

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**

Suplemento

Flávia Porto Carreiro Araújo Bezerra

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

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

Brasília, junho de 2015.

Parte I

Procedimentos Operacionais Padrão e

Registros de Procedimentos

MT 01 – Utilização e manutenção das salas limpas

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	27/10/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definições

Sala limpa é um termo técnico que designa um ambiente fechado, desinfetado, cuja planta e estrutura física permitem o controle do fluxo de ar e a limitação do número de partículas em suspensão. A sala limpa do LaBafes é a capela de segurança biológica (CSB) que se encontra na sala I1-25/5, identificada como sala do “Fluxo laminar” (Figura 1A). A CSB do LaBafes (Figura 1B) é Veco, Modelo: VLFS 12M (Classe II tipo B2), que possui fluxo laminar e circula o ar filtrado na sala de trabalho onde está instalada. Ambas, a capela e a sala, devem ser tratadas como compartimentos limpos de acesso limitado e utilizadas dentro de critérios de biossegurança.



Figura 1. Visão externa e interna da sala I1-25/5. (A) CSB. (B) A sala I1-25/5, identificada com a placa “Fluxo laminar”, é um ambiente de acesso controlado reservado à execução de procedimentos estéreis. O interruptor das luzes UV localiza-se ao lado da porta e uma lâmpada externa se acende quando as lâmpadas UV estão ligadas no interior da sala (setas azuis).

A CSB é também um ambiente de contenção biológica, onde são realizados procedimentos estéreis e/ou com potencial de contaminação. Para tanto a CSB possui um sistema de injeção, direcionamento e exaustão de ar. Ao acionar o funcionamento do sistema de circulação, o ar externo é injetado pelo teto do compartimento através de um filtro HEPA (do inglês: *High Efficiency Particulate Air*) e sugado na base, ao fundo da capela, através dos furos na placa metálica (Figura 2A) formando um fluxo unidirecional. A corrente de ar também é sugada através da placa perfurada (Figura 2B) na entrada, abaixo do vidro de proteção. Este último efeito forma um fluxo laminar de ar (Figura 3) entre o operador e o interior da cabine que isola os dois ambientes, evitando a entrada e saída de partículas. O ar exaurido é devolvido ao ambiente após filtragem. Desta forma a CSB protege o operador, o material e a sala de trabalho, desde que não ocorra perturbação dos fluxos de ar.

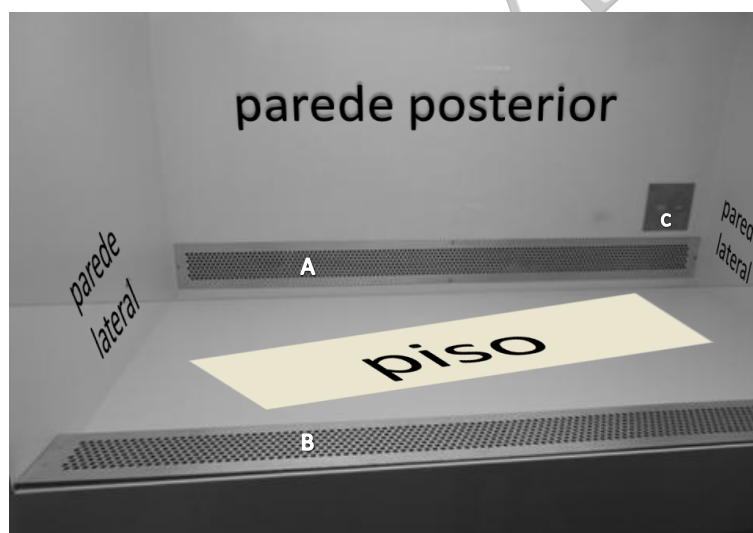


Figura 2. Interior da Capela de segurança biológica. A corrente de ar, que se forma no interior da capela quando acionado o sistema de circulação de ar, sai do teto e é sugada através dos orifícios nas placas metálicas ao fundo do piso (**A**) e abaixo na entrada, abaixo do vidro de proteção (**B**). As partes identificadas na imagem, paredes posterior, lateral e piso, serão referidas ao longo do texto. Na parede posterior há uma tomada de força (**C**) com duas entradas para utilização de equipamentos elétricos, como o esterilizador de alças de platina.

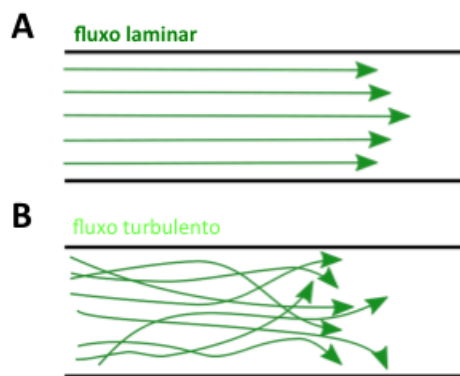


Figura 3. Fluxo laminar. Em um fluxo laminar **(A)** há um mínimo de agitação das diversas camadas de fluido, que se deslocam em planos paralelos, sem se misturar. Neste tipo de fluxo o vetor velocidade é aproximadamente constante em cada ponto do fluido e não se cruzam, tal como descrito para o fluxo turbulento **(B)**.

A CSB é dotada de lâmpadas ultravioleta (UV) para esterilização das superfícies internas e iluminação de trabalho (luz branca). O revestimento interno é de tinta à base de epóxi (piso) e fórmica (paredes). A CSB se destina à execução de procedimentos estéreis ou com potencial de disseminação biológica. Denominamos aqui **procedimento estéril** aquele que é executado em ambiente esterilizado, com utensílios esterilizados e se caracteriza pela exigência de não contaminar amostras de trabalho. Tanto a CSB, quanto a sala onde está instalada, devem ser tratadas como compartimentos limpos de acesso limitado e utilizadas dentro dos critérios de Biossegurança estabelecidos neste procedimento.

Uma **sala limpa** só é considerada como tal, se estiver contida em outra sala limpa com um grau de limpeza igual ou um pouco menor. Portanto, para garantir a eficácia do sistema de contenção e o ambiente estéril dentro da CSB, as condições de desinfecção e segurança devem ser observadas dentro e fora da capela, começando pelo ambiente laboratorial e aumentando-se o grau de exigência de controle da qualidade ambiental da sala limpa que contem a CSB.

Alguns aspectos técnicos mantêm a condição de esterilidade no ambiente interno da CSB: **i)** os filtros possuem a capacidade de retenção de partículas tão pequenas quanto células vegetativas e esporos, mas são sensíveis à umidade; **ii)** a radiação UV tem baixa penetrabilidade e só é eficaz na esterilização de superfícies limpas e do ar. O volume de ar dentro do compartimento varia entre os modelos de cabines e, portanto, o tempo de renovação completa do ar poluído por ar filtrado também. Para a CSB da sala I1-25/5, o

tempo de 30 min é suficiente para estabilização do fluxo laminar e ação eficaz da luz UV na esterilização das superfícies e do ar.

O termo **sistema de esterilização** será utilizado frequentemente nos POPs que se seguem e se refere ao sistema de circulação de ar – ou fluxo laminar – acionado junto com as lâmpadas UV acesas.

A esterilidade dentro da CSB é corrompida se as correntes de ar forem perturbadas ou se for introduzido material contaminado durante o procedimento. Atenção especial deve ser dada às:

- mangas de jalecos;
- caixas de armazenamento de amostras em refrigeradores;
- superfícies externas de frascos e microtubos usados contendo amostras biológicas;
- frascos e microtubos de armazenamento em geladeira e bancadas em geral.

A **contaminação microbiológica de material** e amostras de trabalho pode ocorrer por células vegetativas ou esporos e consiste no principal problema em se tratando da análise espectrométrica de estirpes desconhecidas. Denomina-se **contaminação cruzada**, à contaminação de uma amostra por outra durante a manipulação. A contaminação cruzada ocorre facilmente quando se trabalha com estirpes diferentes, ao mesmo tempo, dentro da CSB.

A **contaminação cruzada entre amostras de esporos secos e suspensões de esporos** merece especial atenção. Este tipo de contaminação produz viés experimental na análise espectrométrica e só é perceptível, após crescimento das colônias, se estas apresentam morfologias bem distintas, o que nem sempre ocorre entre linhagens de Bafes. Como agravante, as colônias destinadas à MALDI-TOF MS são utilizadas no início do crescimento, antes de se tornarem visíveis as características morfológicas típicas de colônias isoladas. Não é possível detectar este tipo de contaminação na análise espectrométrica, a não ser que os microrganismos em questão já estejam inseridos na base de dados.

A presença de contaminantes microbiológicos diminui o fator de reprodutibilidade das colônias analisadas, acarreta a obtenção de um conjunto dúbio de espectros e, por consequência, o espectro mestre calculado será ineficaz na identificação de novas amostras.

II. Objetivos

Orientar procedimentos básicos em ambiente estéril e a correta utilização e manutenção da CSB e sala onde está instalada. Dar suporte às ações de treinamento de pessoal.

Este POP é imprescindível para garantir a qualidade dos experimentos realizados pela equipe, prevenir contaminação de amostras e atender critérios de Biossegurança para laboratórios de Microbiologia.


III. Material

A. Material de limpeza e desinfecção

- ✓ Detergente/desengordurante multiuso
- ✓ Álcool comercial 96° GL
- ✓ Álcool desinfetante (etanol 70% - V/V)
- ✓ Hipoclorito de sódio comercial 2% (p/p)
- ✓ Luvas de borracha para limpeza geral
- ✓ Luvas de procedimento para limpeza do interior da capela
- ✓ EPI: jaleco, máscara e touca Papel toalha resistente à água
- ✓ Papel toalha resistente à água
- ✓ Pano de limpeza esterilizado
- ✓ Balde, rodo e pano de chão (exclusivos)

B. Material básico para procedimento estéril


- ✓ Alças de platina
- ✓ Esterilizador de alças de platina
- ✓ Alças de transferência descartáveis
- ✓ Alças de Drigalski descartáveis
- ✓ Placas de Petri descartáveis
- ✓ Placas de Petri contendo meio sólido apropriado
- ✓ Abridor de tubos eppendorf (esterilizado)
- ✓ Estante suporte para microtubos (esterilizada)
- ✓ Estante suporte para pipetas (desinfetada)
- ✓ Tiras de Parafilm M®
- ✓ Frasco lixeira (vidro de boca larga esterilizado)
- ✓ Papel toalha
- ✓ Luvas de procedimento
- ✓ Luvas de procedimento estéreis


 *Portar luvas de tamanho adequado: luvas grandes diminuem o tato e causam acidentes.*

IV. Procedimentos estéreis

Como dito, a proteção do ambiente interno da CSB pelo sistema de fluxo de ar é falível, se as correntes de ar forem perturbadas ou se forem introduzidos materiais contaminados. Em razão do direcionamento da corrente de ar para baixo, qualquer partícula em suspensão acima de um recipiente aberto será arrastada para dentro do recipiente, portanto, os movimentos de trabalho na CSB devem ser treinados e aperfeiçoados conforme instruções a seguir.

A. Boas práticas de trabalho na CSB


1. Fazer movimentos lentos.
2. Eliminar correntes de ar no ambiente externo (sala da CSB).
 *É vedado o uso de ventiladores em laboratórios de segurança!*
3. Não colocar mãos, braços e mangas de jalecos sujos dentro da capela.
4. Aguardar pelo menos 30 min com o sistema de circulação de ar e luzes UV ligados antes de introduzir o material esterilizado.
5. Utilizar apenas material esterilizado na capela.
6. Após introdução do material de trabalho, aguardar mais 30 min com o sistema de esterilização ligado (luzes UV acesas e sistema de circulação de ar acionado – vide item Definição) antes de iniciar o procedimento e, somente após este tempo, inserir as amostras biológicas na capela.
7. Durante o procedimento na capela, nunca passar as mãos ou qualquer material sobre amostras abertas, placas de cultivo, frascos de meio de cultura e outros recipientes estéreis abertos.

 Em razão do direcionamento vertical do fluxo, qualquer partícula que esteja em suspensão no ar acima de um recipiente aberto será arrastada para dentro deste.


 *Esta falha de procedimento é causa certa de contaminação.*

8. Manter as janelas do LaBafes permanentemente fechadas para evitar a entrada de insetos voadores e partículas contaminadas.

9. Ocorrendo **entrada de insetos** dentro do compartimento da CSB durante a manipulação de amostras ou procedimento prévio de esterilização, retomar o experimento desde o início, a partir da desinfecção da capela.

 *Sob qualquer suspeita de contaminação, reiniciar o procedimento estéril a partir dos primeiros passos e segregar as amostras contaminadas.*

10. A **interrupção da energia elétrica** compromete a condição de esterilidade da CSB durante o procedimento, pois o equipamento não se encontra ligado a uma fonte de alimentação ininterrupta de energia (*nobreak*).

 *Ocorrendo interrupção do fluxo de ar, considerar contaminadas todas as amostras abertas. Tratando-se de placas meio sólido em preparação (abertas), o lote deve ser descartado.*


B. Manipulação de microtubos na CSB

As **amostras de microrganismos** da CBafes são armazenadas em microtubos do tipo eppendorf (em uso) ou criotubos (estoque). O manuseio inadequado dos microtubos é a principal fonte de contaminação. Este requer habilidade com ambas as mãos e treinamento orientado por um operador experiente e em conformidade com este procedimento).


Criotubos são utilizados principalmente para o armazenamento de esporos secos, contidos em tiras de papel de filtro, e suspensões estoque de esporos; possuem tampas rosqueadas e vedação eficiente por anel de borracha, sendo indicados para armazenamento seguro por tempo prolongado. A abertura e fechamento de criotubos requer treinamento e habilidade para desenroscar as tampas com apenas uma mão, sem fazer movimentos sobre a amostra aberta ou tocar as bordas da tampa ou do tubo.

Os **microtubos do tipo eppendorf** possuem tampas de fechamento por pressão e encaixe, e são utilizados para armazenamento de suspensões de trabalho, amostras utilizadas com frequência e substâncias químicas líquidas ou sólidas (pós) em micro quantidades.

1. Em procedimentos estéreis os tubos eppendorf devem ser abertos com abridores esterilizados para evitar o toque nas bordas da tampa ou do tubo.
2. Não abrir tubos eppendorf com apenas uma das mãos, em se tratando de amostras biológicas: deve-se segurar o tubo com uma mão e suspender a tampa por trás com os dedos da outra mão, com firmeza e cuidado para não tocar as bordas ou cruzar o espaço aéreo acima da amostra aberta.

 *Abridores de tubos eppendorf são ótimos auxiliares em procedimentos estéreis, pois o formato permite a abertura do microtubo sem esforço e sem tocar a borda do tubo ou da tampa.*

3. Ao escolher uma estante de apoio para microtubos, observar se estes realmente se encaixam nos orifícios do suporte; se podem ser colocados e retirados com facilidade.
4. Distribuir os microtubos na estante deixando espaços vazios entre um tubo e outro, de forma a facilitar o manuseio.

 *Evitar condições em que seja necessário aplicar força durante a manipulação de amostras; isto pode gerar movimentos bruscos, derramamento de conteúdo e respingos que contaminam as luvas ou outro material próximo.*


5. A abertura de vários microtubos em uma estante ao mesmo tempo, como, por exemplo, para distribuição de água, pode ser necessária, mas deve-se trabalhar de forma a não fazer movimentos sobre amostras abertas, abrindo as amostras a partir da fileira mais distante e iniciando o fechando a partir da fileira mais próxima.


 *Deixar espaçamento de pelo menos um microtubo entre as fileiras. O treinamento individual é imprescindível.*

6. **A manipulação de esporos secos exige cuidados especiais:**

 *Não deixar outras amostras ou qualquer material atrás do microtubo que está sendo manuseado!*

 *Observar que o sentido do fluxo de ar é de cima para baixo e para trás.*

 *Manipular uma amostra por vez e fechar os microtubos imediatamente evitando exposição desnecessária ao ambiente.*

 *Havendo suspeita de contaminação, realizar o procedimento MT 06 - Controle de qualidade microbiológico (A, B ou C) para as suspensões e cultivos sob suspeita.*

E. Procedimento geral

Os cuidados de manutenção e as operações descritas a seguir são necessários para proteção do ambiente, das amostras e do operador. Este POP se aplica a todos os procedimentos estéreis descritos neste manual. Antes de iniciar qualquer procedimento na CSB, observe as condições de higiene e desinfecção do espaço:

1. A capela foi limpa adequadamente pelo usuário anterior?


2. O sistema de ventilação da capela estava em funcionamento por pelo menos 30 min?
3. As luzes UV da CSB e da sala estavam acesas a, pelo menos, 30 min?
4. A lixeira da sala está vazia e limpa?
5. A sala está limpa e organizada?

Se estas condições estiverem satisfeitas, o trabalho pode ser iniciado a partir do próximo item:

6. Fazer a assepsia das mãos e antissepsia com etanol 70% antes de iniciar qualquer trabalho na sala ou na CSB (MT 02 – Procedimentos básicos).
7. Com o sistema de circulação desligado, suspender o vidro de proteção e limpar a CSB com detergente/desengordurante não abrasivo, começando pela parte alta das paredes, superfície das lâmpadas e descendo.

 *Cuidado para não tocar os contatos elétricos das lâmpadas!*

8. Umedecer o papel toalha com o produto de limpeza e esfregar as superfícies internas da capela, começando pela parte posterior do piso (Figura 2) a frente com movimentos em forma de oito deitado (∞).


 *Não utilizar pano ou qualquer outro material não descartável para limpeza interna da CSB! Risco de disseminação de esporos e células vegetativas para outros ambientes.*

9. Repetir a limpeza com etanol 70% e papel toalha.

 *Não aspergir produtos de limpeza dentro da capela! A umidade danifica o filtro de ar (HEPA).*

10. Ligar o sistema de esterilização ligado, apagar a luz branca da sala, sair, fechar a porta e ligar a lâmpada UV no interruptor externo que fica na parede ao lado da porta (Figura 1A). Aguardar pelo menos 30 min antes de iniciar qualquer procedimento na CSB.

11. Após 30 min, desligar as lâmpadas UV da sala e capela, mantendo o sistema de circulação de ar ligado.

 *Desligar o sistema de circulação de ar após a retirada de todo o material da capela.*

12. Lavar as mãos, fazer a antissepsia com etanol 70% e organizar na capela todos os utensílios esterilizados.

13. Limpar e pulverizar sacos plásticos de material estéril comercial com etanol 70% no momento de introduzi-los na cabine.

14. Abrir parcialmente os invólucros do material autoclavado, próximo à fronteira do fluxo laminar, e inserir os utensílios retendo o papel.

💡 *Não introduzir papéis de embalagem dentro da CSB, exceto embalagens de material estéril comercial e após assepsia: as embalagens comerciais de produtos esterilizados são de papel encerado ou plastificado, menos porosos e de fácil desinfecção por etanol 70%.*

15. Pôr a lixeira de capela em um dos cantos, próximo à abertura da CSB (Figura 4A).
16. Se for utilizar o esterilizador de alças de platina, posicionar o mesmo próximo à tomada de força da cabine a, pelo menos, 25 cm das paredes (Figura 4A e B). Observar a posição mais ergonômica para não precisar movimentar o aparelho após o aquecimento.

⚠️ *Sempre segurar o esterilizador pela base. Este pode ter sido utilizado anteriormente e ainda estar quente!*

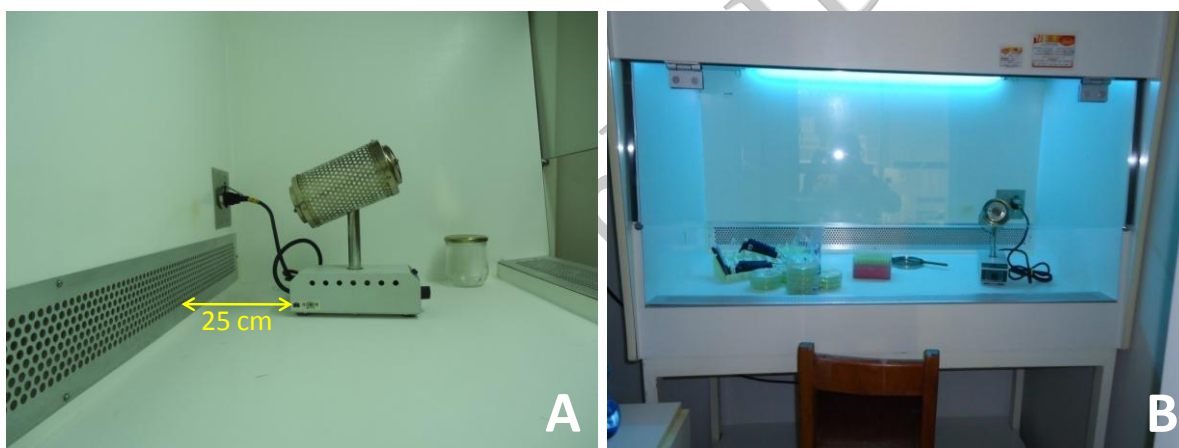


Figura 4. Visão interna da Capela de segurança biológica. (A) Vista lateral mostrando o posicionamento do esterilizador elétrico a 25 cm da parede posterior e pote de vidro utilizado como lixeira de CSB. **(B)** CSB com sistema de esterilização ligado contendo alguns instrumentos de trabalho. Observar a posição do esterilizador e a placa de aço inoxidável para suporte da alça de platina, evitando contato com o piso durante o procedimento.

17. Ligar novamente a lâmpada UV da CSB, sair, ligar a lâmpada UV da sala e aguardar 30 min.
18. Após 30 min, desligar as lâmpadas UV da capela e da sala e acender as lâmpadas brancas (de trabalho).
19. Lavar as mãos e separar as amostras biológicas que serão utilizadas em uma estante para microtubos esterilizada.
20. Devolver as amostras restantes ao local de armazenamento.
21. Depositar as amostras biológicas na bancada de apoio da sala da CSB.

22. Certificar-se que todo o material está organizado na CSB e na bancada de apoio, incluindo a caneta marcadora.
23. Vestir um jaleco limpo e dobrar as pontas das mangas.
24. Arregaçar as mangas até os cotovelos, fazer a assepsia das mãos e antebraços e antissepsia com etanol 70% (MT 02 – Procedimentos básicos).
25. Calçar as luvas de procedimento e depositar as amostras biológicas na CSB, porém distante da fonte de calor (Figura 4A).
26. Considerando o piso da CSB como área de trabalho (Figura 5), dividir mentalmente esta superfície em campos, por exemplo: campo limpo à esquerda, campo sujo à direita e campo principal de trabalho ao centro na região mais próxima ao operador. Sendo assim:
 - No **campo limpo** (Figura 5A), organizar placas de Petri novas, placas de Petri contendo meio fresco, frascos contendo água purificada, Erlenmeyers contendo meio de cultura estéril, tubos eppendorf novos, luvas estéreis excedentes e outros instrumentos esterilizados.
 - No **campo sujo** (Figura 5B), posicionar a lixeira próxima à fronteira, fitas de Parafilm M® e material usado.
 - No **campo principal** (Figura 5C), organizar as amostras biológicas, estante de pipetas, estantes de microtubos e instrumentos em geral.

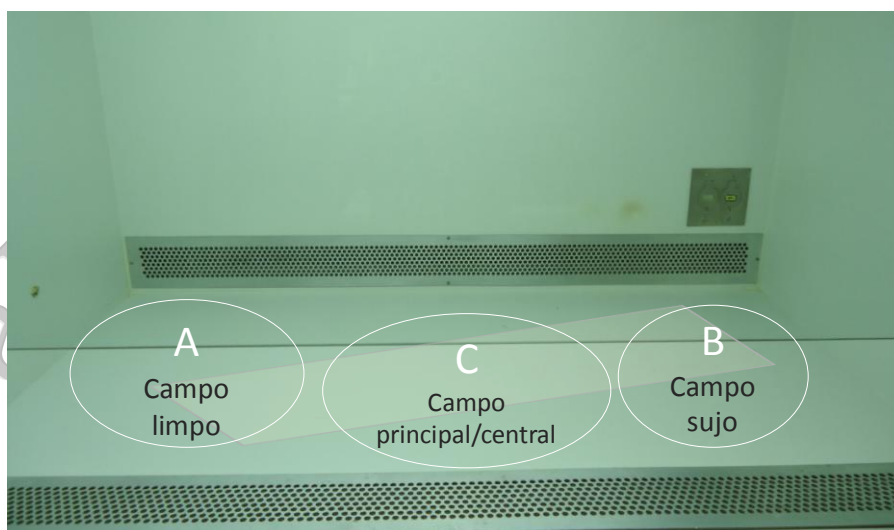



Figura 5. Interior da CSB. A divisão mental do piso em campos de trabalho facilita o movimento e manuseio de amostras e instrumentos evitando o contato entre material estéril e material usado. As amostras de trabalho devem ficar, preferencialmente, no campo central.


27. Ligar o esterilizador de alças de platina.

 *O aparelho estará pronto para uso quando o tubo interno estiver incandescente.*


28. Luvas de procedimento estéreis excedentes devem ser colocadas na mesa de apoio.
29. Durante o procedimento, não cruzar a linha central do campo de trabalho com as mãos. Isto significa que: tudo que estiver à esquerda será manuseado com a mão esquerda e, se preciso, passado para a mão direita e vice-versa.
30. As mãos ou braços também não devem passar por cima de frascos abertos contendo materiais/soluções estéreis ou amostras biológicas.

 *Esses movimentos precisam ser observados e treinados, sempre no intuito de minimizar riscos de contaminação de amostras e do operador.*


31. Utilizar estantes limpas e autoclavadas como suporte para tampas de frascos e placas de Petri abertas.

 *Nunca colocar as tampas dos frascos emborçadas diretamente sobre o piso da capela e nem material esterilizado, como alças de transferência, luvas e alças de Drigalski. O piso sempre deve ser considerado uma superfície potencialmente contaminada.*


32. As placas de Petri possuem um formato que reduz a entrada de partículas no interior, mas há troca de gases com o ambiente externo e a contaminação é possível.

 *Não abrir amostras biológicas fora da CSB e reduzir ao máximo o tempo de exposição das amostras ao ambiente da capela.*

33. Utilizar a lixeira de CSB somente para descarte do material usado dentro da capela.
34. Retirar a lixeira após término do trabalho e colocar no local destinado ao material contaminado para desinfecção.

 *A lixeira individual deve ser autoclavada conforme procedimento de desinfecção (MT 02) antes de ser lavada e esterilizada para reutilização.*

35. Desligar o esterilizador assim que encerrar o uso para reduzir o calor no interior da CSB e ambiente externo.

 *A utilização de alças de transferência descartáveis é preferível, pois o calor gerado pelo esterilizador revoluciona os fluxos de ar dentro da capela diminuindo sua eficácia e segurança.*

36. Ao final do trabalho, recolher todo o material e limpar a capela com etanol 70% conforme descrito anteriormente.
37. No caso de derramamento de substâncias ou amostras no piso, utilizar um desgordurante e papel toalha antes da desinfecção com etanol 70%.
38. Limpar a bancada de apoio com etanol 70% e papel toalha.

39. Acionar o sistema de esterilização por 30 min.
40. Se outro usuário for trabalhar imediatamente após, deixar o sistema de esterilização ligado.
41. Apagar as luzes da sala, sair, fechar a porta e acender as lâmpadas UV da sala no interruptor externo.

! *Nunca adentrar a sala com as lâmpadas UV acesas e nem colocar as mãos dentro da capela com a UV ligada! A radiação UV é mutagênica.*

42. Descartar o papel utilizado para limpeza interna da CSB na lixeira grande da sala.

! *A lixeira da sala da CSB não se destina ao descarte de material utilizado no interior da capela de segurança. Deve ser trocada frequentemente evitando-se o transbordamento de lixo na sala.*

43. Esvaziar a lixeira da sala no local determinado quando a metade da capacidade for ultrapassada.

VI. Boas práticas de utilização da sala da CSB

1. A porta da sala da CSB deve ser mantida fechada para minimizar a entrada de poeira e as luzes UV sempre ligadas, antes e após a utilização da capela.

! *Não entrar desnecessariamente na sala limpa!*

2. Tomar medidas para minimizar correntes de ar, as quais carregam poeira para dentro da sala e interferem no direcionamento do fluxo de ar dentro da CSB.

! *Nunca ligar ventiladores dentro da sala ou em direção à porta! O uso de ventiladores em laboratórios de segurança é proibido.*

3. material guardado na sala da CSB é de uso exclusivo em procedimentos estéreis.


! *Não introduzir caixas de papelão na sala da CSB!*

4. As caixas de luvas de procedimento são uma exceção, porém estas devem ser limpas externamente com papel toalha e álcool desinfetante.

5. O piso, a porta, paredes, luminárias, prateleiras, bancada de apoio e superfície externa da cabine, devem ser limpos semanalmente com desengordurantes instantâneos e álcool desinfetante.

6. O piso deve ser lavado semanalmente, secado com um pano limpo de uso específico e solução de hipoclorito de sódio comercial diluída a 1% (V/V).

7. Todos os procedimentos de limpeza, no laboratório, devem ser realizados umedecendo-se as superfícies para evitar suspensão de partículas.

 *Não é permitida a utilização de vassouras, espanadores e panos secos com finalidade de limpeza, em laboratórios de microbiologia!*

VI. Referências

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do paciente em serviços de saúde. Limpeza e desinfecção de superfícies. Brasília (2010)

DOS SANTOS, V. D. F., RIBEIRO, A. B., PALMA, C. S.. Limpeza e desinfecção da cabine de segurança biológica classe II B2: a realidade dos serviços de oncologia de Curitiba.

Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

MOLINARO, E. T., CAPUTO, L. F. G., AMENDOEIRA, M. R. R.. Conceitos e métodos para formação de profissionais de saúde. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Fundação Oswaldo Cruz Vol. 1 (2009)

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira, 5ª Ed., Vol. 1, Cap. 5.5 - Métodos Biológicos, Ensaio Biológicos E Microbiológicos. Brasília (2010).

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

MT 02 – Procedimentos básicos

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	25/10/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Organização

Nos **itens de III a VII**, este documento orienta os seguintes procedimentos laboratoriais:

III. Procedimentos de autoclavagem

- A. Esterilização de material limpo
- B. Desinfecção de material reutilizável
- C. Esterilização de resíduos biológicos para descarte
- D. Autoclavagem

IV. Procedimentos de esterilização por flambagem (calor seco)

- A. Alças de platina
- B. Alças de Drigalski
- C. Pinças anatômicas

V. Procedimento de filtração

- A. Material
- B. Coleta de água ultrapura
- C. Filtração

VI. Preparação do álcool desinfetante

- A. Material
- B. Diluição do etanol 96 °GL

VII. Assepsia das mãos e antebraços

VIII. Referências

II. Definições

Procedimentos básicos são aqueles que acompanham todas as atividades laboratoriais. Estes procedimentos de aplicam a todas as operações de preparação de amostras microbiológicas para fins espectrométricos sejam estes, análise identificatória ou aquisição de perfis de massa para a biblioteca filoproteômica. Relacionados aos procedimentos básicos, os conceitos de limpeza, desinfecção, assepsia e antissepsia precisam ser bem compreendidos.

De maneira geral, a **limpeza** é um processo que reduz a carga microbiana pela remoção de sujidades visíveis e detritos através de ação mecânica. A **lavagem** é uma forma de limpeza que aproveita da afinidade dos detritos por substâncias surfactantes – detergentes – que permitem sua dissolução na água de lavagem.

Desinfecção é um processo de eliminação da maioria dos microrganismos de superfícies ou objetos inanimados utilizando agentes físicos ou químicos ou por remoção mecânica. Após desinfecção, o número de microrganismos viáveis deve tender a zero. Alguns métodos de desinfecção também são esterilizantes.

As **soluções desinfetantes** utilizadas no LaBafes para limpeza de superfícies são: etanol 70% e hipoclorito de sódio em concentrações variadas. O **hipoclorito de sódio** é um composto inorgânico liberador de cloro ativo, degradável em temperaturas maiores que 25 °C e sob luz solar, volátil e corrosivo para metais, podendo causar irritabilidade nos olhos e mucosas. É um agente bactericida eficaz, viricida, fungicida e esporicida, dependendo da concentração de uso que, para desinfecção, varia entre 0,02% a 1,0%. A apresentação comercial, líquida, com teor de cloro ativo entre 2,0% e 2,5% (*p/p*), foi adotada pela praticidade, ação rápida e baixo custo. É indicado para desinfecção de superfícies plásticas, fórmicas e outras, resistentes à ação do cloro ativado. É mais eficaz após remoção de sujidades, como crostas de material orgânico, mas pode ser aplicado para redução da carga microbiana em superfícies resistentes, antes da limpeza, como pisos, plásticos e superfícies de fórmica.

O **etanol diluído** em água destilada com concentrações entre 60% a 90% (V/V), é um agente desinfetante bactericida, viricida, fungicida e com ação otimizada na concentração de 70%. Não é esterilizante, pois não apresenta ação contra esporos bacterianos. Pode ser usado para limpeza superficial e desinfecção de materiais e superfícies. É eficaz como

antisséptico, mas causa ressecamento da pele. Não é um bom removedor de sujidades, portanto, não substitui o processo de lavagem com detergente ou a utilização de desengordurantes.

O **álcool comercial (96 °GL)** possui ação desengordurante e pode ser utilizado para limpeza rápida de superfícies que sejam resistentes ao produto. Deve-se observar que o etanol é inflamável, explosivo, volátil, opacifica superfícies acrílicas e resseca plásticos e borrachas.

A **antisepsia** é o processo de diminuição de carga microbiana em tecidos vivos superficiais, mediado por agentes químicos denominados antissépticos, capazes de inviabilizar células vegetativas, mas não esporos. Por atuar em tecidos vivos, os antissépticos devem ser suficientemente atóxicos para serem aplicados, por esta razão, não são esterilizantes.

A **esterilização** é um processo capaz de eliminar todas as formas de vida microbiana, incluindo esporos bacterianos, por ação de um agente físico ou químico. A esterilização de superfícies deve ser realizada após limpeza e desinfecção, seguida por exposição por tempo adequado a um agente químico ou luz UV.

A **esterilização em autoclave** é um método físico caracterizado pela ação do calor úmido sob pressão (vapor) em temperaturas superiores ao ponto de ebulição da água e tempo adequado, suprimindo a viabilidade de células vegetativas e esporos presentes no material. No LaBafes, este procedimento se aplica a três situações: i) esterilização de material limpo, ii) esterilização de material reutilizável e iii) tratamento de culturas bacterianas, e outros resíduos biológicos, para o descarte seguro.

A **esterilização de material limpo** como vidrarias e instrumentos é realizada somente após lavagem meticulosa desse material. A limpeza é imprescindível para que o calor úmido aja eficientemente sobre as superfícies, permitindo a condição de esterilidade do material após a autoclavagem. Os meios de cultura e soluções não termolábeis empregadas na manipulação de microrganismos, também, são submetidos à autoclavagem antes de serem distribuídos nas placas de Petri. Por ser eficaz contra esporos, este é o método de esterilização mais utilizado no LaBafes.

A **radiação ultravioleta (UV)** é aplicada somente na capela de segurança biológica (CSB) para esterilização das superfícies e do ar, antes e após o uso (MT 01 - Utilização e manutenção das salas limpas).

A **esterilização por calor seco** é um método de que carboniza resíduos orgânicos aderidos ao utensílio de trabalho. É capaz de eliminar qualquer tipo de contaminação biológica. Pode ser realizada em esterilizador elétrico ou por **flambagem**, em bico de Bunsen, com o instrumento seco (metal) ou após imersão em álcool (vidro). É aplicável à esterilização de superfícies de utensílios de metal ou vidro, como pinças anatômicas de aço inoxidável e alças de platina ou Drigalski. A utilização de fogo nos laboratórios de pesquisa ainda não pôde ser completamente abolida; algumas reações químicas e técnicas colorimétricas requerem a utilização de bicos de Bunsen, assim como a flambagem de pinças metálicas. Porém, estes são procedimentos de bancada e **nunca** devem ser realizados na CSB por questões de segurança e interferência no direcionamento do fluxo de ar.

A **filtração** é um processo de remoção de partículas em suspensão, utilizada para a esterilização de água ultrapura e soluções de baixa viscosidade. Durante a utilização, a água ultrapura (no LaBafes obtida por sistema Milli-Q) pode ser contaminada quando exposta ao ar. No processo de preparação de amostras para a espectrometria de massa, na etapa de preparo das suspensões de esporos (MT 03 - Preparo de suspensões estoque), a água ultrapura deve ser filtrada em membranas com porosidade de 0,22 µm, adaptáveis a seringas hipodérmicas.

A palavra **asepsia** designa um conjunto de medidas que visam manter um ser vivo ou um meio inerte isento de bactérias. No contexto do LaBafes, a asepsia envolve a limpeza e tratamento das mãos e antebraços, no sentido de reduzir a carga microbiana, pois essas partes do corpo entrarão em contato com superfícies esterilizadas de utensílios e com o ar da CSB durante o manuseio das amostras microbiológicas. Este procedimento é obrigatório e fundamental para minimizar a contaminação microbiológica de ambientes, equipamentos, utensílios, amostras e do próprio operador. A asepsia dos antebraços e mãos deve ser realizada antes e após o manuseio de amostras biológicas, ou material potencialmente contaminado, ainda que o operador esteja utilizando equipamentos de proteção individual (EPIs). A asepsia deve ser realizada, também, antes do início e após a rotina laboratorial.

É importante enfatizar que a presença de lesões cutâneas é um impedimento ao trabalho em laboratórios. Pessoas acometidas com doenças respiratórias infecciosas, ou não, ou outras infecções contaminantes, também não devem comparecer ao laboratório até completo restabelecimento.

Estas são medidas importantes de proteção e contenção que não devem ser negligenciadas.

II. Objetivos

Prevenir a disseminação de contaminantes microbiológicos em ambientes e materiais diversos. Preservar a integridade das amostras favorecendo a reprodutibilidade dos espectros e qualidade dos ensaios laboratoriais. Reforçar ações de biossegurança e biossegurança laboratoriais.


Outros procedimentos básicos podem ser consultados no Manual do LaBafes, Manuais de Biossegurança ou, manual de Técnicas Básicas em Biologia Molecular, disponíveis neste Laboratório.

III. Procedimentos de autoclavagem


A. Esterilização de material limpo

Refere-se a soluções de trabalho autoclaváveis, vidrarias e instrumentos gerais de bancada, novos ou limpos: vidraria, tubos plásticos ou de vidro, ponteiras, soluções, meios de cultivo etc. Observe que alguns instrumentos não são resistentes à autoclavagem.

1. Selecionar o material que será autoclavado.

 *Em se tratando de utensílios reutilizáveis, certificar-se que tenham sido devidamente lavados, enxaguados em água corrente e, em seguida, com água destilada.*

2. Embalar o material limpo separadamente em papel pardo (Kraft) e lacrar os pacotes com fita crepe.
3. Identificar os pacotes com nome do operador e data.
4. Abrir a autoclave e verificar se foi limpa e se contém água destilada nova. Em caso negativo, drenar a água e limpar como explicado nos itens 5 a 9.
5. Retirar o cesto de aço inoxidável da autoclave e lavar com esponja e detergente.
6. Enxaguar o cesto com água potável e depois generosamente com água destilada.
7. Limpar a autoclave por dentro com papel toalha e etanol para desengordurar as superfícies internas.

 *Não utilizar desinfetantes, desengordurantes comerciais, hipoclorito de sódio ou outros produtos de limpeza que possam deixar resíduos químicos dentro do equipamento.*

8. Enxaguar as paredes do equipamento com água destilada.


9. Completar o nível até a cruzeta com água destilada.

 *Nunca utilizar água corrente na autoclave!*

10. Recolocar o cesto e organizar o material dentro, de forma a não ultrapassar a borda.

11. **Continuar o procedimento de esterilização a partir do item D - Autoclavagem.**


12. Após a retirada do material, fechar **imediatamente** os frascos contendo líquidos.

 *Durante o resfriamento, o ar ambiente é sugado para dentro do frasco por diferenças de pressão, recontaminando o conteúdo que foi esterilizado.*

13. Organizar os utensílios na estufa de secagem (60 °C) minimizando o espaço ocupado e evitando empilhamentos que possam causar acidentes ao abrir a porta.

B. Desinfecção de material reutilizável

Este item refere-se à desinfecção de material utilizado e potencialmente contaminado para reutilização.

 *Neste caso, a autoclavagem deve ser feita antes do procedimento de lavagem para evitar a disseminação de contaminantes nas águas de lavagem e material de limpeza.*

1. Acondicionar o material que será autoclavado em recipientes **abertos** de metal ou vidro temperado ou plástico termo resistente.

2. Completar a água da autoclave até 1 cm acima do nível da cruzeta.

3. Colocar os recipientes contendo material contaminado no cesto da autoclave, cuidando para não ultrapassar o nível da borda do cesto.

4. Continuar o procedimento no item D – Autoclavagem.

5. Após a retirada da autoclave, transferir o material para a sala de lavagem.

6. O material reutilizável deve, então, ser lavado e enxaguado adequadamente e embalado para procedimento de esterilização conforme o item A – Esterilização de material limpo.

C. Esterilização de resíduos biológicos para descarte

Resíduos laboratoriais contaminados ou potencialmente contaminados por material biológico não podem ser descartados antes da esterilização.

! *Neste caso, todo tipo de material contaminado deve ser submetido ao processo de autoclavagem, não importando sensibilidade à temperatura.*

1. Colocar o material em recipientes de alumínio, aço inoxidável ou vidro temperado.
2. Completar o nível da água destilada até 1 cm acima da cruzeta.
3. Colocar os recipientes contendo material contaminado no cesto cuidando para não ultrapassar o nível da borda do cesto.
4. Continuar o procedimento conforme item D – Autoclavagem.
5. Após término do ciclo de autoclavagem, retirar o material colocando-o em uma bandeja de metal.

! *Utilizar luvas antitérmicas!*

6. Descartar tudo na lixeira de material descontaminado da sala de lavagem principal do laboratório.

D. Autoclavagem

Após o adequado acondicionamento do material no cesto de autoclavagem como descrito nos procedimentos de A – C, prosseguir conforme orientação abaixo:

1. Abaixar a tampa do equipamento e encaixar as travas.
2. Apertar gradualmente os parafusos em posições diametralmente opostas, dois a dois, aplicando força semelhante em todos.

! *Este cuidado é importante para não empenar a tampa e preservar a segurança do equipamento.*

3. Certificar-se que a válvula de saída de ar esteja bem aberta.
4. Girar o botão de temperatura até posição *max* (máxima).
5. Aguardar o aquecimento da água e esgotamento de vapor pela válvula.

! *Aguardar a saída de vapor por cerca de 5 min e fechar a válvula de saída.*

6. Aguardar a temperatura atingir 121 °C, como registrado no termomanômetro, e girar o botão de temperatura para a posição *med* (média).

7. Deixar por, **pelo menos, 20 min** para procedimentos de esterilização e **60 min** para procedimentos de descontaminação de material a ser descartado.
8. Após o tempo estabelecido, girar o botão de temperatura até a posição *desligado*.
9. Aguardar a diminuição da temperatura para menos de 100 °C e abrir lentamente a válvula de ar, para que a pressão interna diminua lentamente até zero (cessar completamente a saída de vapor).

⚠ Não afrouxar os parafusos da tampa antes de esgotar o vapor!

10. Afrouxar gradualmente os parafusos da tampa dois a dois (localizados em posições opostas).
11. Posicionando-se ao lado da autoclave, levantar a tampa cuidando para não deixar o rosto, mãos ou braços sobre a abertura.

⚠ Risco de queimaduras por exposição ao vapor!

12. Portando luvas de antitérmicas, transferir o material autoclavado para uma bandeja e retornar ao procedimento A, B ou C, conforme ao tipo de material em esterilização.

IV. Procedimento de esterilização por calor seco

Este procedimento é diferente para cada tipo de instrumento. Como explicado anteriormente, pode ser realizado em esterilizador elétrico ou bico de Bunsen, com o instrumento seco ou após imersão em álcool, como explicado a seguir.

A. Alça de platina

Deve-se preferir a utilização de alças de transferência de material plástico esterilizado industrialmente para os procedimentos na CSB. Contudo, sendo necessário utilizar **alças de platina**, estas devem ser esterilizadas em esterilizador elétrico, conforme instruções a seguir.

1. Ao iniciar o procedimento na CSB, ligar o esterilizador e aguardar cerca de 20 min até que o tubo interno esteja totalmente incandescente.
2. Pôr a alça em contato direto com a parede interna do tubo e aguardar alguns segundos até que fique incandescente.
3. Retirar a alça e deixar resfriar durante alguns segundos antes de coletar a amostra biológica.
4. Transferir a amostra e esterilizar, imediatamente, a ponta da alça para evitar contaminação de outros materiais dentro da capela.

5. Esterilizar a alça novamente antes de coletar nova amostra.

⚠ Não utilizar bico de Bunsen dentro da CSB ou sala limpa!

B. Alça de Drigalski

A esterilização de **alças de Drigalski** deve ser feita pelo método tradicional de flambagem em bico de Bunsen. Por serem de vidro, o esterilizador elétrico não é adequado a este procedimento. Porém, alças de Drigalski de material plástico e esterilizadas estão disponíveis comercialmente e a utilização destas dispensa a esterilização por flambagem.

⚠ Certificar-se que não existam correntes de ar, provocadas por ar condicionado ou janelas abertas, que possam arrastar o vapor de álcool até a chama.

1. Posicionar o recipiente contendo as alças de Drigalski sobre a bancada, longe de reagentes inflamáveis.
2. Posicionar um frasco de vidro ou aço inoxidável, de boca larga, contendo cerca de 4 cm de etanol comercial 96° GL próximo às alças.
3. Ligar o bico de Bunsen posicionado a uma distância de, pelo menos, 1 m do recipiente contendo o álcool.
4. Mergulhar a alça no etanol e colocar em contato com a chama do bico de Bunsen.
5. Esperar alguns segundos até que o material arrefeça antes de tocar a amostra biológica.
6. Repetir o procedimento de flambagem antes de depositar a alça no suporte.
7. Repetir o procedimento para cada amostra.

C. Pinças anatômicas

As **pinças anatômicas de aço inoxidável** utilizadas em quase todos os procedimentos estéreis, não devem ser esterilizadas no esterilizador elétrico. Em parte devido à liga de aço ser destemperada pela exposição a altas temperaturas. Como o mercado nacional não disponibiliza pinças anatômicas descartáveis esterilizadas, estes instrumentos devem ser flambados com etanol, lavados e esterilizados em autoclave antes da próxima utilização. O tratamento das pinças usadas deve ser realizado de forma segura conforme instruções abaixo.

1. Após a conclusão do trabalho na CSB, colocar uma placa de Petri de aço inoxidável sobre a bancada da pia. Uma das partes com a abertura voltada para baixo e outra para cima, conforme a figura 1.



Figura 1. Procedimento seguro de flambagem das pinças de aço inoxidável. Note a tampa da placa de aço inoxidável emborcada para baixo para proteger a bancada do aquecimento e a pisseta contendo etanol para umedecer as pinças e o fundo da placa.

2. Eliminar todas as correntes de ar, fechando janelas e desligando o ar condicionado.
3. Certificar-se que não existam frascos contendo líquidos inflamáveis na bancada ou próximo a esta.
4. Transferir as pinças usadas que estão na CSB para as placas de aço inoxidável arranjadas na bancada.

⚠ Cuidado para não tocar as partes potencialmente contaminadas.

5. Utilizar a pisseta para pulverizar as pinças com etanol 96° GL, evitando espirrar na pia, adicionando apenas o suficiente para umedecer todo o fundo da placa.
6. Afastar a pisseta contendo etanol e acender o fogo.
7. Deixar flambar até que o fogo se apague e aguardar o resfriamento.
8. Lavar as pinças e a placa, esfregando a parte serrilhada das pinças com a escova.
9. Autoclavar conforme item III, parte A - Autoclavagem de material limpo.

V. Procedimento de filtração

Como dito anteriormente, o procedimento de filtração é utilizado para esterilização da água ultrapura no momento do preparo da suspensão de esporos estoque. Para isto são utilizadas membranas filtrantes de celulose com porosidade de 0,22 μm , adaptáveis a seringas hipodérmicas. O procedimento é estéril, e deve ser realizado antes da introdução de amostras biológicas na CSB (MT 03 - Preparo de suspensões estoque).

⚠ Não autoclavar a água ultrapura Tipo I; isto altera as características físico-químicas desejadas.

A. Material

- ✓ Amostras secas de esporos ou suspensões a diluir
- ✓ 1 sistema de utrapurificação de água (Tipo 1 – por exemplo, sistema Milli-Q)
- ✓ 1 frasco de vidro esterilizado
 - ⚠ Utilizar frasco de vidro autoclavável específico para laboratórios.**
- ✓ 1 seringa hipodérmica de 5-10 mL estéril
- ✓ 1 membrana filtrante de 0,22 μm estéril
- ✓ 1 estante para microtubos autoclavada
- ✓ 1 pinça anatômica esterilizada
- ✓ 1 caneta de marcação permanente

B. Coleta da água ultrapura tipo 1

As instruções a seguir se referem ao sistema de purificação de água *Cascade LS mk2-Water Purification System* (Pall Corporation), instalado no laboratório de Biofísica do Instituto de Biologia da UnB, onde é coletada a água ultrapura utilizada para os experimentos do LaBafes. O acionamento do sistema de coleta de água é similar para outros modelos e as instruções encontram-se afixadas no próprio equipamento. É recomendado ler as instruções de uso antes de acionar o sistema de coleta de água em qualquer equipamento purificador.


1. Utilizar, para a coleta, um frasco de vidro de pequeno volume e esterilizado.

⚠ Só abrir o frasco no momento da coleta!

2. Imediatamente antes da coleta, enxaguar o frasco e a tampa com água Milli-Q.
3. Observar se o reservatório de água do equipamento de purificação está preenchido acima do nível mínimo indicado.
4. Acionar o botão *standby* e aguardar o visor indicar 18,2 Ω.
5. Retirar a tampa de proteção do bico do purificador e posicionar o frasco de coleta próximo ao bico sem tocar.
6. Acionar o botão de ação.
7. Coletar a água e desligar o botão de ação.
8. Tampar imediatamente o frasco.
9. Tampar o bico do purificador.
10. Acionar novamente o modo *standby*.

C. Filtração

1. Transferir todo o material, com as embalagens externas previamente higienizadas, para a CSB (MT 01 - Utilização e manutenção das salas limpas).
2. Usar estante de apoio para os utensílios estéreis.
3. Posicionar a estante com os microtubos que irá trabalhar no campo central.
4. Abrir o invólucro e apoiar a seringa na estante.
5. Abrir a embalagem da membrana filtrante.

 *Preservar a embalagem da membrana filtrante para apoiar a mesma no momento de reabastecer a seringa.*

 *Atenção para não tocar o bico de saída do filtro!*

6. Encher a seringa com água ultrapura.
7. Encaixar o filtro firmemente na ponta da seringa.
8. Abrir o primeiro microtubo e filtrar a água diretamente neste até a marca do volume desejado.
9. Tampar imediatamente e recolocar na estante.
10. Ao encher o próximo microtubo, desprezar a primeira gota de água que fica suspensa na borda da seringa.
11. Para reabastecer a seringa, retirar a membrana filtrante e depositar na própria embalagem, evitando contato com qualquer outra superfície.
12. Reabastecer a seringa e repetir o procedimento.

VI. Preparação do álcool desinfetante

A. Material

Para um litro de etanol 70% (V/V):

- ✓ 1 proveta de 1 L
- ✓ 1 béquer de 1 L
- ✓ 300 mL de água destilada
- ✓ 730 mL de etanol 96 °GL
- ✓ 1 caneta de marcação permanente de ponta grossa
- ✓ fita crepe

B. Diluição do etanol 96 °GL

Considerando que a concentração inicial do etanol comercial (96 °GL) corresponde a 96% e, sendo V_i o volume inicial; C_i a concentração inicial; V_f a concentração final e C_f a concentração final, o volume necessário de etanol para preparar um litro de etanol 70% será:

$$\begin{aligned}
 V_i \cdot C_i &= V_f \cdot C_f \\
 V_i &= V_f \cdot C_f / C_i \\
 V_i &= 70 / 96 \cdot 1000 \text{ mL} \\
 V_i &= 729,1 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Aproximando o resultado para a precisão da bureta que é de ± 2 mL, pode-se considerar o volume inicial de etanol comercial igual a 730 mL.

1. Medir 730 mL de etanol na proveta.
2. Completar o volume com água destilada para 1.000 mL.
3. Homogeneizar a mistura e distribuir nas pissetas das bancadas.

VII. Assepsia e antissepsia das mãos e antebraços

1. Antes de iniciar o trabalho, retirar anéis, pulseiras, relógio, colares e qualquer adorno que possa conferir risco de acidentes no laboratório (cair, enganchar), dificultar a

limpeza e antissepsia da pele ou favorecer processos inflamatórios, como brincos e anéis apertados. As unhas devem estar sempre aparadas rente à pele e limpas.

⚠ Não é permitida a utilização de adornos como anéis, pulseiras, relógio e colares em laboratórios de Microbiologia.

2. A figura 1 apresenta, em onze passos, a higienização das mãos com objetivo de remover microrganismos que colonizam as camadas superficiais da pele, assim como suor, oleosidade, células mortas e sujidades que propiciam a permanência e proliferação de microrganismos.
3. A utilização de escovas macias para limpeza das unhas e esponjas com soluções antissépticas para limpeza da pele, não é apresentada nas imagens, mas deve ser adotada como medida extra de segurança para procedimentos estéreis em CSB.
4. Soluções antissépticas com grau cosmético são menos agressivas para a pele que o etanol 70% e podem apresentar características de proteção ao tecido. A assepsia e antissepsia frequentes das mãos podem provocar escaras e a utilização de óleos reparadores e cremes hidratantes ao final do expediente é recomendada.

⚠ Entretanto, durante as atividades laboratoriais, as mãos devem ser limpas sem a utilização posterior de cremes cosméticos.

5. Para procedimentos de rotina, não estéreis, é suficiente lavar as mãos até os pulsos antes e depois. Antes de sair do laboratório, ao final do período, também.
6. Antes de procedimentos limpos na CSB, lavar os antebraços até a altura dos cotovelos, deixando a água de enxague escorrer no sentido da ponta dos dedos para os cotovelos (Figura 2).

⚠ Utilizar papel-toalha para fechar as torneiras ou lavar a torneira e aplicar etanol 70% antes de enxaguar as mãos.

7. Para descontaminação com etanol 70% (glicerinado ou não) espalhar nas mãos e antebraços e friccionar com os mesmos movimentos utilizados para a lavagem.
8. Para evitar ressecamento e dermatites, não higienizar as mãos com água e sabão imediatamente depois de usar uma preparação alcoólica.
9. Depois de desinfetar as mãos com preparação alcoólica, deixar que sequem completamente (sem utilização de papel-toalha) e, para procedimentos na CSB, deixar que as mãos e antebraços sequem dentro da capela.





Figura 1. Higiene de mãos. Procedimento simples de higienização de mãos em onze passos, com duração de 40-60 segundos. Fonte: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/higienizacao_mao/manual_integra.pdf. Acesso livre.

LaBafes



Figura 2. Enxague das mãos e braços. Fonte: Anvisa. Acesso livre em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/higienizacao_maos/manual_integra.pdf.

VIII. Referências

- AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRIGÍDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, MARLENE TEIXEIRA.** Técnicas Básicas em Biologia Molecular. 1. ed. Universidade de Brasília, v. 1. 211p. Brasília (2003).
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Acessado em Brasília, 27 de maio de 2014.
<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/higienizacao_maos/conteudo/c_tecnicas.htm#2>
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Segurança do paciente em serviços de saúde. Limpeza e desinfecção de superfícies. (2010)
- Brasil. Ministério da Saúde. MOLINARO, E.; CAPUTO L.; AMENDOEIRA, R..** Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Instituto Oswaldo Cruz - IOC, Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/ Fundação Oswaldo Cruz. RJ (2009)
- Dos Santos, A. A. M.; Verotti, M. P.; Sanmartin, J. A.; Mesiano, E. R. A. B..** Importância do álcool no controle de infecções em serviços de saúde. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/controle_alcool.pdf>

INMETRO/MICT Portaria Nº 75 de 14/04/1993. Acondicionamento e comercialização de água sanitária e cloro em pó. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/agua_sanitaria2.asp?i>

RESOLUÇÃO ANVISA - RE Nº 2.606, DE 11 DE AGOSTO DE 2006. Dispõe sobre as diretrizes para elaboração, validação e implantação de protocolos de reprocessamento de produtos médicos e dá outras providências.

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

LaBafes - UnB/IB/CEL

MT 03 – Preparo de suspensões estoque de esporos

Revisão N ^o	Data	Emissor	Aprovação
00	25/10/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definição

O **acervo da CBafes** contém estirpes de diversas origens, porém, somente as estirpes ambientais de Bafes – SDFs (solo do DF) – são utilizadas para a construção da biblioteca de perfis moleculares. Essas estirpes se encontram na forma de esporos secos, aderidos a tiras de papel de filtro acondicionadas em criotubos de 2 mL (Figura 1). Os microtubos são devidamente identificados com o **código da estirpe**. Este código é composto pelas letras SDF (abreviação de solo do Distrito Federal) seguidas por um número de quatro dígitos que representa a sequência em que foram adicionadas à coleção.

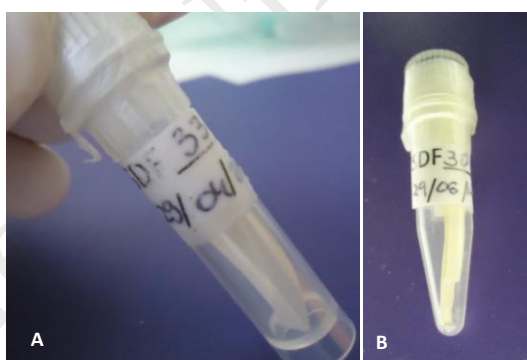


Figura 1. Estirpes da CBafes. Criotubos contendo alíquotas de esporos secos, lacrados com Parafilm M® e identificados com o código da estirpe. **(A)** Alíquota da estirpe SDF0033. **(B)** Alíquota da estirpe SDF0030.

Atualmente a CBafes contém as estirpes SDF0001 à SDF0154. Alguns números estão **desdobrados em A e B**, por exemplo: SDF0040-A e SDF0040-B. Por questão de praticidade e melhor visualização, os números escritos nas tampas dos microtubos contêm apenas os algarismos significativos (Figura 2A). Para reforçar a segurança na preservação da identidade, os microtubos são também identificados na lateral (Figura 1A e B e figura 2B).

