** Use of the MALDI BioTyper system with Maldi-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400:1905 – 1911 (2011)
- WANG, Z.; RUSSON, L.; LI, L.; ROSER, D. C.; LONG, S. R.** Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*. 12, 456–464 (1998)
- WIANGNON, K.; CRAMER, R.** Sample preparation: a crucial factor for the analytical performance of rationally designed MALDI matrices. *American Chemical Society*; 87, 1485–1488 (2015)
- ZENOBI, R.; KNOCHENMUSS, R.** Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 17, 337–366 (1998)