A CBafes contém **quatro ou cinco alíquotas de cada estirpe SDF**. Estas alíquotas são identificadas por dois números separados por uma barra. O número após a barra indica o número de alíquotas que foram preparadas para a estirpe e número anterior discrimina a alíquota. Por exemplo, para a SDF0040-A, foram produzidas 5 alíquotas, acondicionadas em 5 microtubos e identificadas como: 1/5; 2/5; 3/5; 4/5 e 5/5 (Figura 2B).

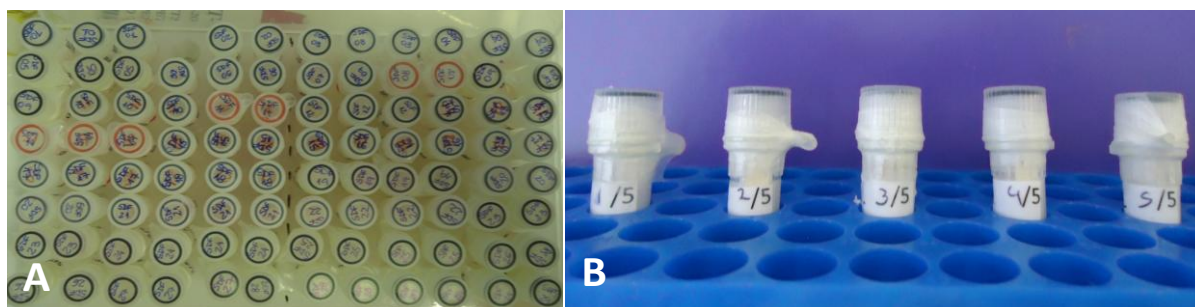


Figura 2. Microtubos de armazenamento da CBafes. (A) Os microtubos numerados contêm esporos de estirpes SDF aderidos tiras de papel de filtro. Nesta caixa estão armazenadas as estirpes SDF0001 a 0029. **(B)** A CBafes contém quatro ou cinco alíquotas de cada estirpe. A inscrição lateral nos microtubos identifica a alíquota – primeiro número, e a quantidade de alíquotas depositada na CBafes – numero após a barra.

Suspensões estoque de esporos, ou, simplesmente, **suspensões estoque**, são suspensões primárias, preparadas pela transferência de uma tira de papel filtro de uma das alíquotas de esporos secos da CBafes para um microtubo estéril contendo água ultrapura filtrada. Das suspensões estoque são retiradas as alíquotas de trabalho (**suspensões de trabalho**) para as análises de MALDI-TOF MS e para os demais membros do nosso grupo de pesquisa, com finalidades diversas (MT 04 – Aliquotagem de suspensões estoque de esporos).

O armazenamento das suspensões estoque foi padronizado em criotubos de base larga. A Figura 3 apresenta os tipos de microtubos utilizados nos procedimentos referentes a este manual e a padronização adotada para armazenamento de esporos secos, suspensões estoque e suspensões de trabalho.

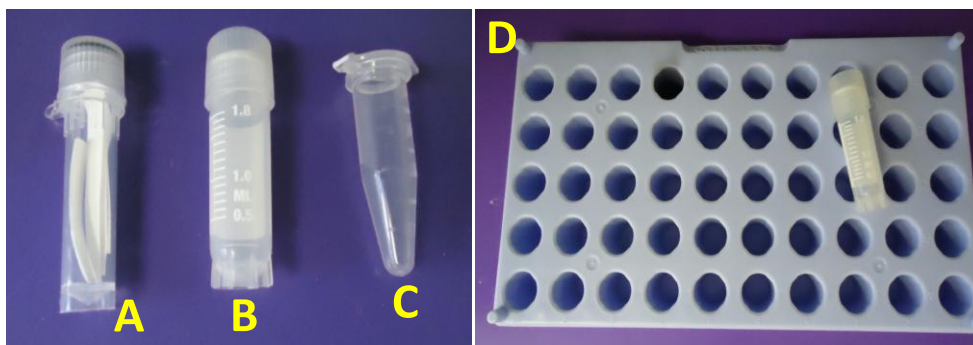


Figura 3. Tipos de microtubos de armazenamento. (A) Criotubo com tampa rosqueada, anel de vedação de borracha e argola de fixação da tampa, contendo tiras de papel filtro para armazenamento de esporos secos. **(B)** Criotubo de base larga, tampa rosqueada e anel de vedação, utilizado para preparo e armazenamento das **suspensões estoque** de esporos. **(C)** Microtubo tipo eppendorf, utilizado para acondicionamento de **suspensões de trabalho**. **(D)** Estante para criotubos de base larga.

II. Objetivos

Descrever o manuseio das estirpes da CBafes para a inoculação dos esporos em meios de cultura sólido na forma de suspensões. Garantir a segurança do processo e a integridade das amostras de trabalho e do estoque principal da CBafes.

III. Material

O material abaixo foi estimado para trabalhar com 15 estirpes por vez. As quantidades devem ser adequadas para trabalhar com um número maior de amostras. A listagem de material está organizada em duas partes e desta forma, conforme procedimento (item IV).

1ª parte: procedimento seco

- ✓ 2 pares de luvas de procedimento estéreis
- ✓ 1 caneta de marcação permanente ponta fina (desinfetada)
- ✓ 1 suporte para criotubos de base larga
- ✓ (N + 3) criotubos de 2.000 µL
- ✓ N pinças anatômicas esterilizadas
- ✓ Tiras de Parafilm M®
- ✓ 2 lixeiras de CSB

💡 *Uma das lixeiras deve ser utilizada somente para deposição das pinças usadas.*

- ✓ *N* amostras de esporos de linhagens SDFs

2ª parte: procedimento de hidratação

- ✓ *N* alíquotas secas de esporos (1ª parte)
- ✓ 3 microtubos de 2.000 µL
- ✓ 2 pares de luvas de procedimento estéreis
- ✓ 1 caneta de marcação permanente de ponta fina (desinfetada)
- ✓ 1 suporte para criotubos de base larga
- ✓ 50 mL de água ultrapura
- ✓ 1 seringa hipodérmica (5 ou 10 mL)
- ✓ 2 membranas filtrantes de 0,22 µm
- ✓ 3 pinças anatômicas esterilizadas
- ✓ Fitas de Parafilm M®
- ✓ 1 lixeira de CSB
- ✓ 1 estante de apoio

IV. Procedimento

O procedimento de preparação das suspensões estoque pode ser um tanto demorado, principalmente as etapas de troca de Parafilm M® e identificação dos microtubos. O respectivo formulário de registro de procedimento – RP 03 – foi elaborado para registrar o preparo de 15 amostras por vez. Sendo necessário trabalhar com um número maior de amostras, deve-se para minimizar o risco de contaminação executando o procedimento em duas etapas, como explicado a seguir.

A sequência de trabalho foi dividida em duas etapas: **Procedimento seco** e **Procedimento de hidratação**.

1ª parte - Procedimento seco: explica passo a passo a transferência dos papéis de filtro contendo esporos para os criotubos de base larga e armazenamento à temperatura ambiente em local protegido de luz e umidade.

2ª parte - Procedimento de hidratação: explica a parte do procedimento que envolve a distribuição de 1.800 µL de água ultrapura nos criotubos, já contendo as alíquotas de

esporos, para a preparação de suspensões e o armazenamento a 4 – 8 °C. Durante esta 2ª parte do procedimento, 3 microtubos estéreis novos devem ser separados para receberem somente água ultrapura filtrada. As alíquotas de água serão testadas quanto à presença de contaminantes ao longo do período de armazenamento das suspensões estoque, conforme explicado no item V – Controle de qualidade microbiológico (CQM).

Os subtítulos a seguir indicam qual parte do procedimento está sendo descrita na sequência posterior. O operador deve ignorar a divisão se estiver realizando o procedimento completo e, deve se orientar somente pela sequência indicada para a parte que está executando, no caso de procedimento parcial.

1ª e 2ª PARTES

1. Em uma cópia do RP 03, registrar a numeração das amostras que irá trabalhar.
2. Limpar a CSB e mesa de apoio conforme procedimento MT 01 (Utilização e manutenção das salas limpas).
3. Ligar o sistema de esterilização por, no mínimo, 30 min.
4. Desligar as luzes UV da sala e da CSB e organizar o material, exceto as amostras biológicas.
5. Deixar o pulverizador de etanol 70% na bancada de apoio.
6. Ligar de novo as luzes UV da sala e da CSB por 30 min.
7. Lavar as mãos e separar as amostras biológicas que irá utilizar.
8. Apagar as luzes UV da sala e da CSB, e colocar as amostras sobre a bancada de apoio.
9. Vestir um jaleco limpo, fazer a assepsia das mãos e antebraços e a antissepsia com etanol 70%, e deixar secarem dentro da capela.

1ª PARTE

10. Com auxílio de uma pinça anatômica estéril, retirar um criotubo do frasco e uma tampa.
11. Rosquear a tampa no criotubo e depositar na estante.
12. Repetir o procedimento para os outros criotubos que for utilizar.



Preparar alguns excedentes para o caso de perdas durante a manipulação.

13. Com a caneta marcadora, identificar todos os criotubos com o número da estirpe SDF sobre a tampa.

 *Omitir os zeros não significativos.*

14. Na lateral, registrar o número da estirpe SDF, além do nome do operador, data e volume de água adicionado (se for procedimento completo).

 *Manter os microtubos fechados sempre que possível evitando exposição desnecessária ao ar.*

 *Nunca tocar a borda ou parte interna das tampas!*

 *Nunca apoiar tampas ou microtubos diretamente sobre o piso da capela!*

 *Descartar qualquer material estéril que tocar o piso.*

15. Posicionar as amostras de esporos no campo de trabalho centro-direito.

16. Calçar as luvas para manipulação das amostras biológicas.

17. Com auxílio de outra pinça, retirar a proteção de Parafilm M® de todas as amostras, sem deixar resíduos.

18. Abrir o criotubo da primeira estirpe, contendo tiras de papel de filtro saturadas com esporos. Retirar uma tira de papel com o auxílio de uma nova pinça esterilizada.

19. Segurar a pinça contendo o papel enquanto encaixa a tampa do criotubo e recoloca na estante com a outra mão.

20. Com a mão livre, retirar da estante o microtubo que irá receber a amostra, levantar a tampa e transferir a tira de papel.

 *Sempre retirar os microtubos da estante!*

21. Depositar a pinça na lixeira específica e fechar a amostra adequadamente.

22. Repetir o procedimento para cada amostra de esporo seco.

23. Ao final guardar as amostras à temperatura ambiente protegidas de calor e umidade.

2ª PARTE

24. Após a assepsia das mãos, colocar na CSB as alíquotas de esporos secas retiradas durante a 1ª parte do procedimento.

25. Calçar as luvas para manipular as amostras biológicas.

26. Registrar na lateral dos criotubos, a data e volume de água que irá adicionar.

27. Identificar os 3 criotubos que receberão alíquotas de água ultrapura filtrada para o CQM da água escrevendo na tampa: CQM1, CQM2 e CQM3.

28. Na lateral dos criotubos de CQM, registrar nome do operador, data e volume de água que será adicionado.

29. Proceder à filtragem da água diretamente nos criotubos conforme MT 02 – Procedimentos básicos.
30. Fechar imediatamente os criotubos após transferência da água filtrada.

 *Manter os criotubos fechados sempre que possível evitando exposição desnecessária ao ar.*

 *Nunca tocar a borda ou parte interna das tampas!*

 *Nunca colocar as tampas ou microtubos no piso da capela!*

 *Descartar qualquer material estéril que tocar o piso.*

31. Ao final, vedar todas as amostras com Parafilm M®, guardar na caixa porta microtubos e estocar em geladeira, inclusive as amostras de água do CQM.

1ª e 2ª PARTES

32. Retirar o restante do material da CSB.
33. Limpar a CSB conforme procedimento MT 01 e organizar a sala.
34. Preencher o registro de procedimento (RP 03) e assinar.
35. Arquivar o RP 03 na pasta *Registros de procedimentos*.

V. Controle de qualidade microbiológico

Um primeiro controle de qualidade da água deve ser realizado tão logo possível, conforme **MT 06–A – Controle de qualidade microbiológico** (Teste A – CQM da água com ensaio de crescimento). O resultado deverá ser registrado no próprio RP 03, que possui um campo apropriado.

Um segundo CQM da água pode ser realizado a qualquer momento no período de armazenamento da suspensão, para testar a segurança das condições de armazenamento. Por este motivo, as alíquotas de água do CQM devem ser guardadas junto com o lote de suspensões representado por elas.

Caso o primeiro CQM da água retorne resultado positivo para contaminação, será necessário repetir a análise para confirmação, conforme orientação a seguir:

Realizar a análise confirmatória de contaminação conforme MT 06-A e registrar o resultado em um formulário RP 06-A. Anexar o formulário ao respectivo RP 03 do lote de suspensões estoque produzido com a água em teste.

Se ainda restarem dúvidas, ou a necessidade de investigar o tipo de contaminação, proceder o CQM por microscopia conforme MT 06-C – Controle de qualidade microbiológico (Teste C – MCF para investigação de tipos morfológicos). Registrar o resultado no formulário RP 06-C e anexar este ao respectivo RP 03.

Amostras contaminadas devem ser imediatamente segregadas e substituídas por novas suspensões estoque preparadas a partir dos esporos depositados na CBafes.

VI. Registro do procedimento

Este procedimento deve ser registrado no RP 03, indicando se foi realizado por completo ou parcialmente e qual parte foi executada.

Algumas estirpes da CBafes foram divididas e armazenadas em 4 alíquotas, identificadas como 1/4; 2/4; 3/4 e 4/4. Outras estirpes foram divididas em 5 alíquotas, identificadas como 1/5, 2/5, 3/5, 4/5 e 5/5. No campo **Alíquota (n/4 ou n/5)**, existem 5 colunas numeradas de 1 a 5. Estes valores correspondem ao número anterior à barra, que identifica a alíquota. Sendo assim, alíquotas com o mesmo número anterior devem ser registradas na mesma coluna. Por exemplo: o operador preparou uma suspensão estoque de esporos da estirpe SDF0040A, utilizando a alíquota 3/5. Então, na primeira coluna do formulário deverá escrever 0040A e, na coluna 3, mesma linha, deverá registrar 3/5.

Na coluna **Observação**, justificar quando houver desvio de procedimento. É considerado desvio de procedimento qualquer desvio ao procedimento padrão. Alguns desvios de procedimento são considerados seguros ou inevitáveis, e estão previstos nos POPs.

Também na coluna **Observação**, relatar suspeitas de contaminação durante o procedimento.

Registrar a retirada e devolução de microtubos de esporos secos da CBafes na planilha **Inventário da CBafes**.

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

Registro de Procedimento – RP

RP 03 – Preparo de suspensões estoque de esporos

Responsável:	Data:
--------------	-------

<input type="checkbox"/> Procedimento completo	<input type="checkbox"/> Procedimento seco	<input type="checkbox"/> Procedimento de hidratação
--	--	---

SDF	Alíquota (n/4 ou n/5)					Desvio de procedimento? (sim ou não)	Suspeita de contaminação? (sim ou não)	Observação
	1	2	3	4	5			
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								

Informe sim ou não

- A CSB foi limpa por você imediatamente antes do uso?
- Fez assepsia e antisepsia das mãos e antebraços antes de iniciar o procedimento na CSB?
- Faltou algum material durante o procedimento? Qual? _____
- O trabalho na CSB foi interrompido por algum motivo?
- Faltou energia elétrica ou o sistema de fluxo laminar foi desligado durante o procedimento?
- Reservou amostras de água para o CQM?
- Vedou todas as amostras com Parafilm M®?
- Todas as alíquotas originais da CBafes foram devolvidas ao estoque principal?
- Registrou a devolução das alíquotas no arquivo *Inventário da CBafes*?

CQM (PP 06-A e B)

Teste B - Inspeção visual: **Negativo** **Positivo**

Teste A - Análise da água:

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE ÁGUA: _____

INÍCIO - data/hora: _____ CONFERÊNCIA - data/hora: _____

Nº de horas de observação: _____ RESULTADO: **Negativo** **Positivo**

RESPONSÁVEL: _____

MT 04 – Aliquotagem de suspensões estoque de esporos

Revisão N ^o	Data	Emissor	Aprovação
00	25/10/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene T. De-Souza
01			

I. Definição

A aliquotagem das **suspensões estoque de esporos** é efetuada para obtenção das **suspensões de trabalho** preparadas conforme procedimento MT 03 – Preparo de suspensões estoque de esporos. A aliquotagem de suspensões estoque é realizada para disponibilizar alíquotas individuais de trabalho aos membros da equipe de pesquisa do LaBafes com finalidades diversas, além da própria análise espectrométrica.

II. Objetivo

Garantir a uniformidade dos resultados de crescimento, em experimentos diversos, pela padronização do procedimento de obtenção das suspensões de trabalho, como reforço ao controle de qualidade microbiológico.

Preservar as suspensões estoque, minimizando o risco de contaminação por repetidas manipulações e exposições ao ambiente.

III. Material


- ✓ Suspensões estoque

 *Trabalhar com 20 estirpes no máximo.*

- ✓ 1 estante para criotubos de base larga (MT 03)
- ✓ 3 pares de luvas de procedimento estéreis
- ✓ 2 canetas de marcação permanente de ponta fina (limpas)
- ✓ 1 estante para micropipetas
- ✓ 1 micropipeta automática P200

- ✓ 1 caixa de ponteiros amarelos com filtro (esterilizadas)
- ✓ (nº alíquotas/40) suportes para tubos eppendorf


 *Utilizar metade da capacidade da estante ou menos.*


 *Este cuidado facilita o manuseio dos tubos eppendorf e previne acidentes (MT 01 – Utilização e manutenção das salas limpas).*

- ✓ Tubos eppendorf de 1.500 µL
- ✓ 3 pinças anatômicas estéreis
- ✓ Abridores de eppendorf esterilizados
- ✓ Parafilm M®
- ✓ Pulverizador com etanol 70%
- ✓ 1 lixeira de CSB

IV. Procedimento

O fracionamento de suspensões estoque deve ser efetuado o mínimo de vezes possível e por um operador treinado, para reduzir o risco de contaminação das amostras. Algumas observações importantes para a aliquotagem das suspensões estoque são:

 *Partículas em suspensão tendem a se depositar no fundo do recipiente quando em repouso. Por esta razão, as suspensões devem ser agitadas em vórtice antes de serem levadas para a CSB.*

 *As micropipetas são uma possível fonte de contaminação, portanto, não ressuspender suspensões estoque com a micropipeta para não injetar o ar do interior da pipeta na amostra.*

 *Nunca inverter a micropipeta! Sempre manter a ponteira inclinada para baixo.*

Micropipetas são contaminadas quando o conteúdo aspirado violentamente é aspirado para a região do êmbolo do instrumento, ou ainda, quando o operador inverte a posição do instrumento verticalmente, favorecendo o escoamento de líquidos - que eventualmente estejam na borda - para o interior da micropipeta. Havendo suspeita de contaminação interna da micropipeta durante o procedimento: **i)** interromper o procedimento, **ii)** utilizar outra micropipeta, **iii)** desinfetar adequadamente, **iv)** repetir a assepsia e antissepsia das mãos e antebraços, **v)** introduzir a micropipeta na CSB e continuar

o procedimento. Posteriormente etiquetar um aviso no instrumento e providenciar a desinfecção.

A. Preparação da CSB

1. Registrar a numeração das amostras que irá trabalhar em uma cópia do RP 04.
2. Proceder ao MT 06-B (Controle de qualidade microbiológico – Teste B – Inspeção visual de amostras líquidas) e registrar o resultado no RP 04.
3. Limpar a CSB e mesa de apoio conforme procedimento MT 01.
4. Ligar o sistema de esterilização da CSB e as lâmpadas UV da sala por, no mínimo, 30 min.
5. Desligar a lâmpada UV da sala e da CSB.
6. Lavar as mãos e antebraços.
7. Introduzir o material de trabalho na CSB, exceto amostras biológicas.
8. Ligar novamente as lâmpadas UV da sala e CSB por mais 30 min.


B. Identificação os tubos eppendorf

9. Vestir um jaleco limpo e fazer a antissepsia as mãos e os braços (MT 02 – Procedimentos básicos).
10. Aplicar álcool 70% até o antebraço e deixar secar naturalmente dentro da capela.
11. Com auxílio de uma pinça esterilizada, retirar os tubos eppendorf do frasco e fechar um a um depositando na estante.

 *Não tocar as bordas ou interior das tampas com a pinça!*

 *Trocar a pinça se suspeitar de contaminação da ponta!*

12. Registrar o número da estirpe SDF, sem os zeros anteriores à numeração, na tampa de cada eppendorf vazio.
13. Registrar o nº da estirpe SDF completo – por exemplo, SDF0002 – na lateral dos tubos eppendorf, acrescentando data, nome do operador e volume de água adicionado.
14. Organizar os tubos eppendorf no suporte em ordem numérica crescente do código SDF.

 *Manter os tubos eppendorf fechados sempre que possível evitando exposição desnecessária ao ar.*

 *Nunca tocar a borda ou parte interna das tampas!*

 *Nunca colocar tampas ou microtubos no piso da CSB!*

 *Descartar qualquer material estéril que tocar o piso.*

15. Regular a micropipeta para o volume que irá utilizar.

C. Aliquotagem

16. Separar as amostras biológicas e colocar no suporte para criotubos de base larga.

 *Retirar do refrigerador somente as amostras que for utilizar.*

17. Agitar em vórtice.

18. Observar visualmente as suspensões estoque conforme MT 06-B e registrar qualquer suspeita de contaminação no RP 04.

19. Colocar as suspensões estoque na bancada de apoio.

20. Repetir a assepsia das mãos e antebraços e antissepsia com etanol 70%.


21. Introduzir as suspensões estoque na CSB ainda com as mãos molhadas e esperar que sequem naturalmente dentro da capela.

22. Calçar as luvas para manipular as amostras biológicas.

23. Com auxílio de uma pinça, retirar a vedação de Parafilm M® das suspensões estoque sem deixar resíduos.

 *Não reutilizar esta pinça: separar à direita, no campo sujo de trabalho, quando terminar a retirada do Parafilm M® (MT 01).*

24. Com auxílio do abridor de tubos eppendorf, abrir somente aqueles identificados para a primeira suspensão estoque que será aliquoteada.

 *Não abra todos os tubos eppendorf de uma vez! Isto acelera o procedimento, mas aumenta consideravelmente o risco de contaminação das suspensões de trabalho.*

25. Afrouxar a tampa do criotubo contendo a primeira suspensão estoque que será aliquoteada e deixar no suporte.

26. Encaixar a ponteira na micropipeta.

27. Levantar a tampa do criotubo com uma das mãos e retirar o volume desejado com a pipeta.

 *Não injetar ar na suspensão! Risco de contaminação!*

28. Recolocar a tampa do criotubo sem atarraxar.

29. Transferir o volume coletado para o respectivo eppendorf vazio e fechar imediatamente a tampa.

 *Cuidado para não tocar a ponteira em nenhum objeto!*

 *Nunca inverter a micropipeta! Sempre manter a ponteira inclinada para baixo.*

30. Abrir novamente o criotubo da suspensão estoque e retirar a próxima alíquota, como nos passos anteriores.

31. Após terminar com a primeira suspensão estoque, atarraxar a tampa do criotubo apertando e afrouxar a tampa da próxima suspensão estoque que será aliquoteada.

32. Repetir o procedimento para todas as alíquotas.


33. Ao final, vedar todas as amostras com tiras de Parafilm M® e estocar no refrigerador.

34. Retirar o restante do material da CSB e proceder à limpeza conforme MT 01.

35. Preencher imediatamente o registro de procedimento (RP 04), assinar e arquivar.

V. Controle de qualidade microbiológico

O Teste B do MT 06 - Controle de qualidade microbiológico (CQM), deve ser realizado antes da aliquoteagem e sempre que for utilizar uma suspensão de trabalho (consultar o Fluxograma do Manual da CBafes).

 *Havendo suspeita de contaminação da suspensão estoque na análise visual (MT 06-B), proceder ao CQM por MCF (MT 06-C) e registrar o resultado no respectivo formulário RP 04.*

VI. Registro

Este procedimento deve ser registrado no RP 04 assim como o resultado do CQM quando for realizado.

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

Registro de Procedimento – RP

RP 04 – Aliquotagem das suspensões estoque de esporos

Responsável:	Data:
--------------	-------

DESTINATÁRIOS DAS ALÍQUOTAS:

Estirpe SDF	Volume retirado (µl)	Suspeita de contaminação? PP 06-B (sim ou não)	Confirmada por MCF? PP 06-C (sim ou não)	Decisão sobre a amostra (preservada, segregada para investigação ou descartada)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

Observações:

Informe sim ou não

- A CSB foi limpa por você imediatamente antes do uso?
- Fez a assepsia e antissepsia das mãos e antebraços antes de iniciar o procedimento na CSB?
- Faltou algum material durante o procedimento? Qual? _____
- O trabalho na CSB foi interrompido por algum motivo?
- Faltou energia elétrica ou o sistema de fluxo laminar foi desligado durante o procedimento?
- Vedou todas as amostras com Parafilm M®?

MT 05 – Preparação de placas de cultivo

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	27/10/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definições

As **placas de cultivo padrão** das estirpes SDFs, que se destinam à MALDI-TOF MS são preparadas no LaBafes, com placas de Petri de poliestireno transparente, descartáveis e estéreis, com diâmetro de 90 mm por 15 mm de profundidade.

O **meio de cultura padrão** utilizado para preenchimento das placas de Petri é o meio complexo Luria-Bertani (LB) sólido (1,8% de ágar) e pH 7,2. A preparação do meio deve ser conforme descrita no manual Técnicas Básicas em Biologia Molecular, página 51, disponível neste laboratório. Este POP orienta a preparação das placas de cultivo a partir do meio de cultura previamente preparado.

Todos os cultivos destinados à construção da biblioteca de perfis moleculares devem ser preparados em **meio de cultura padrão** segundo as orientações deste POP. As condições de crescimento também são padronizadas, *vide* MT 07 – Cultivo para 1ª análise espectrométrica e MT 08 – Cultivo para 2ª análise espectrométrica.

Cultivos destinados a outras finalidades da pesquisa, podem ser inoculados em **placas de cultivo não padronizadas** meios de cultura diferentes, a critério do pesquisador, conforme as variáveis que deseja observar (*vide* MT 12 – Cultivo para análise de Célula Intacta e MT 14 – Cultivo para ensaio avulso com extração de proteínas). **Placas não padronizadas** são placas de Petri contendo meio de cultura sólido alternativo, com composição, ou pH, diferente do padrão (LB contendo 1,8% de ágar; pH 7,2). Contudo, exceto por estas variáveis, as placas não padronizadas devem ser confeccionadas como descrito neste POP e com registro no formulário RP 05. Outrossim, a composição do meio alternativo deve ser informada nos formulários específicos para ensaios que não se destinam à construção da biblioteca: RP 12 ou RP 14.

II. Objetivos

Padronizar os meios de cultura e a preparação das placas de cultivo com a finalidade de obter amostras padronizadas para a MALDI-TOF MS. Padronizar as condições de cultivo. Prevenir contaminação durante a manipulação e garantir a esterilidade das placas de cultura pelos procedimentos de controle de qualidade microbiológico (CQM).

III. Material

- ✓ Pulverizador contendo etanol 70%
- ✓ 2 pares de luvas estéreis
- ✓ 1 caneta de marcação permanente com ponta fina (desinfetada)
- ✓ 1 estante para tubos Falcon de 50 mL
- ✓ 1 tubo Falcon de 50 mL estéril
- ✓ 25 placas de Petri
- ✓ 1 tesoura (limpa e desinfetada)
- ✓ 1 rolo de filme de PVC
- ✓ 1 rolo de fita crepe
- ✓ 2 frascos de 500 mL (vidro borossilicato autoclavável com tampa rosqueável)
- ✓ 1 L de meio LB sólido (1,8% de ágar) pH 7,2
- ✓ Estufa de incubação com temperatura ajustada para 28 °C

IV. Procedimento

Este procedimento orienta: i) a esterilização e distribuição do meio de cultura nas placas de Petri; ii) o CQM por amostragem; iii) o armazenamento e registro das novas placas de cultivo; iv) o CQM do lote completo e, v) o registro das placas utilizadas no formulário de preparação do lote (RP 05).

A. Esterilização do meio de cultura

1. Preparar 1 L de meio LB com 1,8% de ágar, conforme instrução do manual de Técnicas Básicas em Biologia Molecular, primeira edição (pág. 51).
2. Verter o meio LB em um frasco autoclavável.


3. Cobrir a tampa com papel pardo (Kraft) e elástico, e desenroscar $\frac{1}{2}$ volta.
4. Autoclavar a 121 °C durante 30 min (MT 02 – Procedimentos básicos).

B. Preparação da CSB

5. Limpar a CSB e mesa de apoio conforme procedimento MT 01 – Utilização e manutenção das salas limpas.
6. Ligar o sistema de circulação de ar da CSB.
7. Limpar as embalagens plásticas das placas de Petri com etanol 70% e papel toalha.
8. Aspergir novamente etanol 70% e depositar os pacotes contendo as placas de Petri, ainda úmidos, na CSB.
9. Organizar o restante do material na CSB deixando o rolo de fita crepe e o pulverizador de etanol 70% na bancada de apoio.
10. Acender as lâmpadas UV da CSB e da sala por, no mínimo, 30 min.
11. Preencher uma cópia do RP 05 com as informações iniciais.

C. Resfriamento do meio de cultura

12. Desligar e abrir a autoclave conforme MT 02 (item III.A – Esterilização de material limpo).
13. Com auxílio da garra metálica e luva antitérmica, retirar os frascos contendo o meio de cultura da autoclave, depositar em uma bandeja e apertar as tampas imediatamente.
14. Desligar as luzes UV da sala e CSB.
15. Depositar a bandeja na bancada de apoio.
16. Lavar as mãos.
17. Aspergir etanol 70% nos frascos, retirar o papel de proteção da tampa e introduzir os frascos na CSB.
18. Ligar a luz UV da CSB e deixar o meio resfriar por 30 min aproximadamente, até que seja possível segurar os frascos com segurança.

 *A temperatura do meio deve ser suficiente (cerca de 50 °C) para que não ocorra solidificação antes de terminar a distribuição nas placas.*

D. Distribuição do meio nas placas de Petri

19. Vestir um jaleco limpo, arregaçar as mangas e fazer a assepsia das mãos e antebraços, pulverizando etanol 70% imediatamente antes de iniciar a manipulação na CSB.

20. Cortar as embalagens plásticas das placas de Petri sem danificar para que possam ser reutilizadas.

21. Retirar as placas **com cuidado para não abrir** e distribuir em fileiras sobre o piso, começando pelo fundo da capela e deixando o espaço de uma placa, à esquerda de cada fileira, para empilhar as tampas.

22. Deixar as embalagens plásticas dentro da CSB, dobradas no campo direito.

 *Não retirar as embalagens plásticas da CSB se pretender reutilizar.*

23. Abrir as placas de Petri da fileira mais distante e depositar as tampas, com a abertura voltada para cima, no espaço deixado do lado esquerdo.

24. Utilizando o tubo Falcon, distribuir 40 mL de meio nas placas abertas.

 *Verter o meio suavemente para evitar a formação de bolhas.*

 *Atenção para não fazer movimentos por sobre o frasco de meio de cultura aberto!*

25. Abrir as placas da fileira seguinte, empilhando as tampas à esquerda e repetir o procedimento.

 *Nunca fazer movimentos por sobre placas abertas!*

26. Terminando a distribuição, deixar as placas abertas na CSB por até a solidificação do meio (cerca de 10 min).

C. Embalagem e armazenamento


27. Higienizar novamente as mãos e antebraços e retornar à CSB fechando todas as placas uma a uma, começando pelas mais próximas, de forma a não fazer movimentos sobre placas abertas.

28. Considerar contaminadas quaisquer placas que tenham sofrido:

- Transbordamento do meio de cultura;
- Toque no interior da tampa;
- Toque na superfície do meio de cultura.

 *Placas suspeitas de contaminação devem ser descartadas.*

29. Aproveitando as embalagens plásticas originais, ou utilizando filme de PVC, embalar as placas **dentro da CSB**, em pacotes de 3, 6 ou 9 unidades.

 *Estas quantidades são múltiplos inteiros das que serão utilizadas nos ensaios de crescimento. Isto evita desperdício de material posto que, após retiradas das embalagens secundárias, as placas excedentes não poderão ser reutilizadas.*

 *Atenção para não abrir as tampas durante a embalagem.*

30. Lacrar as embalagens com fita crepe.

 *Não acondicionar as placas em embalagens plásticas reaproveitadas de terceiros! Use apenas o material que introduziu na CSB.*

31. Deixar duas placas separadas para o CQM por amostragem.

32. Na parte inferior das placas de cultivo destinadas ao CQM, registrar: CQM, data do lote produzido e nome do operador.

33. Acondicionar placas de Petri restantes em uma embalagem original para reutilização posterior.

34. Guardar as placas não utilizadas, devidamente embaladas, na prateleira da sala da CSB.

35. Identificar todas as embalagens secundárias com nome do operador e data.

36. Guardar as placas de cultivo em uma caixa plástica limpa e desinfetada.

37. Identificar com o nome do operador e data, e guardar na câmara fria.

38. Incubar as placas do CQM em estufa a 28 °C.

39. Limpar a CSB conforme procedimento MT 01.

40. Preencher o registro de procedimento (RP 05).

V. Controle de qualidade microbiológico

As placas de cultivo devem ser submetidas a dois tipos de CQM: controle por amostragem e controle de bancada. O **CQM por amostragem** serve para condenar um lote com antecedência se o resultado for positivo, mas não pode garantir que todas as placas estejam livres de contaminação se o resultado for negativo. Isto, porque não é possível garantir a uniformidade de uma operação manual. Em adição, as placas estão sujeitas à contaminação posterior na estufa durante a incubação. Sendo assim, além do CQM por amostragem, o experimento deve ser planejado e as placas necessárias devem ser colocadas sobre a bancada de trabalho, à temperatura ambiente, com, pelo menos, 5 dias de antecedência. O **CQM de bancada** serve para comprovar a esterilidade de todas as placas do lote produzido.

A. CQM por amostragem

1. Observar por cinco dias (120 horas) o crescimento de possíveis contaminantes nas placas do CQM incubadas a 28 °C.
2. Registrar o resultado do teste no formulário RP 05, relativo ao lote produzido (ver item VI).

B. CQM de bancada

1. Registrar a retirada de placas do estoque no respectivo RP 05 do lote.
2. Deixar as placas à temperatura ambiente, sobre a bancada de trabalho, por 5 dias (120 h).
3. Certificar a ausência de crescimento de microrganismos contaminantes antes de utilizar as placas.
4. Registrar o resultado da condição da placa no RP 05 e assinar na coluna **Usuário**.

 *Não utilizar placas confeccionadas por terceiros, a não ser que estejam em acordo com este procedimento e registradas no RP 05.*

VI. Registro do procedimento

O formulário RP 05 possui três partes a serem preenchidas em tempos diferentes:

- i) a 1ª parte deve ser preenchida ao finalizar o preparo do lote de placas de cultivo, corresponde à primeira tabela e questionário sim-ou-não.
- ii) a 2ª parte (controle do consumo) deve ser preenchida sempre que forem retiradas placas deste lote para qualquer tipo de ensaio.
- iii) 3ª parte refere-se ao CQM do lote por amostragem e deve ser preenchida no dia da conferência do ensaio.

No campo **Suspeita de contaminação**, registrar o número de placas que sofreram algum desvio de procedimento, por exemplo: movimentos por sobre a placa aberta, transbordamento do meio durante o preenchimento, toque dos dedos no interior da placa, formação de bolhas, ou qualquer outra falha de procedimento. Estes acidentes são comuns no início e diminuem com a prática do operador.

 *No caso de toque no interior da placa ou transbordamento do meio, descartar estas e registrar a ocorrência.*

VIII. Referências

MARANHÃO, A Q. (Org.); AZEVEDO, M. O. (Org.); FELIPE, M. S. S. (Org.); BRIGÍDO, M. M. (Org.); DE-SOUZA, MARLENE TEIXEIRA (Org.). Técnicas Básicas em Biologia Molecular. 1ª ed. Brasília: Universidade de Brasília, 2003. v. 1. 211p

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

LaBafes - UnB/IB/CEL

RP 05 – Preparação das placas de cultivo

Responsável:	Data:
--------------	-------

Nº de placas preparadas	Nº de suspeitas de contaminação	Nº de placas p/ CQ	Total de placas estocadas

CONTROLE de CONSUMO

Nº de placas	Data	Destinação (nº e data do RP)	CQM de bancada 5 dd/28 °C (sim, não, não fiz)	Usuário (assinatura)

Informe sim ou não

- A CSB foi limpa por você imediatamente antes do uso?
- Fez a assepsia e antissepsia das mãos e antebraços antes de iniciar o procedimento na CSB?
- Faltou algum material durante o procedimento? Qual? _____
- O trabalho na CSB foi interrompido por algum motivo?
- Faltou energia elétrica ou o sistema de fluxo laminar foi desligado durante o procedimento?
- Separou 2 placas para o CQM por amostragem?
- Lacrou e identificou todas as embalagens secundárias com nome e data?

CQM por amostragem

Início: ____/____/____ - ____ h ____ min
Conferência: ____/____/____ - ____ h ____ min
Tempo de incubação: ____ h ____ min

Resultado: POSITIVO NEGATIVO

Responsável:

MT 06 – Controle de qualidade microbiológico (CQM)

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	27/10/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definições

O **controle de qualidade microbiológico (CQM)** é um sistema de verificação da presença de contaminantes microbianos, que deve ser aplicado a ambientes, equipamentos, instrumentos, soluções de trabalho ou amostras biológicas. O CQM de ambientes, equipamentos e instrumentos faz parte da rotina laboratorial e está descrito no Manual de Boas Práticas do LaBafes.

O CQM pode ser direto, indireto ou por amostragem. Três tipos de testes são aplicados aos procedimentos deste manual:

Teste A: ensaio de crescimento com controle negativo. Realizado com alíquotas da água de preparo das suspensões estoque de esporos e repetido em momentos distintos.

Teste B: inspeção visual de amostras líquidas antes da utilização.

Teste C: verificação por Microscopia de Contraste de Fase (MCF), sendo que:

- em suspensões de esporos deve ser observada a presença de células vegetativas;
- em cultivos sólidos ou líquidos deve ser verificada a existência de mais de um tipo morfológico (contaminante). As células de uma cultura pura possuem a mesma morfologia.

O CQM deve ser acompanhado de meticoloso **controle das condições de desinfecção da CSB e estufa de incubação** para que o resultado seja confiável. Observar o exemplo da figura 1, em que um lote de placas foi reprovado no ensaio de crescimento (CQM por amostragem), sendo, em contrapartida, aprovadas no CQM de bancada. A contaminação originária da estufa foi confirmada porque todos os cultivos em incubação no período foram contaminados. Nestes casos, o CQM de bancada é contraprova para aprovação do lote.

Neste manual, entenda-se como **base** das placas de cultivo, a parte da placa de Petri que contém o meio sólido. Entenda-se como **posição de repouso**, a placa fechada com a base voltada para cima. A **tampa** corresponde à parte maior da placa de Petri, livre de meio de cultura (Figura 1B).

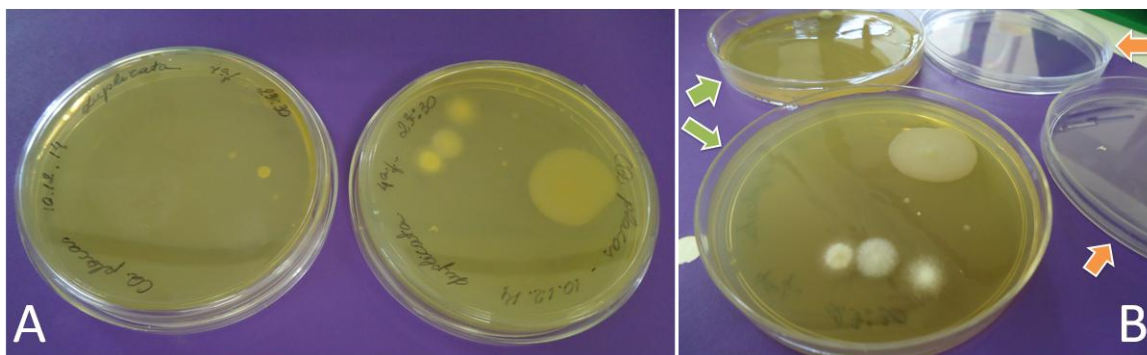


Figura 1. Exemplo de controle de qualidade microbiológico e partes da placa de Petri. A figura mostra as placas utilizadas para o CQM referente ao **RP 05** de 10/12/2014, apresentando resultado positivo após 3 dias de incubação. No mesmo período constatou-se contaminação na estufa de crescimento. Este lote de placas foi aprovado no controle de bancada. **(A)** Placas de cultivo fechadas, em posição de repouso, com identificação do ensaio na base. **(B)** Placas de cultivo abertas. As **setas verdes** indicam as partes inferiores das placas de Petri, que contém meio sólido, e as **alaranjadas** indicam as tampas – ou partes superiores – que aparecem com as aberturas voltadas para cima.

II. Objetivo

Monitorar a pureza das amostras que serão analisadas na espectrometria de massa MALDI-TOF para favorecer a reprodutibilidade dos espectros. Rastrear e dirimir dúvidas sobre a qualidade dos procedimentos envolvidos no processo.

III. Aplicação e registro

O CQM deve ser realizado obrigatoriamente para os procedimentos descritos abaixo, que representam etapas críticas na preparação de amostras para o ensaio espectrométrico.

MT 03 – Preparo de suspensões estoque de esporos

MT 04 – Aliquotagem de suspensões estoque de esporos

MT 05 – Preparação das placas de cultivo

MT 06 – Controle de qualidade microbiológico (CQM)

MT 07 – Cultivo para 1ª análise espectrométrica


MT 08 – Cultivo para 2ª análise espectrométrica

MT 12 – Cultivo para análise de Célula Intacta

MT 14 – Cultivo para ensaio avulso com extração de proteínas

 *Observe que o MT 06-A deve ser acompanhado de controle negativo.*

Todos os **Registros de Procedimento** (RPs) dos POPs acima, possuem um campo para anotação do resultado do 1º teste microbiológico, porém, quando o resultado for positivo, deve ser realizado um 2º teste, confirmatório, que pode ser simplesmente uma repetição do 1º teste ou realizado por intermédio de outro método.

 *Sempre confirmar resultados positivos do CQM antes de descartar amostras ou repetir experimentos complexos.*

Os RPs dos procedimentos citados acima não possuem campo para registrar o teste confirmatório com resultado positivo. **Os resultados dos testes confirmatórios** devem ser registrados nos formulários **RP 06-A, B ou C**, conforme o caso, e estes devem ser anexados ao respectivo RP da amostra.

 *Os RPs 06-A, B ou C, servem somente para registrar testes de confirmação com **resultado positivo** ou testes de CQM independentes.*

IV. Teste A - CQM da água com ensaio de crescimento

Consiste em confirmar a esterilidade da água usada no preparo das suspensões de esporos. É realizado inoculando 100 µL de cada amostra de água em 3 placas de Petri contendo meio LB e verificando o crescimento de possíveis microrganismos contaminantes. Este ensaio aplica-se ao procedimento MT 03 - Preparo de suspensões estoque de esporos.

A. Material

- ✓ N amostras da água de preparação das suspensões (MT 03)
- ✓ (N x 3)+3 placas de Petri contendo meio LB

 *Obrigatoriamente placas confeccionadas conforme procedimento MT 05 - Preparação das placas de cultivo.*

 *As placas devem ter sido aprovadas no CQM de bancada, conforme MT 05.*

 *Tenha **placas excedentes** na CSB para cobrir eventuais falhas de procedimento.*

- ✓ 1 micropipeta P100 ou P200
- ✓ 1 suporte para pipetas
- ✓ 1 caixa de ponteiros amarelos estéreis
- ✓ Alças de Drigalski estéreis
- ✓ 1 suporte ou recipiente autoclavado para as alças de Drigalski
- ✓ 2 pares de luvas de procedimento estéreis
- ✓ 1 caneta de marcação permanente de ponta fina (limpa e desinfetada)
- ✓ Tiras de Parafilm M®
- ✓ 1 pinça esterilizada
- ✓ 1 estante para microtubos autoclavada
- ✓ 1 lixeira de CSB (frasco de vidro autoclavado)
- ✓ Pulverizador com etanol 70%
- ✓ Estufa ajustada para 28 °C

B. Procedimento


Antes de iniciar o procedimento verificar se as amostras de água estão devidamente protegidas com Parafilm M®. Se tiverem sido abertas anteriormente, ou armazenadas em local/condição diferente que as respectivas suspensões, estas amostras não serão representativas do lote e o CQM será inválido.

1. Conferir as condições de temperatura e limpeza da estufa de crescimento a 28 °C e reservar o espaço necessário para os cultivos.
2. Registrar a retirada de placas do estoque no respectivo RP 05 do lote conforme orientação do MT 05.
3. Limpar a CSB e mesa de apoio conforme procedimento MT 01 - Utilização e manutenção de salas limpas.
4. Ligar o sistema de esterilização da CSB e a luz UV da sala por, no mínimo, 30 min.
5. Desligar as lâmpadas UV da sala e da capela.
6. Fazer a assepsia das mãos e antebraços e aplicar etanol 70%.
7. Abrir as embalagens plásticas das placas de Petri, retirar as placas com cuidado para não abrir e depositar imediatamente na CSB, em posição de repouso.
8. Limpar as embalagens das alças de Drigalski com etanol 70% colocando-as na CSB, dentro do suporte ou frasco, evitando o contato com o piso da capela.

9. Organizar o restante do material necessário dentro da CSB, exceto as amostras de água, deixando o pulverizador de etanol 70% na bancada de apoio.
10. Acender as lâmpadas UV da sala e da CSB por mais 30 min.

 *Não introduzir as amostras de água que serão analisadas na CSB neste momento!*

 *Nunca expor as amostras de água à luz UV!*

 *As amostras não devem ser submetidas a nenhum tratamento diferenciado do lote de suspensões estoque que representam.*

11. Separar as amostras de água que irá utilizar e proceder ao Teste B - Inspeção visual de amostra líquida ou água de preparação.
12. Observando turbidez, fazer uma marca na tampa do microtubo para posterior registro no RP 03.
13. Apagar as luzes UV da sala e da CSB e depositar as amostras na bancada de apoio.
14. Vestir um jaleco limpo, arregaçar as mangas e fazer a assepsia das mãos e antebraços (MT 02 - Procedimentos básicos).
15. Pulverizar etanol 70% nas mãos e antebraços imediatamente antes de começar o trabalho na CSB.
16. Depositar as amostras na capela.
17. Organizar as placas de Petri no campo esquerdo.
18. Abrir o saco de alças de Drigalski pelo lado dos cabos e depositar no suporte com a abertura para cima, no campo direito.
19. Identificar todas as placas de cultivo na base, com data, código da amostra, nome do operador e hora aproximada de colocação na estufa, sendo 3 placas para cada amostra de água (triplicata).

 *As 3 placas excedentes serão utilizadas para controle negativo de crescimento (Cneg).*


20. Identificar as placas do controle negativo escrevendo **Cneg** na base, data, nome e hora aproximada de colocação na estufa.
21. Com auxílio da pinça, retirar o Parafilm M® das amostras sem deixar resíduos.
22. Abrir a caixa de ponteiras e depositar as 3 primeiras placas de Petri no campo central, com a tampa voltada para cima, sem abrir.
23. Abrir o microtubo da amostra de água, mantendo-o na estante.

 *Para tubos eppendorf utilizar um abridor.*

24. Encaixar a ponteira na pipeta.

 *Manter a ponteira para baixo!*

25. Levantar a tampa da primeira placa de Petri, transferir a amostra de água e tampar imediatamente.

 *Caso tocar a ponteira em qualquer coisa, descarte a amostra coletada e repita o procedimento com ponteira nova!*

26. Repetir o procedimento para as outras duas placas.

27. Pegar uma alça de Drigalski, abrir a tampa da 1ª placa de Petri e distribuir a amostra sobre o meio uniformemente.

28. Fechar imediatamente a tampa, afastar a placa para mais distante do campo de trabalho.

29. Repetir a mesma sequência de movimentos para as duas outras placas.

 *Manter sempre as placas fechadas, abrindo somente no momento de aplicar e distribuir a amostra!*

 *Nunca realizar movimentos sobre placas abertas!*

 *Sob suspeita de contaminação, descartar a placa de cultivo e preparar outra.*

30. Abrir as placas do Cneg por 20 s e tampar.

 *As placas do controle negativo não recebem amostra de água.*

31. Ao final retirar as placas da CSB e acomodar na estufa de crescimento a 28 °C, evitando empilhamento.

32. Retornar à sala da CSB, recolher o material, proceder à limpeza e organização da sala conforme procedimento MT 01.

33. Fazer o registro do procedimento no respectivo RP 03 - Preparo de suspensões estoque de esporos, ou RP 06-A.

C. Ensaio microbiológico

Deixar as placas do CQM na estufa a 28 °C por 5 dias (120 h) e observar o crescimento de colônias durante este período. Havendo crescimento, o resultado deve ser considerado positivo e, não havendo crescimento, negativo. O **resultado positivo** só será confiável se as placas **Cneg** não apresentarem contaminação. Se as placas do **Cneg** apresentarem crescimento, isto inviabiliza o ensaio. Significa que as placas de cultivo foram contaminadas

durante o procedimento na CSB ou na estufa de crescimento. Neste caso, devem ser tomadas as seguintes medidas:

1. Verificar as possíveis falhas de procedimento como, por exemplo, autoclavagem inadequada de material.
2. Providenciar a desinfecção e verificar a qualificação de equipamentos, tais como:
i) estufas de crescimento; ii) pipetas; iii) autoclaves; iv) CSB.
3. Repetir o ensaio de crescimento com outra alíquota de água da respectiva amostra suspeita.

Havendo confirmação do resultado positivo, considerar as amostras contaminadas e descartar ou, se for de interesse, realizar o Teste C para a suspensão estoque correspondente à alíquota de água analisada.

D. Registro do procedimento

O resultado do Teste A deve ser registrado como positivo ou negativo, no formulário **RP 03**. Preencher todos os campos relativos ao CQM e assinar.

O campo relativo à **identidade da amostra de água** deve ser preenchido com os dados rotulados no microtubo da amostra durante o preparo das suspensões estoque. Como são retiradas mais de uma alíquota de água para o CQM, pode ser, por exemplo: *CQM água – RP 03 – 25.10.14 - alíquota A (ou B, C, etc.)*.

Para **testes de confirmação** de resultado positivo, fazer os registros no formulário **RP 06-A** e anexar ao respectivo RP 03 de preparação da amostra em teste.

Todos os RPs devem ser guardados na pasta **Registros de procedimentos** do manual da Biblioteca de perfis moleculares da CBafes.

V. Teste B – Inspeção visual de amostra líquida

A inspeção visual deve ser feita rotineiramente antes da utilização de qualquer amostra líquida, ou água de preparação das suspensões, e sempre antes de trabalhar com suspensões de esporos. Aplica-se aos procedimentos:

- MT 04 – Aliquotagem de suspensões estoque de esporos
- MT 06 – A – CQM da água com ensaio de crescimento
- MT 07 – Cultivo para a 1ª análise espectrométrica

MT 08 – Cultivo para 2ª análise espectrométrica

MT 12 – Cultivo para análise de Célula Intacta

MT 14 – Cultivo para ensaio avulso com extração de proteínas

O teste B também pode ser aplicado aleatoriamente na checagem de suspensões estoque armazenadas. Neste caso, havendo suspeita de contaminação, deve-se preencher o formulário RP 06-B, assinalar RP 03 no campo **RP de referência**, e anexar o RP 06-B ao RP 03 de preparação das suspensões estoque de esporos.

Este teste é simples, mas imprescindível e é necessário **ser registrado apenas se o resultado for positivo**.

1. Retirar da geladeira as suspensões de esporos que irá utilizar – ou qualquer outra amostra líquida – e organizar em uma estante para microtubos.
2. Agitar os microtubos no vórtice e observar contra a luz a formação de turbidez.
3. Considerar suspeitas de contaminação as amostras que apresentarem turbidez. Reservar para proceder ao teste C.
4. Caso a turbidez seja evidente, e não haja interesse em investigar o tipo de contaminação, descartar a amostra e registrar o resultado no respectivo RP.
5. Caso a contaminação seja confirmada com o teste de confirmação, assinalar *descartada* no RP 06-B ou indicar *preservada*, se for realizar o Teste C.

 *Anexar o RP 06-B ao respectivo RP de preparação da amostra.*

VI. Teste C – Investigação da presença de células vegetativas por MCF

Este ensaio consiste na retirada de uma alíquota de 5 µL da suspensão de esporos com suspeita de contaminação para confirmar a presença de células vegetativas em MCF. Deve ser feito em triplicata e apenas se houver suspeita de contaminação da amostra após o resultado do teste A ou B. Aplica-se aos procedimentos:

MT 04 – Aliquotagem de suspensões estoque

MT 07 – Cultivo para a 1ª análise espectrométrica

MT 08 – Cultivo para 2ª análise espectrométrica

MT 12 – Cultivo para análise de Célula Intacta

MT 14 – Cultivo para ensaio avulso com extração de proteínas

Para **suspensões de esporos** sob suspeita de contaminação, investigar, em MCF, a presença de células vegetativas, registrando o resultado no respectivo RP, ou no RP 06-C. Alguns formulários não possuem campo para registro do teste C, portanto, anexar o RP 06-C ao RP de preparação da suspensão de esporos correspondente.


A investigação por MCF também pode ser realizada com colônias para dirimir dúvidas sobre contaminação ou contaminação cruzada. Neste caso observa-se a presença de diferentes tipos morfológicos nos cultivos, mas o teste não é obrigatório e não possui um procedimento específico. Discuta o resultado com a orientadora do projeto, faça um relatório à parte e tome as providências necessárias se for o caso.

A. Material

- ✓ N amostras suspeitas de suspensões de esporos
- ✓ Frasco esterilizado contendo água destilada
- ✓ 1 estante para micropipetas
- ✓ 1 estante para microtubos ou,
- ✓ 1 estante para criotubos de base larga (suspensões estoque)
- ✓ 2 abridores de tubos eppendorf esterilizados (se for o caso)
- ✓ (N x 3) lâminas de microscópio e lamínulas
- ✓ 1 caneta de marcação permanente limpa e desinfetada
- ✓ Bandeja de aço inoxidável esterilizada para acomodação das lâminas na CSB
- ✓ Ponteiras amarelas esterilizadas
- ✓ 1 micropipeta P20 regulada para 5 µL
- ✓ 1 lixeira de CSB (frasco de vidro autoclavado)
- ✓ 3 pares de luvas de procedimento estéreis
- ✓ Pulverizador com etanol 70%
- ✓ Microscópio óptico equipado com contraste de fase
- ✓ Óleo de imersão
- ✓ Solvente de limpeza para as objetivas
- ✓ Papel macio para limpeza das objetivas

B. Procedimento

1. Em um formulário RP 04 ou RP 06-C, registrar o código das amostras que serão testadas, a data do ensaio e o nome do operador.

 *Preparar as lâminas três a três (triplicatas) e observar imediatamente, para evitar o ressecamento das amostras a serem observadas a fresco.*

2. Limpar a CSB como descrito no MT 01 – Utilização e manutenção de salas limpas, ligar o sistema de esterilização e a lâmpada UV da sala por 30 min.
3. Separar o material necessário ao procedimento.
4. Fazer a assepsia das mãos e antebraços (MT 02).
5. A pagar as lâmpadas UV da sala e CSB e depositar o material esterilizado na capela.
6. Depositar as lâminas na bandeja.
7. Ligar as lâmpadas UV da CSB e da sala por mais 30 min.
8. Recuperar as amostras suspeitas estocadas no refrigerador.
9. Apagar as lâmpadas UV da sala e da CSB.
10. Depositar as amostras na bancada de apoio.


 ***Não expor amostras biológicas à radiação UV!***

11. Vestir um jaleco limpo, arregaçar as mangas e fazer a antissepsia das mãos e antebraços.
12. Pulverizar etanol 70% nas mãos e antebraços e introduzir as amostras na capela.
13. Identificar as lâminas com o código da estirpe SDF.
14. Calçar as luvas de procedimento para manusear as amostras biológicas.
15. Posicionar a bandeja no campo principal de trabalho (MT 01) de forma a não precisar fazer movimentos sobre amostras abertas.

 ***Nunca realizar movimentos sobre amostras ou recipientes estéreis abertos!***


 *Para tubos eppendorf, utilizar o abridor, conforme orientação do MT 01.*

16. Encaixar a ponteira na micropipeta e abrir o microtubo da primeira amostra.
17. Retirar 5 µL e fechar imediatamente o microtubo.
18. Aplicar a amostra na primeira lâmina e descartar a ponteira.

 *Para cultivo em meio sólido utilizar uma ponteira limpa para aplicar pequena quantidade da colônia na lâmina contendo 5 µL de água destilada. Misturar as células com a água, fazendo movimentos circulares com a ponteira.*

19. Repetir a operação para as outras duas lâminas.

20. Depositar imediatamente as lamínulas sobre a amostra, evitando ressecamento da amostra.
21. Observar, imediatamente, a lâmina em MCF e registrar as observações no RP 06-C ou respectivo RP da amostra (*vide* fluxograma de trabalho).
22. Descartar as lâminas conforme protocolo laboratorial.

 *Se estiver trabalhando com várias amostras, lavar as mãos novamente e pulverizar etanol 70% antes de continuar o procedimento na capela.*

23. Retornar à sala da CSB, preparar novas lâminas e proceder à observação microscópica.
24. Ao final, desligar e limpar o microscópio conforme protocolo laboratorial.
25. Recolher o material usado e organizar a sala da CSB conforme MT 01.
26. Anexar o RP 06-C ao respectivo RP da amostra (se for o caso).
27. Guardar a pasta de registros de procedimentos.

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

Registro de Procedimento – RP

RP 06-A – Controle de qualidade microbiológico (CQM) Teste A – CQ da água com ensaio de crescimento

Responsável:	Data:
--------------	-------

Identificação da amostra de água:

Data do RP 03 de referência: ____/____/____

Dados sobre o ensaio

Início: ____/____/____ - ____ h ____ min

Conferência: ____/____/____ - ____ h ____ min

Tempo de crescimento: ____ h ____ min

Resultado: **POSITIVO** **NEGATIVO**

Observações:

Informe sim ou não

- As placas de cultivo foram submetidas ao CQM de bancada por 120 horas?
- Alguma placa do lote apresentou contaminação no teste de bancada?
- Registrou a retirada das placas no RP 05?
- As amostras de água estavam vedadas com Parafilm M®?
- A CSB foi limpa por você imediatamente antes do uso?
- Fez a assepsia e antisepsia das mãos e antebraços antes de iniciar o procedimento?
- Faltou algum material durante o procedimento? Qual? _____
- O trabalho na CSB foi interrompido por algum motivo?
- Faltou energia elétrica ou o sistema de fluxo laminar foi desligado durante o procedimento?

Registro de Procedimento – RP

RP 06-B – Controle de qualidade microbiológico (CQM) Teste B – Inspeção visual de amostras líquidas

Responsável: _____	Data: _____
--------------------	-------------

Tipo de amostra: Água Suspensão estoque Suspensão de trabalho Outra

Identificação da amostra de água: _____

RP de referência: RP 03 RP 04 RP 06 RP 07 RP 08
 RP 12 RP 14 Data do RP: ____/____/____

Foi observado turbidez nas seguintes amostras

Estirpe SDF	Decisão sobre a amostra	
	Preservada	Descartada
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Estirpe SDF	Decisão sobre a amostra	
	Preservada	Descartada
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Informe sim ou não

- As amostras estavam vedadas com parafilme?
- As amostras de água estavam armazenadas junto com as respectivas suspensões estoque?

Registro de Procedimento – RP

RP 06-C – Controle de qualidade microbiológico (CQM)

Teste C – MCF para investigação de tipos morfológicos

Responsável:	Data:
--------------	-------

Tipo de amostra: Água Suspensão estoque Suspensão de trabalho
 Colônia /meio sólido Colônia/meio líquido

RP de referência: RP 03 RP 04 RP 07 RP 08 RP 12 RP 14

Data do RP de referência:

Linagem SDF	Presença de células vegetativas (sim ou não)	Presença de diferentes tipos morfológicos (sim ou não)	Decisão sobre a amostra	
			Preservada	Descartada
1			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
18			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Observação:

MT 07 – Cultivo para 1ª análise espectrométrica

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	27/10/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definições

Os cultivos destinados à constituição da biblioteca são realizados em dois momentos para cada estirpe SDF, correspondentes a dois POPs: **MT 07** e **MT 08 – Cultivo para a 2ª análise espectrométrica**. Por esta metodologia, ao final, devem ser obtidos 6 espectros de qualidade aceitável para cada estirpe que irá compor a biblioteca de perfis moleculares.

O **primeiro cultivo da estirpe**, orientado por este POP, possui um caráter de pré-ensaio, e se destina à coleta de dados preliminares sobre o crescimento bacteriano e estudo da qualidade dos espectros obtidos. Neste ensaio, a morfologia das colônias também é registrada, com a finalidade de harmonizar dados laboratoriais. Duas placas de Petri são inoculadas para cada estirpe: um primeiro do cultivo é submetido ao ensaio de extração de proteínas e subsequente análise por MALDI-TOF MS e o segundo é mantido na estufa e acompanhado durante cinco dias para observação e registro das características morfológicas de colônia. O cultivo mantido em observação é denominado **cultivo secundário**. Se a qualidade dos espectros obtidos para o primeiro cultivo for satisfatória, estes poderão ser integrados à biblioteca.

Ainda que algumas estirpes se desenvolvam melhor em circunstâncias diferentes, o cultivo para a análise espectrométrica deve ser realizado dentro das **condições padrão de crescimento**, a saber:

- i. Meio de cultivo LB (Luria-Bertani) sólido (1,8% de ágar);
- ii. pH do meio: 7,2;
- iii. Temperatura de incubação: 28 °C;
- iv. Tempo de crescimento: estimado para cada estirpe até a obtenção de colônias entre 2 e 3 mm de diâmetro.

A inoculação – ou sementeira – por esgotamento é uma técnica de inoculação que envolve a diluição progressiva de um inóculo contido numa alça de transferência (platina ou plástica estéril e descartável) sobre a superfície do meio sólido, com o objetivo de obter colônias isoladas. O procedimento permite que as células (unidades formadoras de colônias ou UFCs) sejam depositadas ao longo das estrias. Normalmente, as últimas células depositadas encontram-se afastadas entre si o suficiente para resultar colônias isoladas.

Após o período de incubação, em condições físicas e de tempo apropriados, as sucessivas divisões celulares resultam em aglomerados de células depositados sobre a superfície do ágar, denominados colônias (Figuras 1.A e B).

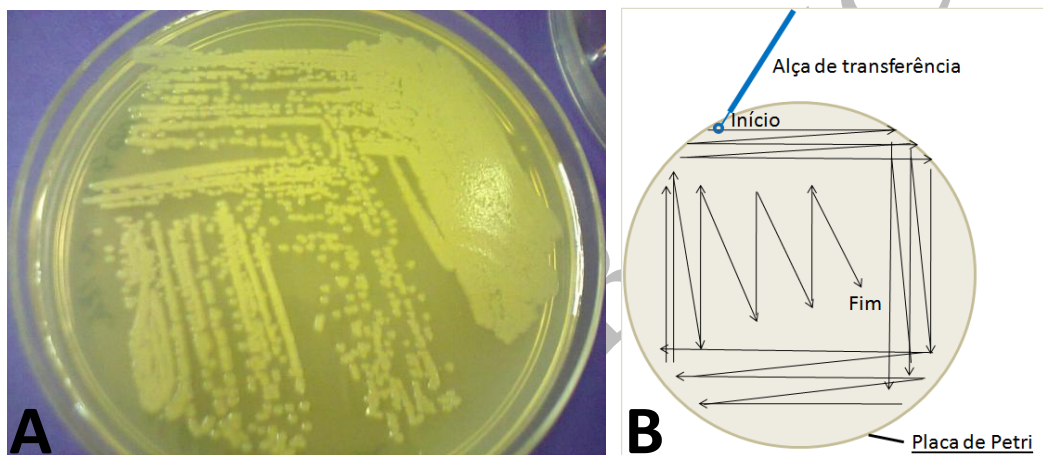


Figura 1: Técnica de inoculação, ou sementeira, por esgotamento. (A) Distribuição das colônias em placa de Petri com regiões de concentração variada e diversas colônias isoladas da estirpe SDF0044 com 32 horas de crescimento. Este padrão de distribuição foi obtido após inoculação por esgotamento com alça de transferência de 10 μ L. **(B)** Esquema de diluição de amostra com alça de transferência mostrando o sentido do movimento. No início tem-se a região de maior densidade celular onde não é possível a obtenção de colônias isoladas.

II. Objetivos

Otimizar o ensaio de crescimento para a 2ª análise, coletando informações preliminares sobre o padrão de crescimento das estirpes e concentração relativa das suspensões de trabalho.

Observar a homogeneidade dos cultivos, identificando presença de possível contaminação e selecionando amostras confiáveis para construção da biblioteca de perfis moleculares.

Obter colônias com tempos de crescimento entre 12 e 24 horas e diâmetros entre 2 e 3 mm, preferencialmente.

Registrar dados sobre características morfológicas de colônias para harmonização de informações taxonômicas entre resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa.

Obter o 1º espectro de massa para a estirpe, avaliar a qualidade dos resultados e efetuar ajustes finos de procedimento se necessário.

III. Material

As alças de transferência comerciais estéreis do LaBafes possuem capacidade para conter 10 µL de suspensão. Sendo necessário inocular um volume maior de suspensão de trabalho, incluir na relação de material os itens assinalados com asterisco.

- ✓ N suspensões de trabalho (no máximo 24)
- ✓ (N x 2) Placas de cultivo
 - 💡 *Obrigatoriamente placas confeccionadas conforme procedimento MT 05 – Preparação das placas de cultivo.*
 - 💡 *As placas devem ter sido aprovadas no CQM de bancada, conforme MT 05.*
 - 💡 *Tenha **placas excedentes** na CSB para cobrir eventuais falhas de procedimento.*
- ✓ 2 estantes para tubos eppendorf autoclavadas
- ✓ Tubos eppendorf estéreis (para alíquotas que serão submetidas a choque térmico – item V)
- ✓ 2 abridores de tubos eppendorf (autoclavados)
- ✓ Tiras de Parafilm M®
- ✓ 3 pinças anatômicas esterilizadas
- ✓ 2 canetas de marcação permanente desinfetadas
- ✓ Alças de transferência estéreis de 10 µL
- ✓ 1 pipeta P100 ou P200*
- ✓ 1 caixa de ponteiros amarelas estéreis*
- ✓ Alças de Drigalski*
- ✓ 1 estante de apoio para instrumentos na CSB (esterilizada)
- ✓ 1 borrifador de etanol 70 %

- ✓ 3 pares de luvas estéreis
- ✓ 1 lixeira de CSB (frasco de vidro autoclavado)
- ✓ Câmera fotográfica
- ✓ Lupa (opcional)
- ✓ Estufa de incubação


IV. Procedimento

Este procedimento envolve o cultivo das estirpes em meio LB sólido nas condições padrão e também o monitoramento do crescimento, com registro de dados a cada 12 horas, se possível. O objetivo é estabelecer o tempo ideal de crescimento e a quantidade de suspensão a ser inoculada nas placas de Petri para aperfeiçoar o MT 08.

Embora todas as estirpes tenham sido inicialmente selecionadas por choque térmico e dentro das mesmas condições padrão de crescimento citadas anteriormente para este ensaio, algumas estirpes não germinam nessas condições. Nestes casos, os cultivos deverão ser repetidos, variando-se alguns parâmetros na ordem sugerida abaixo:

- 1º. Aumentar o volume inoculado de suspensão de trabalho.
- 2º. Proceder à ativação dos esporos, submetendo uma alíquota da suspensão de trabalho a um choque térmico (60 °C, por 5 minutos) imediatamente antes da inoculação.
- 3º. Testar as condições de crescimento para diferentes temperaturas e características do meio de cultivo.


Cada placa de Petri deve conter, pelo menos, 20 colônias isoladas. A técnica de diluição do inóculo (Figura 1) permite o isolamento de colônias a partir de suspensões com concentração elevada. Para suspensões com baixa concentração é necessário inocular mais de 10 µL: utilizar a micropipeta para transferência do inóculo e alças de Drigalski para espalhamento da amostra.

 *Para estirpes que apresentarem menos de 10 colônias por placa, repetir o ensaio aumentando a quantidade de suspensão inoculada.*


Se, para algumas estirpes, não for possível obter o padrão ideal de tamanho, idade e distinção de colônias, deve-se ajustar o quanto possível estas variáveis antes de proceder ao MT 08.

A. Preparação da CSB e amostras

1. Registrar a retirada de placas de Petri do estoque no respectivo RP 05 do lote, conforme orientação do MT 05.
2. Verificar as condições de temperatura e desinfecção da estufa de crescimento a 28 °C e reservar o espaço necessário para suas amostras.
3. Limpar a CSB e mesa de apoio conforme MT 01 – Utilização e manutenção das salas limpas.
4. Ligar o sistema de esterilização.
5. Acender as luzes UV da sala da CSB e aguardar pelo menos 30 min.
6. Separar o material necessário ao procedimento estéril.
7. Desligar as lâmpadas UV da sala e CSB, e depositar o material na bancada de apoio.
8. Fazer a assepsia e antissepsia das mãos e antebraços.
9. Abrir as embalagens plásticas das placas de Petri, retirar as placas com cuidado para não abrir e depositar imediatamente na CSB em posição de repouso.
10. Organizar o restante do material dentro da CSB, exceto uma estante para microtubos que servirá para buscar as amostras biológicas.
11. Deixar o pulverizador de etanol 70% na bancada de apoio.
12. Acender as lâmpadas UV da sala e da CSB por mais 30 min.

 *Se for preciso a ativação de esporos, preparar o banho Maria ajustando a temperatura para 60 °C.*

13. Separar as suspensões de trabalho que irá utilizar em uma estante para tubos eppendorf.
14. Agitar no vórtice e depois observar a presença de turbidez (MT 06-B – CQM – Inspeção visual de amostra líquida)

 *Havendo suspeita de contaminação, separar a amostra suspeita para realizar o MT 06-C (CQM – MCF para investigação de tipos morfológicos) ou descartar. Registrar isto em um formulário RP 06-B.*

15. Apagar as luzes UV da sala e CSB e depositar as amostras na bancada de apoio.

B. Inoculação

16. Vestir um jaleco limpo, arregaçar as mangas e fazer a antissepsia das mãos e antebraços.
17. Fazer a antissepsia com etanol 70% e introduzir as amostras na CSB.

18. Segurar a primeira placa de Petri contra a luz, sem abrir, e observar atentamente a presença de crescimento microbiano.
19. Caso negativo, identificar a placa na base com o código da amostra, data, hora aproximada de colocação na estufa e nome do operador, sendo 2 placas para cada estirpe.
20. Repetir o procedimento para as outras placas de Petri.
21. Empilhar as de placas já identificadas no campo central, sempre em posição de repouso.

 *Manter sempre as placas fechadas! Abrir somente no momento de inocular a amostra.*

 *Nunca realizar movimentos por cima de placas ou amostras abertas.*

 *Havendo suspeita de contaminação, descartar a placa e inocular outra.*

22. Com auxílio da pinça esterilizada, retirar o Parafilm M® de todas as suspensões, sem deixar resíduos.

 *Caso necessária a ativação dos esporos, proceder ao item V e depois continuar a partir do próximo subitem, a seguir.*

23. Abrir o pacote de alças estéreis pelo lado dos cabos e depositar na estante de apoio.
24. Abrir o pacote de alças de Drigalski da mesma maneira.*
25. Ajustar a micropipeta para a quantidade de inóculo desejável e encaixar a ponteira.*
26. Com auxílio do abridor, abrir o eppendorf da 1ª amostra.

 *Seguir sempre as recomendações de manuseio de microtubos (MT 01).*

27. Retirar uma alça de transferência, com cuidado para não tocar em nada, e coletar uma gota de suspensão.

 *Se a ponta da alça de transferência tocar algum objeto, luvas, jaleco ou piso da CSB, descarte.*

28. Fechar o eppendorf e depositar na estante.
29. Abrir uma placa de Petri correspondente à primeira estirpe pela base e inocular por esgotamento.
30. Ou, para volumes maiores, transferir com a micropipeta e espalhar com a alça de Drigalski.*
31. Fechar a placa, retirar da pilha e formar outra pilha mais distante.
32. Repetir o procedimento para a segunda placa de Petri da mesma estirpe.

33. Depositar o eppendorf contendo a amostra utilizada em uma posição destacada das outras amostras.
34. Repetir o procedimento para as próximas estirpes, sempre fechando os tubos eppendorf após o uso.
35. Ao final, retirar as placas da CSB e acomodar na estufa de crescimento a 28 °C, evitando empilhamento.
36. Retornar à sala da CSB, recolher o material, limpar e organizar o espaço conforme procedimento MT 01.
37. Registrar este procedimento no formulário RP 07.

V. Procedimento de ativação de esporos por choque térmico

Caso seja necessário submeter a suspensão de trabalho à ativação de esporos antes da inoculação, ajustar a temperatura do banho Maria para 60 °C antes de iniciar o procedimento na CSB. Proceder normalmente até o **item IV – 22** e, depois, como a seguir:

1. Ajustar a micropipeta para o volume de 30 µL.
2. Com auxílio de uma pinça, retirar os tubos eppendorf vazios que irão receber as alíquotas para choque térmico fechando imediatamente.
3. Depositar os microtubos fechados na estante.
4. Identificar com o número das estirpes na tampa.
5. Com auxílio do abridor, abrir um eppendorf vazio.
6. Abrir a respectiva suspensão e pipetar 30 µL.
7. Fechar imediatamente o microtubo da suspensão de trabalho.
8. Transferir os 30 µL para o eppendorf novo e fechar imediatamente.
9. Repetir o procedimento para as outras amostras.
10. Levar as alíquotas para o banho Maria.
11. Deixar por 5 min e retornar para a sala limpa colocando as amostras na bancada de apoio.
12. Fazer a assepsia das mãos e antebraços.
13. Fazer a antissepsia com etanol 70% e colocar as amostras de volta na CSB, continuando a partir do **item IV – 22**.

 **Priorizar as alíquotas ativadas na sequência de trabalho!**

 *O tempo entre a ativação e a inoculação deve ser o menor possível, portanto, inocule primeiro as amostras ativadas.*

VI. Acompanhamento dos cultivos secundários e registro

Todas as amostras cultivadas devem ser acompanhadas até a coleta de células para a análise espectrométrica. Para execução do MT 11 – Extração de proteínas e aplicação de amostras deve-se escolher um dos dois cultivos da estirpe. Os cultivos submetidos ao procedimento MT 11 devem ser descartados após a coleta e registro fotográfico.

 ***Não coletar células dos cultivos secundários!***

Os **cultivos secundários** devem permanecer na estufa para acompanhamento e registro das características morfológicas de colônias por mais alguns dias. Todas as características observadas durante o crescimento dos cultivos secundários devem ser registradas no RP 07, sendo um formulário para cada estirpe.

O aspecto de distribuição das colônias na placa de Petri deve ser verificado a cada 12 horas nos primeiros dias de incubação e, depois, a intervalos maiores, dependendo do que se deseja observar. A cada verificação, registrar os seguintes parâmetros nos respectivos campos do RP 07:

- a. **Diâmetro colonial:** registrar a variação de tamanho em milímetros, por exemplo: 2 – 3 mm
- b. **Contagem de colônias:** este valor pode ser aproximado se o número de colônias exceder 50. Não contar acima de 100 e, por estimativa da contagem parcial, indicar $\cong 100$, > 100 , $\cong 300$ ou > 300 , no campo respectivo do formulário.
- c. **Confluência:** estimar um grau aproximado de confluência em relação à área da placa de Petri, usando as descrições a seguir:
 - **Não:** significa que todas ou quase todas as colônias se encontram isoladas.
 - **Total:** significa raras colônias isoladas, menos de 1%.
 - **50%:** aproximadamente metade da placa de Petri confluenta.
 - **30%:** aproximadamente um terço da placa de Petri confluenta
- d. **Nº de colônias isoladas:** contar somente até 50. Se maior que 50, indicar **>50**.
- e. **Suspeita de contaminação?** – indicar sim ou não.

- f. **Fotografou os cultivos?** – indicar sim ou não.
- g. **Temperatura da estufa:** deve ser observada e registrada a cada 12 horas.
- h. **Características coloniais:** quando as colônias atingirem tamanho suficiente para que as características coloniais sejam notáveis, preencha a última parte do formulário circulando os aspectos observados para a estirpe e registre o tempo de incubação em horas.

Neste procedimento, deve-se determinar o tempo ideal de incubação para obtenção de colônias quão jovens possível (12 a 24 horas), porém com massa suficiente para a coleta de uma colônia isolada. Diâmetros entre 2 e 3 mm são ideais. Ao atingirem o diâmetro mínimo, quatro colônias serão retiradas de cada placa e submetidas ao procedimento de extração de proteínas para subsequente análise espectrométrica (MT 11).

Após a coleta, os cultivos devem voltar para a estufa e serem observados por mais 3 a 5 dias a cada 12 ou 24 horas, até o momento propício para registro das características morfológicas de colônia. Depois, os cultivos podem ser descartados.

Os resultados registrados no RP 07 devem ser disponibilizados para a equipe de pesquisa tão logo possível.

 *Anexar o MT 06-B ou C, caso existam, ao RP 07.*

VII. Fotodocumentação

Os cultivos devem ser fotografados no momento da coleta e, depois, a cada 24 horas, se ocorrerem mudanças significativas. A mídia contendo as imagens dos cultivos (DVD, CD ou HD externo) deve ser guardada em uma pasta de arquivos digitais ou junto com a pasta *Registros de procedimentos*.

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

RP 07 – Cultivo para 1ª análise espectrométrica

Responsável: _____	Data: _____
--------------------	-------------

Realizou o PP 06-B para a suspensão estoque? Sim Não

Suspeita de contaminação da suspensão estoque? Sim Não

Características do cultivo secundário durante crescimento

Linhagem:							
Início: ____/____/____				Horário: _____		Dia da semana: _____	
Tempo de incubação (h)	Diâmetro colonial (mm)	Contagem de colônias	Confluência (não, total, 50%, 30%)	Nº de colônias isoladas	Suspeita de contaminação? (sim/não)	Fotografou os cultivos?	Umidade e temperatura da estufa
12							
24							
36							
48 (2 dias)							
60 h							
72 (3 dias)							
84							
96 (4 dias)							
108							
120 (5 dias)							

A quantidade de 10 µL de suspensão estoque foi satisfatória? Sim Não

Se não, quantidade estimada para o ensaio de ajuste de crescimento: _____ µL.

Circule as características encontradas para essa estirpe:

Tempo de incubação: _____ h [] Com brilho [] Opaca

puriforme		espalhada		liso		lisa	
circular		achatada		ondulado		ondulado	
filamentosa		ondulada		denteado		radiada	
rizóide		convexa		filamentoso		concêntrica	
irregular		umbilicada		lobado		rugosa	
FORMA		TOPOLOGIA		BORDA		ASPECTO	

MT 08 – Cultivo para 2ª análise espectrométrica

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	27/10/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definições

O segundo cultivo da estirpe se destina à 2ª análise de MALDI-TOF MS que tem caráter de análise sistemática, com a finalidade única de obtenção de espectros para a biblioteca. Um número maior de placas de cultivo é preparado (seis), e o ensaio é planejado de acordo com os resultados de crescimento e qualidade dos espectros obtidos para o primeiro cultivo. Devem ser escolhidas estirpes com desenvolvimento semelhante para que todas atinjam o diâmetro de 2 a 3 milímetros em tempos iguais.

II. Objetivo

Obter colônias bacterianas entre 12 a 24 horas de incubação e tamanhos de 2 a 3 mm, preferencialmente, que serão aproveitadas para gerar a maioria dos espectros.

III. Material

Estão assinalados com um asterisco (*) os itens opcionais para inocular mais de 10 µL de suspensão estoque.


- ✓ N suspensões de trabalho

 *No máximo 4 estirpes, a não ser seja necessário compensar cultivos anteriores.*

- ✓ (N x 6) placas de cultivo

 *Obrigatoriamente placas confeccionadas conforme procedimento MT 05 – Preparação das placas de cultivo.*

 *Obrigatoriamente placas submetidas ao CQM de bancada (MT 05).*


 *Tenha sempre placas excedentes na CSB para cobrir eventuais falhas de procedimento.*

- ✓ 1 estante para tubos eppendorf (autoclavada)
- ✓ 2 abridores de tubos eppendorf (autoclavados)
- ✓ Tiras de Parafilm M®
- ✓ 2 pinças anatômicas (esterilizadas)
- ✓ 2 canetas de marcação permanente (desinfetadas)
- ✓ Alças de transferência estéreis de 10 µL
- ✓ 1 micropipeta P100*
- ✓ 1 caixa de ponteiros amarelos estéreis*
- ✓ Alças de Drigalski*
- ✓ 2 estantes de apoio para material na CSB (esterilizadas)
- ✓ Pulverizador de etanol 70 %
- ✓ 3 pares de luvas de procedimento estéreis
- ✓ 1 lixeira de capela (frasco de vidro autoclavado)
- ✓ Estufa de incubação

IV. Procedimento

Este POP orienta a preparação dos cultivos. O acompanhamento do crescimento deve ser feito conforme orientado no MT 11 – Extração de proteínas e aplicação de amostras.

A quantidade de suspensão de esporo a ser inoculada deve ter sido estabelecida no formulário RP 07 – Cultivo para 1ª análise espectrométrica. As alças de transferência estéreis comportam uma gota de aproximadamente 10 µL.

 *Caso a quantidade necessária de inóculo seja maior que 10 µL, utilizar a micropipeta de 100 µL para transferir a suspensão e alça de Drigalski para distribuir a amostra uniformemente na placa de Petri.*

Devem ser preparadas 6 placas de cultivo para cada estirpe da CBafes. Cada placa de cultivo deve conter, pelo menos 4 colônias isoladas que serão submetidas à extração de proteínas. Se algumas placas não apresentarem número suficiente de colônias, registrar o

fato em campo específico do RP 11. Os cultivos inadequados devem ser repetidos no próximo ensaio de crescimento.

! *O número de cultivos para a análise espectrométrica pode ser maior que 6, mas não menor. O número de colônias obtidas por placa deve ser, no mínimo, 4.*

Os passos marcados com um asterisco (*) se referem aos inóculos com mais de 10 µL, conforme observação anterior.

A. Preparação da CSB e amostras

1. Registrar a retirada de placas de Petri do estoque no respectivo RP 05 do lote, conforme orientação do MT 05.
2. Verificar as condições de temperatura e limpeza da estufa e reservar o espaço necessário às amostras.
3. Preparar a CSB e mesa de apoio conforme procedimento MT 01 – Utilização e manutenção das salas limpas.
4. Ligar o sistema de esterilização da CSB.
5. Acender as luzes UV da sala e aguardar 30 min.
6. Separar o material necessário ao procedimento estéril.
7. Desligar as lâmpadas UV da sala e CSB.
8. Fazer a assepsia das mãos e antebraços.
9. Pulverizar etanol 70% nas mãos e antebraços e introduzir o material estéril na CSB.
10. Retirar as placas de Petri das embalagens plásticas, com cuidado para não abrir as placas, e depositar na CSB em posição de repouso.
11. Deixar o pulverizador de etanol 70% na bancada de apoio.
12. Ligar as lâmpadas UV da CSB e sala por mais 30 min.

! *Não introduzir as amostras biológicas na sala com a luz UV acesa!*

13. Separar as suspensões de trabalho que irá utilizar em uma das estantes para microtubos, agitar no vórtice e depois observar a presença de turbidez (MT 06-B – CQM – Inspeção visual de amostra líquida).
14. Apagar as luzes UV da sala e CSB e depositar as amostras na bancada de apoio.
15. Vestir um jaleco limpo e arregaçar as mangas.
16. Fazer a assepsia das mãos e antebraços e antissepsia com etanol 70%.
17. Depositar as amostras no campo central.

B. Inoculação das amostras

18. Segurar a primeira placa contra a luz, sem abrir, e observar atentamente a presença de crescimento microbiano.

 *Descartar placas suspeitas de contaminação.*

19. Identificar a placa de cultivo na base com código da amostra, data, hora aproximada de colocação na estufa e nome do operador.

20. Repetir o procedimento para as próximas placas de cultivo, sendo 6 placas para cada estirpe.

 *Sempre manter as placas fechadas. Abrir apenas no momento de inocular a amostra!*


 *Nunca fazer movimentos por sobre placas ou amostras abertas.*

21. Abrir a ponta do pacote de alças estéreis pelo lado dos cabos, retirar uma alça e depositar o pacote na estante de apoio.

22. Ou, abrir o pacote de alças de Drigalski da mesma maneira.*

23. Ajustar a micropipeta para o volume apropriado de inóculo e encaixar a ponteira.*

24. Com auxílio do abridor, abrir o eppendorf da 1ª amostra e coletar uma gota de suspensão com a alça de transferência, ou o volume desejado com a micropipeta.

 *Substituir a alça de transferência se a ponta tocar algum objeto, luvas, jaleco ou piso da CSB.*

25. Fechar o eppendorf com uma das mãos e depositar na estante.

26. Abrir a primeira placa de Petri pela base e fazer a inoculação por esgotamento.

27. Ou, transferir o volume com a micropipeta e espalhar o inóculo com a alça de Drigalski.*

28. Fechar a placa, afastar do campo central e formar outra pilha com as placas prontas.

29. Repetir o procedimento para as próximas amostras, sempre fechando o eppendorf após o uso.

 *Seguir sempre as recomendações de manuseio de microtubos do MT 01.*

30. Ao final, retirar as placas da CSB e acomodar na estufa de crescimento a 28 °C, evitando empilhamento.

31. Retornar à sala da CSB, recolher o material, limpar e organizar o espaço conforme procedimento MT 01.

32. Registrar este procedimento no formulário RP 08.

V. Acompanhamento e registro

Aqui são considerados os tempos de crescimento observados no MT 07 (Cultivo para 1ª análise espectrométrica) para planejamento do ensaio, conforme explicado no item I. Contudo, podem ocorrer alterações nos tempos de crescimento e os cultivos devem ser verificados a cada 12 horas, até o momento da coleta. Os dados de crescimento devem ser registrados no RP 11 – Extração de proteínas e aplicação.

Se, durante o crescimento for observada alguma característica diferente do que foi registrado no RP 07, discutir com a orientadora do projeto, fazer um relatório à parte e tomar as providências necessárias.

As condições de crescimento devem ser as **condições padrão** estabelecidas no MT 07: meio LB sólido (1,8% de ágar), pH 7,2; temperatura de incubação 28 °C. O tempo de incubação deve ser o estimado para cada estirpe no RP 07. Após crescimento as colônias serão submetidas ao procedimento de extração de proteínas com subsequente análise por espectrometria de massa MALDI-TOF (MT 11).

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

RP 08 – Cultivo para 2ª análise espectrométrica

Responsável:	Data:
--------------	-------

Cultivo

Início: ____/____/____	Horário: ____ h ____ min	Dia da semana:
---------------------------	-----------------------------	----------------

Estirpe	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Tempo de crescimento estimado no RP 07 (h)						
Nº de placas						
Quantidade de inóculo (µL)						
Utilizou micropipeta? (sim ou não)						
Realizou o PP 06-B para a suspensão estoque? (sim ou não)						
Resultado do PP 06-B (pos ou neg)*						
Desvio de procedimento? (sim ou não)						
Suspeita de contaminação? (sim ou não)						

*Resultado positivo ou negativo para turbidez da suspensão estoque.

Informe sim ou não

- As placas de cultivo foram deixadas sobre a bancada por pelo menos 120 horas?
- Alguma placa do lote apresentou contaminação antes do uso?
- A CSB foi limpa por você imediatamente antes do uso?
- Fez a assepsia e antissepsia das mãos e antebraços antes de iniciar o procedimento?
- As suspensões de trabalho estavam vedadas com parafilme?
- Faltou algum material durante o procedimento? Qual? _____
- O trabalho na CSB foi interrompido por algum motivo?
- Faltou energia elétrica ou o sistema de fluxo laminar foi desligado durante o procedimento?
- Ao final, vedou todas as suspensões com Parafilm M®?

MT 09 – Preparo da solução matriz

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	28/10/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definição

A **matriz, ou matriz de dessorção**, é um composto orgânico de baixa massa molecular (<250 Da) que possui as seguintes propriedades: i) combinar-se a um analito de interesse promovendo uma cocristalização; ii) absorver a energia da frequência laser, evitando a fragmentação das moléculas do analito, iii) converter esta energia em calor e sublimar, carreando o analito para a fase gasosa (processo de dessorção) e iv) ionizar o analito na fase gasosa. As matrizes foram desenvolvidas para possibilitar a análise de moléculas orgânicas de alta massa molecular (1.000 a 100.000 Da), termolábeis e não voláteis, como proteínas e outros biopolímeros, por ionização suave sem quebra molecular.

A **solução matriz** padronizada para as análises de MALDI-TOF MS é composta por uma **substância matriz** (o ácido α -ciano-4-hidroxi cinâmico, α -CHCA ou α -HCCA) diluída em uma solução de acetonitrila (AcN), água e ácido trifluoroacético (TFA), conforme orientado neste POP. Os ensaios foram padronizados com o α -HCCA (*matrix for* MALDI-TOF MS, Bruker, ref. 8255344) na apresentação comercial de 2,5 mg (Figura 1). O produto é entregue pelo fornecedor à temperatura ambiente, mas deve ser imediatamente acondicionado em refrigerador (2 – 8 °C). O prazo de validade deve ser conferido, considerando a frequência das análises de MALDI-TOF MS como estimativa de consumo. Nenhum reagente deve ser utilizado fora do **prazo de validade** estipulado pelo fabricante. Do mesmo modo, nenhuma solução de trabalho deve ser utilizada além do prazo de validade recomendado neste procedimento, exceto em se tratando de ensaios de qualidade (MT 14 – Cultivo para ensaio avulso com extração de proteínas).



Figura 1. Apresentação comercial do ácido α -ciano-4-hidroxi cinâmico. Cada caixa contém 10 microtubos com 2,5 mg de substância matriz para MALDI-TOF MS, Bruker, ref. 8255344.

A apresentação fracionada do α -HCCA em microtubos contendo $2,5 \pm 0,3$ mg facilita o preparo da solução e reduz o risco de contaminação da matriz por excluir a operação manual de pesagem do ácido pelo pesquisador. O α -HCCA é dissolvido no próprio frasco original acrescentando-se 250 μ L de **solução de diluição** (vide item IV–B). Ao planejar o experimento, deve-se considerar que este volume de solução é suficiente para cobrir de 2,5 placas analisadoras de 96 poços contendo amostras (MT 11 – Extração de proteínas e aplicação de amostras, Figura 1. Placa analisadora para MALDI-TOF MS). A ficha técnica do produto contém instruções para a estocagem de solução matriz, recomendando a utilização em até 7 dias após o preparo, e armazenamento entre 20 e 25 °C em ambiente de temperatura controlada. Contudo, para efeito deste trabalho, a solução matriz deve ser acondicionada em refrigerador (item IV–C) e consumida em até 7 dias.

A acetonitrila (80% PA – marca J. T. Baker, CAS nº 75-05-80) e o TFA (Trifluoroacetic acid 99% – Mallinckrodt Chemicals) foram adotados como reagentes padrão para o preparo da solução de diluição do α -HCCA.

A expressão **q.s.p.**, originada do latim *quod satis para*, significa: quantidade suficiente para atingir determinado volume, que será estipulado no procedimento de preparo das soluções.

II. Objetivo

Padronizar a preparação das soluções de trabalho; registrar e controlar o consumo de reagentes; garantir a rastreabilidade dos ensaios de MALDI-TOF MS.

III. Material

- ✓ 125 µL de acetonitrila 80% (V/V)
- ✓ 2,5 mg de α -HCCA (Bruker, ref. 8255344)
- ✓ 30 mL de água ultrapura (recém coletada)
- ✓ 25 µL de ácido trifluoroacético 3% (V/V)

💡 *Caso não haja solução estoque de TFA 3%, substituir por: frasco de TFA 99% (PA).*

- ✓ 1 eppendorf de 1.000 µL
- ✓ 2 frascos âmbar de 30 ou 50 mL
- ✓ Micropipeta P200
- ✓ Micropipeta P100
- ✓ Micropipeta P1000
- ✓ Pipeta graduada de 10 mL
- ✓ Pipetador do tipo roldana ou pera de sucção
- ✓ 1 caixa de ponteiros amarelas
- ✓ 1 caixa de ponteiros azuis
- ✓ 1 estante para microtubos
- ✓ 1 espátula pequena
- ✓ 1 lixeira de bancada

IV. Procedimento

A solução matriz deve ser preparada para a concentração final de 10 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico diluindo-se o conteúdo de 2,5 mg de α -HCCA em solução AcN:água:TFA (5:4:1) q.s.p. 250 µL.

A. Solução de TFA

Instalar um pipetador na pipeta graduada e transferir 24 mL de água ultrapura para o frasco âmbar de 30 ou 50 mL.

⚠ *Nunca aspirar reagentes com a boca! Sempre utilizar o pipetador ou pera de sucção!*

Regular a micropipeta P1000 para 250 µL e transferir este volume de água ultrapura para o frasco âmbar.

Trocar a ponteira da P1000 e transferir lentamente 750 μL de μLTFA (99%) para o frasco âmbar.

Descartar a ponteira, fechar o frasco e misturar suavemente.

Etiquetar o frasco com as informações: TFA 3%, nome do operador e data.

Após utilização, armazenar em local fresco ao abrigo da luz ou em refrigerador.

B. Solução de diluição da matriz

Com a micropipeta P100, transferir 100 μL de água ultrapura para o eppendorf e descartar a ponteira.

Acrescentar 25 μL de ácido trifluoroacético 3%.

Com a micropipeta P200, transferir 125 μL de acetonitrila (80%).

Fechar o eppendorf e homogeneizar em vórtice.

C. Diluição do α -HCCA

Diluir o α -HCCA no microtubo original, transferindo os 250 μL de solução de diluição preparada anteriormente.

Fechar o microtubo e certificar-se que a tampa esteja apertada.

Misturar em vórtice por 1 min ou até completa dissolução.

Acondicionar o microtubo de solução matriz em um frasco âmbar de 30 ou 50 mL e fechar.

Etiquetar o frasco com as informações: α -HCCA, 10mg/mL, data e nome do operador.

Preencher o RP 09 com as informações requisitadas, registrando **operador** no campo **fabricante** onde se referir ao TFA diluído a 3%.

Armazenar em refrigerador e consumir em até 7 dias.

VI. Referências

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. Nature Protocols, vol.4, nº 5, 2009.

KRUPPA, GARY. Microbial Identification for the 21st Century. The MALDI Biotyper. Bruker-Daltonics (2009) Fonte: <<http://www.pda.org/Chapters/North-America-cont/Southeast/Presentations/Microbial-Identification-for-the-21st-Century-The-MALDI-Biotyper.aspx>>

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Resumo do Sistema Internacional de Unidades - SI. Tradução da publicação do BIPM (2006). Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br>.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU R.; RIVEROS J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. Quim. Nova, Vol. 34, No. 10, 1875-1887, 2011

HOSSAIN, M.; LIMBACH, P. A. A Comparison of MALDI Matrices. *In*: Electrospray 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).

RIVER, CHARLES. Bruker Matrix HCCA portioned Instructions. Bruker Daltonics, GmbH (2012).

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

Registro de Procedimento – RP

RP 09 – Preparo da solução matriz

Responsável:	Data:
--------------	-------

Reagentes	Data de fabricação	Validade	Fabricante
α -HCCA			
Acetonitrila 80% PA			
Ácido trifluoroacético – TFA 99%			

A solução estoque de TFA 3% foi preparada nesta data? Sim Não

Se não, qual a data de preparação do TFA 3% utilizado na solução matriz? ____/____/____

Se sim, preencher a tabela abaixo:

Solução	Data de preparo	Data de coleta da água ultrapura	Local de armazenamento
TFA 3%			
Matriz			

Especificação do sistema de ultrapurificação de água:

Laboratório onde está instalado o equipamento de ultrapurificação de água:

MT 10 – Preparo das soluções de extração de proteínas

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	25/04/2015	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definição

As soluções utilizadas para a **extração de proteínas** celulares são solventes orgânicos e ácidos que cumprem a função de desestruturar as membranas e paredes bacterianas e solubilizar proteínas. Os solventes padronizados para os ensaios de MALDI–TOF MS são: água ultrapura, etanol (99% – PA), solução aquosa de acetonitrila (AcN 70%) e ácido fórmico (AF 70%). A acetonitrila (80%, PA – J. T. Baker) e o ácido fórmico (85%, PA – Sigma Aldrich) devem ser diluídos em água ultrapura para obtenção das concentrações de trabalho conforme orientado no item IV.

A **padronização das soluções de extração** é determinante para a reprodutibilidade dos perfis espectrais das estirpes. Alterações na concentração das soluções ou combinação de solventes podem modificar o padrão de cocristalização da amostra após a aplicação da matriz, alterando significativamente a qualidade dos espectros. A troca de solventes de extração pode alterar a intensidade dos picos e a faixa de aquisição dos valores m/z , gerando espectros diferentes para uma mesma estirpe além de interferir no padrão de reprodutibilidade das análises.

Ocorrendo **descontinuidade no fornecimento** dos solventes padrões, as marcas substituintes deverão ser aprovadas em um ensaio de validação que comprove a não interferência da marca nos resultados espectrométricos. O tipo de solvente não poderá ser alterado.

As **soluções de extração** podem ser armazenadas por 60 dias em pequenos volumes (<100 mL), preferencialmente em refrigerador e frascos de cor âmbar, e não devem ser utilizadas após vencimento do prazo de validade. Este POP orienta o preparo de 60 mL de cada. Ao planejar o experimento, deve-se considerar o consumo por análise: para a obtenção de 96 extratos proteicos (*vide* MT 11 – Extração de proteínas e aplicação de amostras) são necessários, aproximadamente, 30 mL de AcN (70%) e 30 mL de AF (70%). De

acordo com esses valores, as soluções devem ser preparadas em volumes pouco maiores que estas quantidades.

A expressão **q.s.p.**, originada do latim *quod satis para*, significa: quantidade suficiente para atingir determinado volume, que será estipulado no procedimento de preparo das soluções.

II. Objetivo

Padronizar a preparação das soluções de trabalho; registrar e controlar o consumo de reagentes; garantir a reprodutibilidade e rastreabilidade dos ensaios de MALDI-TOF MS.

III. Material

- ✓ Acetonitrila 80% (PA)
- ✓ 150 mL de água ultrapura (recém coletada)
- ✓ Ácido fórmico 85% (PA)
- ✓ 2 frascos âmbar de 100 mL
- ✓ Micropipeta P1000
- ✓ 1 caixa de ponteiras azuis
- ✓ 3 pipetas graduadas de 10 mL
- ✓ Pipetador do tipo roldana ou pera de sucção
- ✓ 1 lixeira de bancada

IV. Procedimento

A. Solução de AcN 70%

1. Etiquetar o frasco com as seguintes informações: AcN 70%; data atual e data de vencimento da validade (60 dias).
2. Instalar o pipetador na pipeta graduada de 10 mL e transferir 7,5 mL de água ultrapura para um frasco âmbar de 100 mL.
3. Com uma nova pipeta graduada, adicionar 52,5 mL de AcN 80% (PA).

⚠ *Nunca aspirar reagentes com a boca! Sempre utilizar o pipetador ou pera de sucção!*

4. Tampar e homogeneizar a solução.

5. Armazenar em refrigerador.
6. Preencher os formulário RP 10 com as informações requisitadas.

B. Solução AF 70%

1. Etiquetar o frasco com as informações: AF 70%, data atual e data de vencimento (60 dias).
2. Instalar o pipetador na pipeta graduada de 10 mL e transferir 10 mL de água ultrapura para um frasco âmbar de 100 mL.
3. Regular a micropipeta P1000 para 590 µL e transferir este volume de água ultrapura para o frasco âmbar.
4. Trocar a ponteira da P1000 e transferir lentamente 410 µL AF (85%).
5. Tampar o frasco, homogeneizar a mistura e abrir.
6. Com uma nova pipeta graduada, adicionar lentamente mais 49 mL de AF (85%).
7. Armazenar em refrigerador.

VI. Referências

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols*, vol.4, nº 5, 2009.

KRUPPA, GARY. Microbial Identification for the 21st Century. The MALDI Biotyper. Bruker-Daltonics (2009) Fonte: <<http://www.pda.org/Chapters/North-America-cont/Southeast/Presentations/Microbial-Identification-for-the-21st-Century-The-MALDI-Biotyper.aspx>>

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Resumo do Sistema Internacional de Unidades - SI. Tradução da publicação do BIPM (2006). Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br>.

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)

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

RP 10 – Preparo das soluções de extração de proteínas

Responsável:	Data:
--------------	-------

Reagentes	Data de fabricação	Validade	Fabricante
Acetonitrila 80% (PA)			
Ácido fórmico 85% (PA)			

Solução	Data de preparo	Data de coleta da água ultrapura	Local de armazenamento
AcN 70%			
AF 70%			

Especificação do sistema de ultrapurificação de água utilizado:

Laboratório onde está instalado o sistema de ultrapurificação de água:

Procedimento Operacional Padrão – POP

MT 11 – Extração de proteínas e aplicação de amostras

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	28/10/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definições

Extrato proteico de uma estirpe, ou apenas **extrato**, é o produto obtido como descrito neste POP e que corresponde ao conteúdo total de proteínas celulares extraídas de **uma única colônia**. São aceitas exceções a esta definição nos seguintes casos:

i) Estirpes que não produzem colônias isoladas em razão da morfologia colonial. Nestes casos, **o extrato** corresponde ao conteúdo total de proteínas celulares extraídas de um ponto qualquer do cultivo.

ii) Estirpes que germinam com 12 a 24 horas de incubação, mas apresentando colônias com menos de 2 mm e crescimento lento, demorando vários dias (mais de 48 h) para adquirir diâmetro colonial adequado. Sendo assim, é preferível coletar mais de uma colônia entre 12 e 24 horas de incubação. Nestes casos, **o extrato** corresponde ao conteúdo total de proteínas celulares extraídas de duas ou mais colônias.

Placa analisadora, placa de análise ou ainda placa de MALDI (em inglês: *target plate*), é uma placa metálica utilizada como suporte sólido para dessorção das amostras dentro do espectrômetro de massa. As placas utilizadas neste trabalho são de aço inoxidável polido, modelo MTX-96, marca Bruker Daltonics, contendo 96 poços (ou do inglês *spots*) para deposição de amostras (Figura 1).

O termo **aplicação de amostras** na placa analisadora, ou simplesmente **aplicação**, significa, neste manual, a deposição de uma porção de amostra biológica para um poço na placa analisadora. Nesse contexto, a amostra pode ser o extrato proteico ou a massa celular de uma colônia bacteriana (MT 13 – Ensaio de Célula Intacta).

Denomina-se aqui **ciclo de extração**, ao procedimento completo de extração das proteínas celulares das colônias de **uma única placa de cultivo**: desde a retirada da incubadora até a aplicação das amostras na placa analisadora.

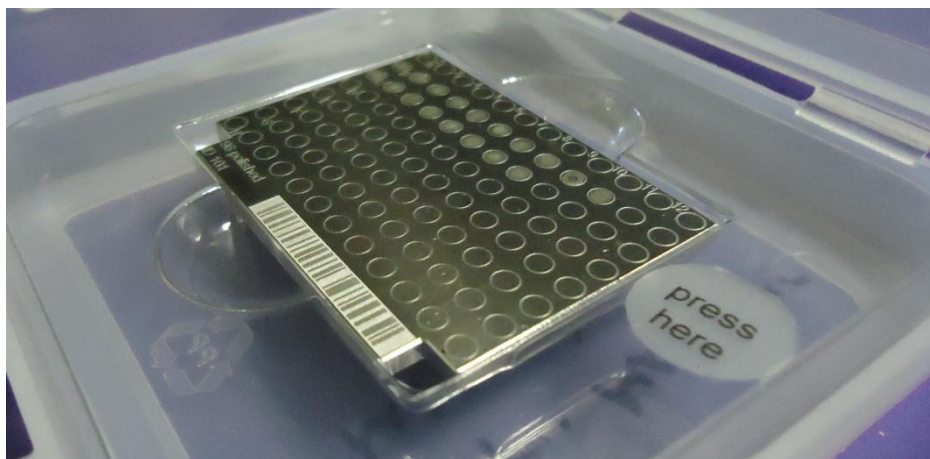


Figura 1. Placa analisadora para MALDI-TOF MS. Placa analisadora de aço inoxidável polido, modelo MTX-96 (Bruker) para o espectrômetro de massa Micro-Flex, contendo amostras cristalizadas por matriz nas linhas B e C. Este modelo contém 96 poços – ou *spots* – para deposição de amostras.

A **matriz**, ou **solução matriz**, é uma solução de ácido α -ciano 4-hidroxi cinâmico responsável pela dessorção e ionização da amostra na incidência do pulso de laser (*vide* MT 09 – Preparo da solução matriz). A expressão **aplicação da matriz** significa, neste manual, o ato de recobrir a amostra aplicada na placa analisadora com 1 μ L de solução matriz. Aplica-se a matriz após o ciclo de extração e secagem das amostras.

Tempo de crescimento (tc) é aqui considerado o mesmo que tempo de incubação na estufa.

Este POP inicia-se com o acompanhamento e seleção dos cultivos preparados no **MT 07** – Cultivo para 1ª análise espectrométrica, **MT** – Cultivo para 2ª análise espectrométrica ou **MT 14** – Cultivo para ensaio avulso com extração de proteínas. Dos cultivos preparados nestes referidos POPs, somente aqueles que apresentarem 4 ou mais colônias isoladas, e sem suspeita de contaminação, são aproveitados para o ensaio espectrométrico. De cada um destes cultivos, são coletadas 4 colônias e cada qual é transferida para um microtubo onde será submetida ao processo de extração de proteínas. Os extratos obtidos ao final são aplicados nos poços da placa analisadora, correspondendo, cada poço, ao extrato proteico de uma única colônia (exceto o disposto no primeiro parágrafo deste item). Sendo assim, uma placa analisadora comporta o extrato proteico de 96 colônias isoladas. Após a distribuição dos extratos, aplica-se, em cada poço, uma determinada quantidade de **matriz**. Esta se associa ao extrato formando uma camada cristalizada (Figura 1), efeito este necessário para a análise espectrométrica.

II. Objetivos

Selecionar colônias adequadas ao ensaio espectrométrico. Padronizar o procedimento de extração de proteínas e aplicação dos extratos na placa analisadora para reduzir o número de variáveis interferentes na qualidade dos espectros.

III. Material

A lista de material a seguir está dimensionada para o preenchimento de uma placa analisadora de 96 poços.


- ✓ N cultivos
- ✓ (N x 4) tubos eppendorf de 1.500 µL
- ✓ 3 estantes para microtubos (capacidade para 80 microtubos)

 *Sempre utilizar metade da capacidade da estante.*

 *Este cuidado facilita o manuseio e evita acidentes.*

- ✓ 1 micropipeta P2
- ✓ 1 micropipeta P100
- ✓ 1 micropipeta P200
- ✓ 1 micropipeta P1000
- ✓ 2 caixas de ponteiros brancos
- ✓ 2 caixas de ponteiros amarelos
- ✓ 2 caixas de ponteiros azuis

 *Não utilizar ponteiros autoclavados!*

 *Sob aquecimento a ponteira sofre deformação e alteração na precisão do volume aspirado.*

- ✓ 1 estante para micropipetas
- ✓ 2 pinças anatômicas esterilizadas
- ✓ 1 caneta de marcação permanente ponta fina
- ✓ 1 lixeira de bancada para material contaminado
- ✓ 3 pares de luvas de procedimento
- ✓ Óculos de proteção
- ✓ Palitos de dente estéreis

- ✓ 30 mL de água ultrapura recém coletada
- ✓ 100 mL de etanol 96 °GL (MT 10 – Preparo das soluções de extração)
- ✓ 30 mL de solução de acetonitrila 70% (V/V) (RP 10)
- ✓ 30 mL de solução de ácido fórmico 70% (V/V) (RP 10)
- ✓ 100 µL de solução matriz (10 mg/mL) (RP 09)
- ✓ 1 placa analisadora

 *Limpar a placa analisadora com metanol e papel que não deixe fibras.*

- ✓ Papel toalha
- ✓ Pisseta com metanol
- ✓ Pisseta com etanol 70%
- ✓ 1 máquina fotográfica
- ✓ 1 caixa de isopor (para transporte)

IV. Procedimento

O procedimento de extração de proteínas deve ser realizado na seguinte sequência:

- i. Retirar da estufa os cultivos de uma estirpe para a extração de proteínas e realizar o procedimento completo até a aplicação das amostras nos poços da placa analisadora.
- ii. Deixar as amostras aplicadas secando sobre a bancada.
- iii. Retirar da estufa os cultivos da próxima estirpe e realizar o procedimento completo até a aplicação das amostras nos poços da placa analisadora.
- iv. Observar se os extratos da primeira amostra já secaram na placa analisadora e, se afirmativo, aplicar a matriz nos respectivos poços.
- v. Deixar as amostras da segunda estirpe secando enquanto executa o procedimento completo para a terceira estirpe e, assim, sucessivamente.

As placas de Petri que não apresentarem número adequado de colônias para o ensaio espectrométrico devem ser descartadas. O ensaio de crescimento para a estirpe deve ser repetido, com o número de placas faltantes, para análise posterior, conforme orientação dos POPs MT 07, MT 08 e MT 14.

Como citado anteriormente, para algumas estirpes não é possível obter colônias isoladas e de tamanho adequado, em razão da morfologia colonial. Para **colônias amorfas e**

confluentes (Figura 2), coletar as 4 amostras de pontos diversificados da placa de Petri. Para **colônias minúsculas** (< 2 mm), coletar mais de uma colônia por extrato, para obter massa significativa ao procedimento de extração. Ambas as situações representam desvio de procedimento, portanto, assinale **sim** no campo **Desvio de procedimento** do formulário RP 11 e fotografe as placas antes e após a coleta. No campo **Observação**, explique o desvio de procedimento.

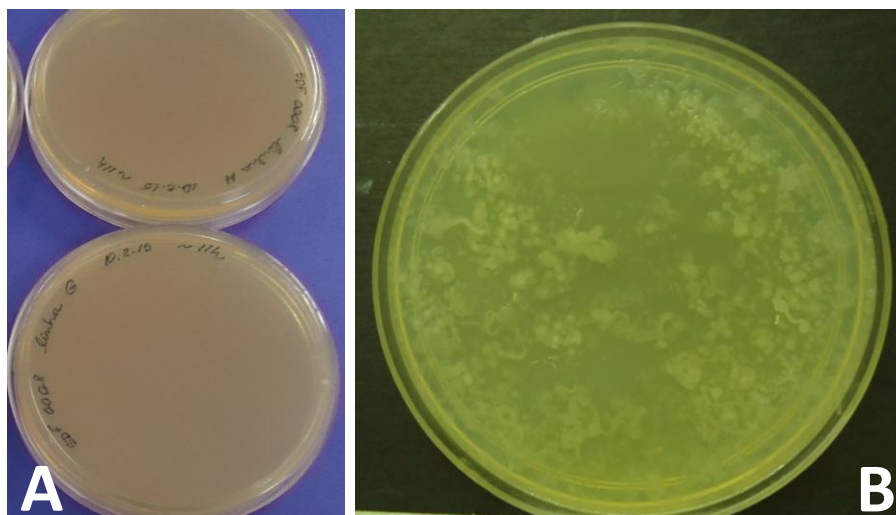


Figura 2. Placas de Petri contendo cultivos da estirpe SDF0008. (A) SDF0008 com 24 horas de incubação: colônias ainda imperceptíveis. As placas de Petri estão fechadas em posição de repouso, mostrando a identificação das estirpes inoculadas. **(B)** SDF0008 com 37 horas de incubação. Colônias amorfas, espalhadas e confluentes, características de crescimento típicas desta estirpe.

A. Preparação do ensaio e fotodocumentação

1. Limpar a bancada de trabalho e desinfetar com etanol 70%.
2. Providenciar um formulário RP 11 escolhendo as páginas conforme o número de estirpes que vai analisar (consultar item V).
3. Registrar as estirpes selecionadas para o ensaio de MALDI-TOF MS (no máximo 12 por formulário).
4. Assinalar quais RPs correspondem aos cultivos selecionados e preencher as respectivas datas.
5. Vestir um jaleco limpo e fazer a e antissepsia das mãos e antebraços.
6. Com auxílio da pinça anatômica retirar os tubos eppendorf do recipiente, fechar as tampas e organizar na estante para microtubos.

! Não tocar as bordas ou o interior das tampas com a pinça ou com os dedos!

7. Escrever na tampa dos tubos eppendorf, o número da estirpe e as coordenadas do poço que irá receber a alíquota na placa analisadora (Figura 3).

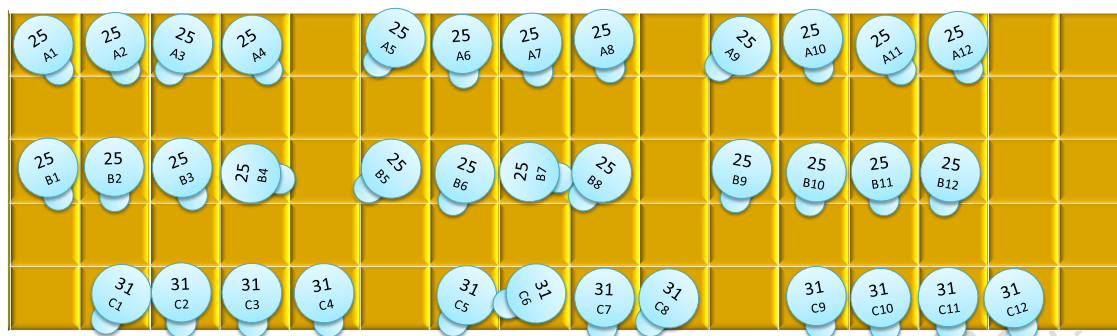


Figura 3. Organização de microtubos em estante. Identificação dos tubos eppendorf em uma estante com 80 lugares. Exemplo de organização de microtubos, contendo, cada um, a massa celular de uma colônia isolada que será submetida à extração de proteínas. As estirpes **SDF0025** e **SDF0031** foram cultivadas conforme MT 08, tendo sido: 6 cultivos para cada estirpe; 4 colônias isoladas retiradas de cada cultivo e distribuídas em 4 tubos eppendorf. Sendo assim, os extratos proteicos posteriormente obtidos nos microtubos A1, A2, A3 e A4 correspondem às colônias coletadas em apenas uma Placa de Petri. As tampas dos microtubos estão identificadas com o número da estirpe SDF e coordenadas do poço onde será aplicado o extrato na placa analisadora. Observar que a capacidade da estante é parcialmente aproveitada para facilitar o manuseio, de forma que, para a **SDF0031** só estão representadas 3 placas de cultivo; as outras 3 estariam em uma segunda estante para microtubos.

8. Calçar a luva de procedimento na mão que irá manipular as placas de Petri.
9. Retirar da estufa a primeira estirpe com cultivos adequados à extração, depositando as placas de Petri sobre a bancada de trabalho.

💡 *Os cultivos devem apresentar, pelo menos, 4 colônias distintas com tamanhos entre 2 e 3 mm.*

10. Os **cultivos secundários**, relativos ao MT 07, devem permanecer na estufa.
11. Registrar o horário de retirada das placas de Petri da estufa no campo **Horário**.
12. Com as placas de Petri fechadas, observar todas as colônias contra a luz branca procurando detectar o crescimento de colônias atípicas (contaminantes) e anotar no campo **Suspeita de contaminação**.



💡 *Manusear a máquina fotográfica e outros objetos com a mão sem luva.*


13. Fotografar cada placa de Petri contendo os cultivos da primeira estirpe: primeiro, sem abrir, em posição de repouso, registrando assim a identificação da placa. Em seguida fotografar as colônias com a placa de Petri aberta, buscando uma imagem nítida de toda a placa.


14. Retirar a luva.
15. Verificar no RP 07, RP 08 ou RP 14, de preparação dos cultivos, data e horário de início da incubação da estirpe e registrar o tempo de incubação no campo **Tempo de incubação**, aproximando o valor para número de horas, sem minutos.
16. Registrar o número de placas que não apresentaram crescimento ou menos de 4 colônias, nos campos: **Nº de placas s/crescimento** e **Nº de placas < 4 colônias**, respectivamente.
17. No campo **Total de replicatas**, registrar o número de amostras sem crescimento e que serão repetidas em análise posterior.
18. Registrar o horário de início do procedimento de extração no campo **Início do procedimento de extração**.

B. Extração de proteínas celulares


 *Para melhor compreender a distribuição dos extratos na placa analisadora, ler o item V deste documento.*

19. Portando os óculos de proteção, regular a micropipeta P1000 para 300 µL.
20. Abrir os tubos eppendorf relativos à primeira placa de Petri que irá manipular.
21. Distribuir 300 µL de água ultrapura em cada eppendorf sem trocar a ponteira.
22. Descartar a ponteira e iniciar o procedimento de coleta das colônias.
 -  *Atentar à distribuição das colônias nos respectivos microtubos!*
 -  *A troca de identidade das amostras dificilmente é detectável.*
23. Calçar as luvas para manipular as amostras biológicas.
24. Retirar um palito da embalagem de papel, segurando no meio do cilindro, sem tocar as pontas, e coletar uma colônia inteira da primeira placa de Peri.
25. Depositar fechar a placa e transferir o conteúdo celular para o respectivo eppendorf contendo água.
26. Mergulhar a amostra esfregando contra a parede do microtubo para facilitar a dissolução.
27. Fechar o eppendorf e repetir o procedimento para as 3 outras colônias da mesma placa.
28. Afastar a placa de Petri utilizada para a coleta de amostras formando uma pilha mais distante da área de trabalho.
29. Agitar em vórtice as 4 amostras que foram transferidas para os microtubos até a completa homogeneização.

 *Caso não obtenha boa homogeneização, ressuspender vigorosamente com a micropipeta P200 regulada para 100 μ L, trocando a ponteira a cada amostra.*

 *Para minimizar o risco de contaminação da parte interior do cilindro da micropipeta durante a aspiração do conteúdo, não ultrapassar o volume médio da micropipeta!*

 *Nunca ultrapassar o limite de regulação da micropipeta durante a homogeneização!*


 *Ter atenção ao ejetar o conteúdo da micropipeta! Há risco de atingir o operador ou material da bancada com respingos da suspensão de bactérias.*

30. Registrar o resultado da homogeneização em água.
31. Regular a P1000 para 900 μ L.
32. Abrir os 4 tubos eppendorf.
33. Transferir 900 μ L de etanol 96 °GL para os 4 primeiros tubos eppendorf trocando as ponteiras.
34. Fechar os 4 tubos eppendorf e homogeneizar no vórtice.
35. Centrifugar a 13.000 rpm por 2 min.
36. Ajustar a P1000 para 1000 μ L e retirar cuidadosamente os sobrenadantes e descartar, preservando o sedimento.

 *Cuidado para não aspirar o sedimento!*

 *Trocar a ponteira a cada amostra.*


37. Ajustar a P100 para 30 μ L, distribuir 30 μ L de solução de acetonitrila em cada microtubo e agitar em vórtice.

 *Caso não obtenha homogeneização adequada com a agitação, ressuspender vigorosamente com a P200 regulada para 100 μ L, tomando as devidas precauções (item 30).*

38. Registrar o resultado da homogeneização em acetonitrila.
39. Abrir as 4 amostras e adicionar 30 μ L de solução de ácido fórmico em cada uma.

 *Manter os frascos de reagentes fechados entre as aplicações; estes são muito voláteis.*

40. Fechar todas as amostras e agitar no vórtice.
41. Observar se obteve boa dissolução em ácido fórmico, caso negativo, homogeneizar suavemente com a micropipeta.

 **Executar movimentos suaves com a micropipeta para homogeneizar em ácido fórmico!**

42. Registrar o resultado da homogeneização em ácido fórmico.
43. Centrifugar a 13.000 rpm por 2 min.
44. Retirar os tubos eppendorf da centrifuga delicadamente para não misturar as fases da suspensão e depositar no suporte para microtubos.

C. Aplicação da amostra na placa analisadora

45. Ajustar a P2 para o volume de 1 μ L.
46. Abrir o primeiro eppendorf e retirar 1 μ L de sobrenadante.
47. Aplicar o sobrenadante no respectivo poço da placa analisadora.
48. Fechar o eppendorf e separar das amostras que ainda não foram aplicadas.
49. Repetir o procedimento para os outros 3 extratos do respectivo cultivo.

 *Conferir a regulagem da micropipeta para 1 μ L. Durante a manipulação, acidentalmente, a regulagem pode ser alterada.*

50. Esperar que os extratos sequem completamente e, enquanto isto, iniciar o segundo ciclo de extração, repetindo todo o procedimento para o próximo cultivo, até a aplicação.

 *O tempo de secagem dos extratos na placa analisadora é muito variável. Pode ser de minutos a mais de uma hora.*

D. Aplicação da matriz e transporte da placa analisadora

51. Terminando o segundo ciclo de extração, observar se as amostras aplicadas ao final do primeiro ciclo já estão secas.
52. Caso positivo, conferir a regulagem da P2 para 1 μ L e aplicar 1 μ L da solução matriz sobre cada amostra.

 **A solução matriz é muito volátil, não deixar o eppendorf aberto desnecessariamente.**

53. Caso as amostras ainda estejam úmidas, iniciar o 3º ciclo de extração.
54. Ao final de todos os ciclos de extração, observar se os últimos poços da placa analisadora já secaram.
55. Caso positivo, aplicar a solução matriz naqueles que faltam. Se não, aguardar a secagem completa antes de aplicar a matriz.

! *Manter a uniformidade experimental para cada cultivo! Sempre completar o procedimento para cada placa de Petri antes de iniciar o próximo ciclo de extração.*

56. Acomodar a placa analisadora em sua caixa original, deixar a caixa aberta até secar completamente a matriz.

! *A completa secagem da matriz pode ser observada pela formação de uma lâmina opaca sobre cada poço (Figura 1).*

! *O tempo de secagem da matriz na placa analisadora também é muito variável. Pode ser de minutos até mais de uma hora.*

57. Preencher os campos que faltam no formulário RP 11, assinar e arquivar.

58. Guardar o material, transferir a lixeira da CSB para a estante de material contaminado, limpar a bancada e desinfetar com etanol 70%.

59. Guardar as soluções de extração no refrigerador (4 a 8 °C) e a matriz no freezer.

60. Fechar a caixa da placa analisadora e envolver em papel alumínio.

! *A matriz é fotosensível e termolábil, não expor esta à luz intensa, à luz ambiente por tempo prolongado e ao calor!*

61. Em uma caixa de isopor limpa, acondicionar a placa analisadora, um jaleco limpo e o CD para gravação dos dados.

62. Levar imediatamente as amostras para análise no Laboratório de espectrometria de massa do Cenargem.

V. Registro do procedimento

O formulário RP 11 possui duas páginas, discriminadas acima do título do formulário, como **Folha 1** e **Folha 2**.

A. Folha 1

Corresponde à primeira página do RP 11 que comporta dados de 12 linhagens no máximo. Se estiver ensaiando mais de 12 linhagens serão necessárias 2 cópias da folha 1 e 1 cópia da folha 2. O campo direito do cabeçalho, em todas as folhas, deve ser preenchido com o número da página atual e o total de páginas. Por exemplo, para 21 linhagens, as páginas devem ser numeradas assim: 1/3 – 2/3 – 3/3.

Os campos da folha 1 do RP 11 estão listados a seguir com as orientações de preenchimento.

Horário (h e min): registrar horário de retirada dos cultivos da estufa incluindo minutos, no formato em português, exemplo: 13h12.

Tempo de incubação (h): período de tempo desde a colocação dos cultivos na estufa até a retirada. Para efeito deste manual, é corresponde ao tempo de crescimento (**tc**) das colônias.

Diâmetro médio (mm): estimar o diâmetro médio (**D**) das colônias coletadas ou a faixa de variação em milímetros e registrar.

Suspeita de contaminação? (sim/não): após a verificação dos cultivos, indicar sim ou não para qualquer suspeita de contaminação. Neste caso, descartar as placas de Petri contaminadas ou, proceder ao MT 06-C (CQM – MCF para investigação de tipos morfológicos), anexando o formulário RP 06-C ao RP 11 atual.

Nº de placas s/crescimento: registrar o número de placas que não apresentarem crescimento.

Nº de placas < 4 colônias: registrar o número de placas que apresentaram menos de 4 colônias.

Total de reposições: registrar o número de placas de Petri que devem ser cultivadas novamente para compensar os cultivos inadequados: com suspeita de contaminação ou crescimento insuficiente.

Desvio de procedimento? (sim/não): indicar se houve ou não qualquer tipo de desvio às instruções deste POP, como a utilização de mais de uma colônia por extrato, por exemplo. Considerar também como desvio de procedimento a coleta parcial de colônias.

Início do procedimento de extração (h e min): registrar o horário de início do procedimento de extração indicando hora e minutos, no formato em português, exemplo: 15h11.

Obteve boa homogeneização em água? (sim/não): algumas estirpes são resistentes à dispersão das células em água. Nestes casos, as células se mantêm agregadas mesmo após a agitação em vórtice, sendo necessário homogeneizar vigorosamente com a micropipeta, conforme orientação deste POP. Ao final da homogeneização, registrar neste campo se obteve ou não bom resultado.

Obteve boa dissolução em acetronitrila? (sim/não): assim como para a mistura em água, algumas estirpes são resistentes à dissolução em acetronitrila, formando aglomerados celulares e necessitando vigorosa homogeneização com a micropipeta. Registre se ao final da operação obteve ou não bom resultado.

Obteve boa dissolução em ácido fórmico? (sim/não): a homogeneização em ácido fórmico deve ser feita em vórtice ou com **movimentos suaves** se for utilizar a micropipeta. Registrar, ao final, se obteve ou não bom resultado.

Tempo de exposição: calcular o período de tempo decorrido desde o início do procedimento de extração até a aplicação da matriz, incluindo minutos, no formato do exemplo: 1h13 ou 0h25.

Data e horário da aquisição (dia/h): registrar dia, mês e horário da aquisição no espectrômetro de massa, indicando minutos, no formato do exemplo: **23/05 – 12h53.**

B. Folha 2

A folha 2 contém um quadro de distribuição dos extratos proteicos na placa analisadora. Este quadro pode ser preenchido à lápis no início do procedimento para orientar a identificação dos tubos eppendorf e a escrita recoberta com caneta ao final da aplicação da matriz. Isto, porque é necessário determinar a posição dos extratos no início do procedimento, mas podem ocorrer perdas e outras alterações durante o procedimento.

! Os formulários de registro de procedimento – RPs não podem conter rasuras!

! Se errar o preenchimento do formulário, inutilizar e iniciar o registro em uma cópia em branco.

O quadro é necessário para fazer a correspondência entre os espectros adquiridos e as amostras. A figura 4 mostra a distribuição, na placa analisadora, dos extratos obtidos nos microtubos do exemplo anterior (Figura 3). Registrar o número da estirpe SDF sem os zeros anteriores ao algarismo significativo.

Para o procedimento MT 07, são inoculadas 2 placas de cultivo para cada estirpe, porém uma destas é mantida na estufa para estudo morfológico das colônias (cultivo secundário), não sendo aproveitada para o ensaio espectrométrico. Somente uma placa de Petri por estirpe é cultivada para a análise espectrométrica. Portanto, para cultivos do MT 07, a placa analisadora comporta 24 estirpes por ensaio (Figura 4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
B	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
C	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
D	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
E												
F												
G												
H												

Figura 3. Representação de uma placa analisadora de 96 poços. O esquema mostra a posição em que foram aplicados os extratos proteicos obtidos para as estirpes SDF0025 e SDF0031, do exemplo anterior (Figura 3). Os cultivos foram realizados conforme o POP MT 08: 6 placas de cultivo para cada estirpe ocupam 2 linhas da placa que, portanto, comporta 4 linhagens por análise.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25	25	25	25	26	26	26	26	33	33	33	33
B	37	37	37	37	44B	44B	44B	44B	45	45	45	45
C	54	54	54	54	56	56	56	56	66	66	66	66
D	70	70	70	70	74	74	74	74	75	75	75	75
E	80	80	80	80	87	87	87	87				
F												
G												
H												

Figura 4. Distribuição de amostras de extratos proteicos em placa analisadora. Esquema de distribuição dos extratos protéicos na placa analisadora para cultivos do MT 07. Cada linha comporta 3 estirpes e a placa analisadora completamente preenchida comporta 24 estirpes.

VI. Referências

FREIWALD, A.; SAUER, S.. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols*, vol.4, nº 5 (2009)

KRUPPA, GARY. Microbial Identification for the 21st Century. The MALDI Biotyper. Bruker Daltonics. Disponível em: <<http://www.pda.org/Chapters/North-America-cont/Southeast/Presentations/Microbial-Identification-for-the-21st-Century-The-MALDI-Biotyper.aspx>>

AGUSTINI, B. C.; SILVA, L. P.; BLOCH JR, C.; BONFIM, T. M. B.; SILVA, G. A.. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and

development of supplementary database. Applied Microbiology Biotechnology
98:5645 – 5654 (2014)

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

LaBafes - UnB/IB/CEL

Registro de Procedimento – RP – Folha 1

RP 11– Extração de proteínas e aplicação de amostras

Responsável:	Data:
--------------	-------

RPs de referência: RP 07 Data: ___/___/___ Data: ___/___/___ RP 08 Data: ___/___/___ Data: ___/___/___
 RPs de referência: RP 14 Data: ___/___/___ Data: ___/___/___ RP ____ Data: ___/___/___ Data: ___/___/___

Linhagem	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Horário (h, min)												
Tempo de incubação (h)												
Diâmetro médio (mm)												
Suspeita de contaminação? (sim/não)												
Nº de placas s/crescimento												
Nº de placas < 4 colônias												
Total de reposições												
Desvio de procedimento? (sim/não)												
Início do procedimento de extração (h, min)												
Obteve boa homogeneização em água? (sim/não)												
Obteve boa dissolução em acetronitrila? (sim/não)												
Obteve boa dissolução em ácido fórmico? (sim/não)												
Tempo da extração até aplicação da matriz (h, min)												
Data e horário da aquisição (dia/h)												

Registro de Procedimento – RP – Folha 2

RP 11 – Extração de proteínas e aplicação de amostras

Responsável:

Data:

Esquema de distribuição das linhagens na placa de 96 poços para o espectrômetro Micro-Flex

Insira o nº da linhagem, sem SDF e zeros à esquerda, no poço onde foi aplicado o respectivo extrato protéico.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Observações:

Procedimento Operacional Padrão – POP

MT 12 – Cultivo para análise de Célula Intacta (CI)

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	01/11/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definições

A expressão **Célula Intacta (CI)**, para efeito deste trabalho, é empregada como alusão ao ensaio de IC MALDI-TOF MS (do inglês: *Intact cell matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight, mass spectrometry*), que consiste na análise espectrométrica de amostras microbianas aplicadas diretamente sobre a placa analisadora, sem qualquer tratamento anterior. Os cultivos para a análise de CI podem ser realizados com inóculos de origens diversas, como: suspensões de esporos da CBafes; repiques de cultivos de colegas; ou cultivos já analisados por extração de proteínas; células de outras coleções, etc. As condições de crescimento podem ser padronizadas conforme MT 07 (Cultivo para 1ª análise espectrométrica) ou não, dependendo do que se pretende observar. Trata-se de um ensaio livre, porém observando-se as recomendações de manuseio de amostras biológicas e procedimentos básicos laboratoriais.

È importante observar que, como os cultivos para análise de células intactas **não precisam obedecer a um padrão específico**, pode-se analisar até mesmo uma única colônia retirando amostras de 4 pontos das bordas (Figura 1). Deve-se, porém, tentar obter os padrões de quantidade, diâmetro, colônias isoladas e tempo de incubação, adotados nos procedimentos anteriores. Para comparação de resultados, é importante variar apenas uma condição por vez. Muitas variáveis aplicadas ao mesmo ensaio dificultam a correlação de resultados.

A **placa analisadora** utilizada para este ensaio é a mesma placa de 96 poços utilizada para os ensaios com extratos proteicos (*vide* MT 11 – Extração de proteínas e aplicação de amostras).

Por se tratar de um ensaio livre, o **número de placas de Petri por estirpe** admitido para este POP não é pré-estabelecido. Porém, ao planejar o ensaio, deve-se calcular o

número de cultivos por estirpe considerando a capacidade da placa analisadora (**96 poços**), o número de amostras por placa de Petri (**4 amostras/placa de Petri**) e a relação amostra por poço (**1 amostra/3 poços**). Isto corresponde a **uma estirpe por linha**.

II. Objetivos

Os ensaios de IC MALDI-TOF MS são úteis para confrontar dados laboratoriais ou interlaboratoriais; testar a eficácia da biblioteca na identificação de amostras de origens diversas, além de ampliar o conhecimento acerca das linhagens da CBafes.

III. Material

Na lista abaixo, considera-se a quantidade de material necessária para preparar um cultivo por estirpe. Encontram-se destacados com um asterisco (*) os itens necessários para inocular volumes maiores que 10 µL de suspensão estoque.

- ✓ Suspensões de trabalho e/ou cultivos para repique (no máximo 8)
- ✓ Placas de cultivo
 - 💡 *Obrigatoriamente placas confeccionadas conforme procedimento MT 05 – Preparação das placas de cultivo.*
 - 💡 *As placas devem ter sido aprovadas no CQM de bancada, conforme MT 05.*
 - 💡 *Sempre manter **placas excedentes** na CSB para cobrir eventuais falhas de procedimento.*
- ✓ 1 estante para tubos eppendorf autoclavada
- ✓ 2 abridores de tubos eppendorf esterilizados
- ✓ Tiras de Parafilm M® (para suspensões de esporos)
- ✓ 2 pinças anatômicas esterilizadas (retirada de Parafilm M®)
- ✓ 1 caneta de marcação permanente ponta fina (desinfetada)
- ✓ Alças de transferência estéreis de 10 µL
- ✓ Alças de Drigalski (para distribuir mais de 10 µL)*
- ✓ Micropipeta P100 µL*
- ✓ 1 caixa de ponteiros amarelos estéreis*
- ✓ 1 estante de apoio esterilizada


- ✓ 1 pulverizador de etanol 70 %
- ✓ 3 pares de luvas estéreis
- ✓ 1 lixeira de CSB (frasco de vidro autoclavado)
- ✓ Câmera fotográfica
- ✓ Estufa de incubação

IV. Procedimento

1. Registrar a retirada das placas de cultivo do estoque no respectivo RP 05 do lote, conforme orientação do MT 05.
2. Conferir as condições de temperatura e limpeza da estufa de incubação.
3. Limpar a CSB e mesa de apoio conforme procedimento MT 01 – Utilização e manutenção das salas limpas.
4. Ligar o sistema de esterilização por pelo menos 30 min.
5. Separar o material para o procedimento estéril.
6. Desligar as lâmpadas UV da sala e CSB.
7. Fazer a assepsia e antissepsia das mãos e antebraços (MT 02 – Procedimentos básicos).
8. Abrir as embalagens plásticas das placas de Petri, retirar as placas com cuidado para não abrir e depositar imediatamente na CSB, em posição de repouso.
9. Organizar o restante do material estéril na CSB, exceto uma estante para microtubos.
10. Deixar o pulverizador de etanol 70% na bancada de apoio.
11. Acender as luzes UV da sala e CSB por mais 30 min.
12. Separar as suspensões de trabalho e/ou cultivos que irá repicar.


 ***Não expor amostras biológicas à luz UV!***

13. Agitar as suspensões de trabalho no vórtice, observando a presença de turbidez (MT 06-B – CQM – Inspeção visual de amostras líquidas).


 *Havendo suspeita de contaminação, separar a amostra suspeita para realizar o MT 06-C (CQM – MCF para investigação de tipos morfológicos) ou descartar. Registrar a ocorrência em um formulário RP 06-B e anexar ao RP 12.*

14. Apagar as luzes UV da sala e CSB e colocar as amostras na bancada de apoio.
15. Vestir um jaleco limpo e arregaçar as mangas.

16. Fazer a assepsia e antisepsia das mãos e antebraços.
17. Depositar as amostras no campo central da CSB.
18. Identificar as placas de Petri novas na base, com código da amostra, data, hora estimada em que será colocada na estufa e nome do operador.
19. Ao identificar a placa, observar se houve crescimento bacteriano.
20. Colocar a pilha de placas no campo central em posição de repouso.

 *Manter as placas sempre fechadas e em posição de repouso. Abrir apenas no momento de aplicar a amostra!*


 *Nunca executar movimentos sobre placas ou amostras abertas.*

 *Havendo suspeita de contaminação, descartar a placa e inocular outra para reposição.*


21. Abrir a ponta do pacote de alças estéreis pelo lado dos cabos e colocar na estante de apoio.
22. Abrir o pacote de alças de Drigalski da mesma maneira.*
23. Ajustar a micropipeta para a quantidade de inóculo e encaixar a ponteira.*
24. Retirar uma alça com cuidado para não tocar as partes externas da embalagem.
25. Com auxílio do abridor, abrir o eppendorf da primeira amostra.
26. Coletar uma gota de suspensão com a alça de transferência, fechando imediatamente o eppendorf.

 *Para quantidade maior utilizar a pipeta.**

27. Para reisolar colônia, abrir o cultivo, tocar levemente uma colônia isolada, fechar imediatamente e, se não for coletar nova colônia, distanciar o cultivo utilizado do campo central de trabalho.

 *Se a ponta da alça de transferência, ou da ponteira*, tocar algum objeto – luvas, jaleco ou piso da CSB – descartar e pegar uma nova.*

28. Abrir a respectiva placa de Petri estéril e transferir a amostra, empregando a técnica de inoculação por esgotamento (Figura 1, MT 07).
29. Ou, para volumes maiores, espalhar com a alça de Drigalski.*
30. Fechar a placa inoculada e segregar mais ao fundo do campo principal de trabalho, iniciando uma pilha de cultivos prontos.
31. Repetir o procedimento para as próximas amostras que serão inoculadas, sempre fechando o eppendorf (ou placa de Petri) imediatamente após a coleta.


 *Sempre conferir se a identificação das placas de Petri novas corresponde à estirpe que se está inoculando.*

32. Ao final, retirar as placas inoculadas da CSB e incubar na estufa, evitando empilhamentos.
33. Registrar o horário de incubação.
34. Retornar à sala da CSB, recolher o material usado, limpar e organizar conforme procedimento MT 01.
35. Registrar o procedimento no formulário RP 12 conforme orientação do item V.

V. Acompanhamento e registro

O formulário RP 12 possui uma página para preenchimento após término do procedimento. Preencher o cabeçalho do RP 12, indicando a data, dia da semana, hora de incubação na estufa e assinar. Preencher os campos da tabela conforme explicado a seguir.

- a. **Origem do inóculo:** informar abreviadamente a linhagem e nome do fornecedor do inóculo no formato: SDF0003/Juliana; ou B. subtilis/Embrapa; ou apenas SDF0012 para suspensões de trabalho padronizadas.

 *Não é preciso informar se o inóculo for uma suspensão de trabalho obtida pelo MT 04 – Aliquotagem de suspensões estoque de esporos. Basta informar o código da estirpe.*

- b. **Tc estimado (h):** anotar o tempo de crescimento estimado para a estirpe no RP 07 (informar data do RP), ou informado pelo fornecedor da amostra, se for uma amostra de terceiro.
- c. **Nº de placas:** registrar o número de placas de Petri cultivadas para a estirpe.
- d. **Tipo de inóculo:** informar se o inóculo foi retirado de cultivo sólido, cultivo líquido ou suspensão de esporos.
- e. **Realizou o PP 06-B para a suspensão estoque? (sim ou não):** apenas informar sim ou não ou apenas um traço (–) se o inóculo for de outra natureza.
- f. **Suspeita de contaminação? (sim ou não):** registrar o resultado da inspeção visual do cultivo ou amostra líquida (PP 06-B – CQM – Inspeção visual de amostras líquidas).
- g. **Meio de cultura (padrão ou descrever tipo e pH):** informar se utilizou meio de cultura sólido padrão (LB, ágar 1,8%, pH 7,2 – conforme MT 05) ou descrever o tipo utilizado no seguinte formato: nome abreviado meio/pH. Por exemplo: LB + 10% peptona/9,0.
- h. **Temperatura:** registrar a temperatura de incubação adotada.

- i. **Informe sim, não ou (-):** informar sim, não ou preencher com um traço (-) os casos que não se aplicam ao ensaio.

Os cultivos para análise de CI devem ser acompanhados somente até o momento da coleta (MT 13 – Ensaio de Célula Intacta), fotografados e depois descartados, evitando ocupação desnecessária da estufa. Os dados de crescimento serão informados no próximo formulário, RP 13.

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

LaBafes - UnB/IB/CEL

Registro de Procedimento – RP

RP 12 – Cultivo para análise de Célula Intacta

Responsável:	Data:
--------------	-------

Início da incubação: ____/____/____	Dia da semana:	Horário: ____ h ____ min
-------------------------------------	----------------	--------------------------

Estirpe	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Origem do inóculo								
Tc estimado (h)								
Nº de placas								
Tipo de inóculo (cultivo sólido, líquido ou suspensão de esporos)								
Realizou o PP 06-B para a suspensão estoque? (sim ou não)								
Suspeita de contaminação? (sim ou não)								
Meio de cultura (padrão ou descrever tipo e pH)								
Temperatura (°C)								

Informe sim, não ou (-)

- As placas de cultivo foram submetidas ao CQM de bancada?
- Alguma placa do lote apresentou contaminação antes do uso?
- Registrou a retirada das placas no RP 05?
- A CSB foi limpa por você imediatamente antes do uso?
- Fez a assepsia e antissepsia das mãos e antebraços antes de iniciar o procedimento estéril?
- As suspensões de trabalho estavam vedadas com Parafilm M®?
- Faltou algum material durante o procedimento? Qual? _____
- O trabalho no fluxo foi interrompido por algum motivo?
- Faltou energia elétrica ou o sistema de fluxo laminar foi desligado durante o procedimento?
- Ao final, vedou todas as suspensões com Parafilm M®?
- Limpou a CSB e a sala adequadamente após o procedimento?

Procedimento Operacional Padrão – POP

MT 13 – Ensaio de Célula Intacta

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	02/11/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definições

A expressão **Célula Intacta (CI)**, para efeito deste trabalho, é empregada em alusão ao ensaio de IC MALDI-TOF MS (do inglês: *Intact cell matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight, mass spectrometry*), que consiste na análise espectrométrica de amostras microbianas aplicadas diretamente sobre a placa analisadora, sem qualquer tratamento anterior. A **aplicação de células intactas** é um procedimento simples que consiste em transferir diretamente a colônia microbiana – ou parte desta – para a placa analisadora e recobrir com solução matriz antes de proceder à análise de CI.

A **placa analisadora** disponível no LaBafes para a MALDI-TOF MS, como descrito no MT 11 – Extração de proteínas e aplicação de amostras, é uma placa de aço inoxidável polido, contendo 96 poços – ou *spots* – para deposição de amostras, modelo MTX-96 (Bruker), adaptável ao espectrômetro de massa Micro-Flex da Bruker Daltonics (Figura 1).



Figura 1. Placa analisadora para MALDI-TOF MS. Placa analisadora de aço inoxidável polido, modelo MTX-96 (Bruker) para o espectrômetro de massa Micro-Flex, acondicionada na caixa original e contendo amostras cristalizadas por matriz nas linhas B e C. Este modelo contém 96 poços – ou *spots* – para deposição de amostras.

Neste ensaio, **cada amostra celular** coletada será **aplicada diretamente em 3 poços** da placa analisadora, em um esquema de diluição explicado detalhadamente no item IV. De cada cultivo destinado à análise de CI podem ser coletadas: **i)** células das bordas de 4 colônias isoladas; **ii)** 4 colônias inteiras isoladas – se o diâmetro estiver entre 2 e 3 mm; **iii)** mais de uma colônia por poço – se as colônias forem confluentes ou minúsculas; **iv)** até mesmo células de 4 pontos das bordas de uma única colônia, se o crescimento tiver sido insuficiente.

A origem das amostras para este POP pode e deve ser diversificada. Considerando que o objetivo principal é a validação do banco de dados, a diversidade de amostras servirá para testar a robustez do banco de dados para reconhecimento das estirpes. Entretanto, o experimento, deve ser controlado dentro dos padrões deste POP para que seja possível analisar as variáveis. Podem ser utilizados cultivos preparados conforme o **MT 12** – Cultivo para análise de Célula Intacta, ou **cultivos frescos** de colegas do grupo de pesquisa.

Não podem ser aproveitados com finalidade de validação da biblioteca: **i)** cultivos conservados em refrigerador; **ii)** cultivos contaminados; **iii)** cultivos em meio líquido; **iv)** suspensões de esporos.

Cultivos armazenados em refrigerador nunca devem ser utilizados para análise espectrométrica com qualquer finalidade, em virtude da umidade da amostra comprometer a aquisição dos espectros.

A análise direta de **suspensões de esporos** e **cultivos em meio líquido** para estudos de validação requer uma prévia revisão do estado da técnica e a criação de POPs específicos.

A análise de CI de **cultivos contaminados** é aceita, mas apenas para auxiliar a identificação de contaminantes contra o banco de dados do sistema *MALDI-Biotyper*; não pode ser aproveitada em estudos de validação da biblioteca. Para **estudos de validação com contaminantes**, o microrganismo contaminante deve ser isolado do cultivo contaminado, e as células da cultura pura derivada, sim, poderão ser analisadas por IC MALDI-TOF MS com este objetivo.

II. Objetivos

Preparar amostras para obtenção dos espectros de CI dentro dos padrões experimentais recomendados por este manual.

Validar o banco de dados/biblioteca da CBafes, construído pelo método de extração de proteínas, para a capacidade de reconhecer amostras de origens diversas.

III. Material

- ✓ 100 µL de solução matriz (RP 09 – Preparo da solução matriz)
- ✓ Placas de cultivo
- ✓ Palitos estéreis
- ✓ Placa analisadora
- ✓ Micropipeta P2
- ✓ 1 caixa de ponteiros brancos estéreis
- ✓ Lixeira de bancada para material contaminado
- ✓ 1 pisseta com etanol 70%
- ✓ 1 pisseta com metanol
- ✓ 3 pares de luvas de procedimento
- ✓ Papel toalha
- ✓ Óculos de proteção
- ✓ Máquina fotográfica

IV. Procedimento

As instruções deste procedimento se aplicam a cultivos frescos, obtidos como descrito no MT 12 ou cedidos por colegas da equipe de pesquisa (Figura 1), dentro do estabelecido no item I deste POP.

Os cultivos referentes ao MT 12 devem ser retirados da estufa quando as colônias possuírem tamanho suficiente para serem coletadas, preferencialmente com 12 a 24 h de incubação. Para cultivos de outras origens não há critérios estabelecidos em relação ao tempo de incubação.

A placa analisadora comporta apenas 8 cultivos, sendo uma linha para cada placa de Petri cultivada.

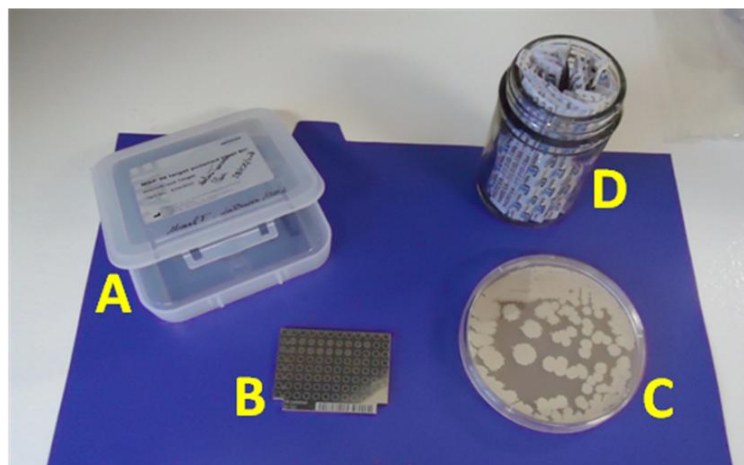


Figura 1. Material de bancada para aplicação de células intactas. (A) Caixa original de acondicionamento da placa analisadora. **(B)** Placa analisadora de 96 poços contendo amostras cristalizadas nas linhas B e C. **(C)** Cultivo fresco com 60 horas de incubação, cedido por terceiro. **(D)** Palitos embalados individualmente estéreis.

1. Limpar a bancada de trabalho e desinfetar com etanol 70%.
2. Registrar a data do ensaio no formulário RP 13.
3. Colocar os óculos de proteção.
4. Limpar a placa analisadora com metanol e um papel que não solte fibras.
5. Fazer a assepsia das mãos e antebraços.
6. Retirar os cultivos da estufa e depositar na bancada de trabalho.
7. Registrar o código das estirpes selecionadas para o ensaio no RP 13.
8. Registrar o horário de retirada dos cultivos no RP 13.
9. Verificar, no RP 12 de preparação dos cultivos, a data e hora de início da incubação, calcular o tempo de incubação e registrar no RP 13.
10. Informar quais estirpes não apresentaram crescimento ou apresentaram menos de 4 colônias isoladas no RP 13.
11. Registrar a lápis, no quadro **Distribuição das amostras na placa analisadora**, a posição que cada estirpe ocupará na placa analisadora, sendo que cada linha da placa comporta um cultivo.
12. Fotografar cada placa de Petri: primeiro, sem abrir, em posição de repouso, registrando assim a identificação da placa. Em seguida fotografar as colônias com a placa de Petri aberta, buscando uma imagem nítida de toda a placa.
13. Calçar as luvas para manipular as amostras biológicas.

14. Escolher a primeira placa de Petri e observar tamanho e distribuição das colônias.
15. Considerando que devem ser coletadas 4 amostras em cada placa (1 amostra por poço), adotar a seguinte metodologia de coleta:
 - i. **Colônias maiores que 3 mm:** escolher 4 colônias isoladas e coletar uma pequena quantidade da borda de cada (Figura 2).
 - ii. **Diâmetro colonial de 2 a 3 mm:** coletar 4 colônias inteiras isoladas. Este é o procedimento padrão.
 - iii. **Colônias confluentes:** coletar pequena porção em 4 pontos distintos da placa de Petri.
 - iv. **Colônias minúsculas:** coletar mais de uma colônia para cada poço da placa analisadora.
 - v. **Menos de 4 colônias na placa de Petri:** se o diâmetro permitir, coletar 4 porções das bordas, ainda que seja uma única colônia.

💡 *A quantidade de amostra aplicada não deve ser excessiva em razão do limite de detecção do espectrômetro de massa.*

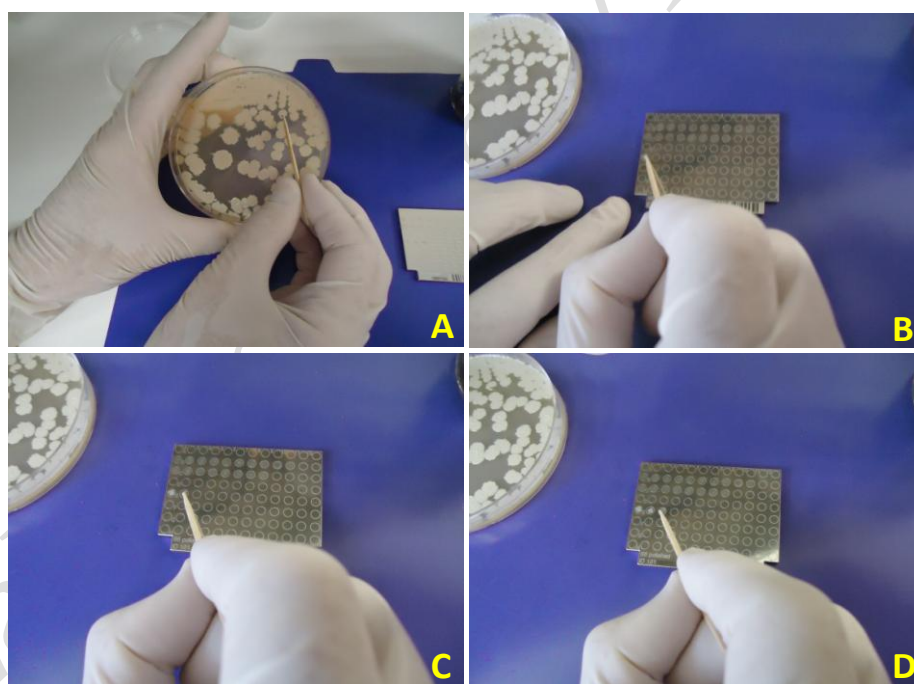


Figura 2. Aplicação de células intactas na placa analisadora. (A) Coleta de uma pequena porção da borda de uma colônia isolada. **(B, C e D).** Aplicação da mesma amostra em três poços consecutivos – E1, E2 e E3, com diminuição gradual da massa celular nos poços E2 e E3.

16. Registrar o número de colônias que serão aproveitadas para retirada das 4 amostras no campo **Nº de colônias aproveitadas**.
17. Abrir um palito segurando o cilindro pelo centro, com cuidado para não tocar nas pontas (Figura 2).

18. Coletar a primeira amostra conforme metodologia explicada no tópico 14.
19. Aplicar no poço respectivo com movimentos circulares, de forma a cobrir toda a área do poço.
20. Aplicar a mesma amostra no 2º poço e no 3º, com movimentos circulares, esgotando a amostra resultando, assim, em diminuição gradual da massa bacteriana nos poços 2 e 3 (Figura 2)

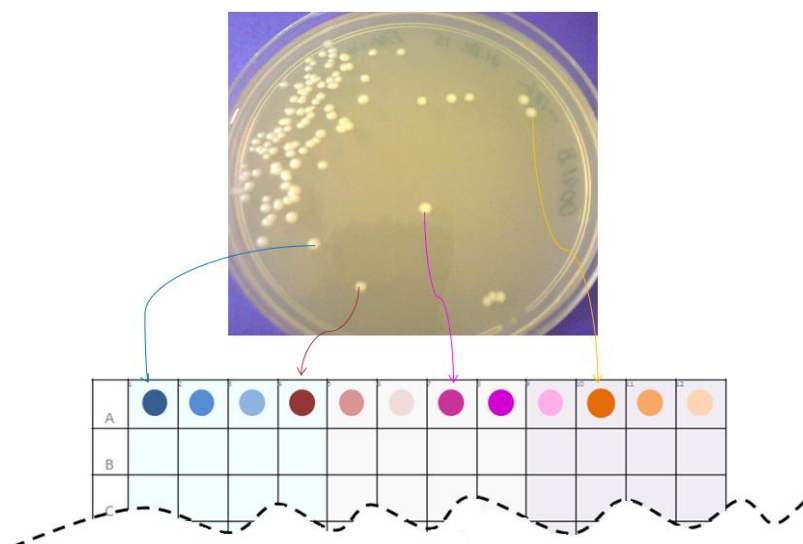


Figura 3. Aplicação colônias isoladas na placa analisadora. Quatro colônias isoladas retiradas do cultivo estão representadas com cores diferentes. Cada colônia ocupa 3 poços da placa analisadora, de forma que cada cultivo ocupe uma linha. As setas mostram a posição da primeira aplicação de cada colônia e o degradê de cor nos 2 poços seguintes indica diluição da massa bacteriana aplicada.

21. Descartar o palito na lixeira de bancada.
22. Abrir outro palito e repetir a operação para as outras 3 colônias isoladas escolhidas.
23. Separar o cultivo utilizado iniciando uma pilha nova distanciada do campo de trabalho.
24. Terminando a aplicação das amostras na placa analisadora, cobrir todos os poços contendo amostras com 1 μ L de solução matriz, trocando a ponteira a cada aplicação.

- ⚠ *Não tocar a ponteira em qualquer objeto! Suspeitando de contaminação, descartar a ponteira e utilizar uma nova.*
- ⚠ *Não economizar ponteiras! Trocar a cada aplicação!*
- ⚠ *A solução matriz é muito volátil, não deixar o eppendorf aberto desnecessariamente.*

25. Acomodar a placa analisadora na caixa original e deixar a caixa aberta até completa secagem da matriz.

💡 *A secagem das amostras é constatada pela formação de uma lâmina opaca sobre cada poço (Figura 1).*

💡 *O tempo de secagem das amostras é variável, podendo ser de minutos a mais de uma hora.*

26. Descartar as placas de Petri nos recipientes de material contaminado.

27. Destinar adequadamente o material usado e limpar a bancada com etanol 70%.

28. Guardar a solução matriz em *freezer* (-20 °C).

29. Preencher o formulário RP 13, assinar e arquivar.

30. Fechar a caixa da placa analisadora e envolver em papel alumínio.

⚠️ *A matriz é fotosensível! Não expor à luz intensa, à luz ambiente por tempo prolongado ou ao calor.*

31. Em uma caixa de isopor limpa, acondicionar a placa analisadora, um jaleco limpo e o CD para gravação dos dados.

32. Levar imediatamente as amostras para análise no Laboratório de espectrometria de massa do Cenargem.

V. Referências

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols*, vol.4, nº 5 (2009)

KRUPPA, GARY. Microbial Identification for the 21st Century. The MALDI Biotyper. Bruker Daltonics. Fonte: <<http://www.pda.org/Chapters/North-America-cont/Southeast/Presentations/Microbial-Identification-for-the-21st-Century-The-MALDI-Biotyper.aspx>>

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

RP 13 – Ensaio de Célula Intacta

Responsável:	Data:
--------------	-------

Informação sobre os cultivos:

Estirpe	Hora de retirada (h:min)	Tempo de crescimento (h)	Sem crescimento (sim/não)	Menos de 4 colônias isoladas? (sim/não)	Nº de colônias aproveitadas	Suspeita de contaminação? (sim/não)
13.						
14.						
15.						
16.						
17.						
18.						
19.						
20.						

Distribuição das amostras na placa analisadora

No poço onde foi aplicada amostra inicial da colônia e diluições, inserir o nº da estirpe, apenas algarismos sem zeros à esquerda,

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Procedimento Operacional Padrão – POP

MT 14 – Cultivo para ensaio avulso com extração de proteínas

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	23/11/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definições

As **técnicas de inoculação e cultivo** utilizadas neste POP são essencialmente as mesmas adotadas no MT 12 – Cultivo para análise de Célula Intacta, sendo necessário modificar apenas o planejamento do ensaio quanto ao número de cultivos que serão preparados. A distribuição das amostras na placa analisadora após crescimento segue o disposto no MT 11 – Extração de proteínas e aplicação de amostras – e o respectivo formulário (RP 11).

As **condições de cultivo** não necessariamente precisam ser as mesmas padronizadas no MT 07 – Cultivo para 1ª análise espectrométrica e MT 08 – Cultivo para 2ª análise espectrométrica (meio LB sólido; pH 7,2 e temperatura de incubação de 28 °C). Contudo, deve-se alterar somente uma variável padrão por experimento. A alteração de várias variáveis concomitantemente dificulta a interpretação dos resultados.

Placas de cultivo não padronizadas, como descrito no MT 05 – Preparação das placas de cultivo, são placas de cultivo contendo meio sólido com uma composição alternativa, diferente do padrão (LB com 1,8% de ágar), ou que foram produzidas com pH diferente do padrão (7,2). Contudo, exceto por estas variáveis, as placas não padronizadas são confeccionadas como descrito no MT 05 e possuem registro no formulário RP 05.

O **tempo de crescimento**, deve ser suficiente para a obtenção de colônias com 2 a 3 mm de diâmetro, salvo estudos em que seja significativo alterar esta variável.

O **número de placas de Petri cultivadas por estirpe** deve ser calculado pela capacidade da placa analisadora, considerando a relação de 4 colônias isoladas por cultivo, 1 colônia por extrato e 1 extrato por poço, como estabelecido no MT 11. São necessários 4 poços para cada cultivo. Desta forma, uma placa analisadora de 96 poços comporta, no máximo, 24 cultivos: **24 cultivos/placa analisadora**.

A **origem das inóculos** pode ser outra que não as suspensões de trabalho padronizadas, assim como disposto para o MT 12: **i)** suspensões estoque de esporos da CBafes; **ii)** repiques de cultivos de terceiros; **iii)** cultivos analisados apenas por IC MALDI-TOF MS; **iv)** células de outras coleções e etc. Nesse aspecto, assim como para o MT 12, trata-se de um ensaio livre, porém realizado conforme as recomendações de manuseio de amostras biológicas e procedimentos básicos laboratoriais.

II. Objetivos

Os ensaios avulsos possuem a finalidade de investigar variáveis experimentais que possam melhorar a caracterização espectrométrica das estirpes. Estes compreendem: i) checar e validar métodos; ii) verificar a reprodutibilidade dos espectros em diferentes condições experimentais; iii) revelar variáveis interferentes; iv) explorar os limites da técnica; v) identificar contaminantes; vi) confrontar e harmonizar dados laboratoriais ou interlaboratoriais; vii) testar a eficácia da biblioteca na identificação de amostras de origens diversas e, viii) ampliar o conhecimento acerca das estirpes da CBafes.

III. Material

Na lista seguinte, os itens necessários para inocular mais de 10 µL de suspensão estoque estão marcados com um asterisco (*).

- ✓ Suspensões de trabalho de esporos ou cultivos para repique
- ✓ Placas de cultivo

 *Obrigatoriamente placas confeccionadas conforme procedimento MT 05.*

 *As placas devem ter sido aprovadas no CQM de bancada, conforme MT 05.*

 *Tenha **placas excedentes** na CSB para cobrir eventuais falhas de procedimento.*

- ✓ 1 estante para microtubos autoclavada
- ✓ 2 abridores de tubos eppendorf esterilizados
- ✓ Tiras de Parafilm M®
- ✓ 2 canetas de marcação permanente ponta fina (desinfetadas)
- ✓ 2 pinças anatômicas esterilizadas

- ✓ Alças de transferência estéreis (10 µL)
- ✓ Micropipeta P100*
- ✓ 1 caixa de ponteiros amarelos estéreis*
- ✓ Alças de Drigalski*
- ✓ 1 estante de apoio (esterilizada)
- ✓ Pulverizador de etanol 70 %
- ✓ 3 pares de luvas estéreis
- ✓ 1 lixeira de CSB (frasco de vidro autoclavado)
- ✓ Câmera fotográfica

IV. Procedimento

As estirpes devem ser inoculadas em meio sólido, com critérios semelhantes ao MT 12. Porém, cada placa de cultivo deve fornecer pelo menos 4 colônias isoladas para as análises.

! *Deve-se manter o parâmetro de 4 colônias isoladas por placa de Petri cultivada.*

A inoculação de amostras deve ser efetuada com alça de transferência (10 µL), empregando-se a técnica de inoculação por esgotamento, explicada detalhadamente no MT 07 – item I – figura 1, reproduzida neste documento.

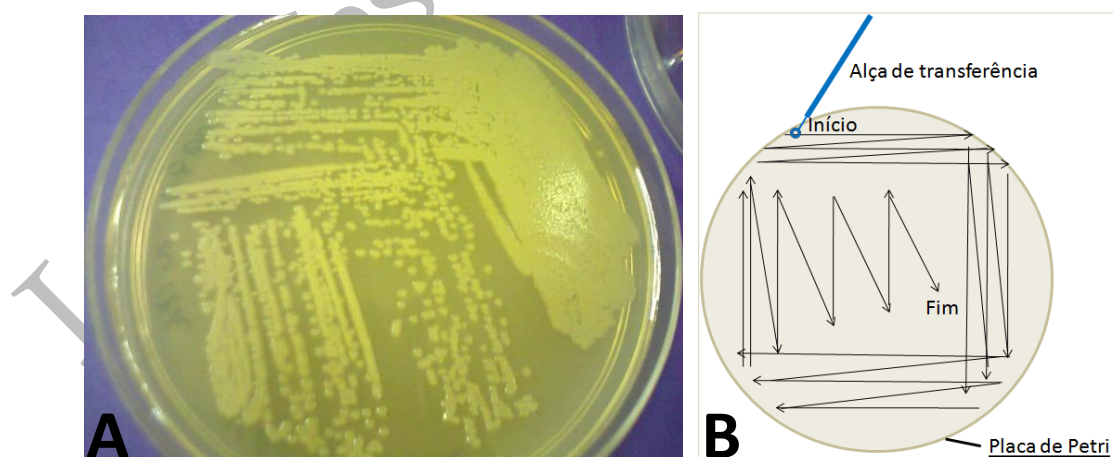


Figura 1: Técnica de inoculação, ou semeadura, por esgotamento. (A) Distribuição das colônias em placa de Petri com regiões de concentração variada e diversas colônias isoladas da estirpe SDF0044 com 32 horas de crescimento. Este padrão de distribuição foi obtido após inoculação por esgotamento com alça de transferência de 10 µL. **(B)** Esquema de diluição de amostra com alça de transferência mostrando o sentido do movimento. No início

tem-se a região de maior densidade celular onde não é possível a obtenção de colônias isoladas. Reproduzida do MT 07 – Cultivo para 1ª análise espectrométrica.

A diluição da carga microbiana pela técnica de inoculação por esgotamento permite o isolamento de colônias a partir de suspensões de esporos com concentração elevada, porém, para algumas suspensões de trabalho não se obtém crescimento nas condições padrão do ensaio. Nestes casos, como descrito no MT 07 (item IV), os cultivos devem ser repetidos utilizando-se a micropipeta para transferir um volume maior de inóculo, e alças de Drigalski para espalhamento do inóculo. Se ainda assim não for obtido sucesso para o número de colônias necessário em cada placa de Petri, os cultivos deverão ser repetidos, variando-se outros parâmetros na ordem sugerida abaixo:

- 1º. Proceder à ativação dos esporos, submetendo uma alíquota da suspensão de trabalho a um choque térmico (60 °C por 5 minutos) imediatamente antes da inoculação.
- 2º. Testar as condições de crescimento para diferentes temperaturas e características do meio de cultivo.

O histórico de crescimento das estirpes da CBafes fica registrado no RP 07, devendo-se aproveitar as informações contidas neste formulário para aperfeiçoar o ensaio atual.


As variáveis experimentais devem ser registradas no RP14, e os cultivos preparados neste ensaio avulso devem ser acompanhados até o momento da coleta de células para a extração (MT 11). As características coloniais durante o crescimento devem ser registradas no RP 14 (consultar item V).

1. Registrar a retirada das placas de Petri do estoque no respectivo RP 05 do lote, conforme orientação do MT 05.
2. Verificar as condições de temperatura e limpeza da estufa de crescimento.
3. Limpar a CSB e mesa de apoio conforme MT 01 – Utilização e manutenção de salas limpas.
4. Ligar o sistema de esterilização da CSB.
5. Ligar as luzes UV da CSB e sala e aguardar pelo menos 30 min.
6. Lavar as mãos.
7. Separar o material para procedimento estéril.
8. Desligar as lâmpadas UV da sala e CSB e depositar o material sobre a bancada de apoio.

9. Fazer a assepsia e antissepsia das mãos e antebraços.
10. Abrir as embalagens plásticas das placas de Petri, retirar as placas com cuidado para não abrir e depositar imediatamente na CSB, em posição de repouso.
11. Organizar o restante do material na CSB, exceto uma estante para microtubos.
12. Deixar o pulverizador de etanol 70% na bancada de apoio.
13. Acender as luzes UV da sala e CSB por mais 30 min.
14. Separar as suspensões de esporos e/ou cultivos para reisolamento de colônias.


 *Não introduzir amostras biológicas na sala ou CSB com a luz UV acesa!*

15. Organizar as suspensões de esporos na estante para microtubos.
16. Agitar as suspensões em vórtice e observar quanto à presença de turbidez (MT 06-B – CQM – Inspeção visual de amostras líquidas).


 *Havendo suspeita de contaminação, separar a amostra suspeita para realizar o MT 06-C (CQM – MCF para investigação de tipos morfológicos) ou descartar. Registrar a ocorrência em um formulário RP 06-B e anexar ao RP 14.*

 *Suspeita de contaminação em cultivos para reisolamento de colônias devem ser registradas diretamente no RP14.*

17. Apagar as luzes UV da sala e CSB e depositar as amostras na bancada de apoio.
18. Vestir um jaleco limpo e arregaçar as mangas.
19. Fazer a assepsia e antissepsia das mãos e antebraços.
20. Colocar as amostras no campo central da CSB.
21. Identificar as placas de cultivo na base com data, código da amostra ou origem, hora estimada de colocação na estufa, e nome do operador.
22. Ao identificar a placa, observar contra a luz, sem abrir, a presença de crescimento microbiano.

 *Havendo suspeita de contaminação, descartar a placa e inocular outra para reposição.*

23. Colocar a pilha de placas no campo central em posição de repouso.

 *Manter as placas sempre fechadas e em posição de repouso. Abrir apenas no momento de aplicar a amostra!*


 *Nunca executar movimentos sobre placas ou amostras abertas.*


24. Abrir a ponta do pacote de alças estéreis pelo lado dos cabos e colocar na estante de apoio.
25. Abrir o pacote de alças de Drigalski da mesma maneira.*

26. Retirar uma alça com cuidado para não tocar as partes externas da embalagem ou qualquer outro material.
27. Ou, ajustar a micropipeta para a quantidade apropriada de inóculo e encaixar a ponteira.*
28. Com auxílio do abridor, abrir o eppendorf da primeira amostra (ou placa para repique) e coletar uma gota de suspensão com a alça de transferência.

 *Para volume superior utilizar a pipeta.**

 *Seguir sempre as recomendações de manuseio de microtubos do MT 01.*

 *Se a ponta da alça de transferência, ou ponteira*, tocar algum objeto, luvas, jaleco ou piso da CSB, descartar.*


29. Fechar imediatamente o eppendorf.
30. Para reisolar uma colônia, abrir o cultivo, tocar levemente uma colônia isolada, fechar imediatamente e, se não for coletar nova colônia, distanciar o cultivo utilizado do campo central de trabalho.
 *Se a ponta da alça de transferência, ou da ponteira*, tocar algum objeto – luvas, jaleco ou piso da CSB – descartar e pegar uma nova.*

31. Abrir a respectiva placa de Petri estéril e transferir a amostra, empregando a técnica de inoculação por esgotamento (Figura 1, MT 07).

32. Ou, para volumes superiores, espalhar com a alça de Drigalski.*

33. Fechar a placa inoculada e segregar mais ao fundo do campo principal de trabalho, iniciando uma pilha de cultivos prontos.

34. Repetir o procedimento para as próximas amostras que serão inoculadas, sempre fechando o eppendorf (ou placa de Petri) imediatamente após a coleta.

 *Sempre conferir se a identificação das placas de Petri novas corresponde à estirpe que se está inoculando.*

35. Ao final, retirar as placas inoculadas da CSB e acomodar na estufa de crescimento, evitando empilhamentos.

36. Registrar o horário de incubação no RP 14.

37. Retornar à sala da CSB, recolher o material usado, limpar e organizar conforme procedimento MT 01.

38. Registrar este procedimento no formulário RP 14.

V. Acompanhamento e registro

Durante o crescimento, os cultivos devem ser acompanhados até o momento da coleta de células para a extração. As características coloniais, observadas a cada 12 horas, devem ser registradas no RP 14, sendo um formulário para cada estirpe. Os campos do formulário devem ser preenchidos conforme as orientações que se seguem.

- a. **Estirpe:** código da estirpe SDF completo. Por exemplo: SDF0041.
- b. **Objetivos do ensaio:** esclarecer sucintamente os objetivos da análise espectrométrica.
- c. **Tipo de amostra inoculada:** assinalar o tipo.
- d. **Origem do inóculo:**
 - **Suspensão de esporos:** registrar RP 04 e data do RP (Aliquotagem de suspensões estoque) ou, informar o nome do fornecedor da suspensão.
 - **Cultivo líquido:** informar nome do fornecedor.
 - **Cultivo sólido:** informar nome do fornecedor e idade do cultivo.
- e. **Tipo de placa de cultivo:** assinalar o tipo e registrar as informações pertinentes. Para placas não padronizadas, fazer referência ao protocolo adotado para a composição do meio e indicar data do RP 05.
- f. **Características coloniais durante crescimento:** registrar as características coloniais a cada 12 horas, até o momento da extração.
 - i. Registrar data da incubação (**Início**), dia da semana e horário de alocação na estufa de crescimento.
 - i. **Diâmetro colonial:** registrar a variação de tamanho em milímetros, por exemplo: 2 – 3 mm
 - ii. **Contagem de colônias:** este valor pode ser aproximado se o número de colônias exceder 50. Não contar acima de 100 e, por estimativa da contagem parcial, indicar $\cong 100$, > 100 , $\cong 300$ ou > 300 , no campo respectivo do formulário.
 - iii. **Confluência:** estimar um grau aproximado de confluência em relação à área da placa de Petri, usando as descrições a seguir:
 - **Não:** significa que todas ou quase todas as colônias se encontram isoladas.
 - **Total:** significa raras colônias isoladas, menos de 1%.
 - **50%:** aproximadamente metade da placa de Petri confluenta.

- **30%**: aproximadamente um terço da placa de Petri confluenta

iv. **Nº de colônias isoladas**: contar somente até 50. Se maior que 50, indicar **>50**.

v. **Suspeita de contaminação**: indicar sim ou não.

vi. **Fotografou os cultivos**: indicar sim ou não.

vii. **Temperatura da estufa**: deve ser observada e registrada a cada 12 horas.

VI. Fotodocumentação

Após retirada das colônias para análise, fotografar todos os cultivos e salvar em mídia digital identificada (DVD ou CD). A mídia contendo as imagens dos cultivos (DVD, CD ou HD externo) deve ser guardada na pasta *Registros de procedimentos* e os arquivos digitais transferidos para o banco de dados da CBafes (www.cbafes.unb.br).

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

Registro de Procedimento – RP

RP 14 – Cultivo para ensaio avulso com extração de proteínas

Responsável:	Data:
--------------	-------

Estirpe

Objetivos do ensaio:

Realizou o PP 06-B para a suspensão estoque? Sim Não

Suspeita de contaminação da amostra de origem? Sim Não

Tipo de amostra inoculada: <input type="checkbox"/> Suspensão de esporos <input type="checkbox"/> Cultivo sólido <input type="checkbox"/> Cultivo líquido
Origem do inóculo:
Número de placas inoculadas:

Tipo de placa de cultivo

<input type="checkbox"/> Padrão	Data do RP 05:
<input type="checkbox"/> Comercial	Tipo e fabricante:
<input type="checkbox"/> Não padronizada	Tipo de meio sólido:
	pH:
	Protocolo de referência:
	Data do RP 05:

Características coloniais durante crescimento

Início: _____/_____/_____		Dia da semana: _____			Horário: _____ h _____ min		
Tempo de incubação	Diâmetro colonial (mm)	Contagem de colônias	Confluência (não, total, 50%, 30%)	Nº de colônias isoladas (min/max)	Suspeita de contaminação? (sim/não)	Fotografou os cultivos?	Temperatura
12 h							
24 h							
36 h							
48 h (2 dias)							
60 h							
72 h (3 dias)							
84 h							

MT 15 – Aquisição dos espectros

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	02/11/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definições

O termo **aquisição dos espectros** é aqui utilizado para definir a sequência de operações que se inicia com o ajuste da placa analisadora contendo material biológico no compartimento do espectrômetro de massa até o registro das análises em mídia removível. Estas operações basicamente envolvem: i) adaptação da placa analisadora à porta de entrada do espectrômetro de massa Microflex™ (Bruker); ii) criar o projeto no programa FlexAnalysis™; iii) selecionar a região de interesse na placa analisadora; iv) adquirir os espectros; iv) transferir os espectros gerados para o programa MALDI Biotyper, selecionar a base de dados de microrganismos para comparação; v) salvar os arquivos de aquisição e identificação gerados pelo FlexAnalysis™ e *MALDI Biotyper* em mídia removível.

As análises espectrométricas são realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargem) sob supervisão do Dr Luciano Paulino da Silva. As únicas mídias regraváveis permitidas neste laboratório para a transferência de arquivos do computador principal (acoplado ao espectrômetro de massa) são CDs ou DVDs. Não é permitida a utilização de *pen drives* ou outro dispositivo eletrônico de armazenamento de dados. O **CD (ou DVD) utilizado para arquivamento dos dados** deve ser de uso exclusivo, acondicionado em estojo adequado e ambos, o estojo e o CD devem estar devidamente identificados.

II. Objetivos

Obtenção dos espectros iniciais e definitivos para as estirpes da Coleção Bafes. Organização dos arquivos gerados pelo programa *Flex-Analysis* e *Biotyper*.

III. Material

- ✓ Placa analisadora contendo amostras de extrato protéico ou células intactas.
- ✓ RP 11 referente às análises.

💡 *Referente ao MT 11 – Extração de proteínas e aplicação de amostras.*

- ✓ Ou RP 13 respectivo.

💡 *Referente ao MT 13 – Ensaio de Célula Intacta.*

- ✓ CD regravável.

💡 *Exclusivo para armazenamento das análises espectrométricas e devidamente identificado, por exemplo: CD 2 – Análises de MALDI-TOF MS 1/2014 – LaBafes, UnB/IB/CEL.*

- ✓ Espectrômetro de massa Microflex™.
- ✓ Programas FlexAnalysis™ e MALDI Biotyper (computador do espectrômetro de massa).
- ✓

IV. Procedimento

A. Acoplamento da placa analisadora e programação das análises

1. Retirar a placa analisadora da caixa de transporte segurando pelas bordas, evitando o contato direto com a superfície de deposição de amostras.

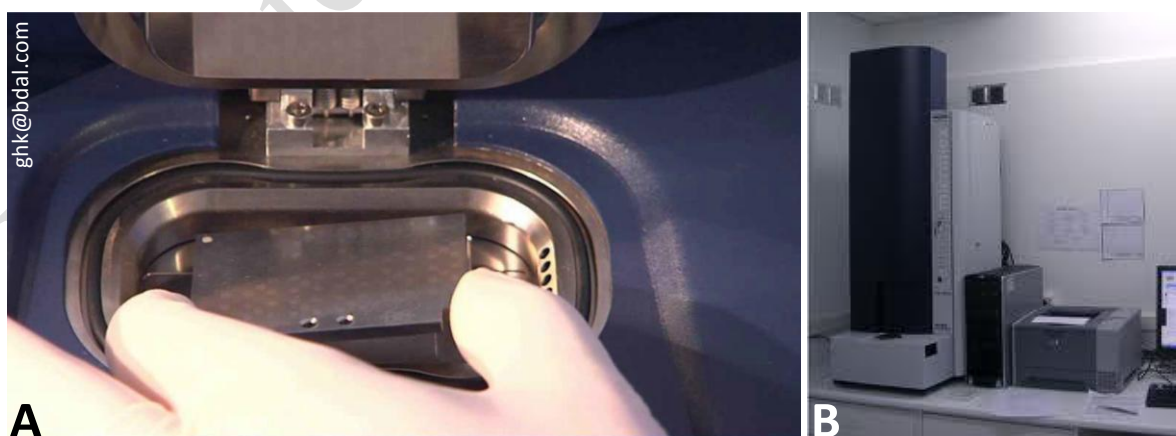



Figura 1. Espectrômetro de massa Bruker Micro-Flex e placa analisadora de 96 poços. A) Adaptação da placa analisadora ao compartimento de entrada do espectrômetro. **B)** Espectrômetro de massa Bruker MicroFlex AnalySys, do laboratório de espectrometria de massa da Embrapa Cenargem em série com computador (computador principal). Figura A: adaptada de KRUPPA, GARY. Microbial Identification for the 21st Century The MALDI Biotyper. Bruker Daltonics (2010). ghk@bdal.com

2. Encaixar a placa no compartimento de entrada do espectrômetro (Figura 1), fechar o compartimento e acionar o botão de partida, no corpo do equipamento.

B. Programação da análise

3. Abrir o programa *FlexAnalysis*TM e aguardar a indicação de pressão de vácuo estabilizada.
4. Programar a aquisição para o modo automático: a potência e o número de disparos do laser serão ajustados automaticamente.
5. Assinalar com o cursor a região da placa analisadora contendo amostras (conforme registro no RP 11 ou RP 13).
6. Selecionar a pasta *Usuários/Luciano/Marlene/nome do operador* para salvamento dos arquivos de aquisição dos espectros.
7. Nomear a subpasta, que receberá os arquivos de aquisição, com nome do operador e data da aquisição, no formato deste exemplo: Flavia09122014.
8. Ao final da análise espectrométrica, abrir os arquivos de aquisição no programa **MALDI Biotyper** e selecionar a mesma pasta para salvamento.
9. Selecionar todos os *taxa* disponíveis na plataforma de microrganismos e rodar o programa para reconhecimento das estirpes.
10. Salvar os resultados do *FlexAnalysis*TM e do *MALDI-Biotyper* no CD/DVD.
11. Retirar a placa analisadora do compartimento de entrada do equipamento e acondicionar na caixa de transporte.
12. Chegando ao LaBafes, limpar a placa analisadora com metanol e papel toalha, sem deixar fragmentos de papel e acondicionar a placa na caixa de transporte.
13. Guardar a placa analisadora no armário.
 *Nunca deixar a placa analisadora na bancada de trabalho, exceto quando estiver sendo utilizada.*
14. Transferir os dados do CD/DVD para o computador de trabalho o quanto antes e guardar o CD/DVD no armário.

V. Referências

KOSTRZEWA, MARKUS. Importance of QUALITY CONTROL when creating own LIBRARIES for identification of micro-organisms with MALDI-TOF MS. Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany (apresentação).

KRUPPA, GARY. Microbial Identification for the 21st Century The MALDI Biotyper. Bruker Daltonics (2010). ghk@bdal.com

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
Matrícula nº 13/0061191

Marlene Teixeira De-Souza
Orientadora

LaBafes - UnB/IB/CEL

MT 16 - Seleção e edição dos espectros de massa

Revisão Nº	Data	Emissor	Aprovação
00	28/10/2014	Flávia Porto Carreiro A. Bezerra	Marlene Teixeira De-Souza
01			

I. Definição

Edição dos espectros é a parte experimental que antecede a análise dos perfis de massa e corresponde basicamente à: i) extração dos arquivos *fid* gerados pelo programa *Flex-Analysis*; ii) geração de relatórios individuais - para cada espectro; iii) seleção dos espectros e cálculo do espectro médio e iv) tratamento das imagens para análise visual e apresentação. A edição dos espectros é efetuada com o programa *mMass* versão 5.5, desenvolvido por Martin Strohm e disponível para instalação no sítio www.mmass.org.

O CD/DVD contendo os arquivos gerados pelos programas *FlexAnalysis*TM e *MALDI Biotyper* será denominado doravante **CD de segurança**.

A primeira organização dos arquivos de aquisição dos espectros é efetuada no computador do espectrômetro de massa MicroflexTM do Cenargem. No momento da análise espectrométrica, após programar o equipamento para o modo de aquisição desejado, deve-se escolher o local de salvamento e nomear a pasta de alocação dos arquivos que serão gerados pelo *FlexAnalysis*TM com nome do operador e data (MT 15 - Aquisição dos espectros). Doravante, esta pasta, contendo os arquivos de aquisição, será denominada **pasta principal**.

Neste documento, a sigla **IC** (do inglês: *intact cells*) será utilizada para designar amostras de células intactas e **EP** para amostras de extrato proteico. **AS** (do inglês: *averaged*, e do latim: *spectra*) é a sigla utilizada pelo *mMass* para designar a **média dos espectros**.

II. Objetivos

Extrair e organizar os arquivos *fid* gerados pelo programa *Flex-Analysis* e *Biotyper*, que contêm os dados espectrométricos; efetuar a primeira edição dos espectros e análise visual da qualidade das aquisições para posterior estudo dos perfis de massa.

Selecionar os espectros que farão parte da biblioteca de perfis moleculares e avaliar possíveis ajustes na metodologia de preparação das amostras em prol da qualidade de aquisição dos espectros.

III. Material

- ✓ CD/DVD contendo os arquivos gerados pelos programas *FlexAnalysis*TM e *MALDI Biotyper*.
- ✓ RP 11 ou RP 13
 - 💡 *Os RPs contêm o esquema de distribuição das amostras na placa analisadora necessário para a coidentificação de poços e estirpes.*
- ✓ Computador de trabalho, configurado com sistema operacional compatível com o programa *mMass* versão 5.5 ou atualizada.
- ✓ Programa *mMass* versão 5.5

IV. Procedimento

A. Organização dos arquivos de aquisição e identificação

Os procedimentos a seguir foram executados em sistema operacional Windows 8 (Microsoft).

1. No computador de trabalho do LaBafes, inserir o CD segurança e transferir os arquivos novos para a respectiva pasta de trabalho (Figura 1).

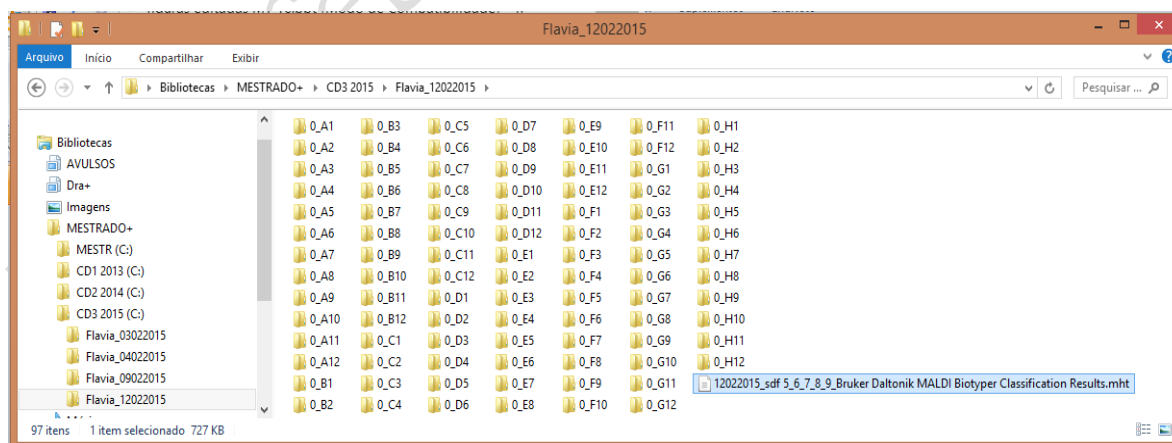


Figura 1. Janela do explorador de arquivos no computador de trabalho. A figura mostra a interface do *Windows explorer* contendo cópias dos CDs de segurança dos anos de 2013, 2014 e 2015. Os arquivos gerados pelos programas *FlexAnalysis*TM e *MALDI Biotyper* são armazenados nas pastas principais, identificadas com data e nome do operador. A pasta principal *Flavia_12022015* foi recém transferida para o computador de trabalho. Dentro, encontram-se os arquivos da última aquisição e o resultado do *MALDI Biotyper* para a

análise de identificação das estirpes contra o banco de dados. O arquivo do *MALDI Biotyper* foi renomeado, inserindo-se o código das estirpes analisadas na data (destacado em azul). Notar as subpastas identificadas com as coordenadas dos poços da placa analisadora que continham amostras. Será necessário consultar o RP 11 (ou RP 13) para reconhecer os arquivos referentes a cada estirpe.

2. Renomear as pastas do CD inserindo o código das estirpes que foram analisadas na data (Figura 2), assim como o arquivo gerado pelo *MALDI Biotyper* (Figura 1).

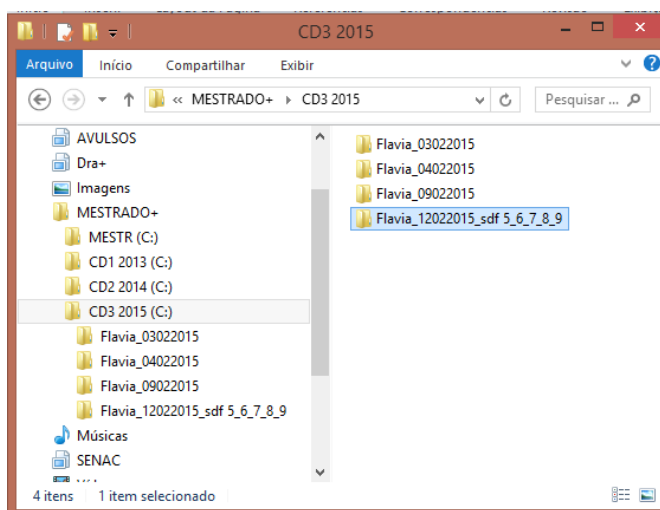


Figura 2. Subpastas contendo os arquivos de aquisição e análise do *MALDI Biotyper*. As pastas transferidas do CD devem ser renomeadas, acrescentando-se os códigos das estirpes analisadas. A pasta destacada em azul já foi renomeada.

3. Dentro da pasta principal (no exemplo: *Flavia_120215_sdf 5_6_7_8_9*), criar uma subpasta para cada estirpe (Figura 3) utilizando o mesmo padrão de identificação e espaçamento entre os caracteres para que fiquem ordenadas na janela, facilitando a localização dos arquivos. Estas subpastas serão referidas, doravante, como pastas de estirpe.

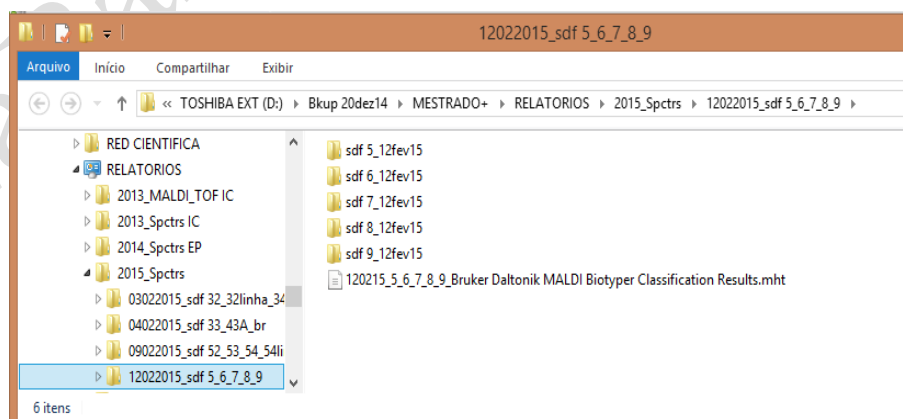


Figura 3. Reorganização da pasta principal. Foram criadas subpastas nomeadas com código das estirpes (pastas de estirpe). Os arquivos de aquisição identificados por coordenadas de poços foram transferidos para as respectivas pastas de estirpe. Uma cópia do arquivo gerado pelo Biotyper foi colada em cada subpasta de estirpe.

4. Consultar a distribuição das amostras no respectivo RP 11 (ou RP 13) – no exemplo, RP 11 de 12fev15 – e transferir as pastas nomeadas por coordenadas de poços para as respectivas pastas de estipe.
5. Copiar e colar o arquivo gerado pelo MALDI Biotyper em cada subpasta de estirpe (Figura 3).
6. Criar um diretório independente que servirá para fundamentar relatórios de análises. Nomear o diretório independente como **SDFs Espcs**.
7. Copiar as pastas de estirpes para **SDFs Espcs** (Figura 4 e 5).

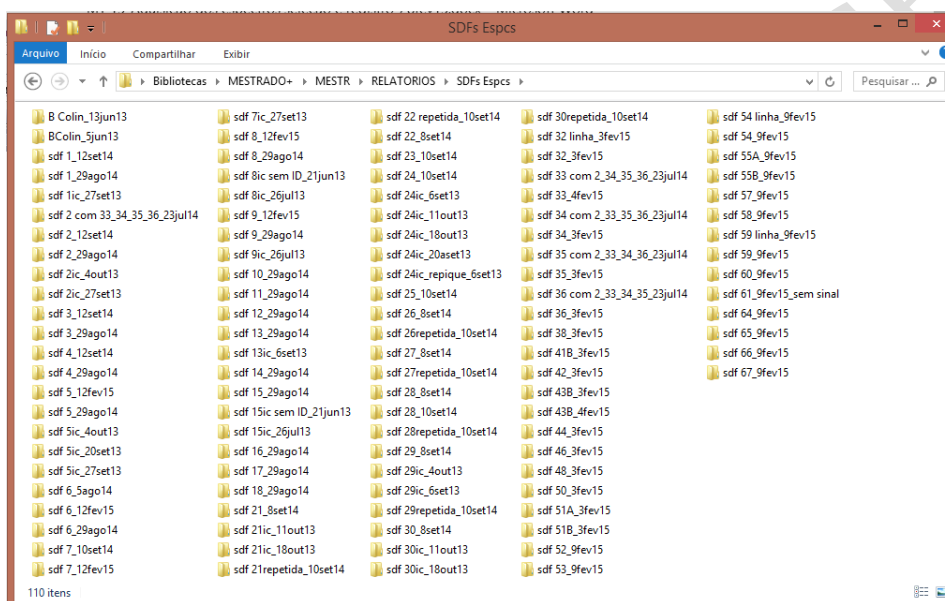


Figura 4. Diretório SDFs Espcs contendo todos os arquivos de aquisição organizados em pastas de estirpe. Obedecendo-se um padrão de identificação, as pastas aparecem ordenadas por código da estipe facilitando a visualização dos arquivos. O incide *ic* significa que os espectros foram adquiridos por análise de IC MALDI–TOF MS.

8. A *SDFs Espcs* será a pasta de trabalho para edição dos espectros no programa *mMass*.

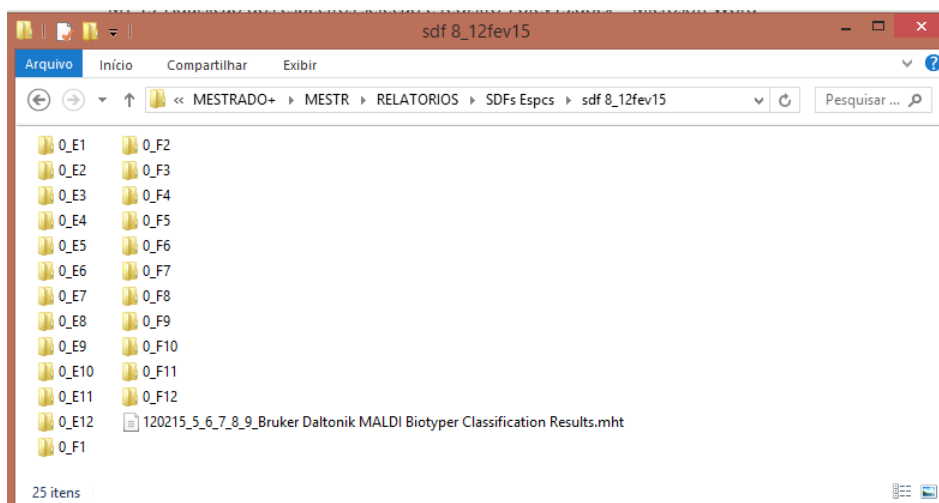


Figura 5. Pasta da estirpe SDF008 alocada no diretório SDFs Especs. A pasta contém os arquivos de aquisição adquiridos no dia 12 de fevereiro de 2015.

9. Se for necessário gerar relatórios a partir do programa *mMass*, para cada espectro adquirido, as pastas **1Slin** - que são subpastas dos poços: *0_A1*, *0_A2*, ... *0_G9*, etc. - deverão ser nomeadas com os códigos das respectivas estirpes (Figura 6).

 *Renomear as pastas 1Slin somente se for necessário gerar relatórios individuais ou imagens identificadas para cada espectro adquirido.*

10. Abrir a pasta da estirpe - no exemplo: *sdf_8_12fev15* - e expandir até a subpasta **1**. Renomear a **1Slin** com o código da estirpe (Figura 6).

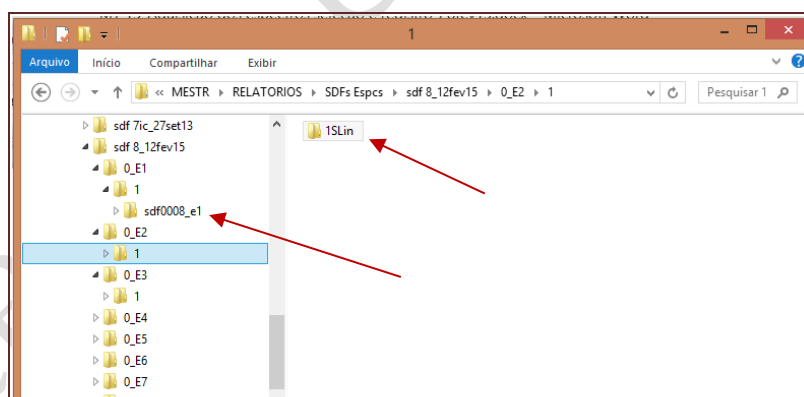


Figura 6. Subpastas 1Slin renomeadas com código da estirpe. As setas mostram uma pasta recém nomeada (esquerda) e a próxima que será nomeada (direita). Este procedimento é necessário para posterior identificação do arquivo de imagem/relatório gerado pelo programa *mMass*.

B. Abertura dos arquivos *fid*

11. Abrir o programa *mMass* ao lado da janela do explorador de arquivos.
12. Arrastar os arquivos ***fid*** que se encontram dentro cada pasta **1Slin** para a janela do *mMass* (Figura 7).

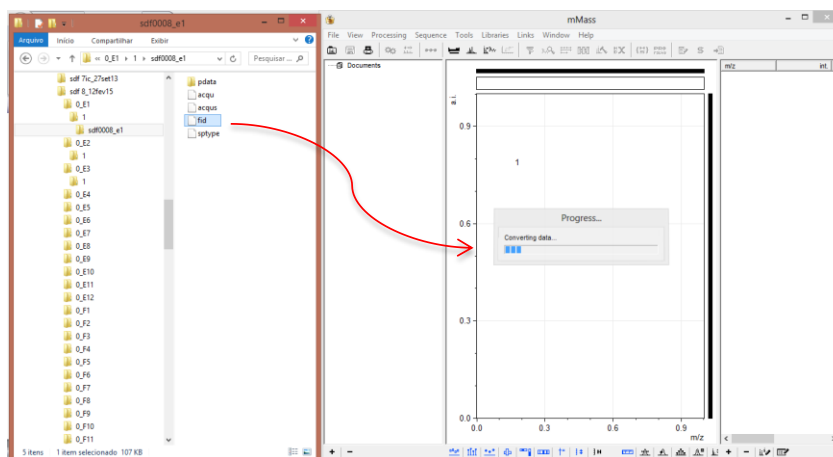


Figura 7. Abertura do arquivo *fid* no mMass. Arrastar o arquivo *fid* para a janela do programa mMass (seta vermelha) e aguardar até que o espectro apareça na tela antes de abrir novo arquivo *fid*.

13. O código da estirpe conforme designado para a pasta *1Slin*, aparecerá no painel *Documents* (Figura 8). Todos os relatórios e imagens gerados a partir do mMass, para o espectro, aparecerão identificados com este código.

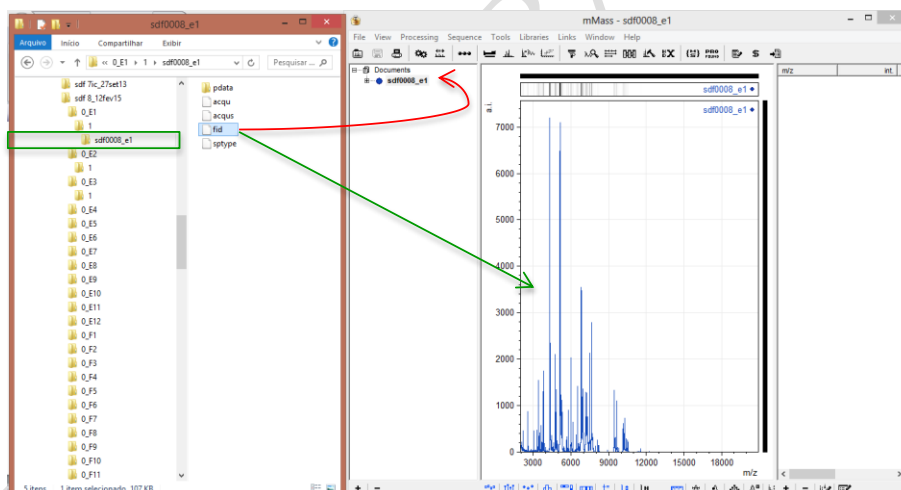


Figura 8. Abertura do arquivo *fid* da pasta *1Slin*. A pasta *1Slin* na janela do Explorer aparece renomeada com o código da estirpe que estava depositada no poço E1 da placa analisadora: sdf0008_e1 (destacado em verde). O arquivo *fid* (destacado em azul) contém o espectro que aparece na janela do mMass (seta verde). O código da estirpe aparece na coluna *Documents* (seta vermelha) com um marcador colorido da cor do espectro respectivo. Se desejado, essas cores podem ser alteradas clicando com o botão esquerdo sobre o marcador.

14. Após transferência de todos os arquivos *fid*, os espectros aparecerão sobrepostos em cores variadas e os códigos de estirpe aparecerão listados na coluna *Documents* (Figura 8).
15. Os resultados da primeira análise espectrométrica da estirpe sdf0001, realizada em 29/08/2014, conforme o procedimento MT 07 – Cultivo para 1ª análise

espectrométrica, serão utilizados como exemplo para a edição inicial dos arquivos (Figura 8).

💡 *Observar que o MT 07 orienta a coleta de 4 colônias por placa de cultivo e a inoculação de apenas um cultivo por estirpe.*

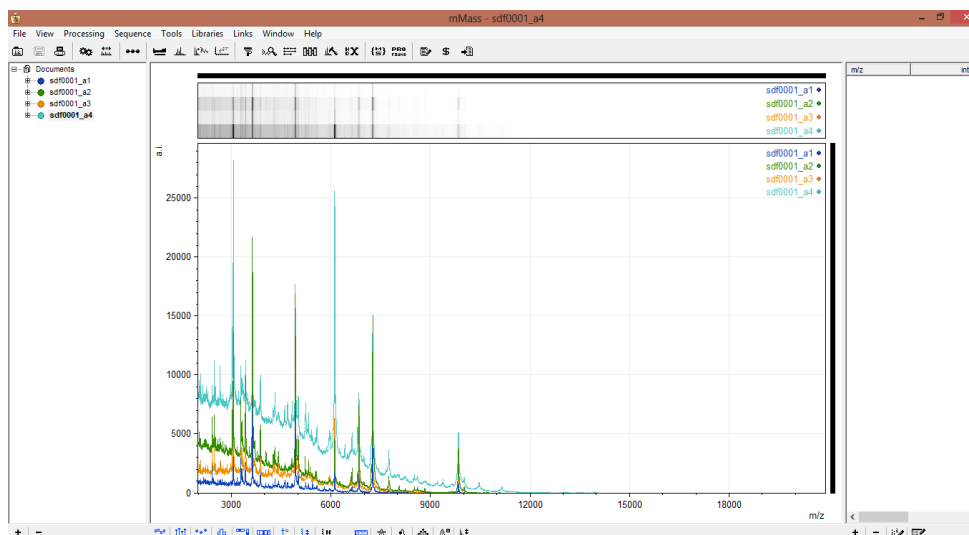


Figura 8. Espectros de massa de EP adquiridos por MALDI-TOF MS para a estirpe sdf0001 em 29 de agosto de 2014. O extrato protéico de cada uma das 4 colônias foi aplicado nos poços A1, A2, A3 e A4 da placa analisadora e a análise foi realizada no modo de aquisição automático do espectrômetro de massa Bruker MicroFlex. A figura mostra os espectros em sobreposição em cores variadas.

B. Processamento

16. Após a abertura de todos os arquivos **fid** de interesse, fechar o explorador de arquivos e ampliar a janela do *mMass*.
17. No menu principal do *mMass*, clicar em **View** → **Normalize intensity**.
18. Abrir cada espectro individualmente e verificar o nível de elevação da linha de base.
19. Clicando no marcador à esquerda do nome do arquivo, desmarcar os espectros que apresentarem elevação da linha de base igual ou acima de 30% da intensidade relativa. Estes espectros serão excluídos do cálculo do espectro médio (AS).
20. No menu principal, clicar em **Processing** → **Math operations** → **Average all visible**, para gerar um espectro médio como novo arquivo (Figura 9). Todas as outras opções da caixa de diálogo aparecerão desmarcadas. Clicar em **Apply** (Figura 9).

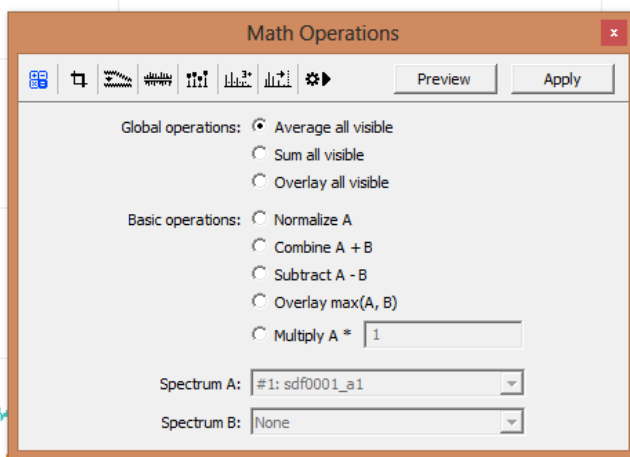


Figura 9. Gerando um espectro médio. O espectro médio será calculado a partir dos espectros que estiverem visíveis quando clicar em **Apply** com a caixa de seleção *Average all visible* selecionada.

21. O arquivo gerado, **Averaged spectra**, aparecerá ao final da lista no campo *Documents*.
22. Assinalar o primeiro arquivo da lista em *Documents*, que no exemplo da figura 8 será o sdf0001_a1.
23. No menu principal clicar em **File** → **Document info** e preencher as informações sobre a amostra: **Title** (*sdf0001_a1*), **Operator**, **Institution** (*UnB*), **Instrument** (*Bruker MicroFlex Analysis*) e **Date** (Figura 10).
24. Automaticamente o programa informará a data atual e localização do arquivo original no computador de trabalho. Substituir a data automática pela data de aquisição dos espectros, neste formato: **29ago2014** (Figura 10).

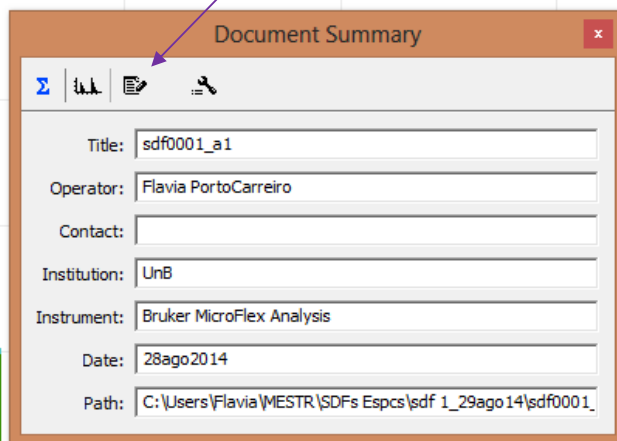


Figura 10. Preenchendo informações sobre o arquivo fid. A seta aponta para o ícone da função *Analysis notes*. Observe que automaticamente o programa informa a data atual e localização do arquivo original no computador. A data deve ser substituída pela data de aquisição e a localização do arquivo poderá ser escolhida durante o salvamento.

25. Na mesma caixa de diálogo (Figura 10), clicar no ícone **Analysis notes** e preencher o campo aberto com as informações retiradas do RP 11 ou RP 13, sendo **tc**, o tempo de crescimento (incubação) até o momento da coleta, **D**, o diâmetro aproximado das colônias coletadas e **Boa, Ruim** ou **Média**, a qualidade da dissolução obtida para os reagentes (Figura 11). O formato adotado para registro das informações deve ser padronizado nos formatos apresentados abaixo.

a. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS para ensaio com EP:

- tc = horas
- D = mm
- Tempo até aplicação do extrato = horas
- Dissolução em água = Boa, Média ou Ruim
- Dissolução em AcN = Boa, Média ou Ruim
- Dissolução em AF = Boa, Média ou Ruim
- Cultivos = número
- Origem = RP 11 – data

b. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS para CI:

- tc = horas
- D = mm (indicar se material foi retirado das bordas ou mais de 1col/extrato)
- Cultivos = número de cultivos
- Origem = RP 13 – data ou indicar origem

26. Copiar estas informações (Figura 11) para a área de transferência para colar nas próximas notas de análise, pois serão as mesmas para todos os arquivos em processamento.

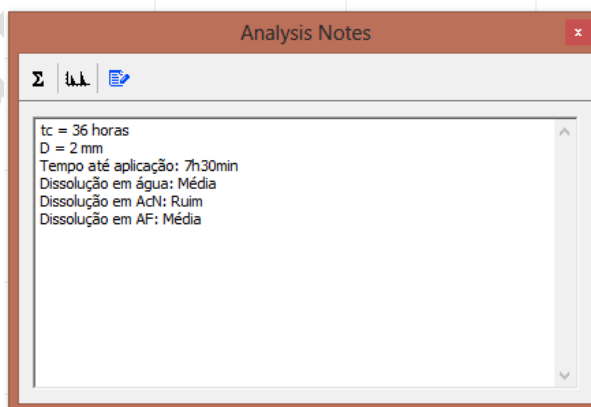


Figura 11. Preenchimento do campo *Analysis note*. As condições experimentais foram transferidas do formulário RP 11 de 28 de agosto de 2014. As mesmas informações serão repetidas para os outros arquivos da mesma estirpe.

27. Clicar no ícone Σ → **Operator presets** → **Save as presets**, escrever SDFs e clicar em **Save**.

💡 As predefinições de arquivo salvas só ficam disponíveis enquanto o mMass estiver em uso. Ao fechar o programa as predefinições serão perdidas.

💡 As definições do arquivo em *Document summary* e *Analysis notes* permanecem após salvamento e constarão no relatório de análise que será gerado posteriormente.

28. Fechar a caixa de diálogo e repetir a operação para os outros espectros adquiridos e também para o espectro médio gerado (Figura 12) conforme próximo item.

💡 Aproveitar as predefinições de arquivo salvas clicando no ícone **Operator presets** → **SDFs**. A tabela será preenchida automaticamente exceto a data, que deve ser substituída (item 24).

29. Para o espectro médio, na caixa **Document summary**, acrescentar o código da estirpe ao nome, no formato do exemplo: *Averaged Spectra sdf0001_29ago1*.

30. Na mesma janela, clicar no ícone **Analysis notes**. O campo aparecerá semi preenchido, indicando que este é um espectro médio calculado a partir dos espectros discriminados na lista em **Documents**.

31. Copiar e colar as mesmas informações experimentais contidas nos arquivos individuais (Figura 11), salvar as predefinições da mesma forma anteriormente feita para os outros arquivos e fechar a caixa de diálogo.

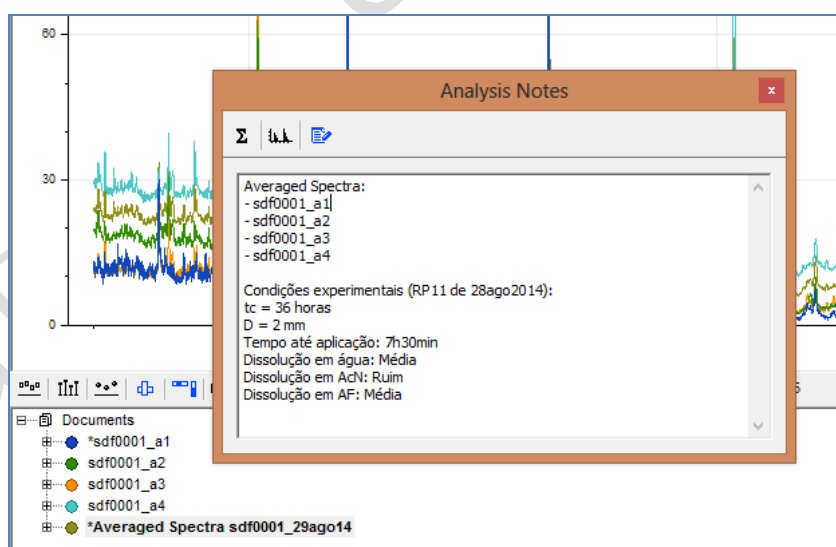


Figura 12. Editando informações sobre o documento *Averaged Spectra sdf0001_29ago14*. As informações sobre condições experimentais devem ser copiadas para área de transferência do windows e coladas em cada documento. Ao fundo da janela *Analysis Notes* aparece a janela principal do programa podendo-se visualizar os espectros em edição.

C. Edição da lista de picos

A lista de picos deve ser editada para visualização rápida dos parâmetros que serão analisados durante o estudo dos espectros (próximo POP). Nenhuma seleção de picos deve ser realizada neste momento.

32. Na janela principal do *mMass*, no painel **Peaklist panel**, clicar com o botão de atalho sobre algum título de coluna. Marcar as caixas de seleção: ***m/z***, ***Intensity***, ***Rel. intensity***, ***s/n***, ***Charge*** e ***Resolution***, desmarcando as outras.

D. Seleção da faixa de aquisição

A faixa de aquisição dos valores *m/z* de espectros adquiridos de EP frequentemente se apresenta com valores máximos entre 12 e 18.000 Da. Os espectros adquiridos por IC MALDI-TOF MS apresentam uma faixa de aquisição expandida e mais variável, porém abaixo de 20.000 Da. Durante o estudo dos espectros que será realizado posteriormente (MT 17 – Análise dos perfis de massa) será necessário estabelecer comparações entre as análises, portanto, os espectros devem ser cortados dentro de determinada faixa de interesse, especificamente entre 2 e 20.000 Da.

33. No menu principal, clicar em **Processing** → **Bath processing**;
34. Clicar no segundo ícone do menu superior – **Crop data**, preencher 2.000 em **Low mass** e 20.000 em **High mass**.
35. Na mesma janela, clicar no 5º ícone do menu superior – **Peak picking**.
36. Escrever 0,0 em **S/N threshold** e **Abs. intensity threshold**.
37. Colocar 0,5 em **Rel. intensity threshold**;
38. Marcar 100% em **Picking height** e desmarcar as outras caixas de seleção.
39. Ainda na mesma janela, clicar no 8º ícone (**Batch processing**) e selecionar todos os documentos, marcando o primeiro e segurando a tecla **shift + seta pra baixo**.
40. Assinalar os itens **Crop** e **Peak picking**, anteriormente configurados, e clicar em **Apply** (Figura 13).

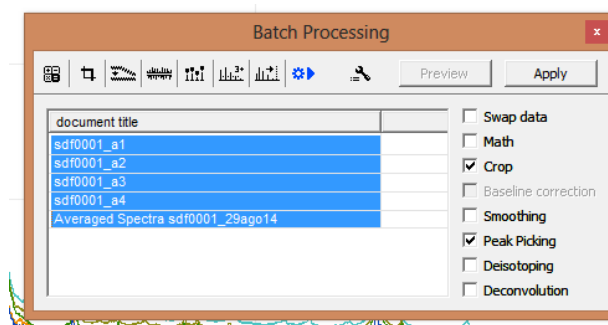


Figura 13. Janela de processamento em grupo (*Batch processing*). A figura mostra os títulos dos documentos selecionados e a seleção dos passos de processamento que serão aplicados, no caso, *Crop* e *Peak Picking*, anteriormente configurados.

41. Fechar a janela ***Batch processing***. Os espectros aparecerão estendidos e a lista de picos do arquivo que estiver em destaque aparecerá na janela lateral (Figura 14).

💡 Após salvamento dos arquivos, esta operação não poderá ser revertida, porém o programa gera novos arquivos, preservando os originais das pastas de estirpe.

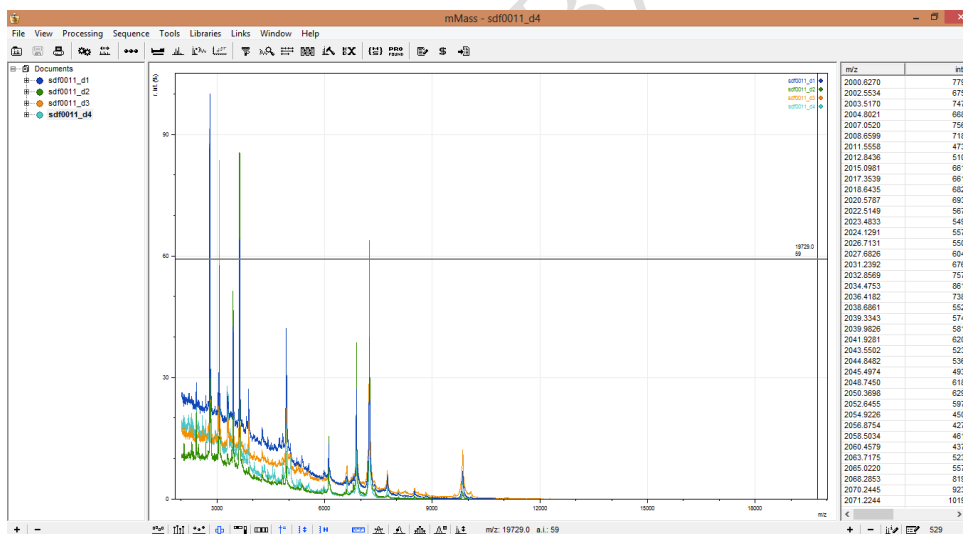


Figura 14. Faixa de aquisição selecionada. Os espectros em evidência foram cortados entre 2 e 20 kDa para análise posterior (MT 17). A lista automática de picos, ao lado direito, corresponde ao arquivo em destaque na lista *Documents* – *sdf0011_d4*.

D. Edição das imagens

42. No menu principal, clicar em ***Window*** → ***Wide spectrum***.
43. Clicar em ***View*** → ***Normalize intensity***.
44. Clicar em ***View*** → ***Spectrum canvas*** e selecionar a opção ***Legend***.
45. Clicar em ***View*** → ***Spectrum canvas*** → desmarcar ***Gel view***.

46. Clicar de novo em **View** → **Canvas properties** e, na régua do item **Canvas font size**, ajustar para um valor intermediário entre 5 e 7.
47. Na mesma janela ajustar **Label font size** para 5,5. Ajustar **m/z precision** para uma casa decimal.
48. No menu principal, clicar em **File** → **Save all** e salvar o primeiro arquivo na respectiva pasta da estirpe, no exemplo, *sdf 1_29ago14*. O programa irá fechar a janela e abrir imediatamente outra para salvar o próximo arquivo, sugerindo a mesma pasta escolhida inicialmente para todos.

E. Relatórios de análise

Relatórios de análise podem ser gerados no *mMass* para um espectro por vez, porém, todos os espectros visíveis na janela do *mMass* aparecerão sobrepostos no relatório. O primeiro relatório de análise deve mostrar a sobreposição dos espectros (Figura 15A) e o AS calculado. O segundo relatório deve mostrar o espectro médio com ou sem picos principais, ocultando os espectros constituintes (Figura 15B). Relatórios individuais de cada espectro constituinte podem ser gerados a critério do operador, mas não se fazem necessários como registro documental.

49. Para gerar o 1º relatório do espectro médio mostrando a sobreposição dos espectros constituintes (Figura 15A), marcar o arquivo AS, no campo *Documents*, clicando sobre o nome do arquivo sem desmarcar os outros espectros e prosseguir com o item 53.
50. Para gerar o 2º relatório de espectro médio isolado (Figura 15B), ocultando os espectros constituintes, desmarcar os outros arquivos segurando a tecla **Ctrl** enquanto seleciona o arquivo AS. Todos os outros arquivos aparecerão esmaecidos. Prosseguir com o item 53.
51. Para gerar relatórios individuais, clicar no marcador colorido à frente do arquivo no campo *Documents*, segurando a tecla **Ctrl**. Todos os outros arquivos aparecerão esmaecidos. Prosseguir com o item 53.
52. Clicar em **View** → **Spectrum canvas**, e desmarcar os itens **Gel view**, **Gel view legend**.
53. Na mesma caixa de diálogo, marcar o item **Legend**.
54. Clicar em **File** → **Analysis report**. O relatório será aberto no navegador principal do computador de trabalho em formato HTML (Figura 15).
55. Salvar os arquivos HTML como PDF na pasta da estirpe.

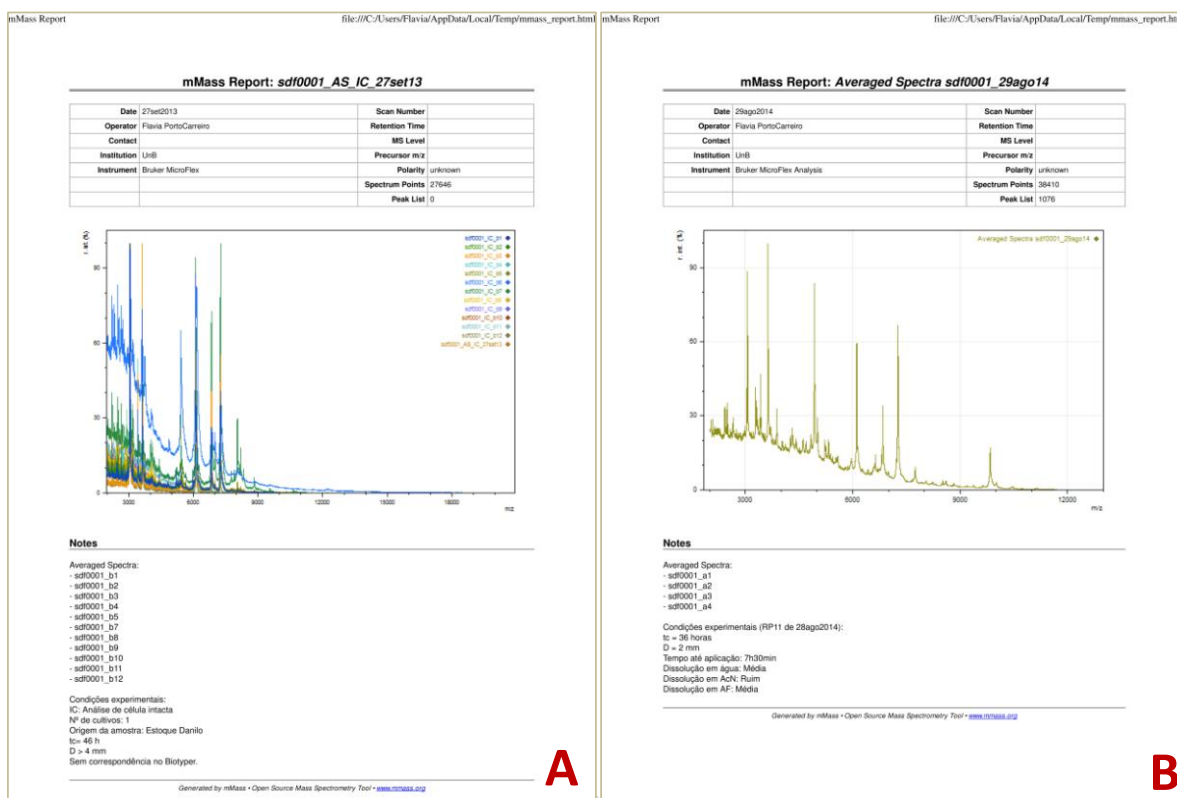


Figura 15. Relatórios de análise. Os relatórios são gerados pelo mMass em formato HTML e abertos automaticamente no navegador web principal. **A)** Primeiro relatório do espectro médio mostrando a sobreposição dos espectros constituintes. Observar que a faixa de aquisição não foi cortada. Todos os espectros adquiridos na data aparecem legendados com cores diferentes e sobrepostos na imagem, porém, somente os espectros designados no campo *Notes – Averaged spectra* foram incluídos no cálculo de AS. Este relatório corresponde a uma análise de IC MALDI–TOF MS, como informado no campo *Notes – Condições experimentais*. **B)** Segundo relatório do espectro médio isolado. Análise de EP referente ao RP 11 de 28/ago/2014.

V. Referências

STROHALM, MARTIN. mMass 5.5.0 – User’s guide. ©MS 2005 – 2013.

Flávia Porto Carreiro A. Bezerra
 Matrícula nº 13/0061191

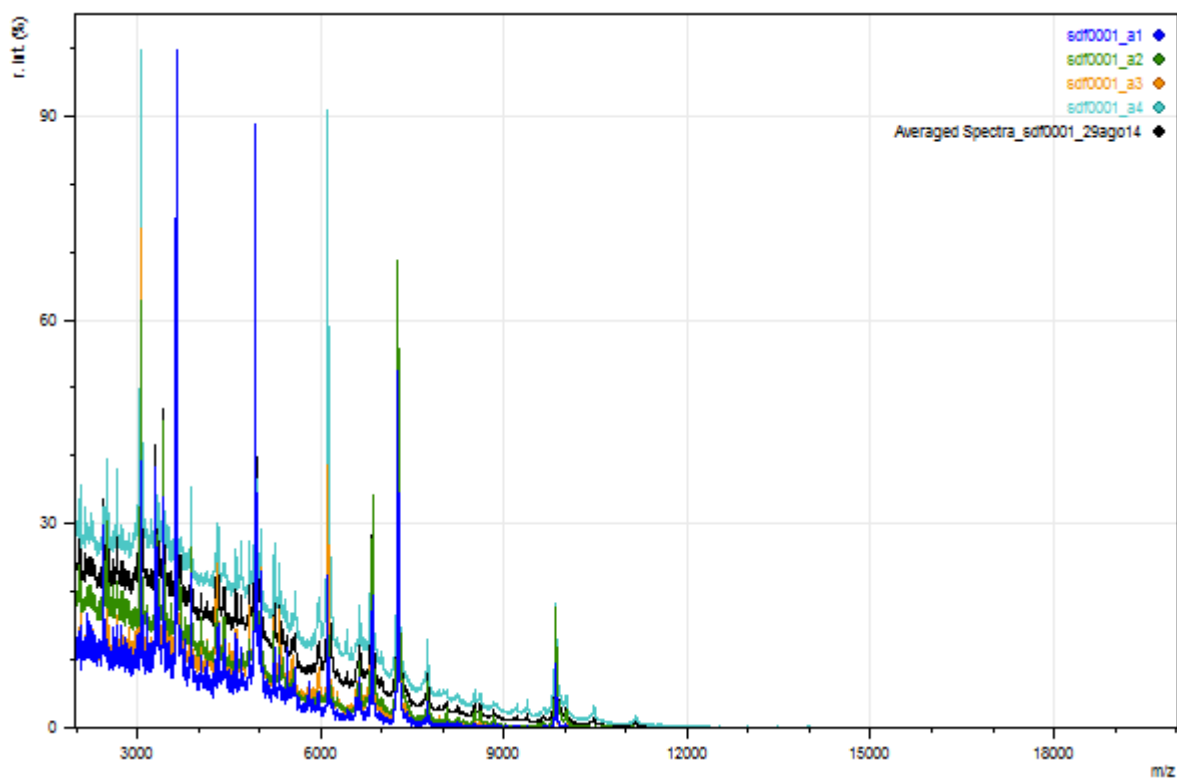
Marlene Teixeira De–Souza
 Orientadora

Parte II

Relatórios de análise da espectrometria de massa MALDI-TOF

mMass Report: sdf0001_a1

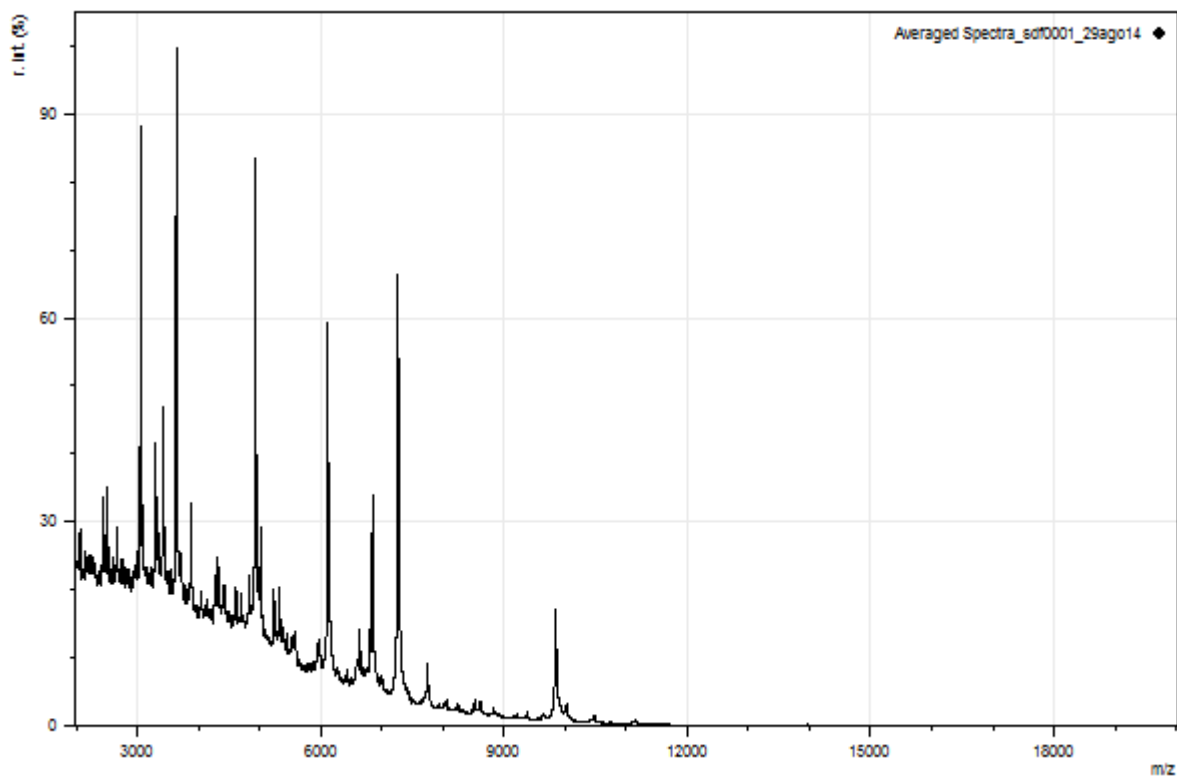
Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	0.0
Contact		MS Level	1
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	positive
		Spectrum Points	26783
		Peak List	425



Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0001_29ago14

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	166

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0001_a1
- sdf0001_a2
- sdf0001_a3
- sdf0001_a4

Condições experimentais

tc = 36 horas

D = 2 mm

Ponto de interrupção = etanol

Tempo de extração = 7h30min

Dissolução em água = Ruim

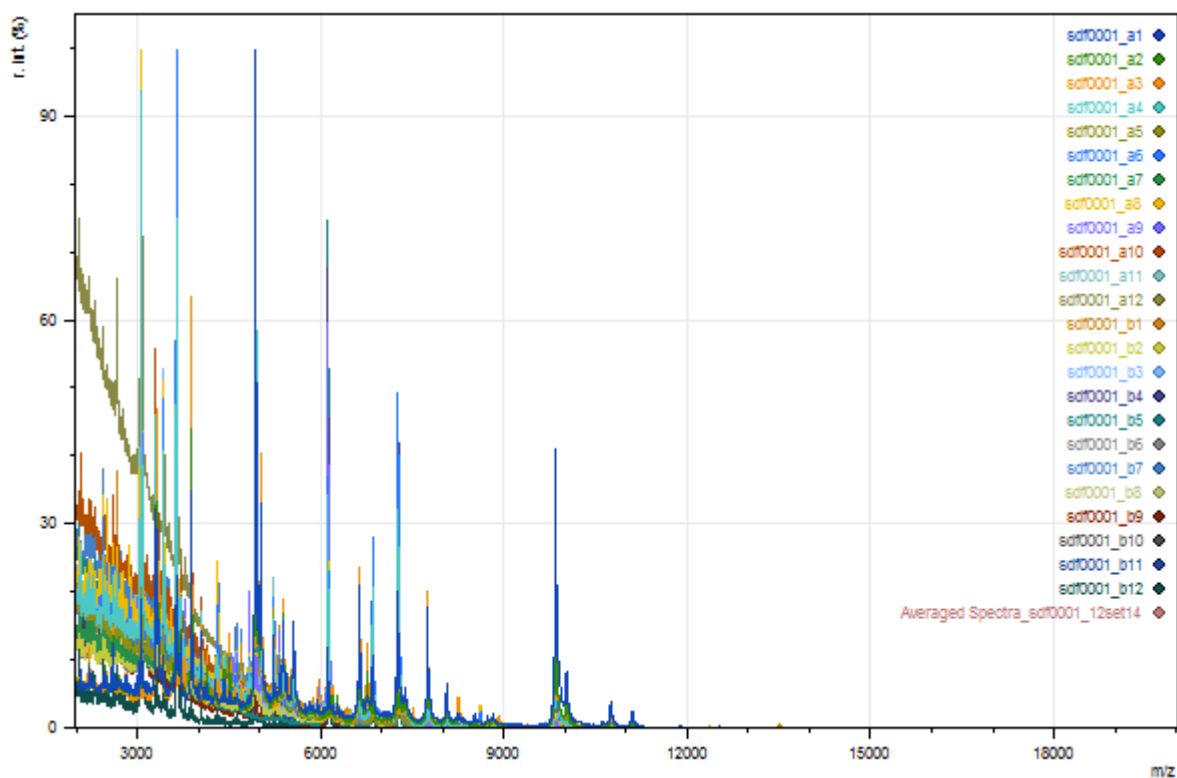
Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Ruim

Origem = RP11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0001_12set14

Date	12set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	96

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0001_a1
- sdf0001_a2
- sdf0001_a3
- sdf0001_a4
- sdf0001_a5
- sdf0001_a6
- sdf0001_a7
- sdf0001_a8
- sdf0001_a9
- sdf0001_a11
- sdf0001_b1
- sdf0001_b2
- sdf0001_b3
- sdf0001_b4
- sdf0001_b5
- sdf0001_b6
- sdf0001_b7
- sdf0001_b8
- sdf0001_b9
- sdf0001_b10
- sdf0001_b11
- sdf0001_b12

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = s/registro

Tempo até aplicação: 10h

Dissolução em água: sem registro

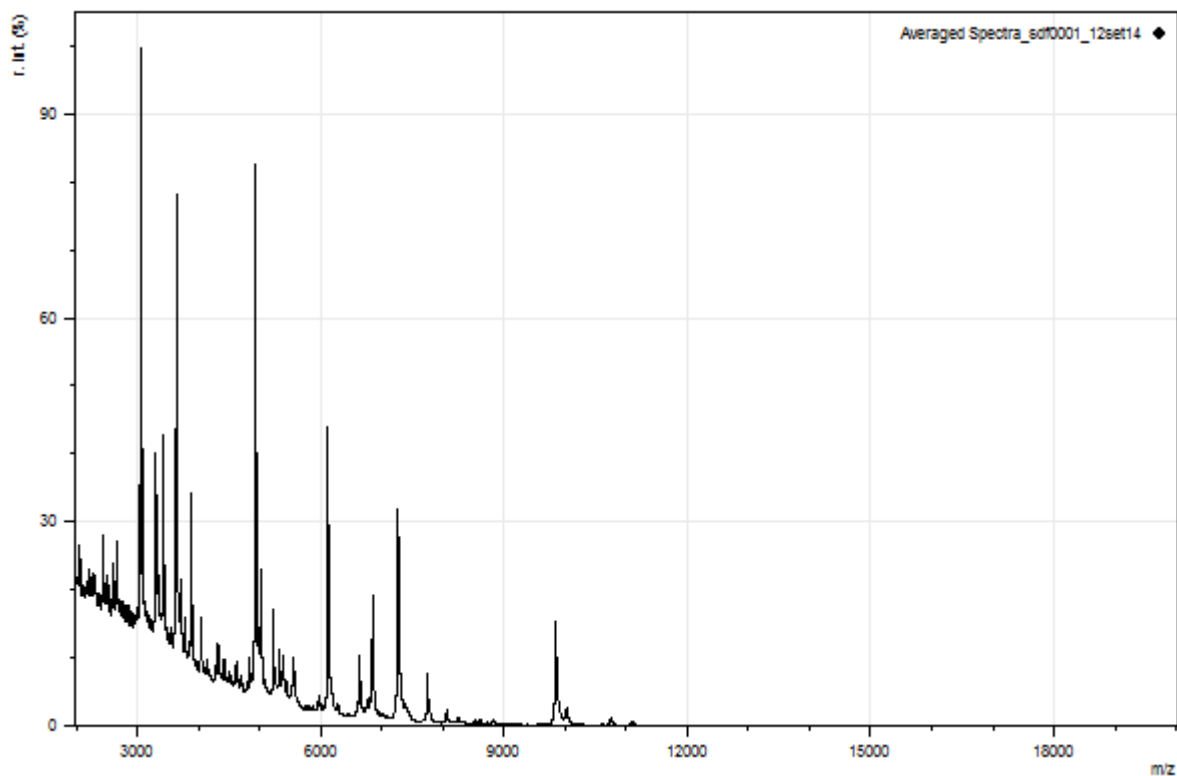
Dissolução em AcN: Boa

Dissolução em AF: Boa

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0001_12set14

Date	12set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	96

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0001_a1
- sdf0001_a2
- sdf0001_a3
- sdf0001_a4
- sdf0001_a5
- sdf0001_a6
- sdf0001_a7
- sdf0001_a8
- sdf0001_a9
- sdf0001_a11
- sdf0001_b1
- sdf0001_b2
- sdf0001_b3
- sdf0001_b4
- sdf0001_b5
- sdf0001_b6
- sdf0001_b7
- sdf0001_b8
- sdf0001_b9
- sdf0001_b10
- sdf0001_b11
- sdf0001_b12

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = s/registro

Tempo até aplicação: 10h

Dissolução em água: sem registro

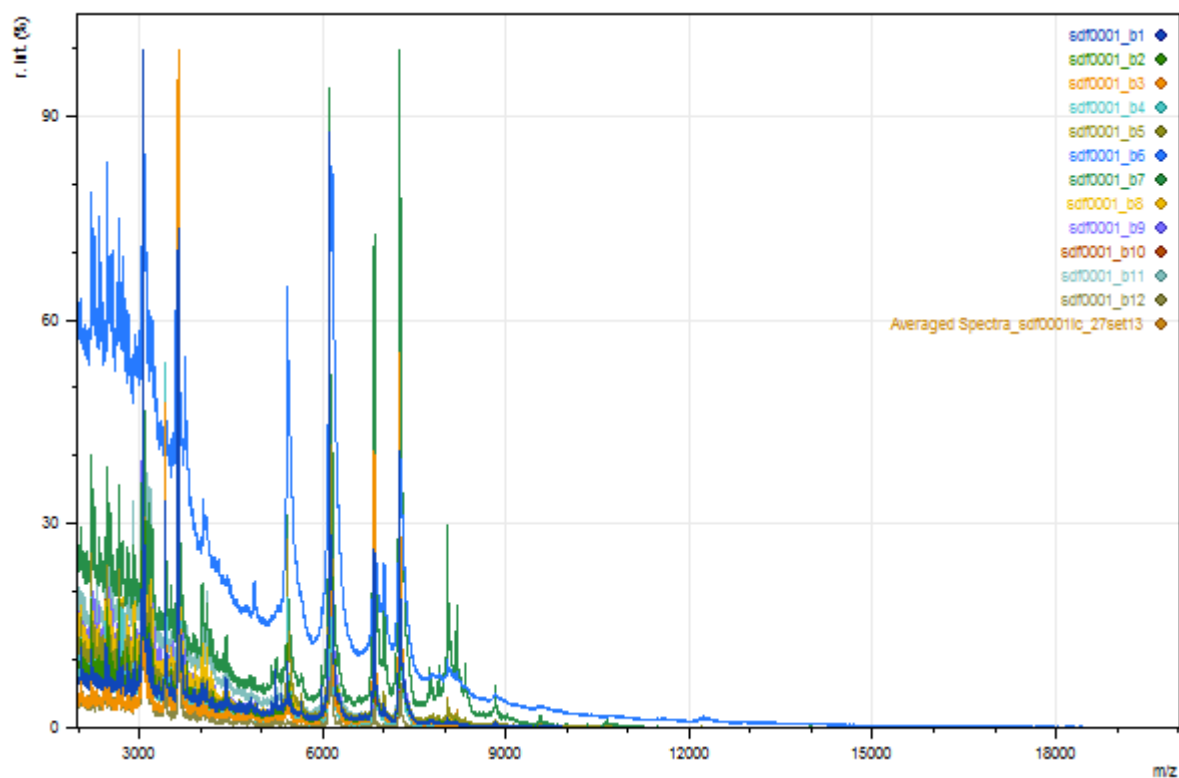
Dissolução em AcN: Boa

Dissolução em AF: Boa

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0001ic_27set13

Date	27set2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	91

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0001_b1
- sdf0001_b2
- sdf0001_b3
- sdf0001_b4
- sdf0001_b5
- sdf0001_b7
- sdf0001_b8
- sdf0001_b9
- sdf0001_b10
- sdf0001_b11
- sdf0001_b12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 46 horas

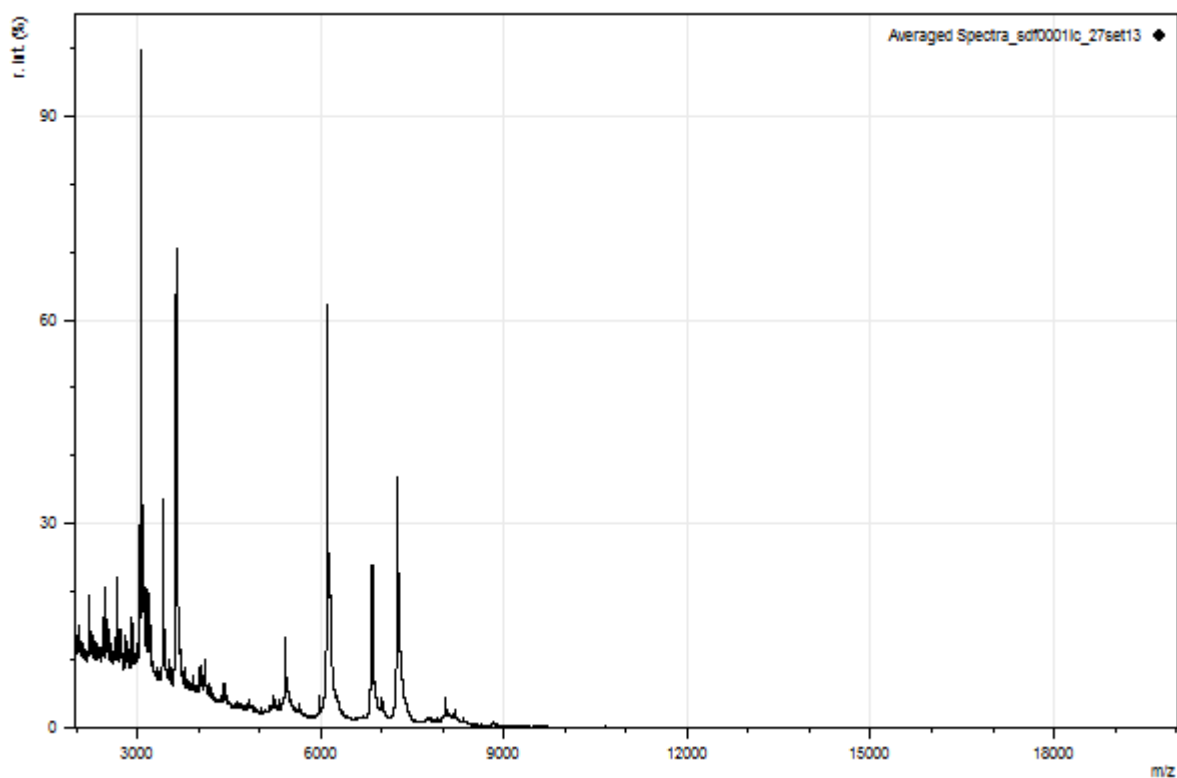
D > 4 mm (bordas)

Cultivos = 1

Origem = estoque Danilo

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0001ic_27set13

Date	27set2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	91

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0001_b1
- sdf0001_b2
- sdf0001_b3
- sdf0001_b4
- sdf0001_b5
- sdf0001_b7
- sdf0001_b8
- sdf0001_b9
- sdf0001_b10
- sdf0001_b11
- sdf0001_b12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 46 horas

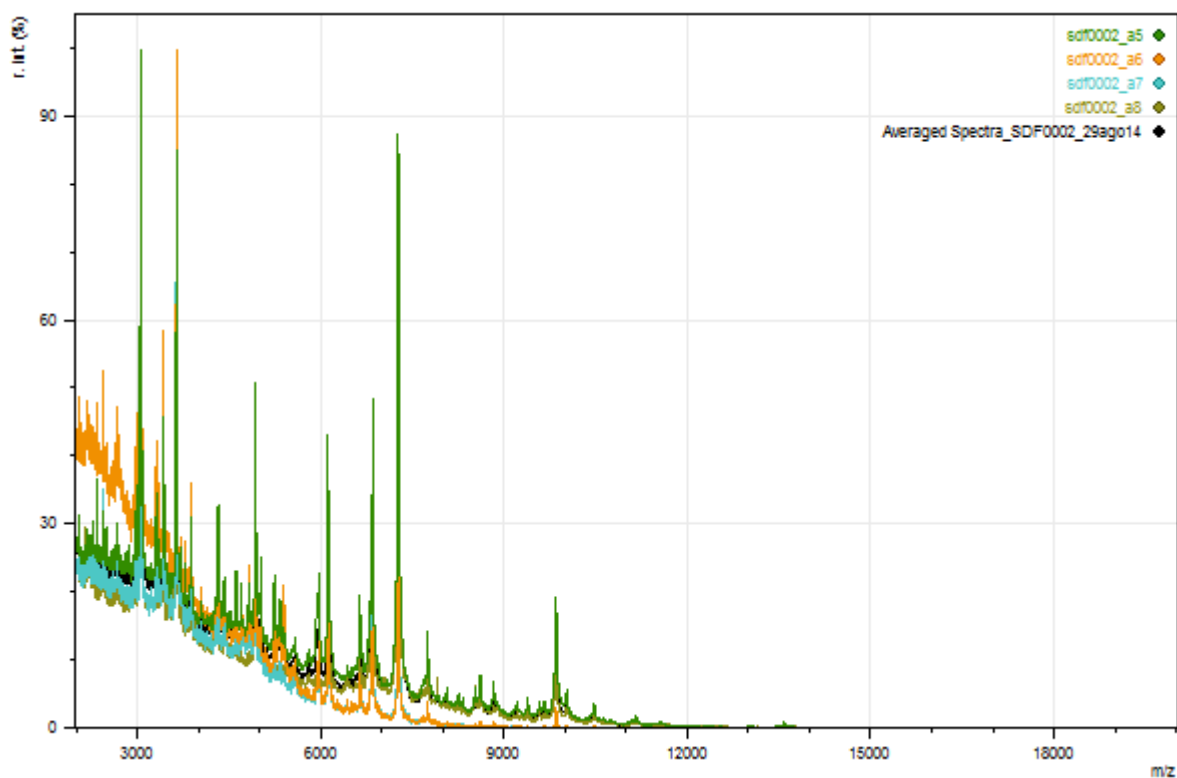
D > 4 mm (bordas)

Cultivos = 1

Origem = estoque Danilo

mMass Report: Averaged Spectra_SDF0002_29ago14

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	167



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0002_a5
- sdf0002_a7
- sdf0002_a8

Condições experimentais:

RP 11 - 28ago14

tc = 13 horas

D = 2 - 3 mm

Tempo até aplicação: 7h30min

Dissolução em água: Ruim

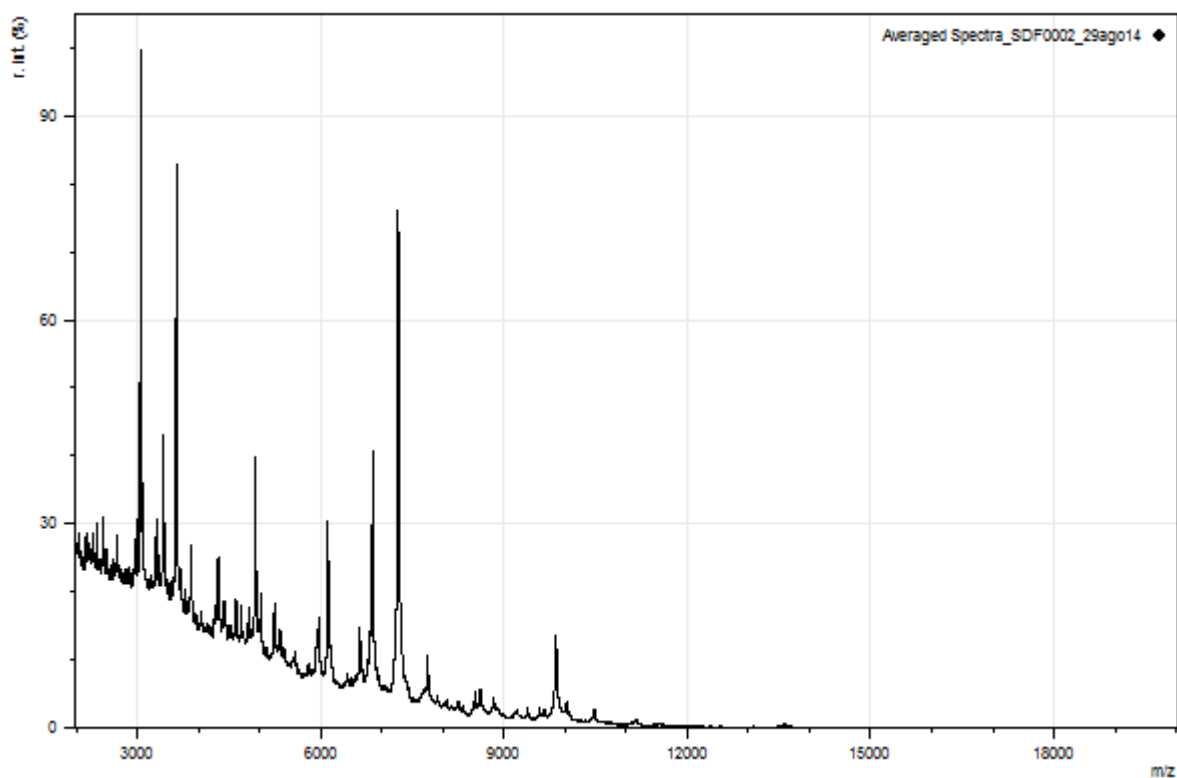
Dissolução em AcN: Ruim

Dissolução em AF: Ruim

Ponto de interrupção: etanol

mMass Report: Averaged Spectra_SDF0002_29ago14

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	167

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0002_a5
- sdf0002_a7
- sdf0002_a8

Condições experimentais:

RP 11 - 28ago14

tc = 13 horas

D = 2 - 3 mm

Tempo até aplicação: 7h30min

Dissolução em água: Ruim

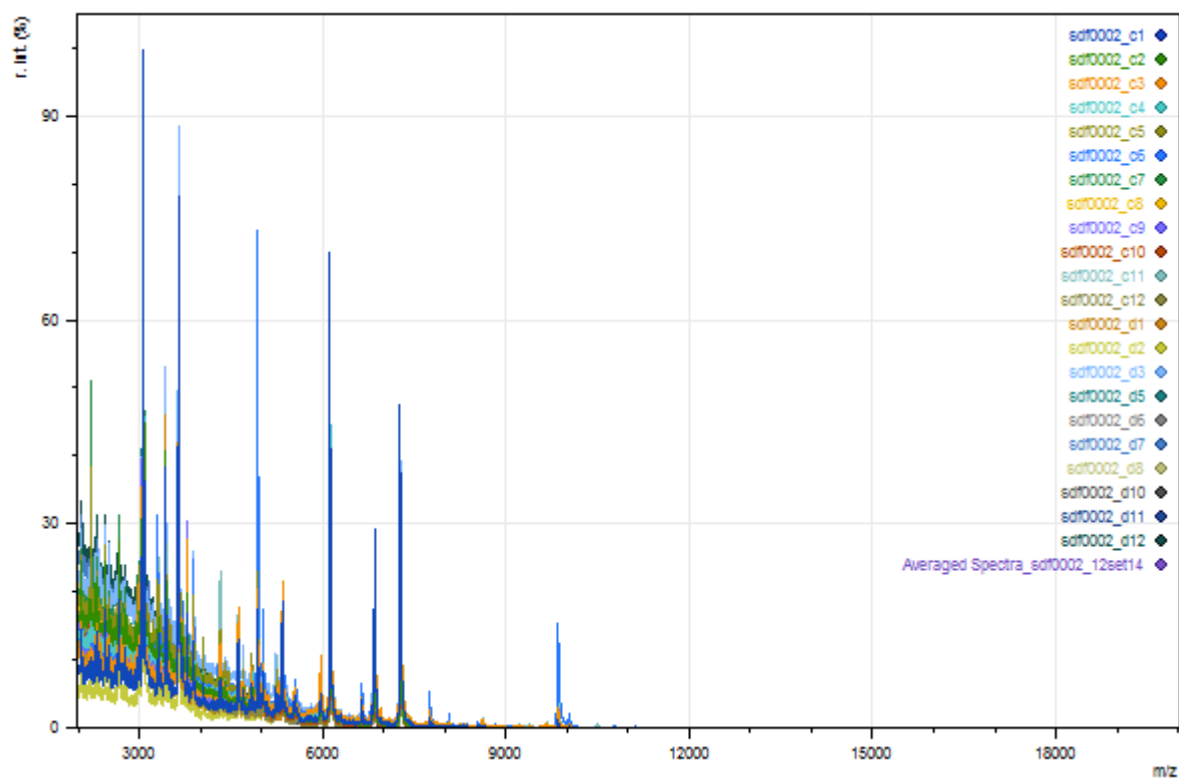
Dissolução em AcN: Ruim

Dissolução em AF: Ruim

Ponto de interrupção: etanol

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0002_12set14

Date	12set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	87



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0002_c1
- sdf0002_c2
- sdf0002_c3
- sdf0002_c4
- sdf0002_c5
- sdf0002_c6
- sdf0002_c7
- sdf0002_c8
- sdf0002_c9
- sdf0002_c10
- sdf0002_c11
- sdf0002_c12
- sdf0002_d1
- sdf0002_d2
- sdf0002_d3
- sdf0002_d5
- sdf0002_d6
- sdf0002_d7
- sdf0002_d8
- sdf0002_d10
- sdf0002_d11
- sdf0002_d12

Condições experimentais:

tc = 36 h

D = s/registro

Início: 12set14 às 3h30min

Tempo até aplicação: 10 h

Dissolução em água: s/registro

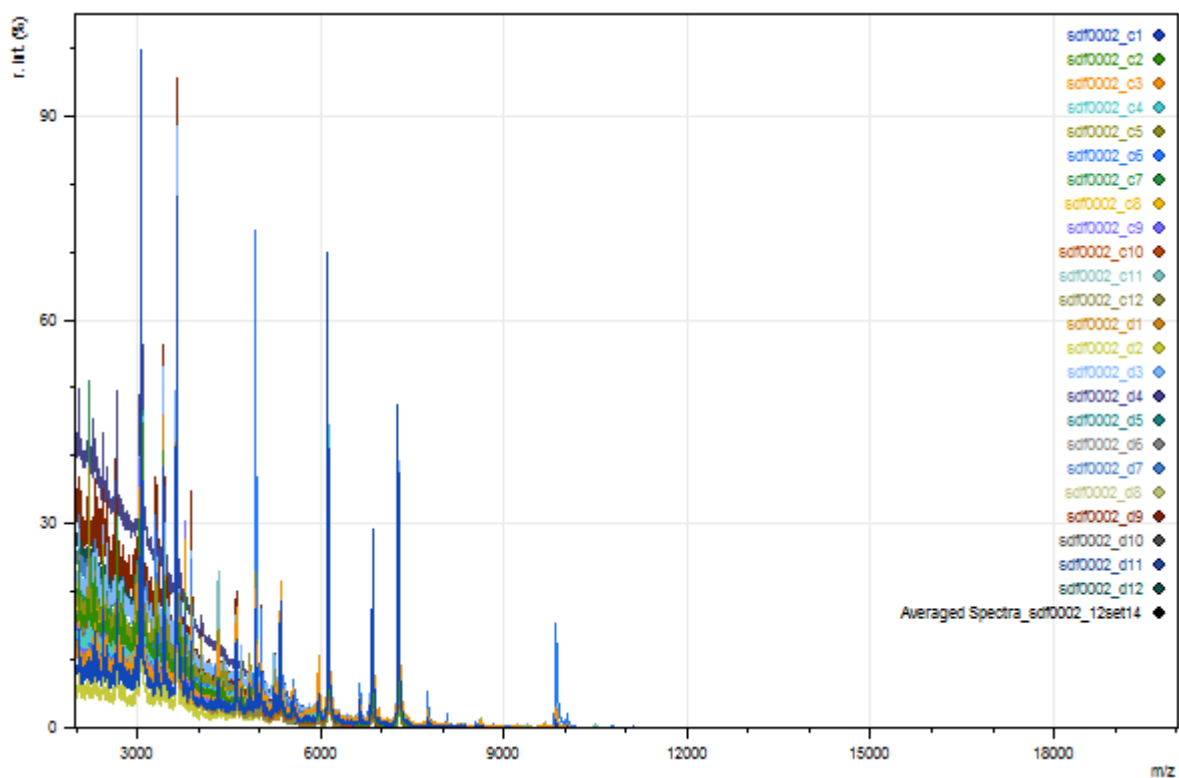
Dissolução em AcN: Boa

Dissolução em AF: Boa

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0002_12set14

Date	12set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	87

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0002_c1
- sdf0002_c2
- sdf0002_c3
- sdf0002_c4
- sdf0002_c5
- sdf0002_c6
- sdf0002_c7
- sdf0002_c8
- sdf0002_c9
- sdf0002_c10
- sdf0002_c11
- sdf0002_c12
- sdf0002_d1
- sdf0002_d2
- sdf0002_d3
- sdf0002_d5
- sdf0002_d6
- sdf0002_d7
- sdf0002_d8
- sdf0002_d10
- sdf0002_d11
- sdf0002_d12

Condições experimentais:

tc = 36 h

D = s/registro

Início: 12set14 às 3h30min

Tempo até aplicação: 10 h

Dissolução em água: s/registro

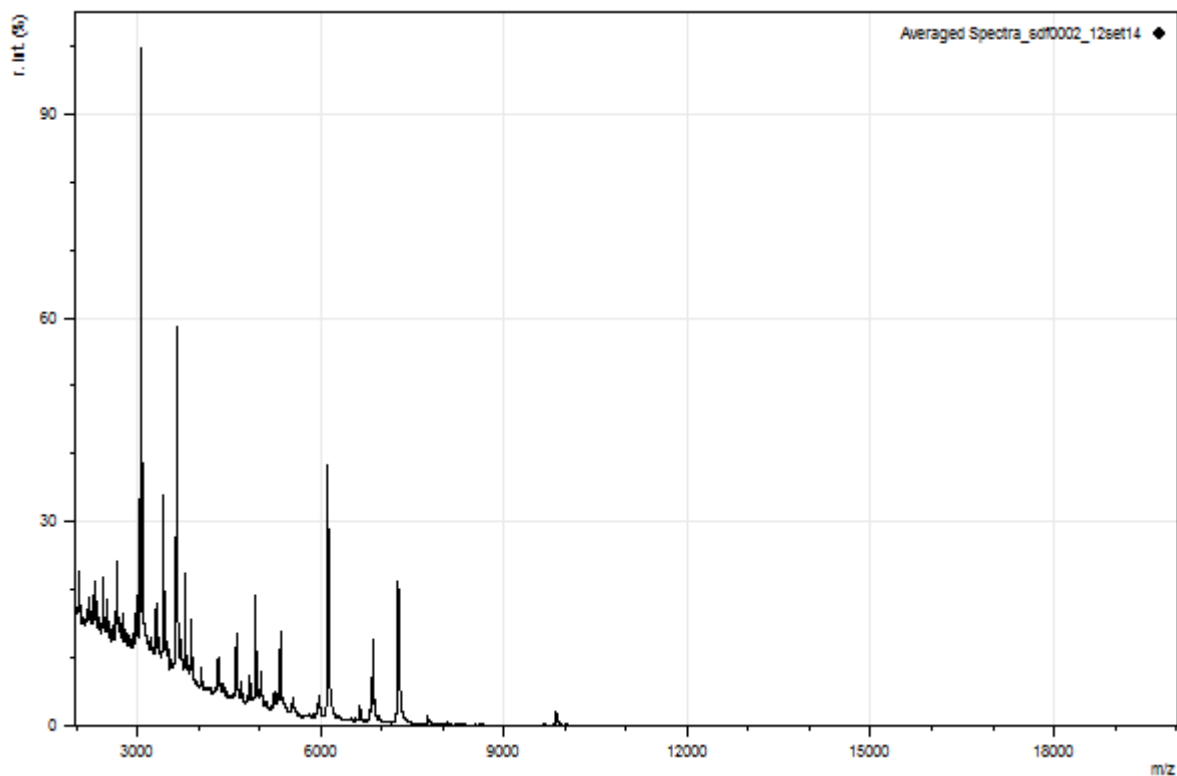
Dissolução em AcN: Boa

Dissolução em AF: Boa

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0002_12set14

Date	12set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	87

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0002_c1
- sdf0002_c2
- sdf0002_c3
- sdf0002_c4
- sdf0002_c5
- sdf0002_c6
- sdf0002_c7
- sdf0002_c8
- sdf0002_c9
- sdf0002_c10
- sdf0002_c11
- sdf0002_c12
- sdf0002_d1
- sdf0002_d2
- sdf0002_d3
- sdf0002_d5
- sdf0002_d6
- sdf0002_d7
- sdf0002_d8
- sdf0002_d10
- sdf0002_d11
- sdf0002_d12

Condições experimentais:

tc = 36 h

D = s/registro

Início: 12set14 às 3h30min

Tempo até aplicação: 10 h

Dissolução em água: s/registro

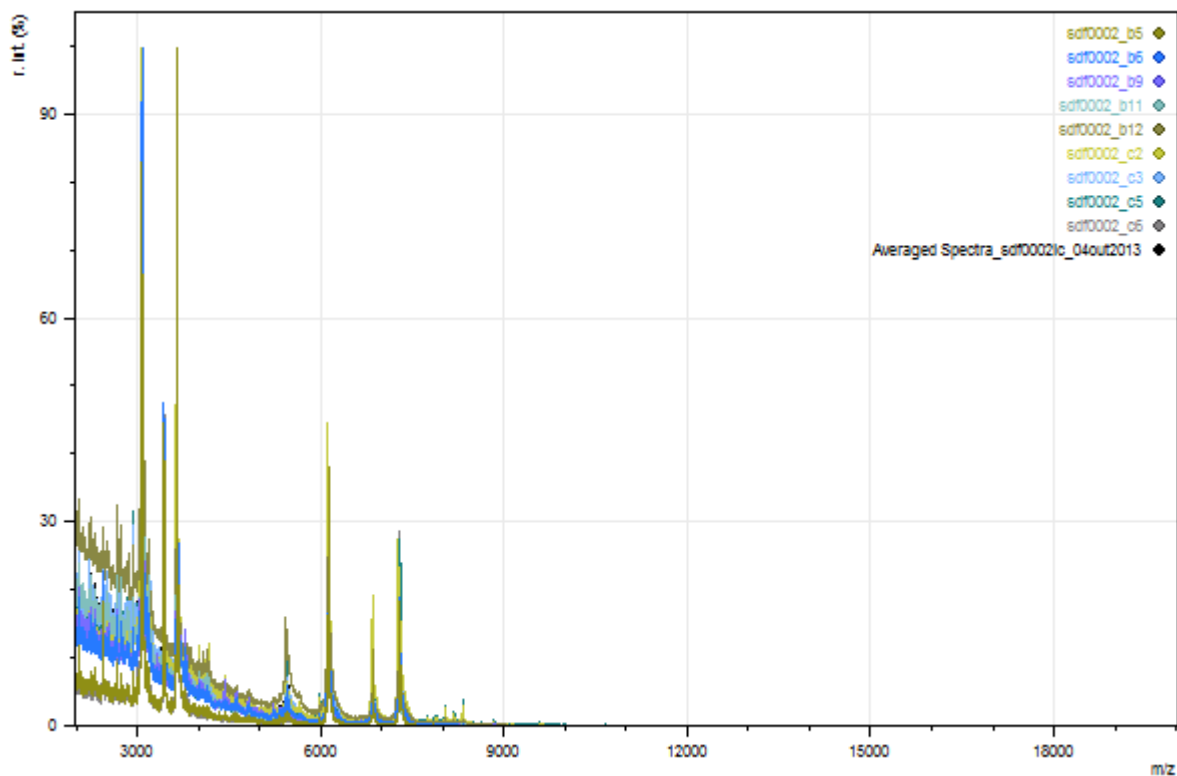
Dissolução em AcN: Boa

Dissolução em AF: Boa

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0002ic_04out2013

Date	04out2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	100



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0002_b5
- sdf0002_b6
- sdf0002_b9
- sdf0002_b11
- sdf0002_b12
- sdf0002_c2
- sdf0002_c3
- sdf0002_c5
- sdf0002_c6

Condições experimentais (CI)

tc = 44 horas

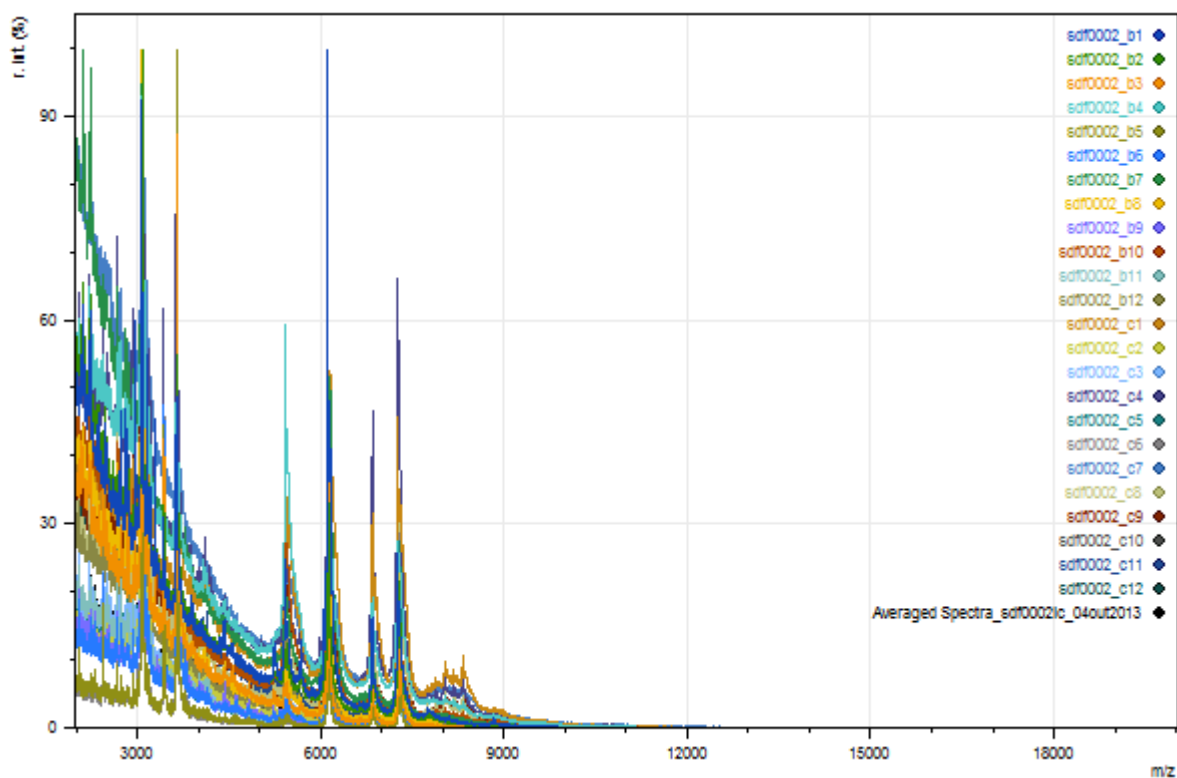
D = 2 - 3 mm

Cultivos: 2

Origem: alíquota de trabalho Danilo

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0002ic_04out2013

Date	04out2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	100



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0002_b5
- sdf0002_b6
- sdf0002_b9
- sdf0002_b11
- sdf0002_b12
- sdf0002_c2
- sdf0002_c3
- sdf0002_c5
- sdf0002_c6

Condições experimentais (CI)

tc = 44 horas

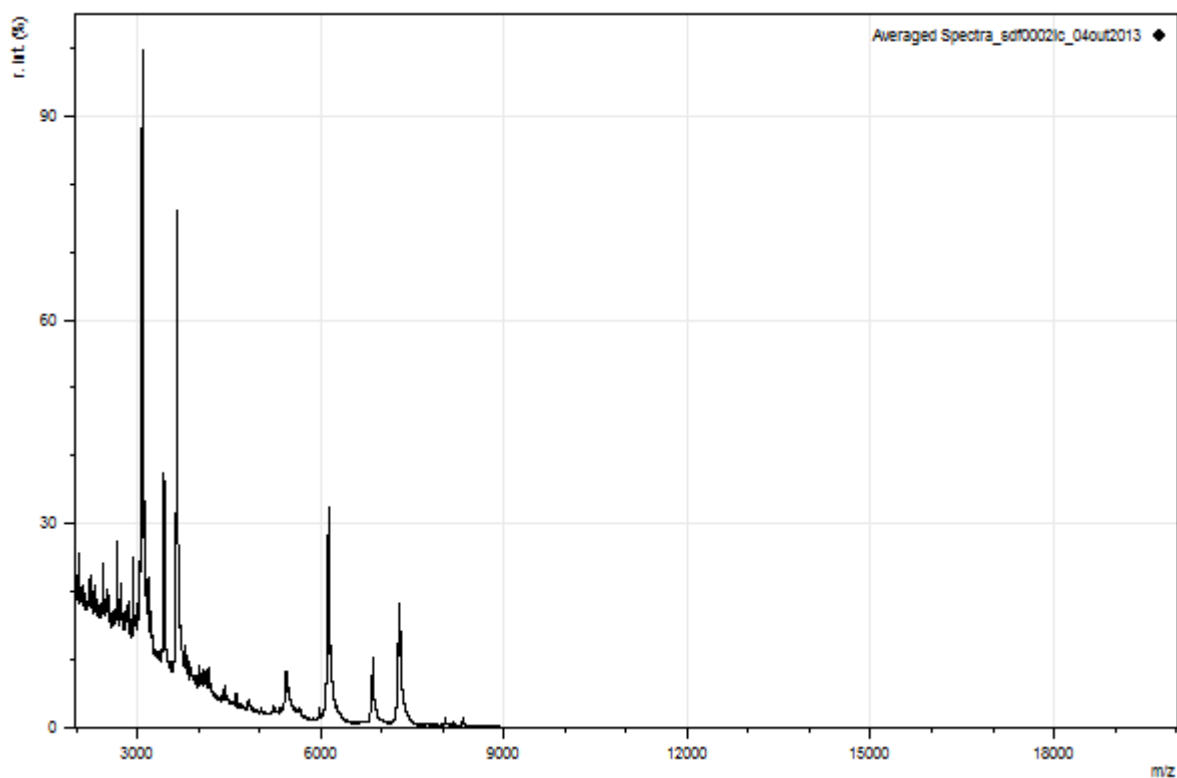
D = 2 - 3 mm

Cultivos: 2

Origem: alíquota de trabalho Danilo

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0002ic_04out2013

Date	04out2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	100



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0002_b5
- sdf0002_b6
- sdf0002_b9
- sdf0002_b11
- sdf0002_b12
- sdf0002_c2
- sdf0002_c3
- sdf0002_c5
- sdf0002_c6

Condições experimentais (CI)

tc = 44 horas

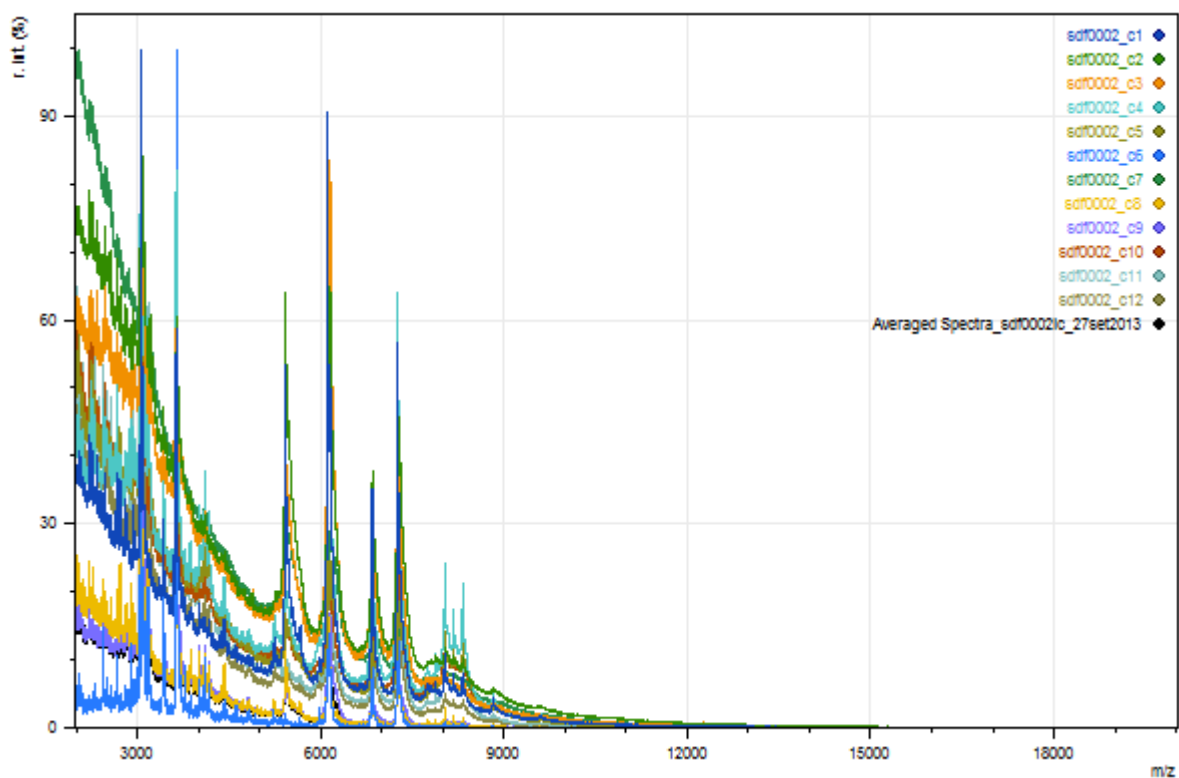
D = 2 - 3 mm

Cultivos: 2

Origem: alíquota de trabalho Danilo

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0002ic_27set2013

Date	27set2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	136

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0002_c6
- sdf0002_c8
- sdf0002_c9

Condições experimentais:

tc = 46 horas

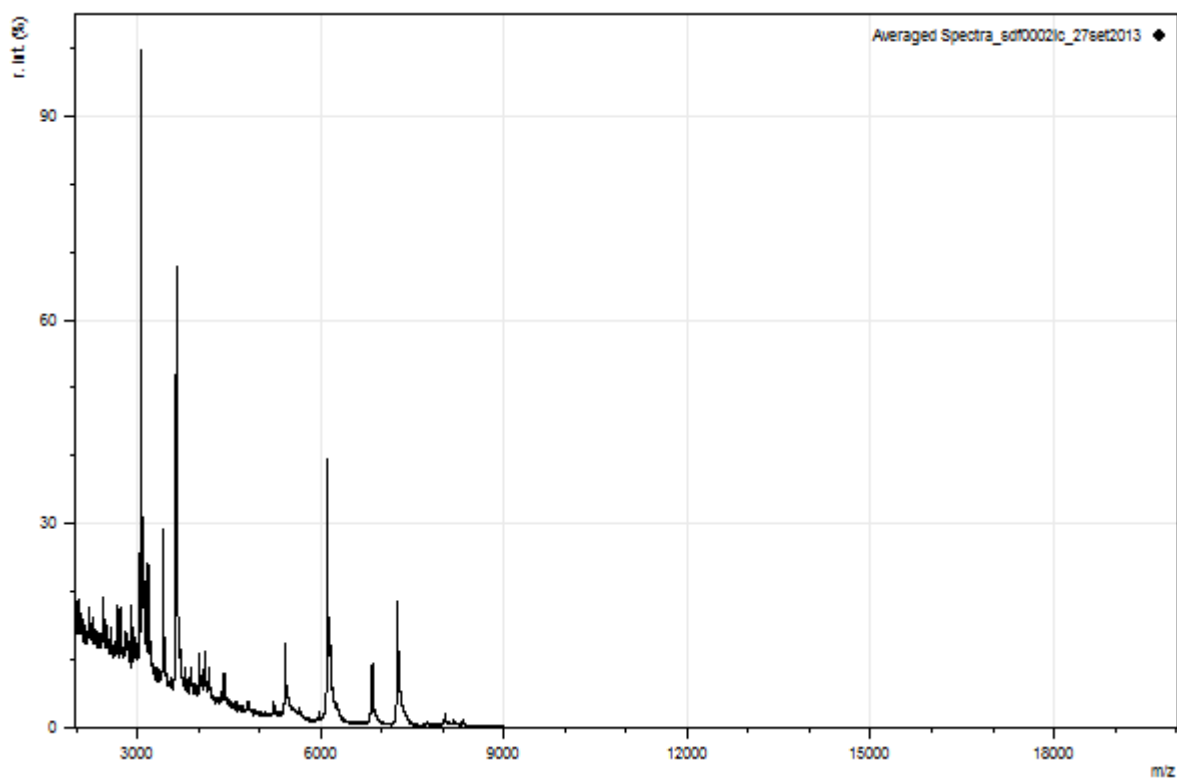
D = 1 mm

Cultivos = 1

Origem = aliquota de trabalho Danilo

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0002ic_27set2013

Date	27set2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	136

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0002_c6
- sdf0002_c8
- sdf0002_c9

Condições experimentais:

tc = 46 horas

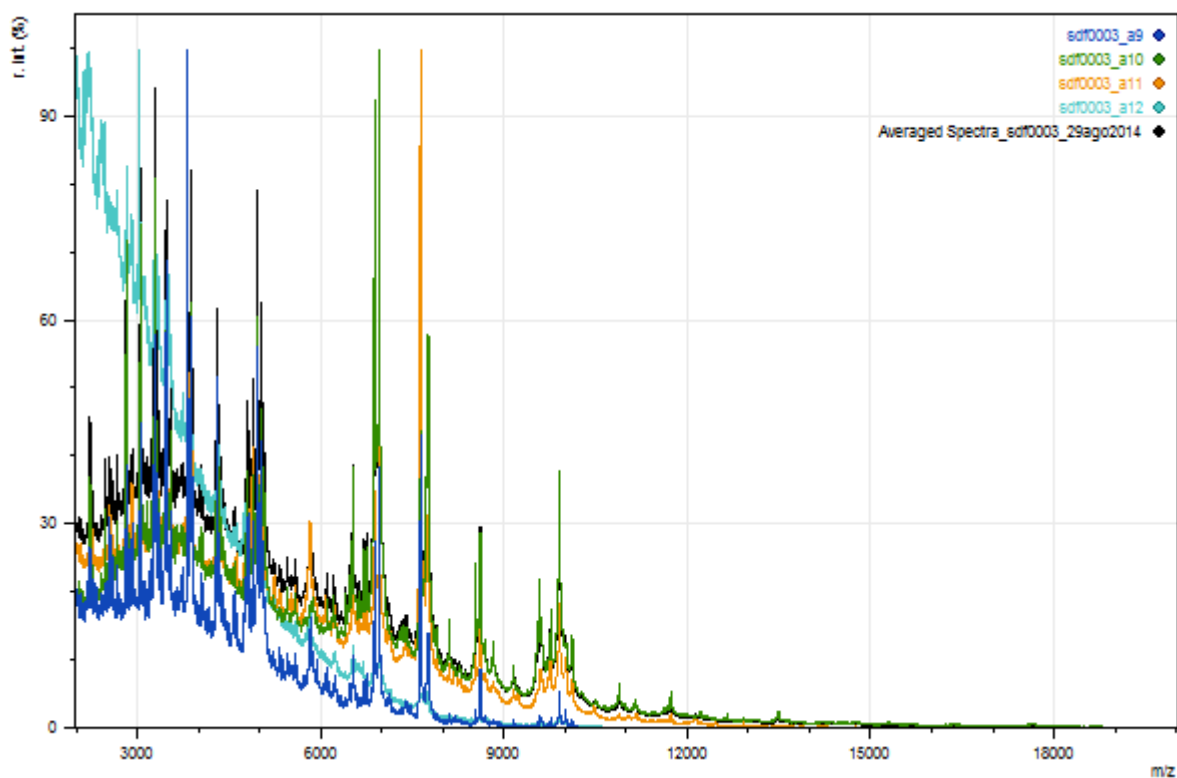
D = 1 mm

Cultivos = 1

Origem = aliquota de trabalho Danilo

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0003_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	155

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0003_a9
- sdf0003_a10
- sdf0003_a11

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = 2 - 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

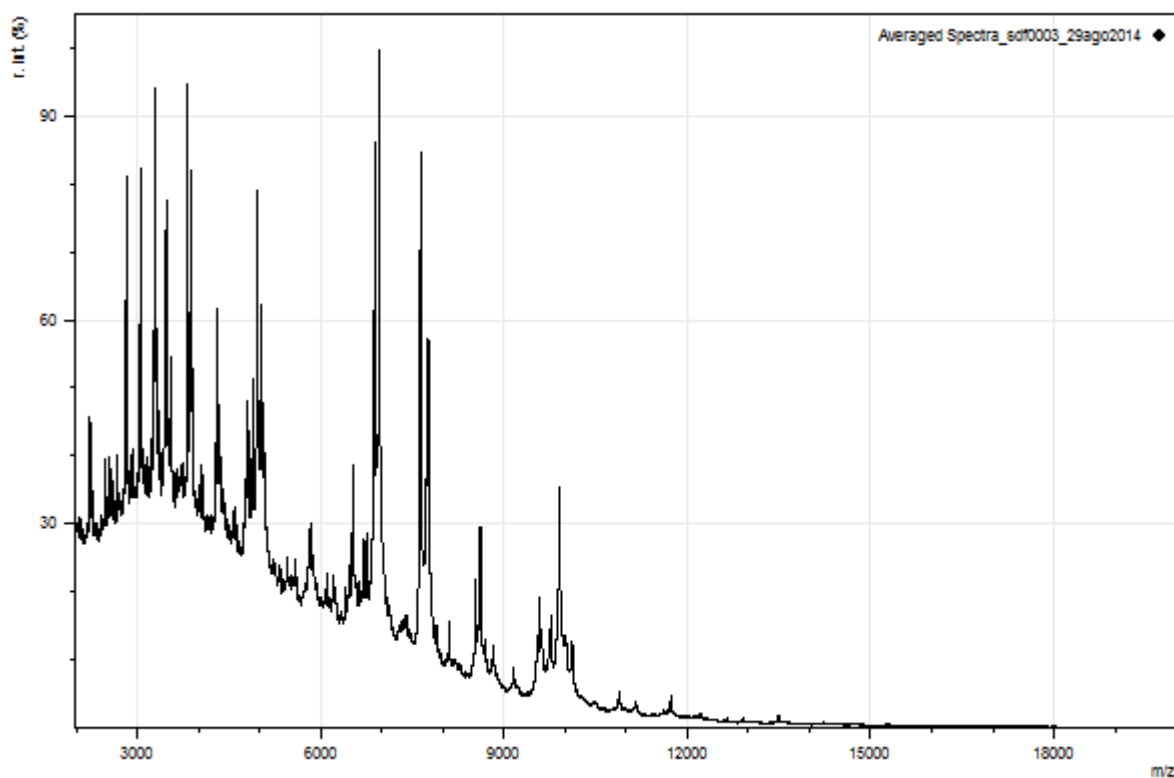
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0003_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	155

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0003_a9
- sdf0003_a10
- sdf0003_a11

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = 2 - 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

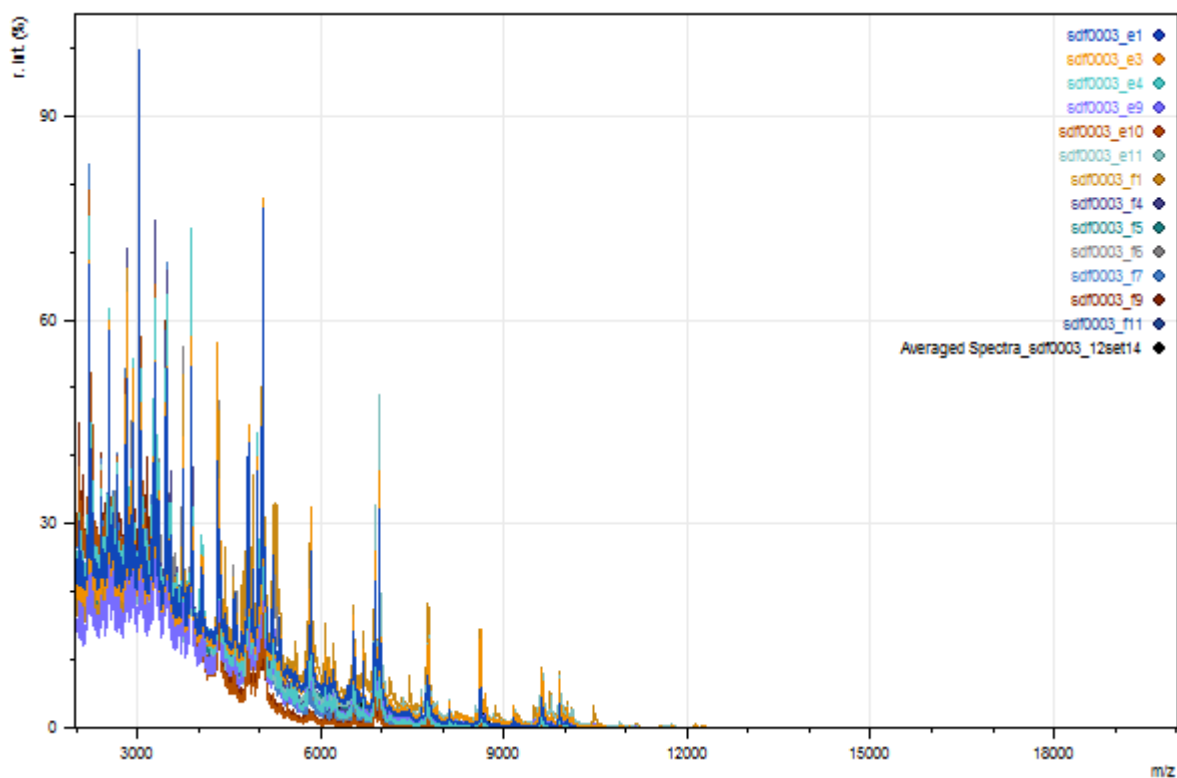
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0003_12set14

Date	12set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	131

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0003_e1
- sdf0003_e3
- sdf0003_e4
- sdf0003_e9
- sdf0003_e10
- sdf0003_e11
- sdf0003_f1
- sdf0003_f4
- sdf0003_f5
- sdf0003_f6
- sdf0003_f7
- sdf0003_f9
- sdf0003_f11

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = sem registro

Tempo até aplicação do extrato: 10 horas

Dissolução em água: sem registro

Dissolução em AcN: Boa

Dissolução em AF: Boa

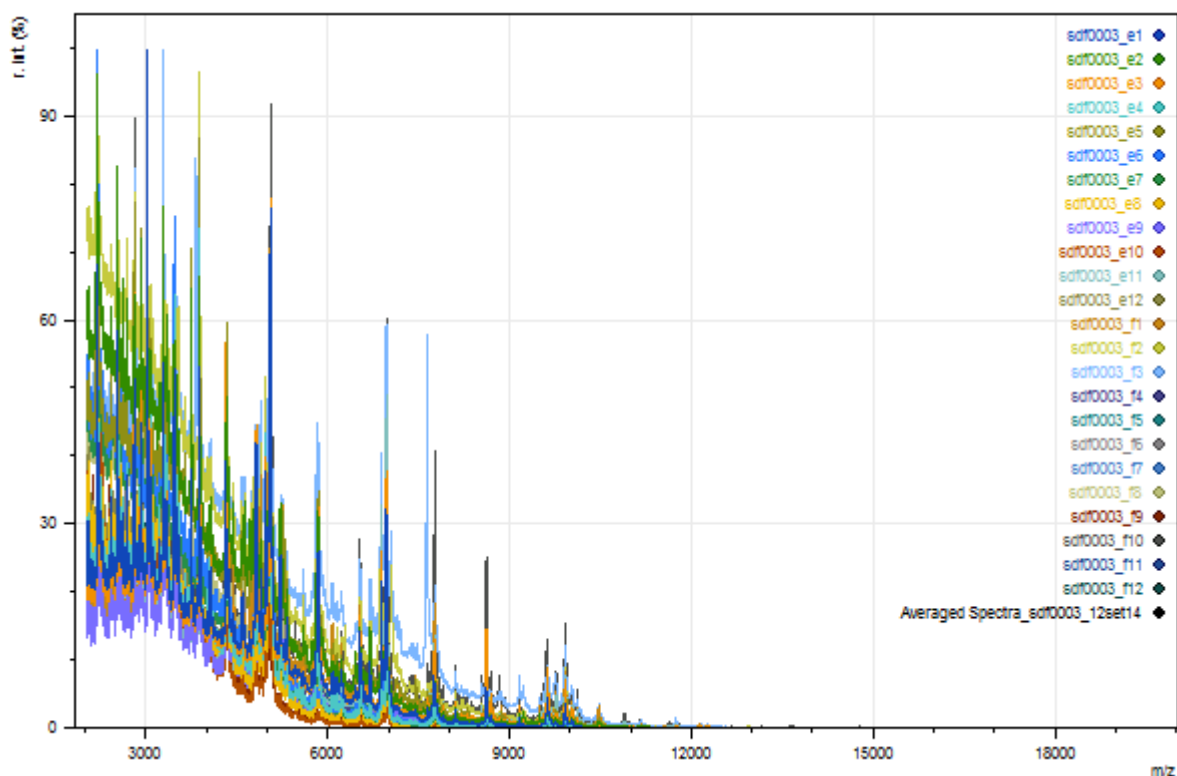
Cultivos: 6

Origem: RP 11 - 12set14

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0003_12set14

Date	12set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	131

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0003_e1
- sdf0003_e3
- sdf0003_e4
- sdf0003_e9
- sdf0003_e10
- sdf0003_e11
- sdf0003_f1
- sdf0003_f4
- sdf0003_f5
- sdf0003_f6
- sdf0003_f7
- sdf0003_f9
- sdf0003_f11

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = sem registro

Tempo até aplicação do extrato: 10 horas

Dissolução em água: sem registro

Dissolução em AcN: Boa

Dissolução em AF: Boa

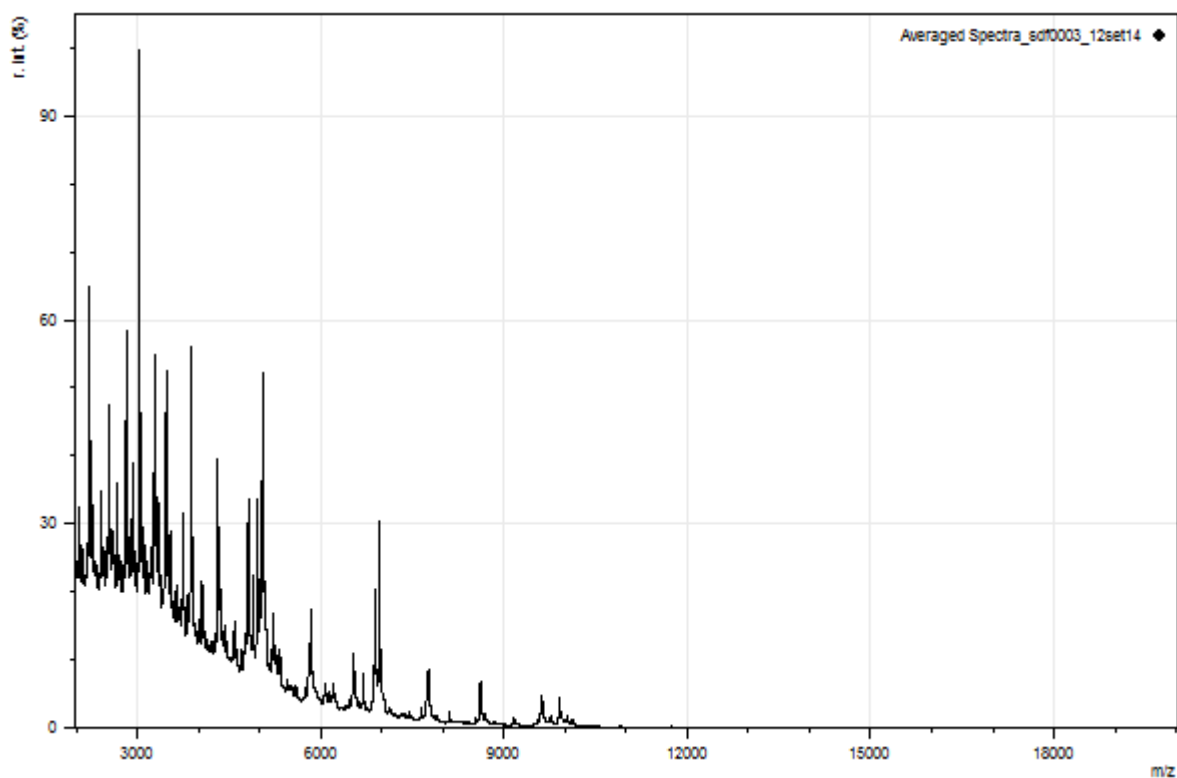
Cultivos: 6

Origem: RP 11 - 12set14

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0003_12set14

Date	12set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	131

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0003_e1
- sdf0003_e3
- sdf0003_e4
- sdf0003_e9
- sdf0003_e10
- sdf0003_e11
- sdf0003_f1
- sdf0003_f4
- sdf0003_f5
- sdf0003_f6
- sdf0003_f7
- sdf0003_f9
- sdf0003_f11

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = sem registro

Tempo até aplicação do extrato: 10 horas

Dissolução em água: sem registro

Dissolução em AcN: Boa

Dissolução em AF: Boa

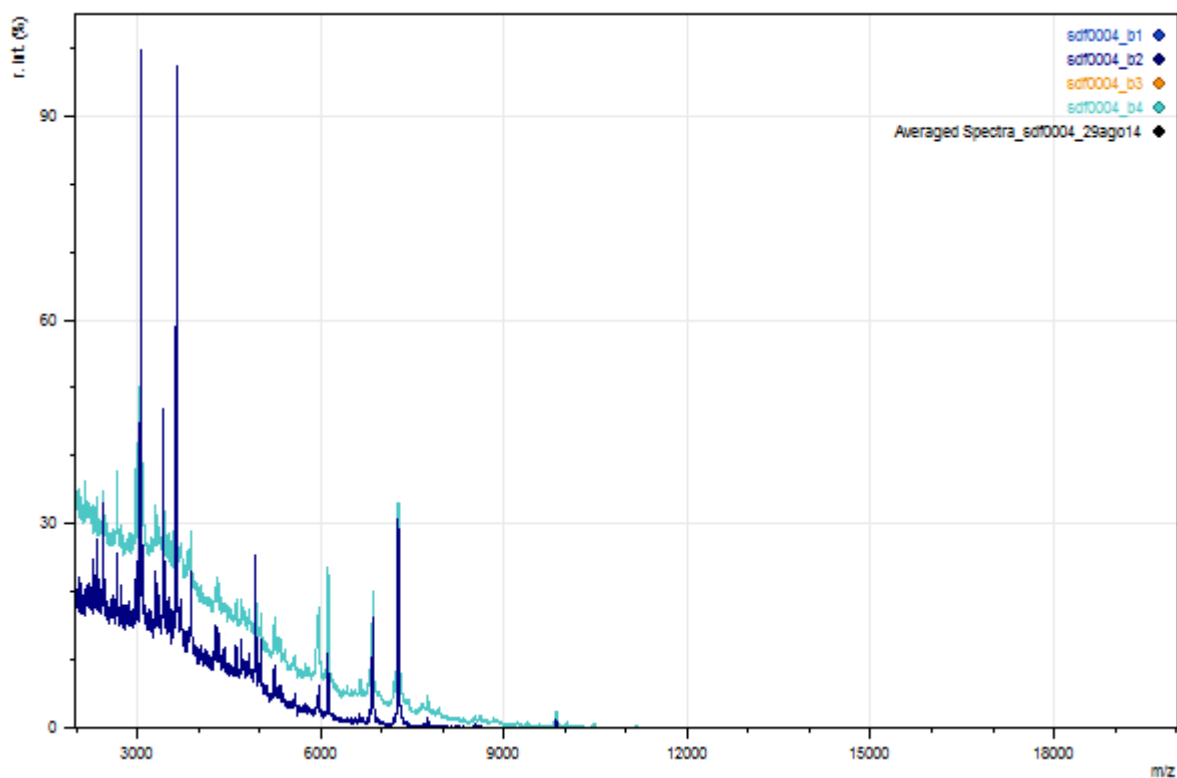
Cultivos: 6

Origem: RP 11 - 12set14

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0004_29ago14

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	341



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0004_b2

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

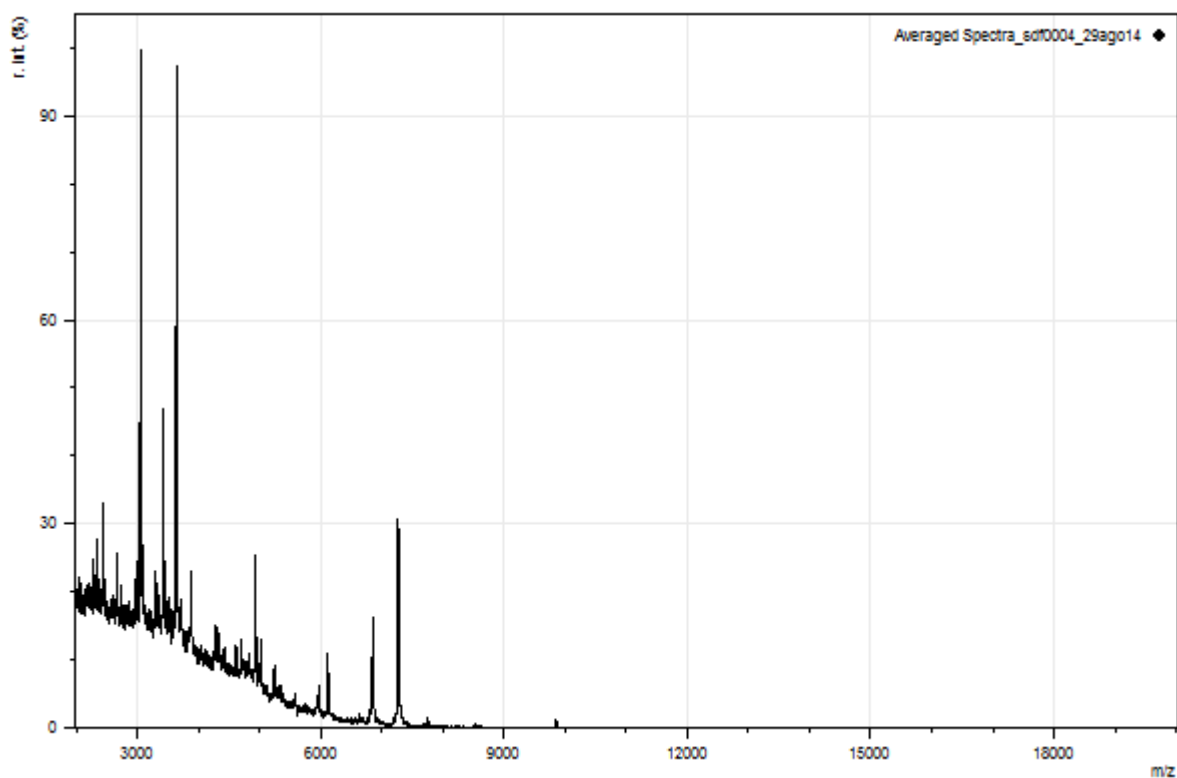
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0004_29ago14

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	341



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0004_b2

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

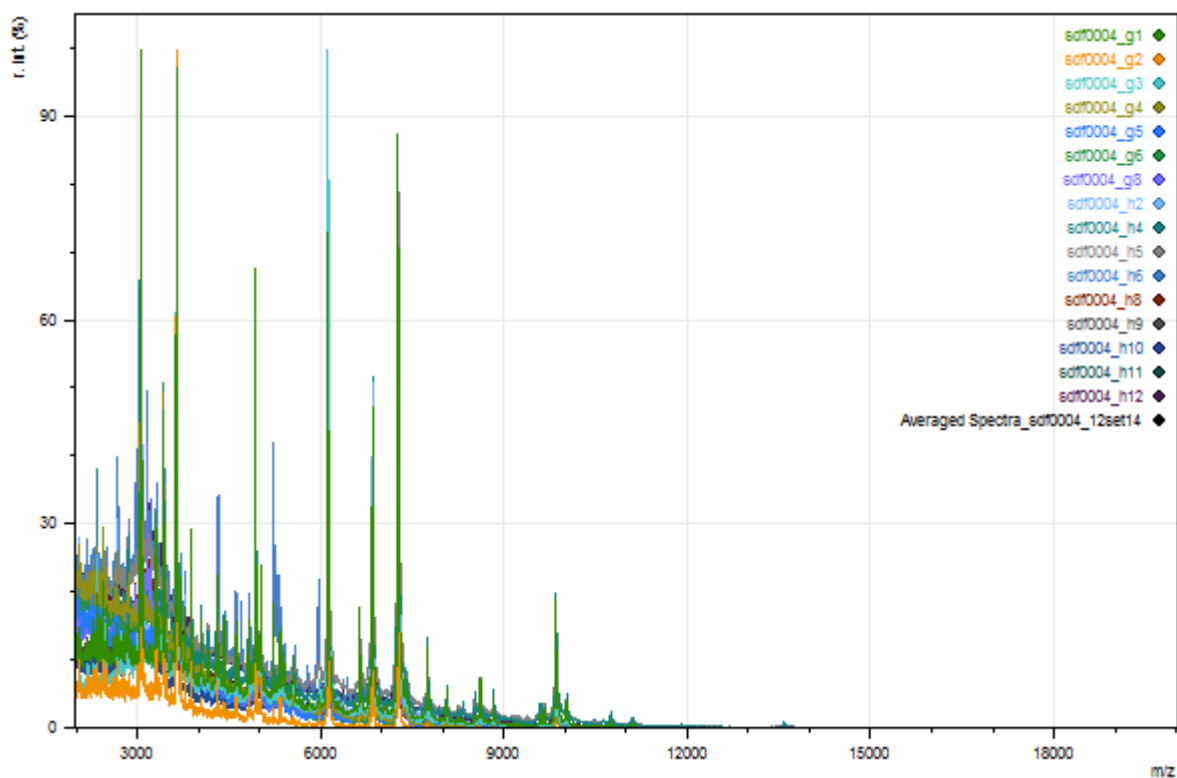
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0004_12set14

Date	12set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	102

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0004_g1
- sdf0004_g2
- sdf0004_g3
- sdf0004_g4
- sdf0004_g5
- sdf0004_g6
- sdf0004_g8
- sdf0004_h2
- sdf0004_h4
- sdf0004_h5
- sdf0004_h6
- sdf0004_h8
- sdf0004_h9
- sdf0004_h10
- sdf0004_h11
- sdf0004_h12

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = sem registro

Tempo até aplicação do extrato = 10 horas

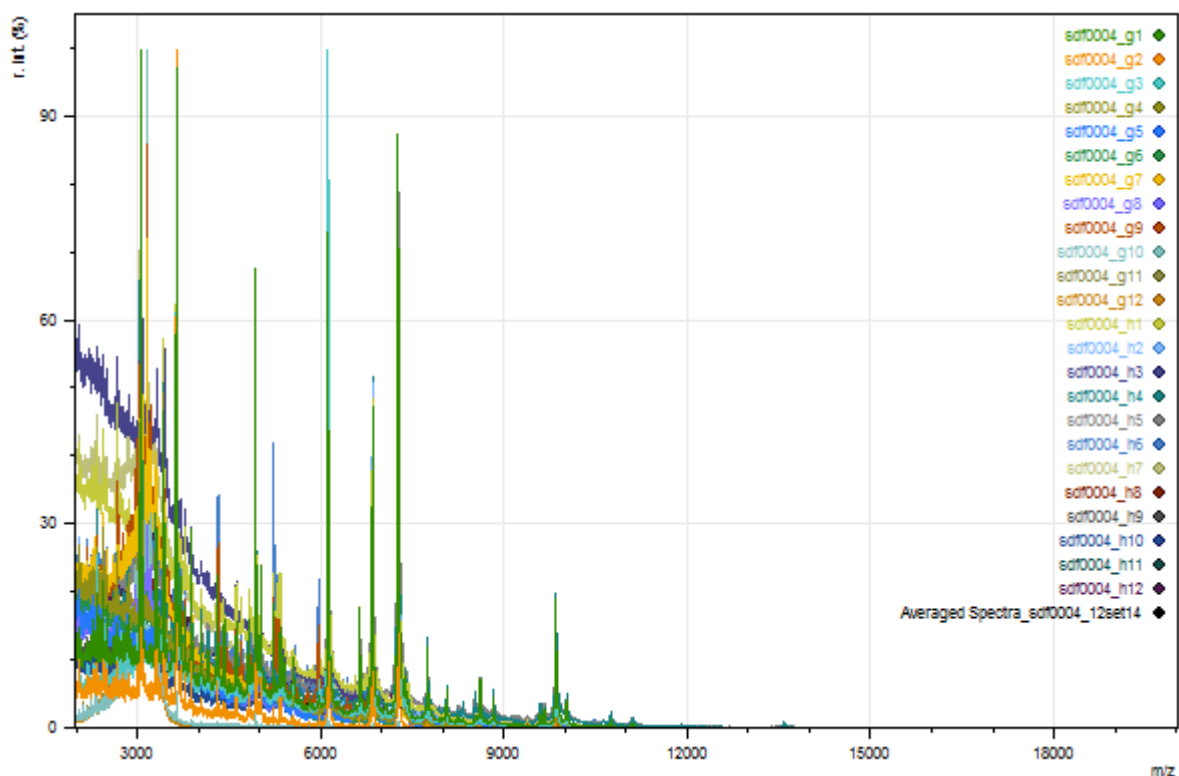
Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Boa
Dissolução em AF = Boa
Cultivos = 6
Origem = RP 11 - 12set2014

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0004_12set14

Date	12set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	102



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0004_g1
- sdf0004_g2
- sdf0004_g3
- sdf0004_g4
- sdf0004_g5
- sdf0004_g6
- sdf0004_g8
- sdf0004_h2
- sdf0004_h4
- sdf0004_h5
- sdf0004_h6
- sdf0004_h8
- sdf0004_h9
- sdf0004_h10
- sdf0004_h11
- sdf0004_h12

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = sem registro

Tempo até aplicação do extrato = 10 horas

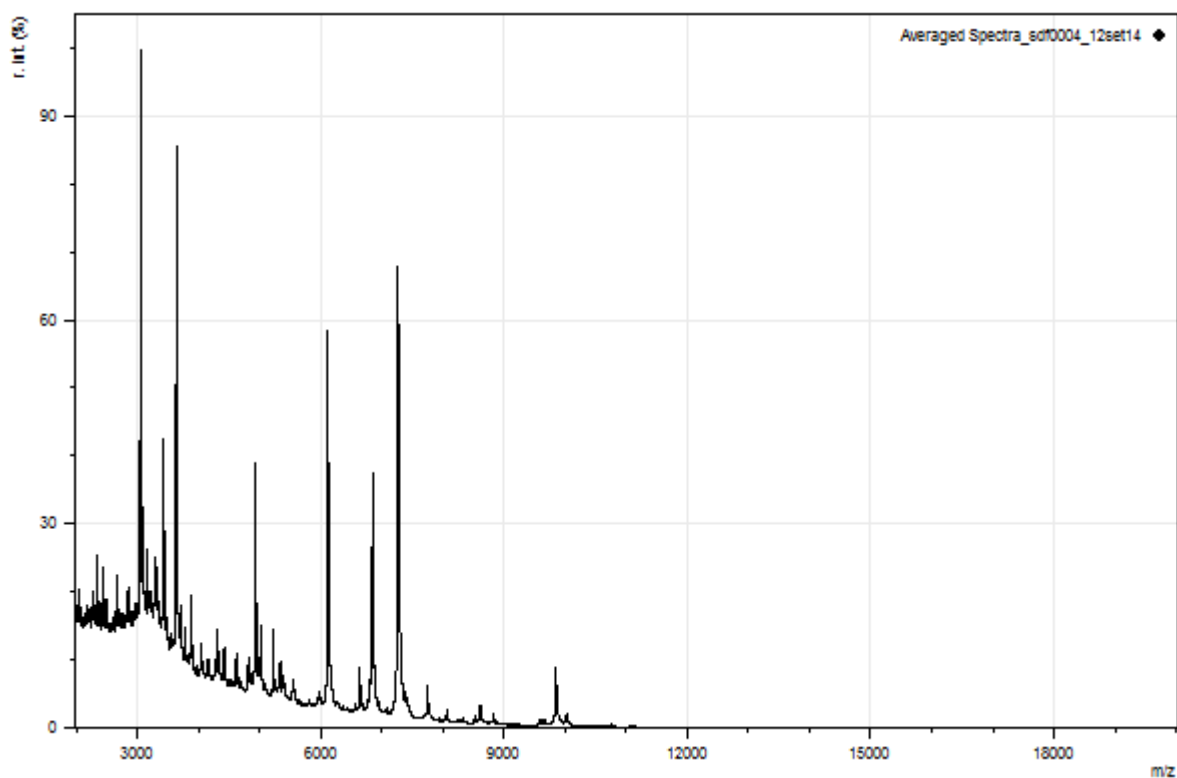
Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Boa
Dissolução em AF = Boa
Cultivos = 6
Origem = RP 11 - 12set2014

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0004_12set14

Date	12set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	102

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0004_g1
- sdf0004_g2
- sdf0004_g3
- sdf0004_g4
- sdf0004_g5
- sdf0004_g6
- sdf0004_g8
- sdf0004_h2
- sdf0004_h4
- sdf0004_h5
- sdf0004_h6
- sdf0004_h8
- sdf0004_h9
- sdf0004_h10
- sdf0004_h11
- sdf0004_h12

Condições experimentais:

tc = 36 horas

D = sem registro

Tempo até aplicação do extrato = 10 horas

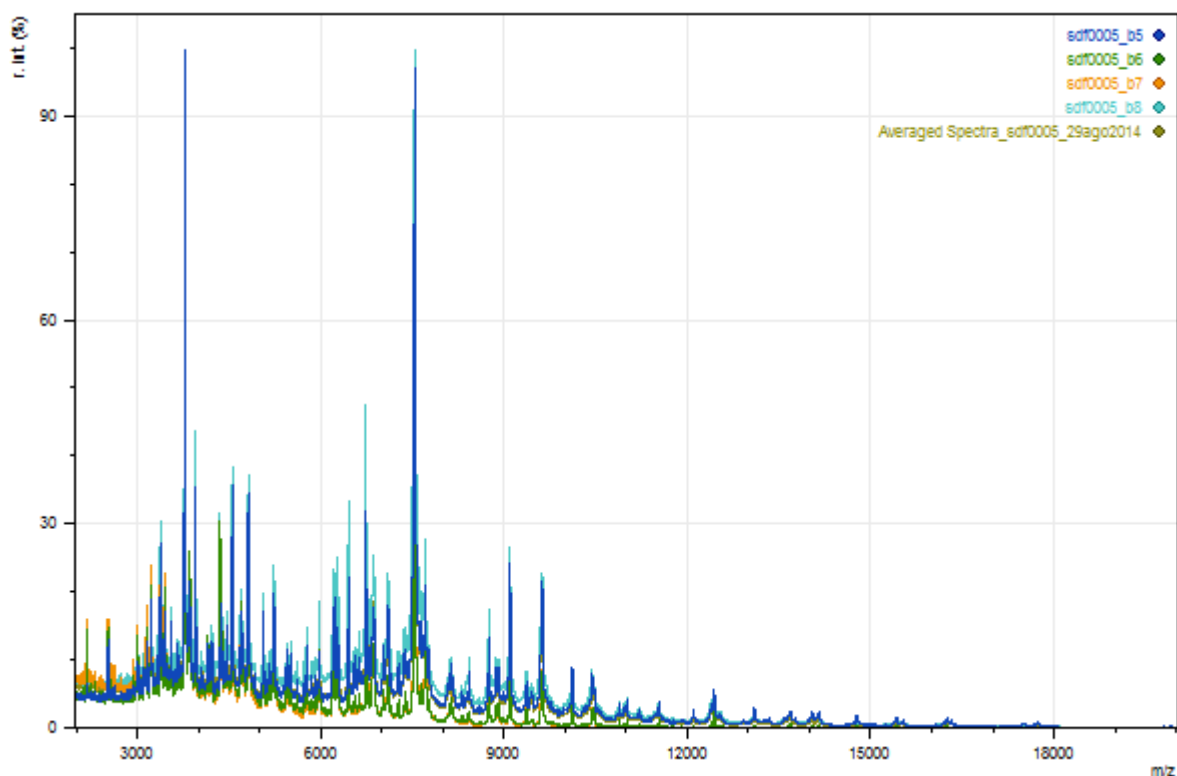
Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Boa
Dissolução em AF = Boa
Cultivos = 6
Origem = RP 11 - 12set2014

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0005_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	568



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0005_b5
- sdf0005_b6
- sdf0005_b7
- sdf0005_b8

Condições experimentais:

tc = 13 horas

D = 5 - 7 (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = sem registro

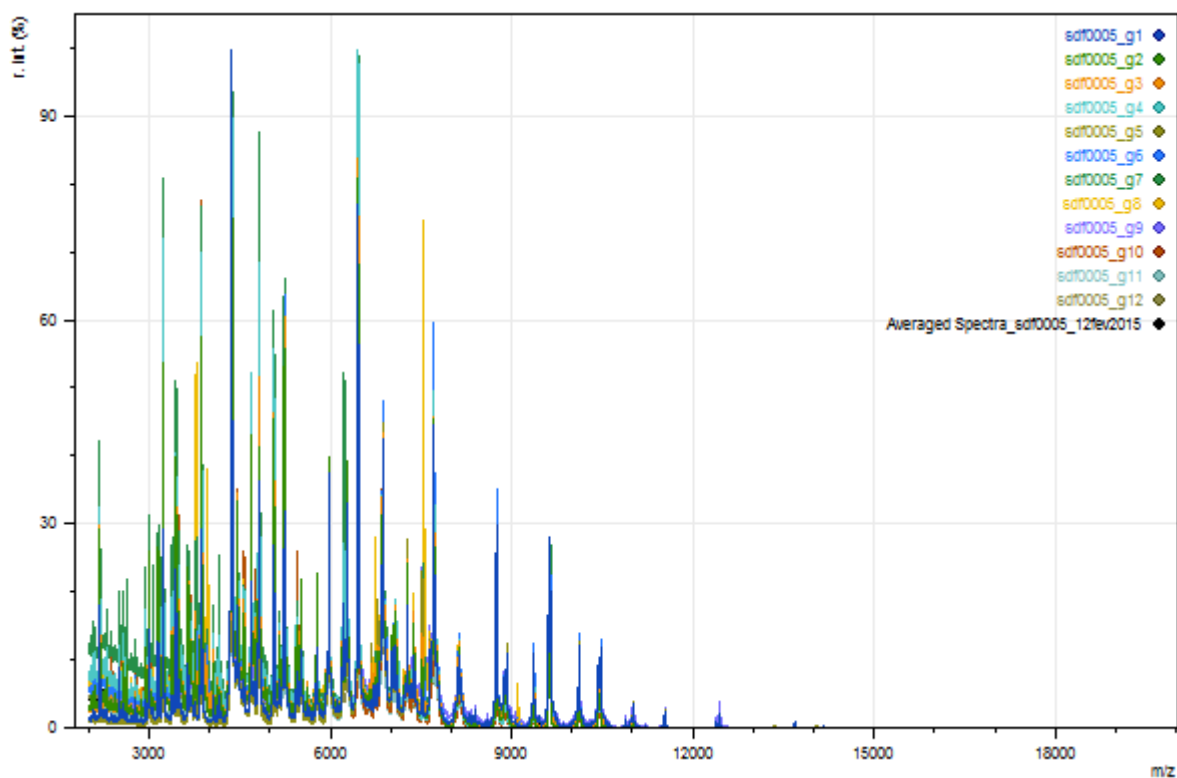
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

Interrupção no etanol.

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0005_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	360

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0005_g1
- sdf0005_g2
- sdf0005_g3
- sdf0005_g4
- sdf0005_g5
- sdf0005_g6
- sdf0005_g7
- sdf0005_g8
- sdf0005_g9
- sdf0005_g10
- sdf0005_g11
- sdf0005_g12

Condições experimentais:

tc = 41 horas

D = 5 mm (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = ~ 3h30min

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 3

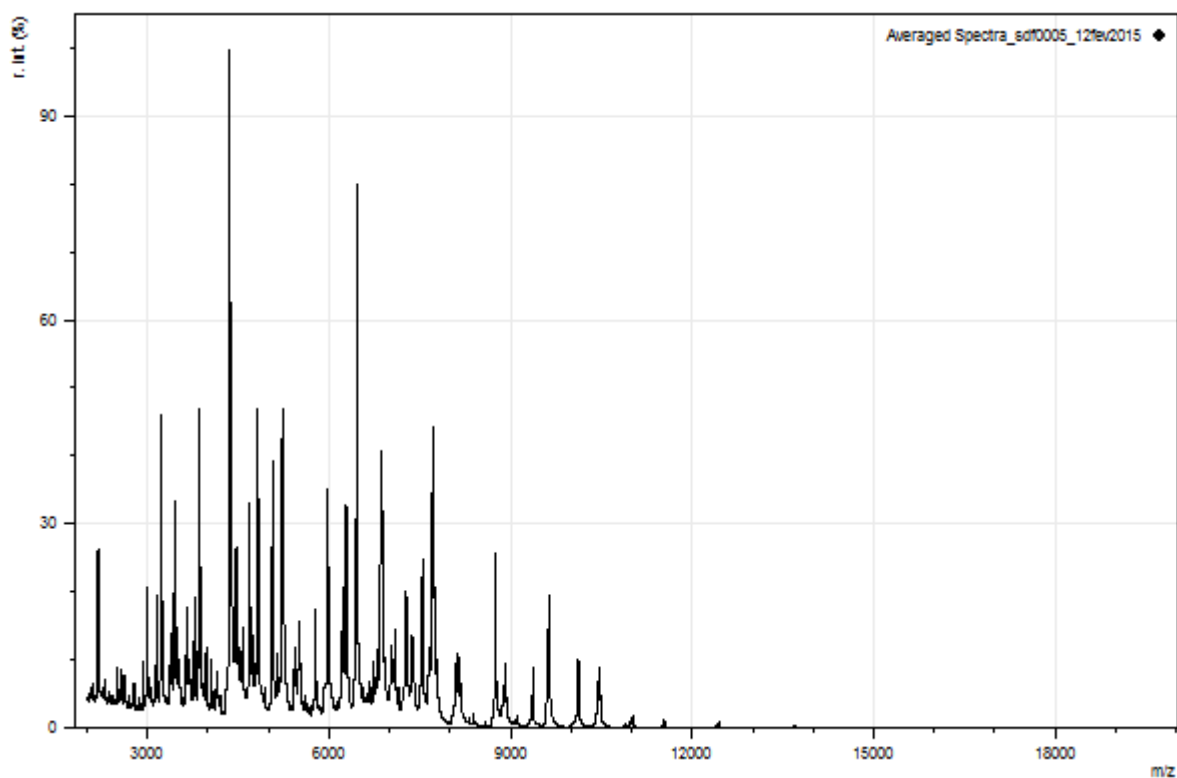
Origem = RP 11 - 12fev2015

Ponto de interrupção = AF

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0005_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	360

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0005_g1
- sdf0005_g2
- sdf0005_g3
- sdf0005_g4
- sdf0005_g5
- sdf0005_g6
- sdf0005_g7
- sdf0005_g8
- sdf0005_g9
- sdf0005_g10
- sdf0005_g11
- sdf0005_g12

Condições experimentais:

tc = 41 horas

D = 5 mm (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = ~ 3h30min

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 3

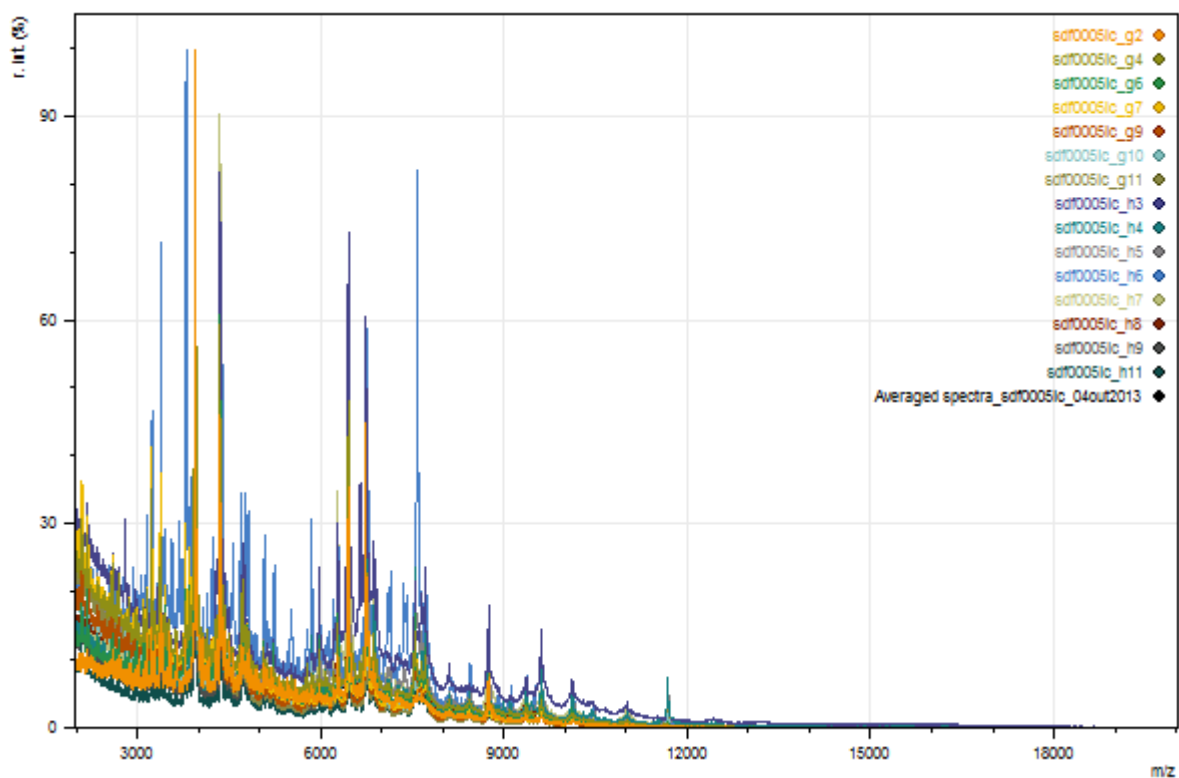
Origem = RP 11 - 12fev2015

Ponto de interrupção = AF

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged spectra_sdf0005ic_04out2013

Date	04out2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	108



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0005ic_g2
- sdf0005ic_g4
- sdf0005ic_g6
- sdf0005ic_g7
- sdf0005ic_g9
- sdf0005ic_g10
- sdf0005ic_g11
- sdf0005ic_h3
- sdf0005ic_h4
- sdf0005ic_h5
- sdf0005ic_h6
- sdf0005ic_h7
- sdf0005ic_h8
- sdf0005ic_h9
- sdf0005ic_h11

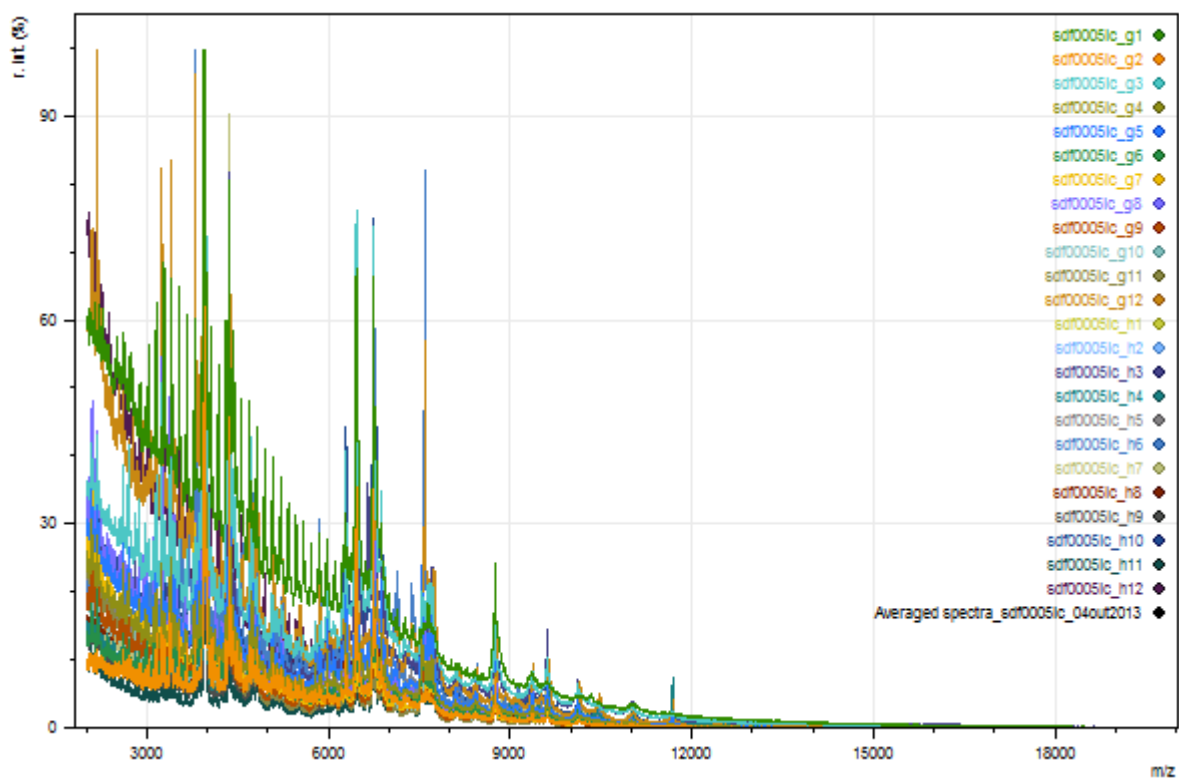
Condições experimentais (CI):

tc = 44 horas
 D = 5 mm (bordas)
 Cultivos = 2
 Origem = alíquota Danilo diluída 21x

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged spectra_sdf0005ic_04out2013

Date	04out2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	108



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0005ic_g2
- sdf0005ic_g4
- sdf0005ic_g6
- sdf0005ic_g7
- sdf0005ic_g9
- sdf0005ic_g10
- sdf0005ic_g11
- sdf0005ic_h3
- sdf0005ic_h4
- sdf0005ic_h5
- sdf0005ic_h6
- sdf0005ic_h7
- sdf0005ic_h8
- sdf0005ic_h9
- sdf0005ic_h11

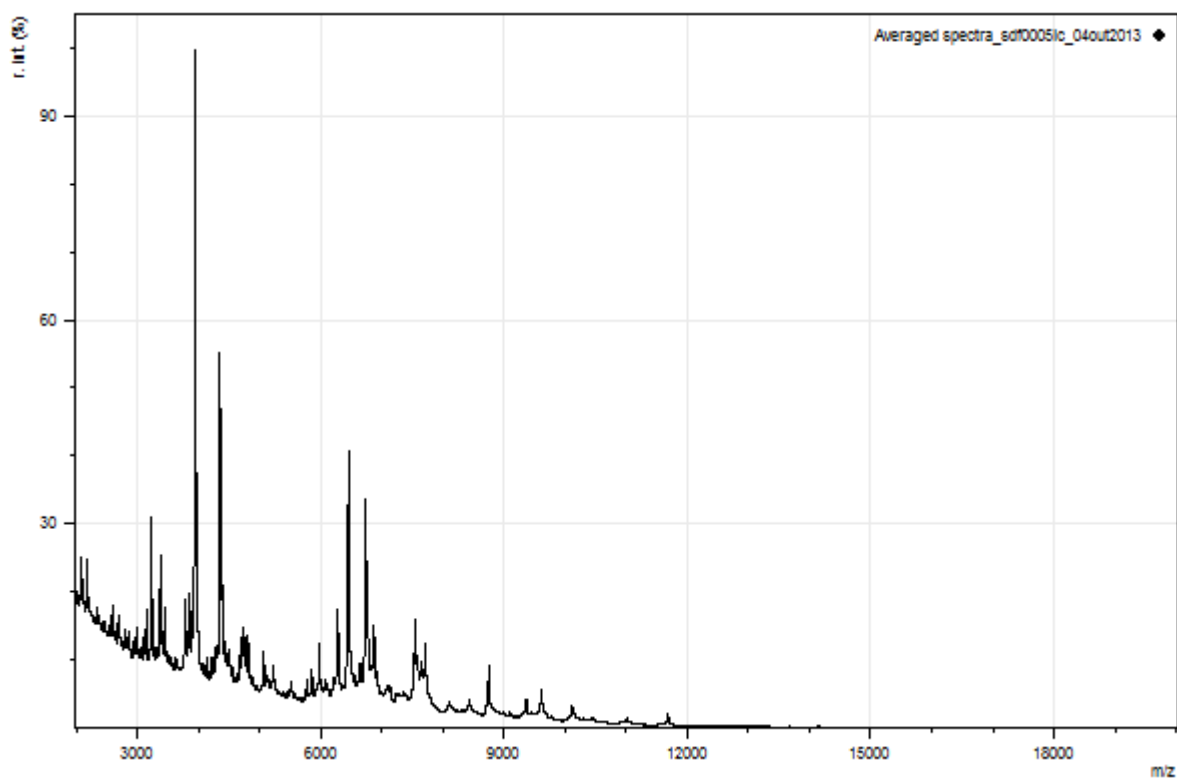
Condições experimentais (CI):

tc = 44 horas
 D = 5 mm (bordas)
 Cultivos = 2
 Origem = alíquota Danilo diluída 21x

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged spectra_sdf0005ic_04out2013

Date	04out2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	108

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0005ic_g2
- sdf0005ic_g4
- sdf0005ic_g6
- sdf0005ic_g7
- sdf0005ic_g9
- sdf0005ic_g10
- sdf0005ic_g11
- sdf0005ic_h3
- sdf0005ic_h4
- sdf0005ic_h5
- sdf0005ic_h6
- sdf0005ic_h7
- sdf0005ic_h8
- sdf0005ic_h9
- sdf0005ic_h11

Condições experimentais (CI):

tc = 44 horas

D = 5 mm (bordas)

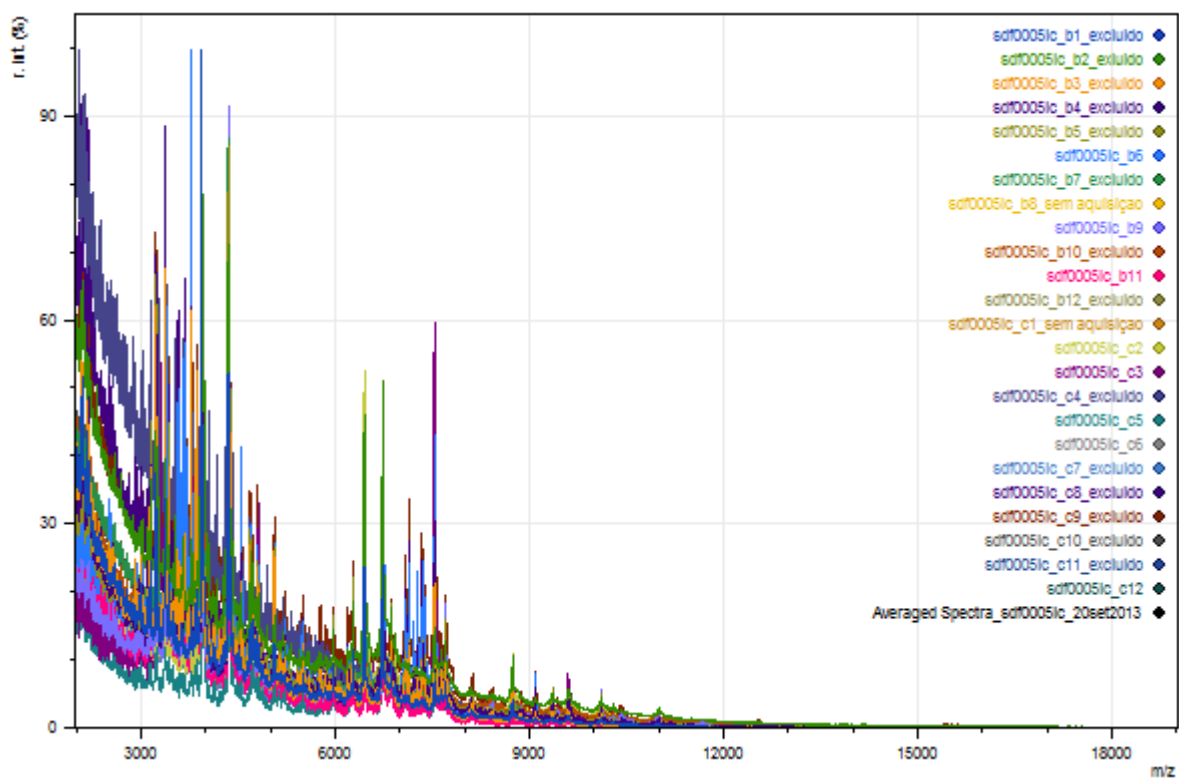
Cultivos = 2

Origem = alíquota Danilo diluída 21x

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0005ic_20set2013

Date	20set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	25793
		Peak List	389



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0005ic_b6
- sdf0005ic_b9
- sdf0005ic_b11
- sdf0005ic_c2
- sdf0005ic_c3
- sdf0005ic_c5
- sdf0005ic_c6
- sdf0005ic_c12

Condições experimentais - CI:

tc = 48 horas

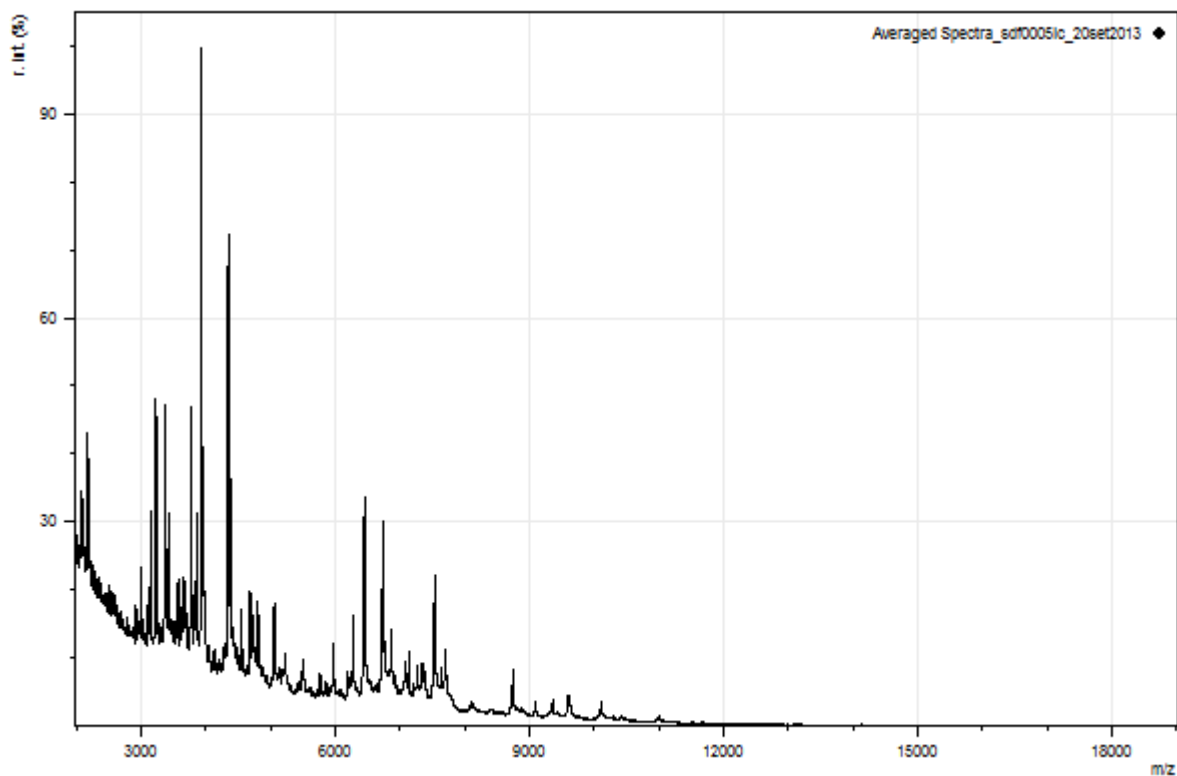
D = 7 mm (bordas)

Cultivos = 2

Origem = alíquota de trabalho Juliana

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0005ic_20set2013

Date	20set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	25793
		Peak List	389



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0005ic_b6
- sdf0005ic_b9
- sdf0005ic_b11
- sdf0005ic_c2
- sdf0005ic_c3
- sdf0005ic_c5
- sdf0005ic_c6
- sdf0005ic_c12

Condições experimentais - CI:

tc = 48 horas

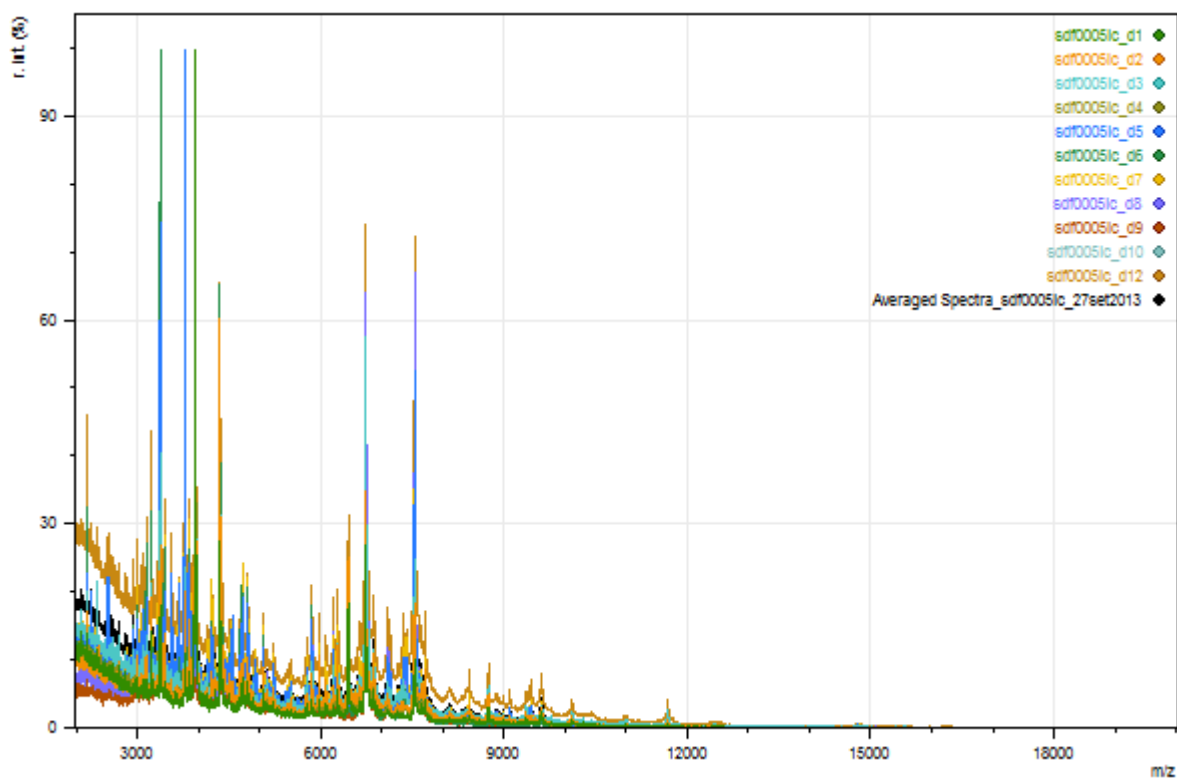
D = 7 mm (bordas)

Cultivos = 2

Origem = alíquota de trabalho Juliana

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0005ic_27set2013

Date	27set2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	112



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0005ic_d1
- sdf0005ic_d2
- sdf0005ic_d3
- sdf0005ic_d4
- sdf0005ic_d5
- sdf0005ic_d6
- sdf0005ic_d7
- sdf0005ic_d8
- sdf0005ic_d9
- sdf0005ic_d10
- sdf0005ic_d12

Condições experimentais - CI:

tc = 46 horas

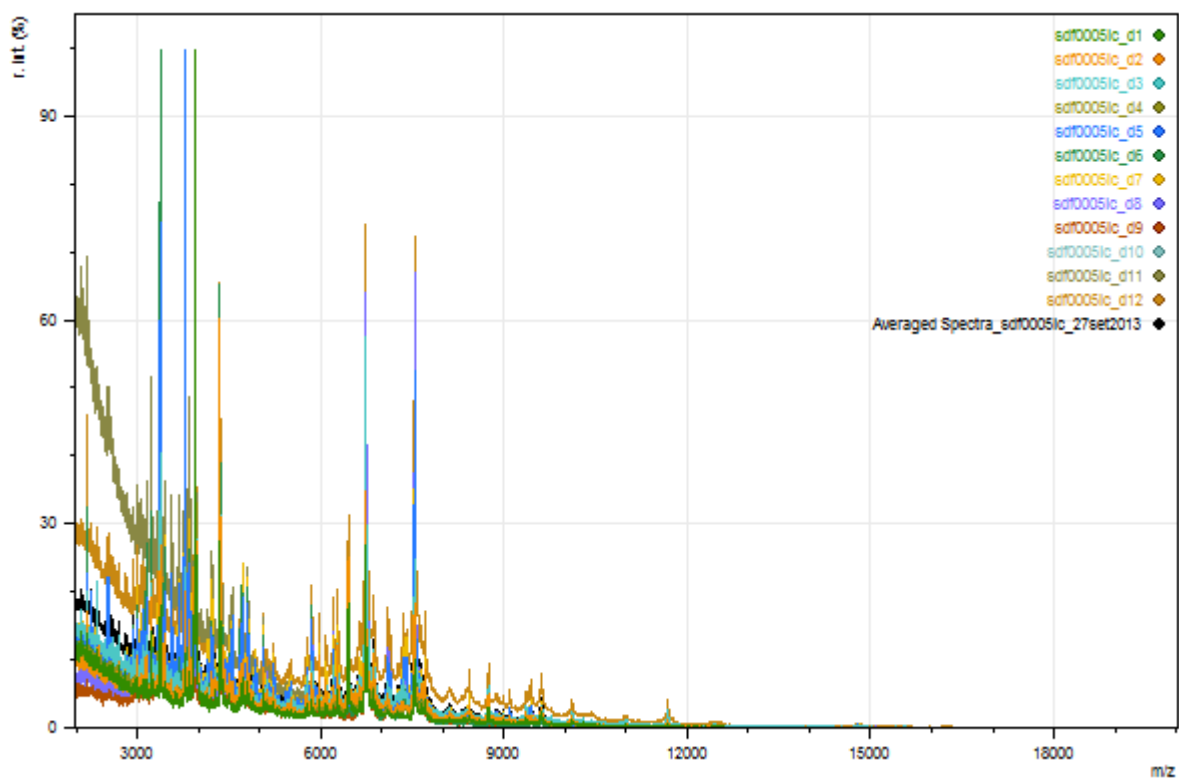
D = confluyente (bordas)

Cultivos = 1

Origem = alíquota estoque Danilo

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0005ic_27set2013

Date	27set2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	112



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0005ic_d1
- sdf0005ic_d2
- sdf0005ic_d3
- sdf0005ic_d4
- sdf0005ic_d5
- sdf0005ic_d6
- sdf0005ic_d7
- sdf0005ic_d8
- sdf0005ic_d9
- sdf0005ic_d10
- sdf0005ic_d12

Condições experimentais - CI:

tc = 46 horas

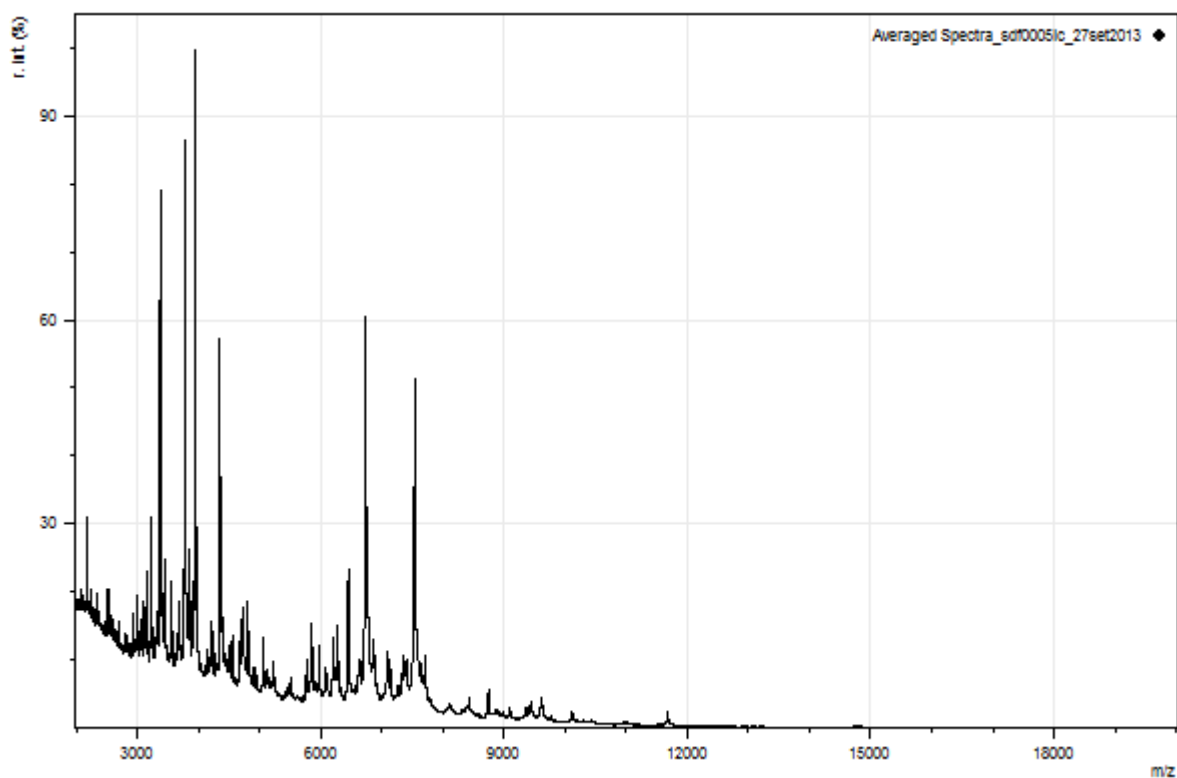
D = confluyente (bordas)

Cultivos = 1

Origem = alíquota estoque Danilo

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0005ic_27set2013

Date	27set2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	112

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0005ic_d1
- sdf0005ic_d2
- sdf0005ic_d3
- sdf0005ic_d4
- sdf0005ic_d5
- sdf0005ic_d6
- sdf0005ic_d7
- sdf0005ic_d8
- sdf0005ic_d9
- sdf0005ic_d10
- sdf0005ic_d12

Condições experimentais - CI:

tc = 46 horas

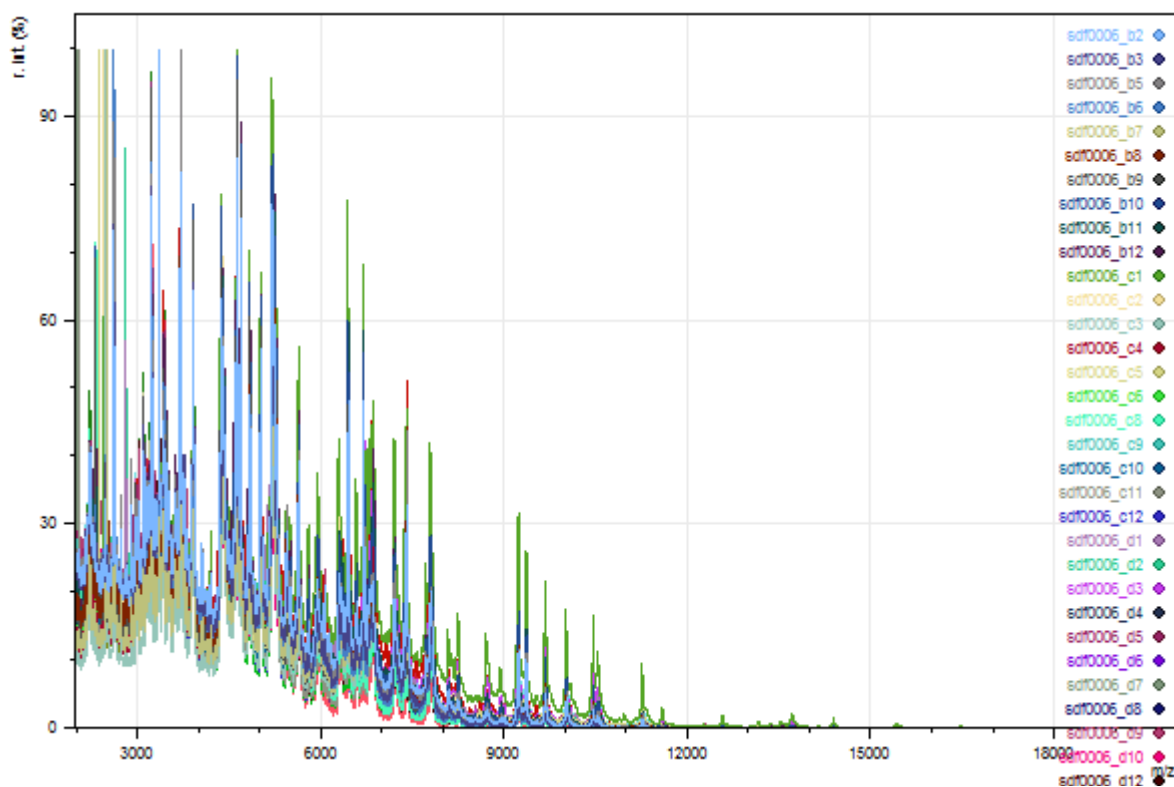
D = confluyente (bordas)

Cultivos = 1

Origem = alíquota estoque Danilo

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0006_05ago2014

Date	05ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	89

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0006_b2
- sdf0006_b3
- sdf0006_b5
- sdf0006_b6
- sdf0006_b7
- sdf0006_b8
- sdf0006_b9
- sdf0006_b10
- sdf0006_b11
- sdf0006_b12
- sdf0006_c1
- sdf0006_c2
- sdf0006_c3
- sdf0006_c4
- sdf0006_c5
- sdf0006_c6
- sdf0006_c8
- sdf0006_c9
- sdf0006_c10
- sdf0006_c11
- sdf0006_c12
- sdf0006_d1

- sdf0006_d2
- sdf0006_d3
- sdf0006_d4
- sdf0006_d5
- sdf0006_d6
- sdf0006_d7
- sdf0006_d8
- sdf0006_d9
- sdf0006_d10
- sdf0006_d12
- sdf0006_e5
- sdf0006_e6
- sdf0006_e7
- sdf0006_e8
- sdf0006_e9
- sdf0006_e10
- sdf0006_e11
- sdf0006_e12
- sdf0006_f1
- sdf0006_f2
- sdf0006_f3
- sdf0006_f4
- sdf0006_f8
- sdf0006_f9
- sdf0006_f10
- sdf0006_f11
- sdf0006_f12

Condições experimentais:

tc = 24 horas

D >10 mm (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = sem registro

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = sem registro

Dissolução em AF = sem registro

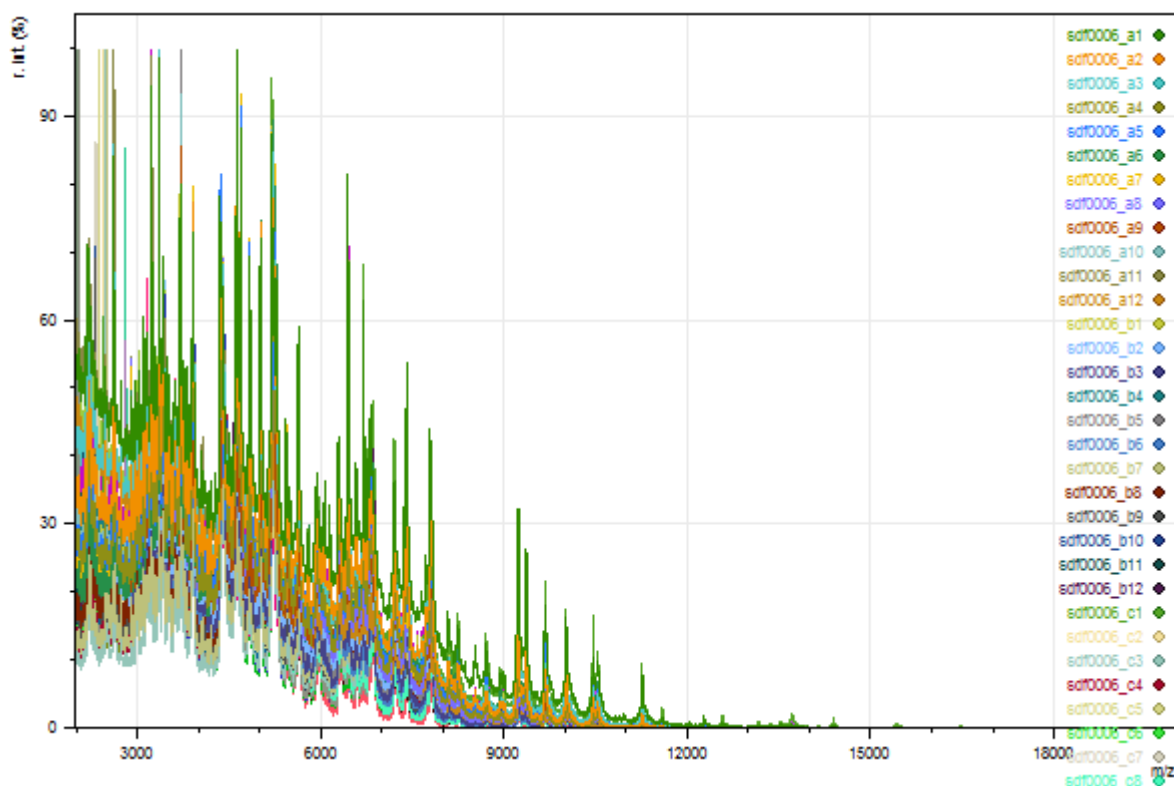
Cultivos = 3 (1 EP/4 spots)

Origem = RP 14 - 05ago14 (reisolados de cultivo da Juliana)

Ponto de interrupção = etanol

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0006_05ago2014

Date	05ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	89

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0006_b2
- sdf0006_b3
- sdf0006_b5
- sdf0006_b6
- sdf0006_b7
- sdf0006_b8
- sdf0006_b9
- sdf0006_b10
- sdf0006_b11
- sdf0006_b12
- sdf0006_c1
- sdf0006_c2
- sdf0006_c3
- sdf0006_c4
- sdf0006_c5
- sdf0006_c6
- sdf0006_c8
- sdf0006_c9
- sdf0006_c10
- sdf0006_c11
- sdf0006_c12
- sdf0006_d1

- sdf0006_d2
- sdf0006_d3
- sdf0006_d4
- sdf0006_d5
- sdf0006_d6
- sdf0006_d7
- sdf0006_d8
- sdf0006_d9
- sdf0006_d10
- sdf0006_d12
- sdf0006_e5
- sdf0006_e6
- sdf0006_e7
- sdf0006_e8
- sdf0006_e9
- sdf0006_e10
- sdf0006_e11
- sdf0006_e12
- sdf0006_f1
- sdf0006_f2
- sdf0006_f3
- sdf0006_f4
- sdf0006_f8
- sdf0006_f9
- sdf0006_f10
- sdf0006_f11
- sdf0006_f12

Condições experimentais:

tc = 24 horas

D >10 mm (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = sem registro

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = sem registro

Dissolução em AF = sem registro

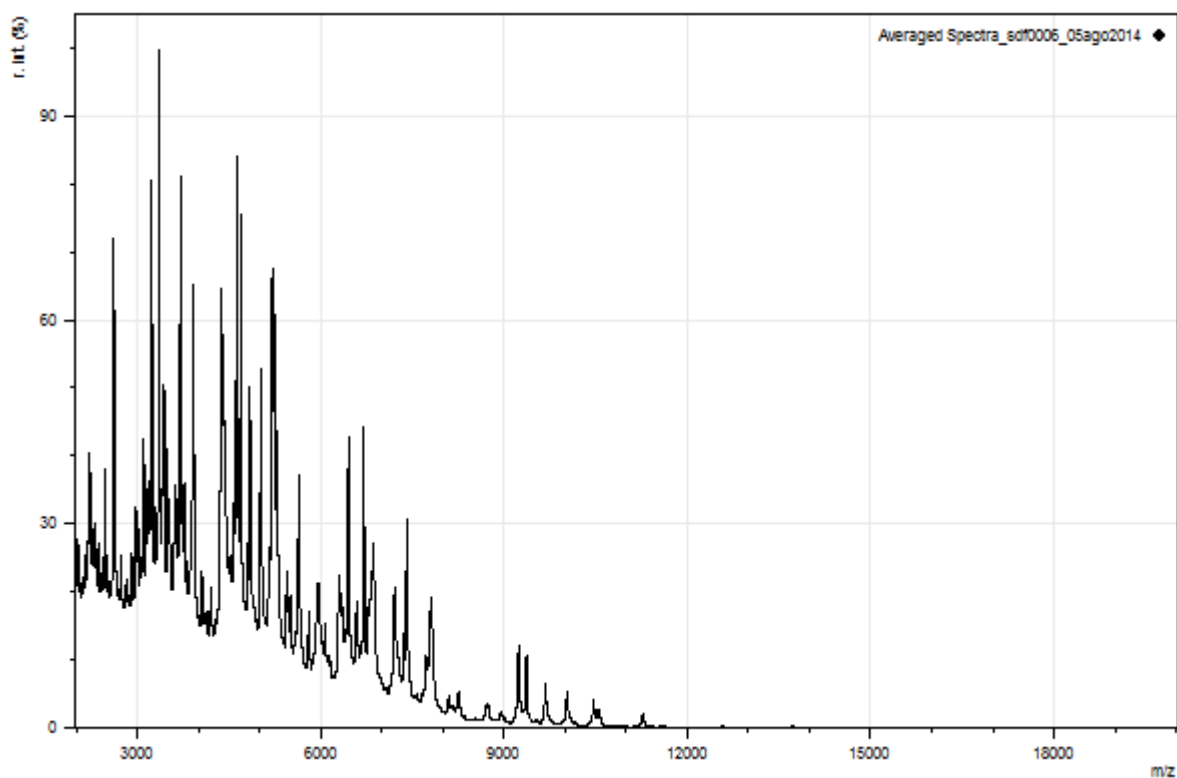
Cultivos = 3 (1 EP/4 spots)

Origem = RP 14 - 05ago14 (reisolados de cultivo da Juliana)

Ponto de interrupção = etanol

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0006_05ago2014

Date	05ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	89

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0006_b2
- sdf0006_b3
- sdf0006_b5
- sdf0006_b6
- sdf0006_b7
- sdf0006_b8
- sdf0006_b9
- sdf0006_b10
- sdf0006_b11
- sdf0006_b12
- sdf0006_c1
- sdf0006_c2
- sdf0006_c3
- sdf0006_c4
- sdf0006_c5
- sdf0006_c6
- sdf0006_c8
- sdf0006_c9
- sdf0006_c10
- sdf0006_c11
- sdf0006_c12
- sdf0006_d1

- sdf0006_d2
- sdf0006_d3
- sdf0006_d4
- sdf0006_d5
- sdf0006_d6
- sdf0006_d7
- sdf0006_d8
- sdf0006_d9
- sdf0006_d10
- sdf0006_d12
- sdf0006_e5
- sdf0006_e6
- sdf0006_e7
- sdf0006_e8
- sdf0006_e9
- sdf0006_e10
- sdf0006_e11
- sdf0006_e12
- sdf0006_f1
- sdf0006_f2
- sdf0006_f3
- sdf0006_f4
- sdf0006_f8
- sdf0006_f9
- sdf0006_f10
- sdf0006_f11
- sdf0006_f12

Condições experimentais:

tc = 24 horas

D >10 mm (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = sem registro

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = sem registro

Dissolução em AF = sem registro

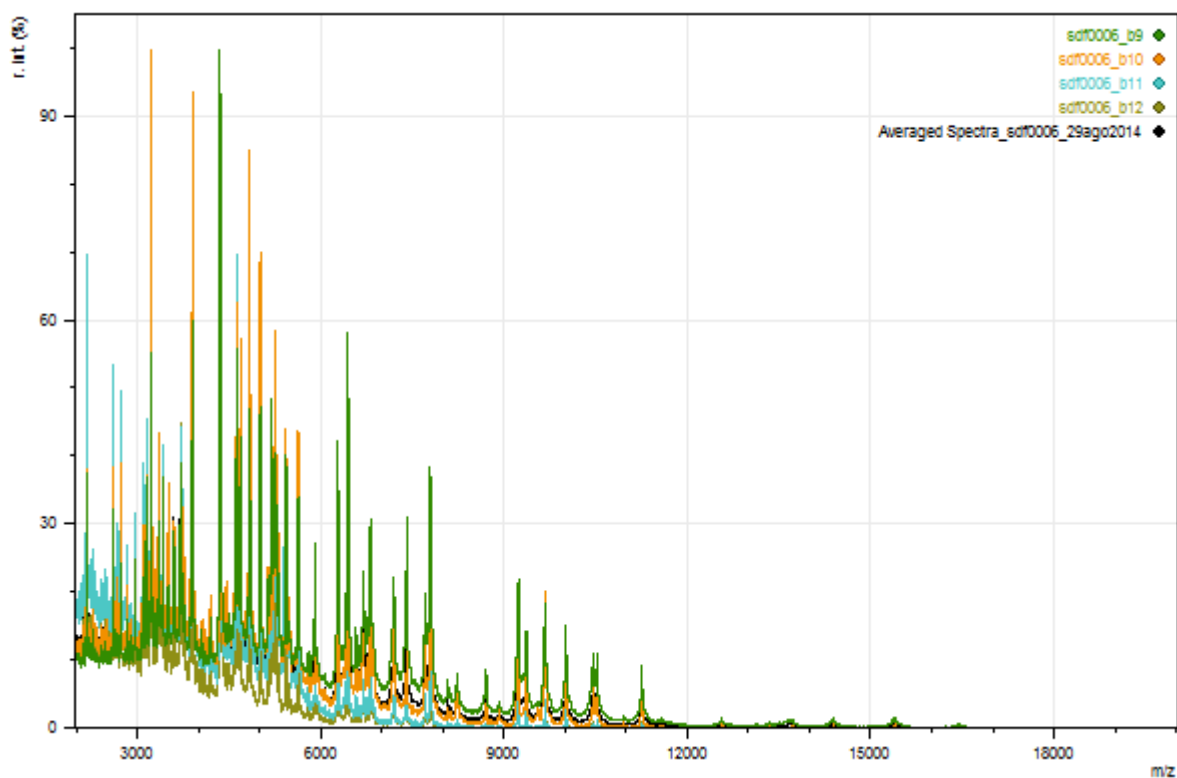
Cultivos = 3 (1 EP/4 spots)

Origem = RP 14 - 05ago14 (reisolados de cultivo da Juliana)

Ponto de interrupção = etanol

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0006_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	146

**Notes**

Averaged Spectra:

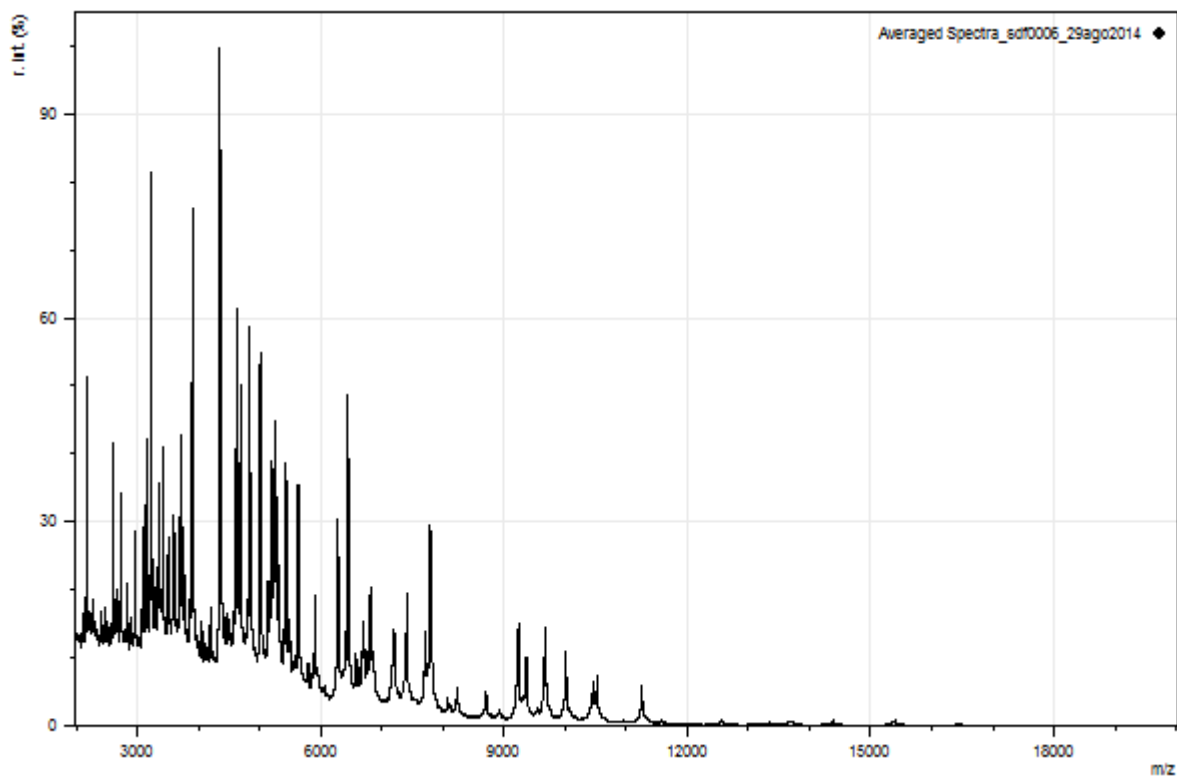
- sdf0006_b9
- sdf0006_b10
- sdf0006_b11
- sdf0006_b12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas
D = 10 mm (bordas)
Tempo até aplicação do extrato = 7h30min
Dissolução em água = sem registro
Dissolução em AcN = Ruim
Dissolução em AF = sem registro
Cultivos = 1
Origem = RP 11 - 28ago2014
Ponto de interrupção = etanol

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0006_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	146

**Notes**

Averaged Spectra:

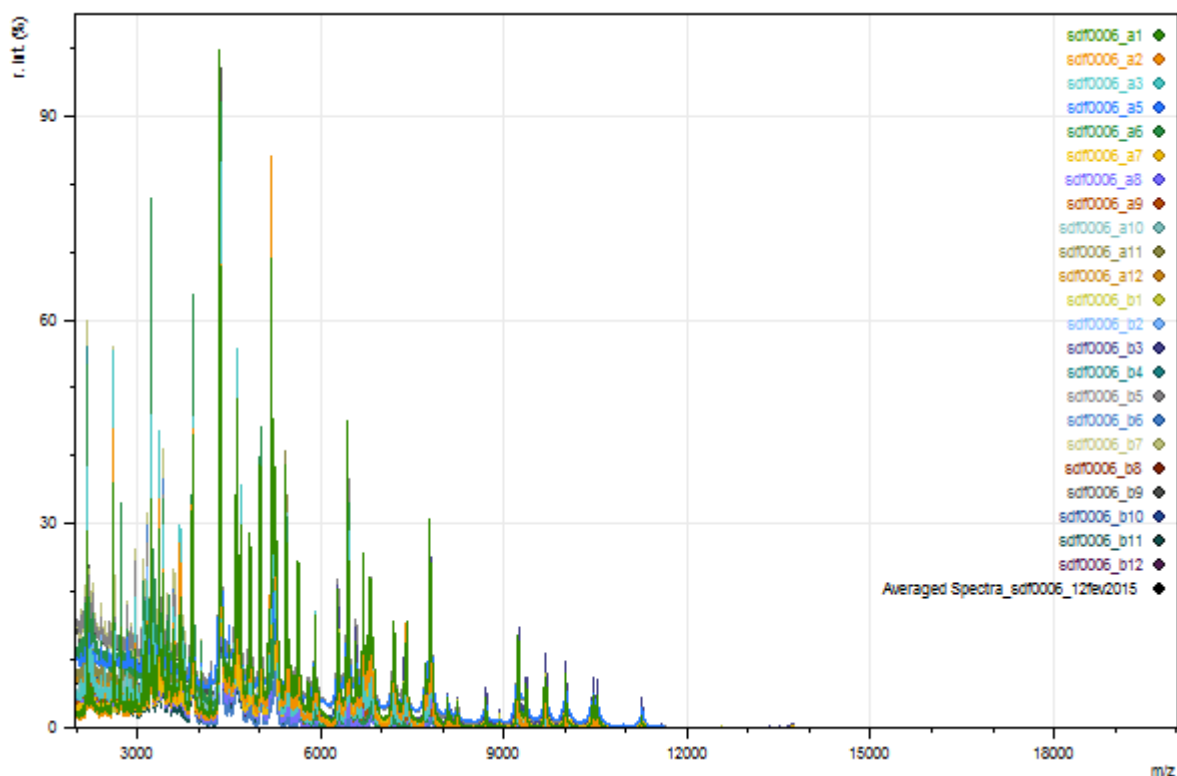
- sdf0006_b9
- sdf0006_b10
- sdf0006_b11
- sdf0006_b12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas
D = 10 mm (bordas)
Tempo até aplicação do extrato = 7h30min
Dissolução em água = sem registro
Dissolução em AcN = Ruim
Dissolução em AF = sem registro
Cultivos = 1
Origem = RP 11 - 28ago2014
Ponto de interrupção = etanol

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0006_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	89

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0006_a1
- sdf0006_a2
- sdf0006_a3
- sdf0006_a5
- sdf0006_a6
- sdf0006_a7
- sdf0006_a8
- sdf0006_a9
- sdf0006_a10
- sdf0006_a11
- sdf0006_a12
- sdf0006_b1
- sdf0006_b2
- sdf0006_b3
- sdf0006_b4
- sdf0006_b5
- sdf0006_b6
- sdf0006_b7
- sdf0006_b8
- sdf0006_b9
- sdf0006_b10
- sdf0006_b11

- sdf0006_b12

Condições experimentais:

tc = 37 horas

D = 6 mm (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = 7 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 6

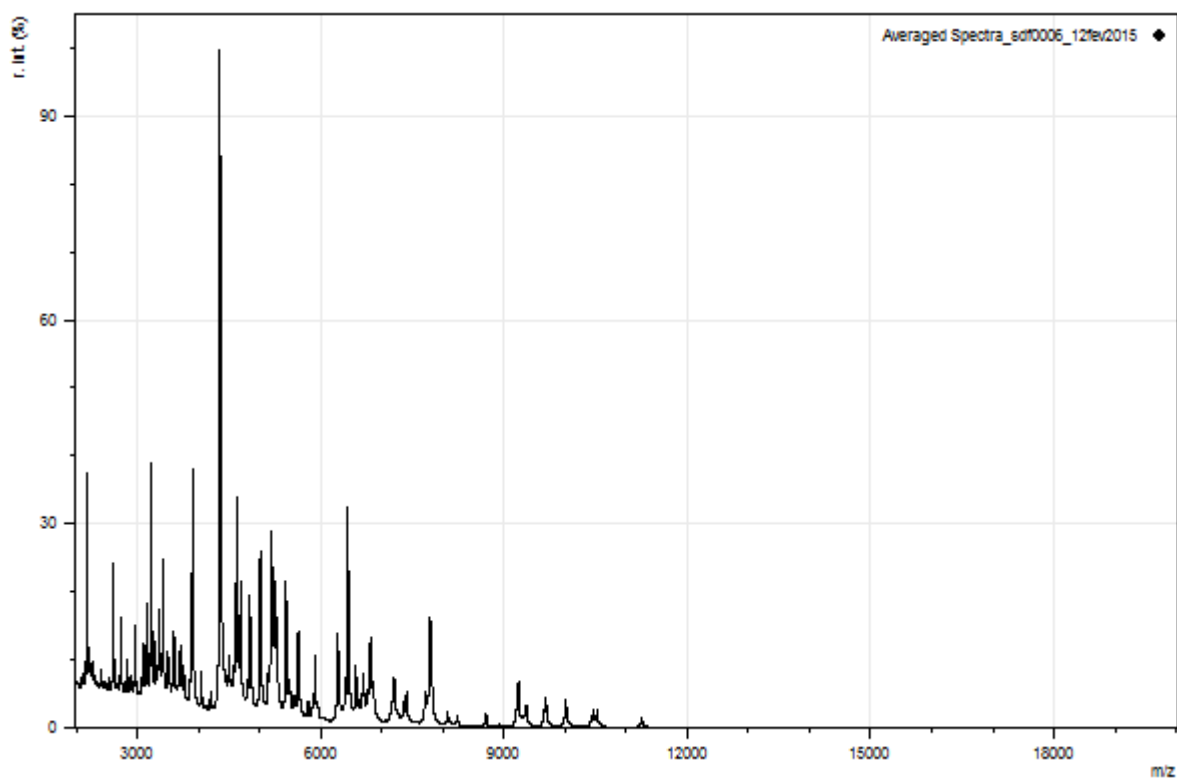
Origem = RP 11 - 12fev2015

Ponto de interrupção = AF

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0006_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	89

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0006_a1
- sdf0006_a2
- sdf0006_a3
- sdf0006_a5
- sdf0006_a6
- sdf0006_a7
- sdf0006_a8
- sdf0006_a9
- sdf0006_a10
- sdf0006_a11
- sdf0006_a12
- sdf0006_b1
- sdf0006_b2
- sdf0006_b3
- sdf0006_b4
- sdf0006_b5
- sdf0006_b6
- sdf0006_b7
- sdf0006_b8
- sdf0006_b9
- sdf0006_b10
- sdf0006_b11

- sdf0006_b12

Condições experimentais:

tc = 37 horas

D = 6 mm (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = 7 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 6

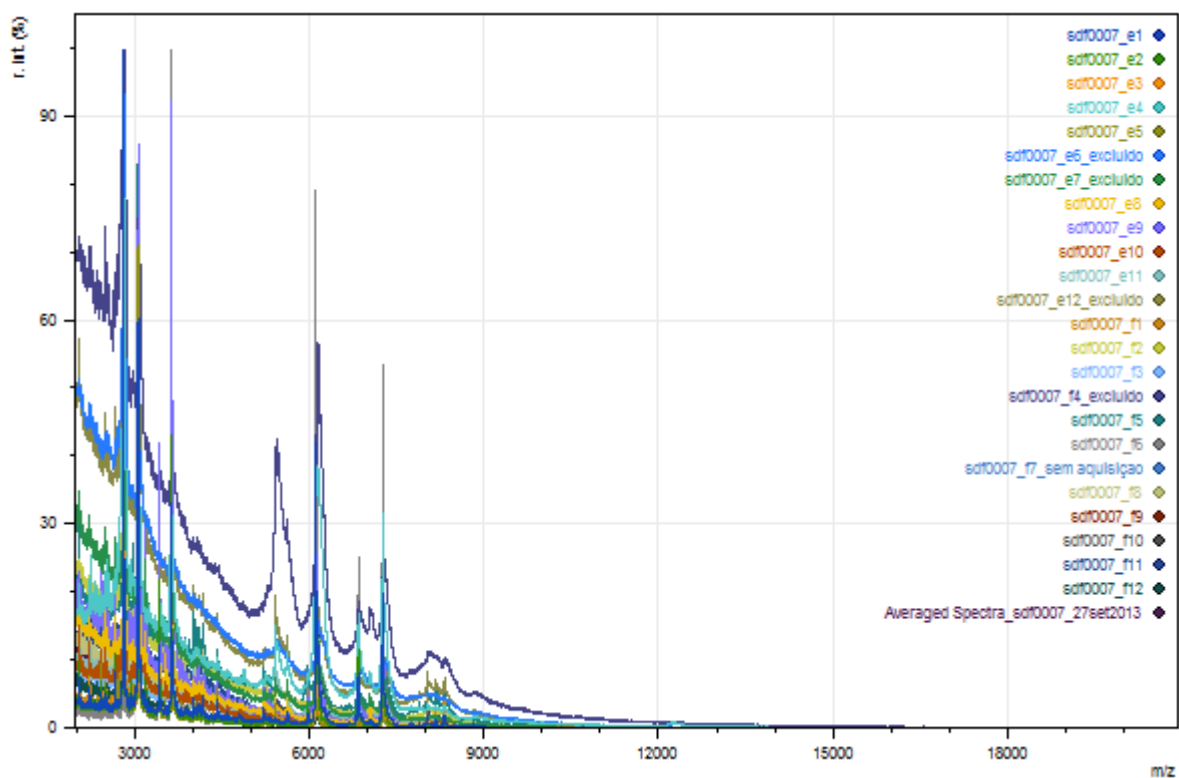
Origem = RP 11 - 12fev2015

Ponto de interrupção = AF

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0007_27set2013

Date	27set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0007_e1
- sdf0007_e2
- sdf0007_e3
- sdf0007_e4
- sdf0007_e5
- sdf0007_e8
- sdf0007_e9
- sdf0007_e10
- sdf0007_e11
- sdf0007_f1
- sdf0007_f2
- sdf0007_f3
- sdf0007_f5
- sdf0007_f6
- sdf0007_f8
- sdf0007_f9
- sdf0007_f10
- sdf0007_f11
- sdf0007_f12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

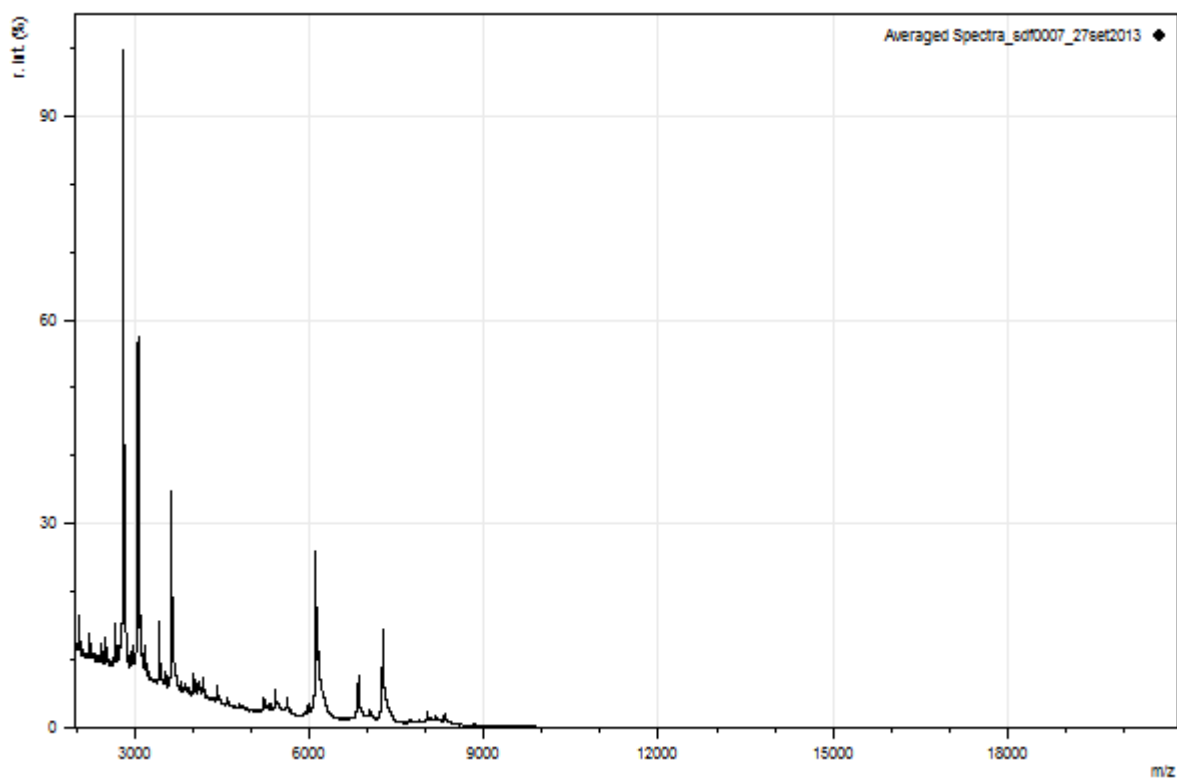
tc = 46 horas

D = 3 mm - confluente (partes aleatórias)
Cultivos = 2
Origem = Estoque Danilo

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0007_27set2013

Date	27set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0007_e1
- sdf0007_e2
- sdf0007_e3
- sdf0007_e4
- sdf0007_e5
- sdf0007_e8
- sdf0007_e9
- sdf0007_e10
- sdf0007_e11
- sdf0007_f1
- sdf0007_f2
- sdf0007_f3
- sdf0007_f5
- sdf0007_f6
- sdf0007_f8
- sdf0007_f9
- sdf0007_f10
- sdf0007_f11
- sdf0007_f12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

tc = 46 horas

D = 3 mm - confluente (partes aleatórias)

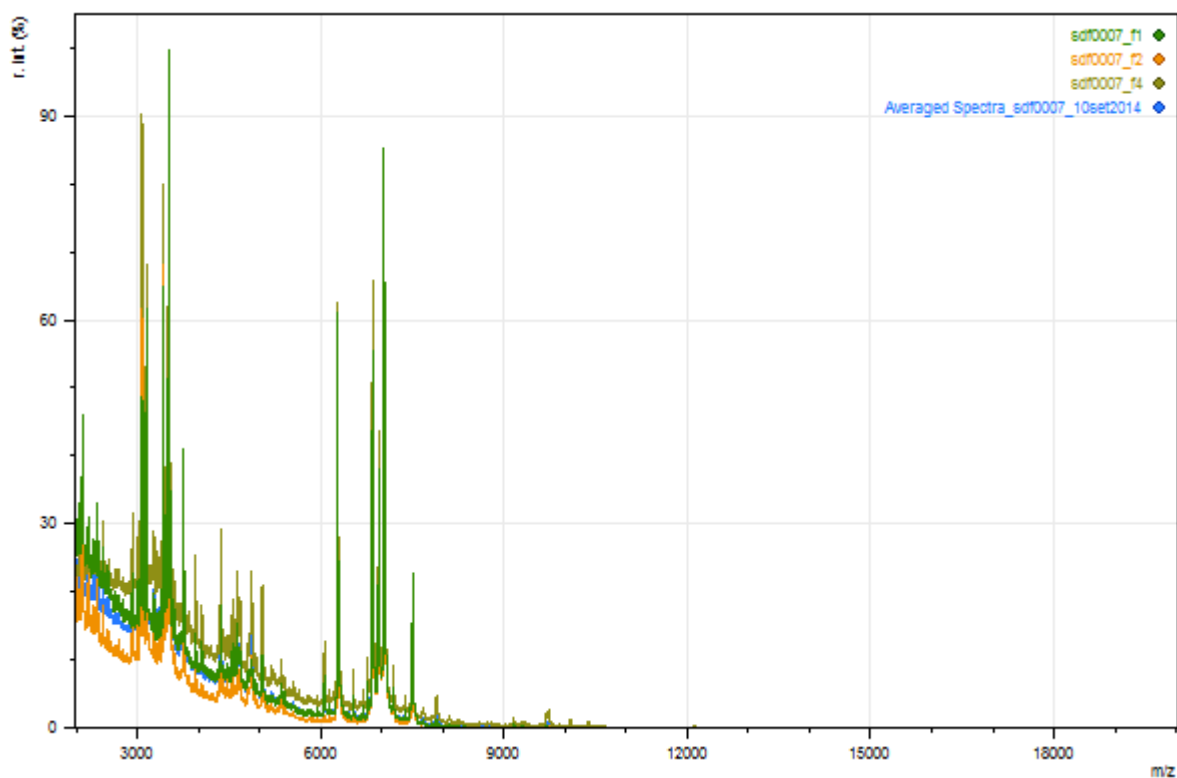
Cultivos = 2

Origem = Estoque Danilo

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0007_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	101

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0007_f1
- sdf0007_f2
- sdf0007_f4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 3 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Boa

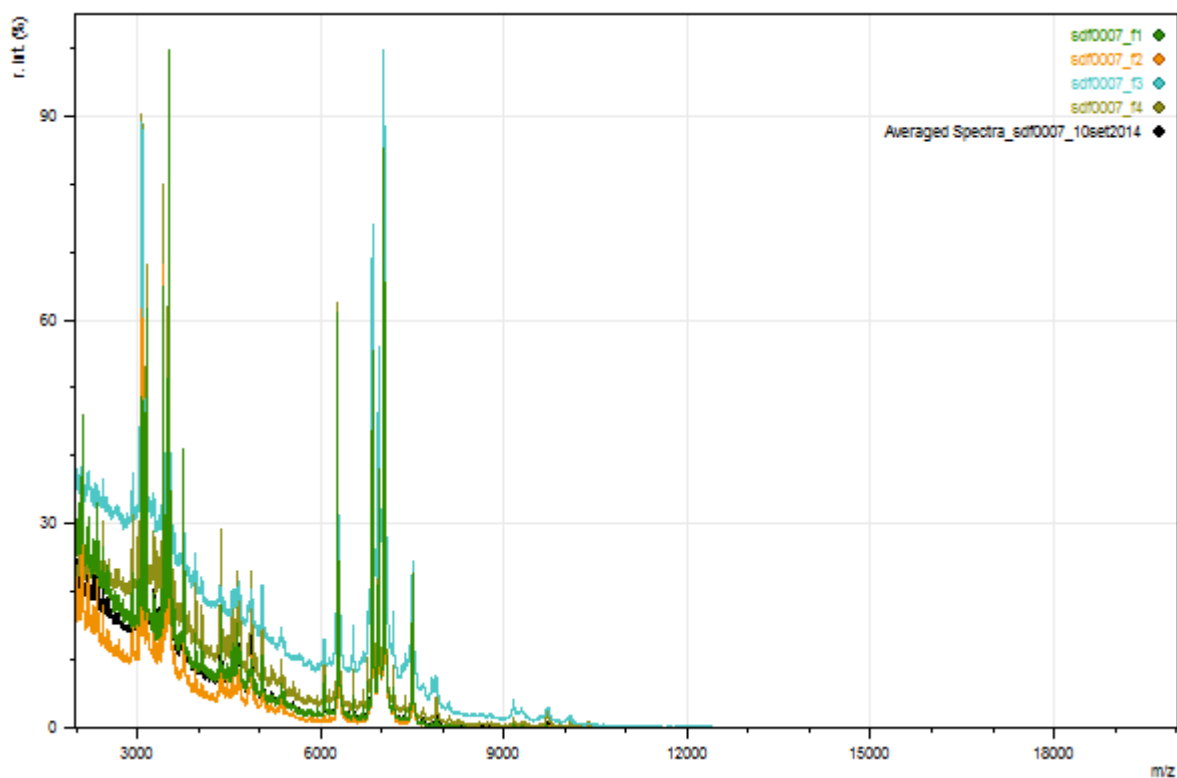
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

Ponto de interrupção = AF

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0007_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	101

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0007_f1
- sdf0007_f2
- sdf0007_f4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 3 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Boa

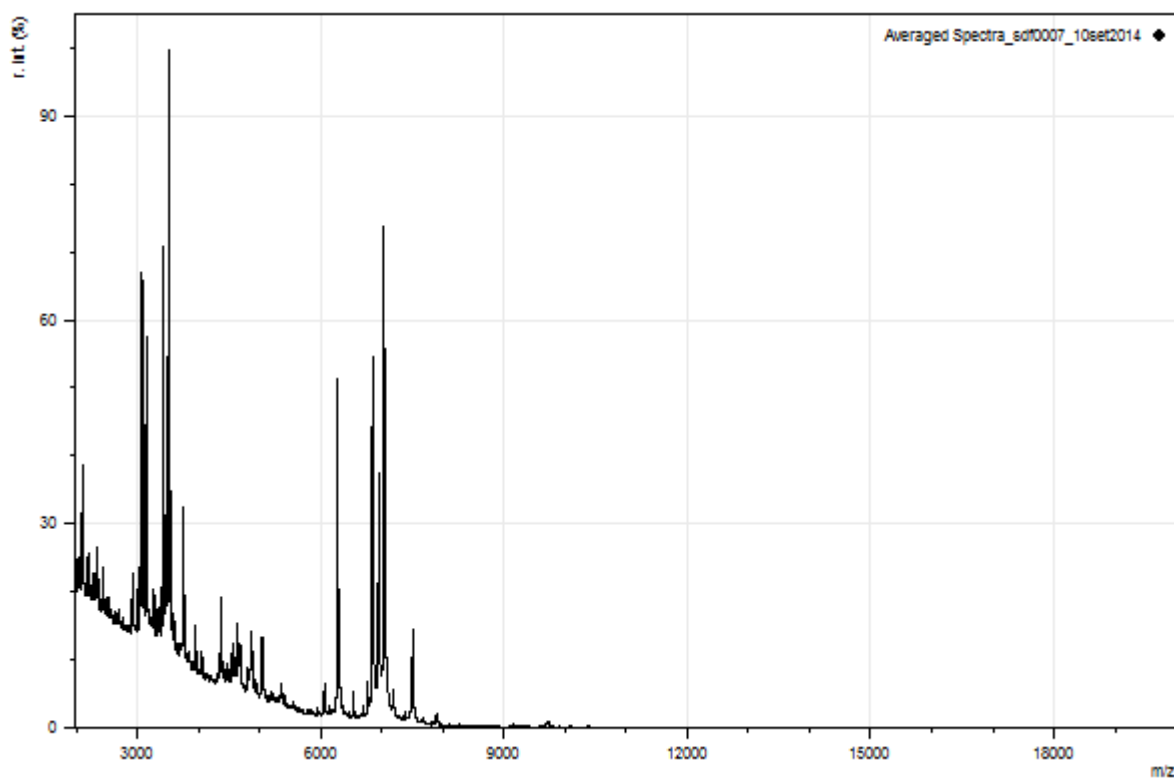
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

Ponto de interrupção = AF

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0007_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	101

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0007_f1
- sdf0007_f2
- sdf0007_f4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 3 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Boa

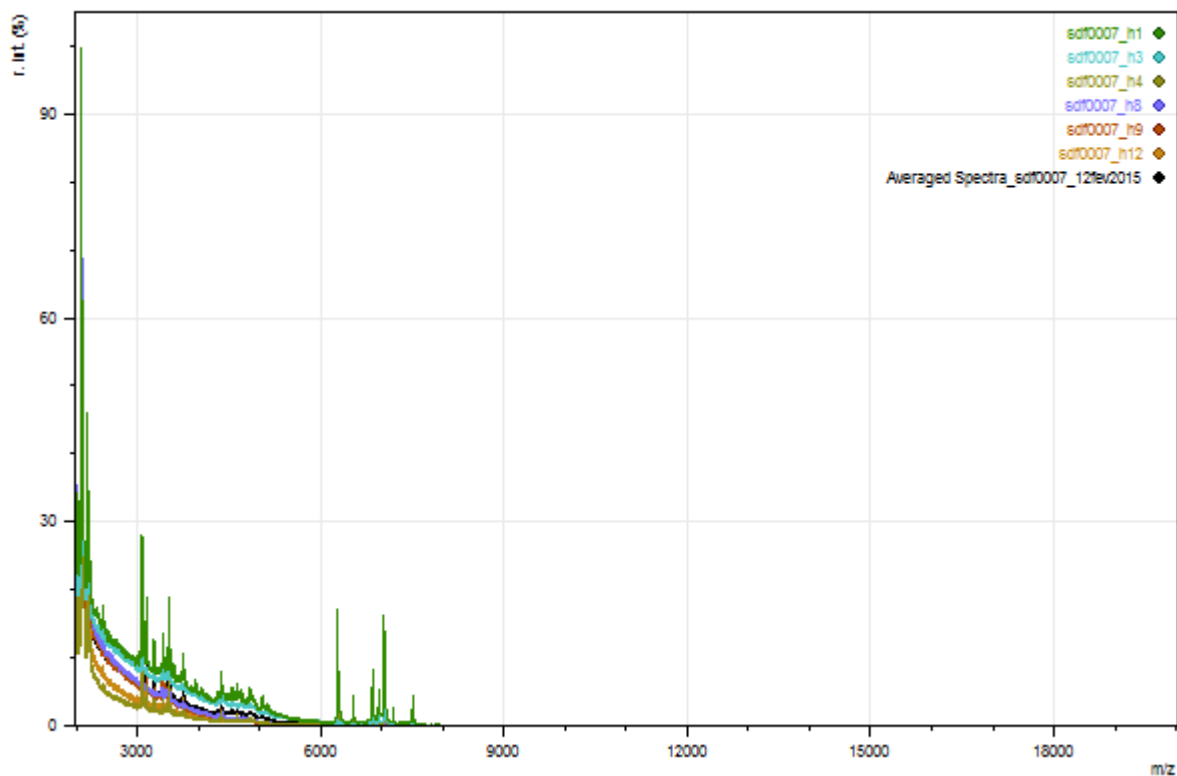
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

Ponto de interrupção = AF

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0007_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	39



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0007_h1
- sdf0007_h3
- sdf0007_h4
- sdf0007_h8
- sdf0007_h9
- sdf0007_h12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 41 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 4 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

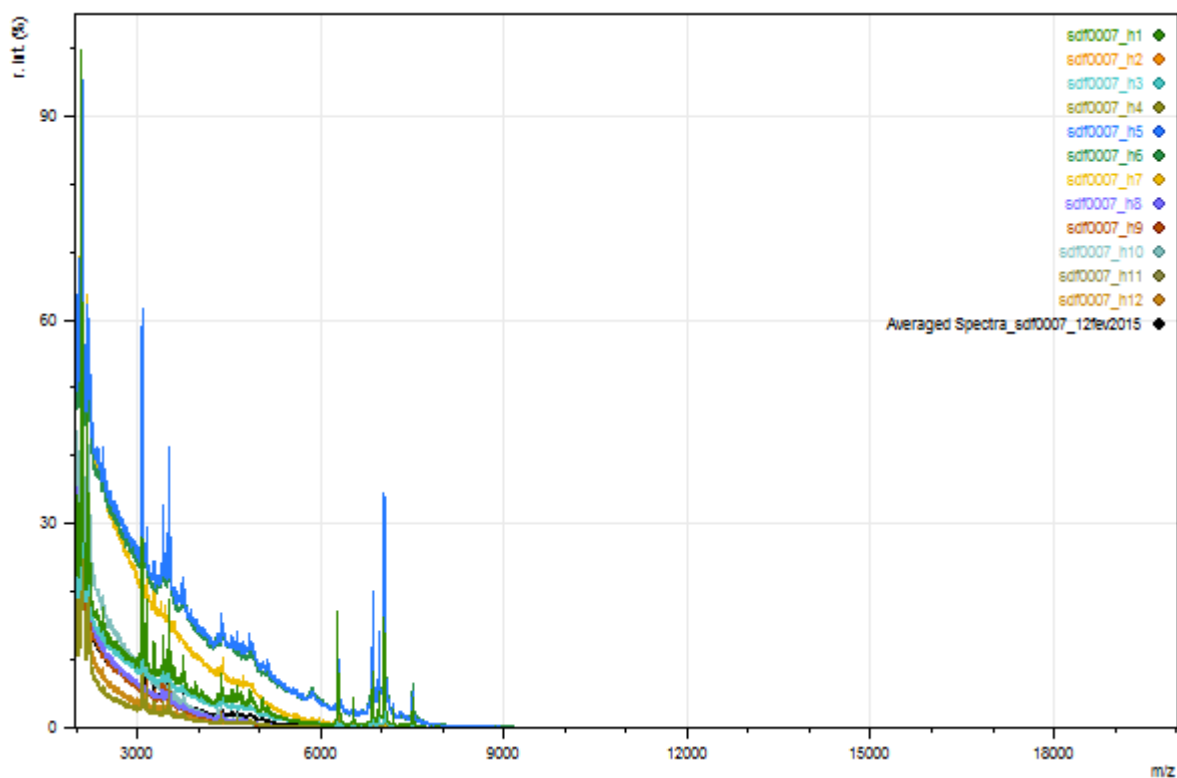
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 3

Origem = RP 11 - 12fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0007_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	39



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0007_h1
- sdf0007_h3
- sdf0007_h4
- sdf0007_h8
- sdf0007_h9
- sdf0007_h12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 41 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 4 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

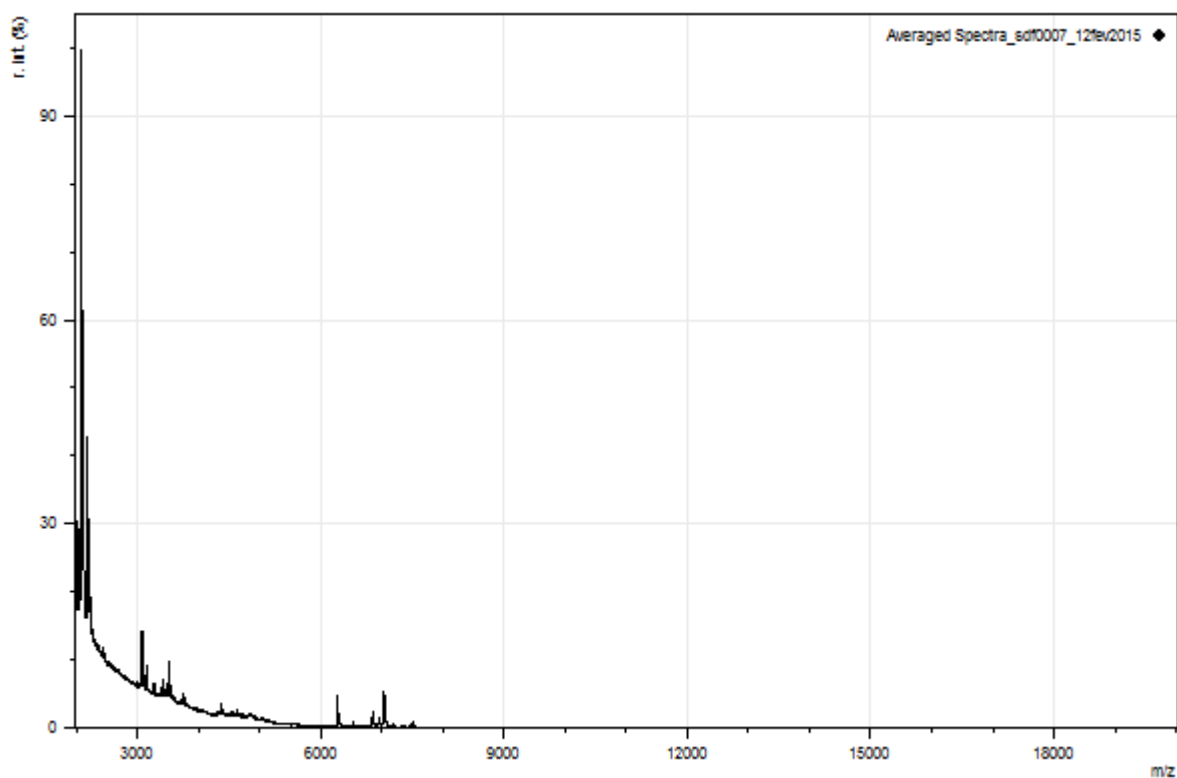
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 3

Origem = RP 11 - 12fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0007_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	39

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0007_h1
- sdf0007_h3
- sdf0007_h4
- sdf0007_h8
- sdf0007_h9
- sdf0007_h12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 41 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 4 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

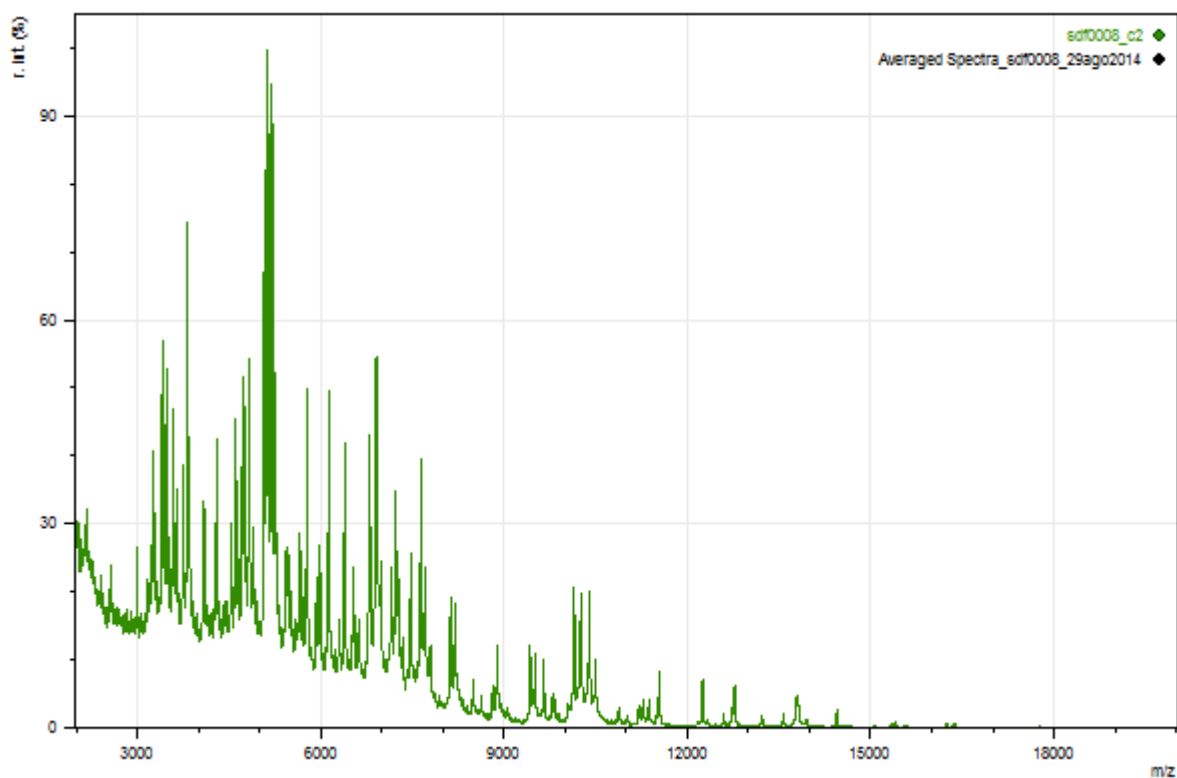
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 3

Origem = RP 11 - 12fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0008_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	216

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0008_c2

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

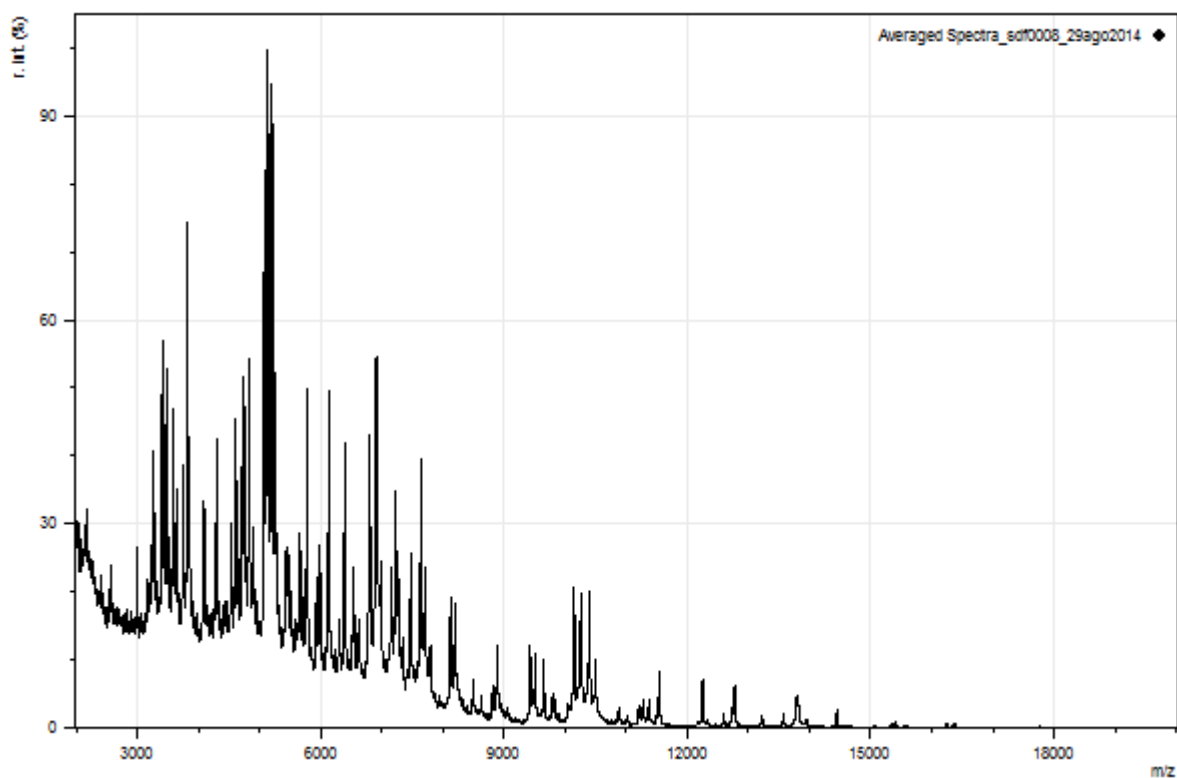
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0008_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	216

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0008_c2

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

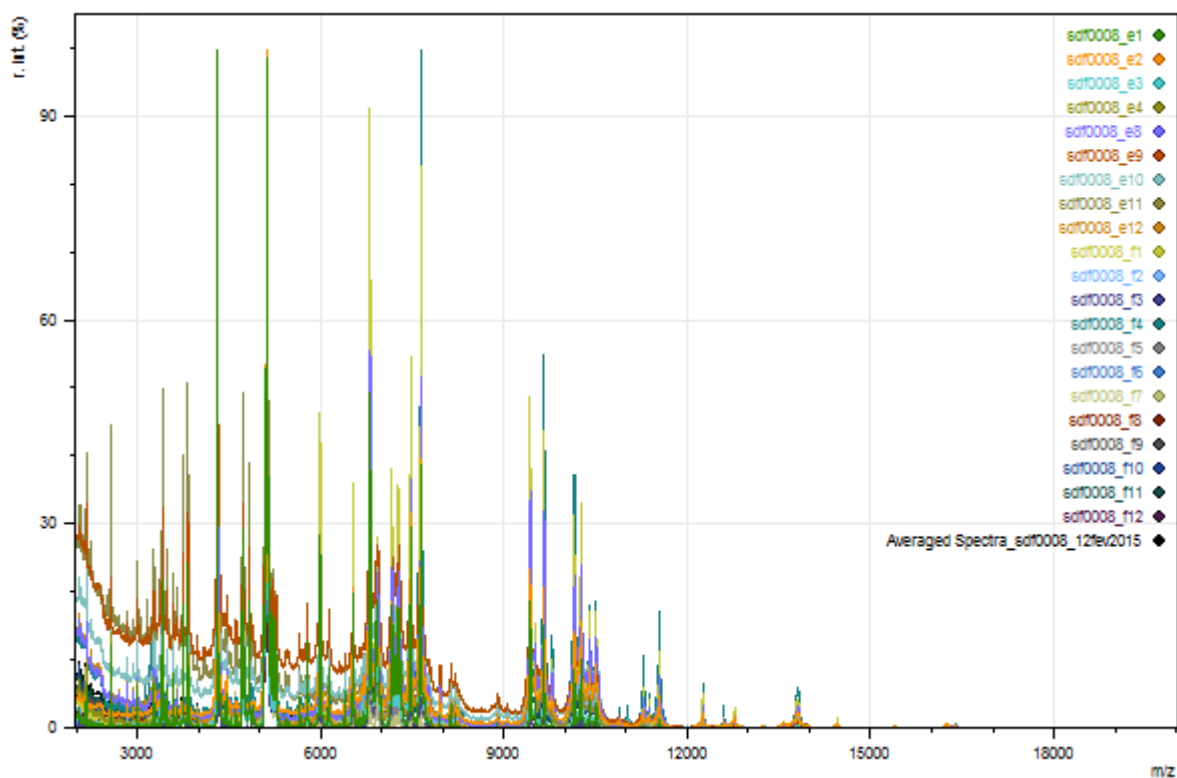
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0008_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	70

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0008_e1
- sdf0008_e2
- sdf0008_e3
- sdf0008_e4
- sdf0008_e8
- sdf0008_e9
- sdf0008_e10
- sdf0008_e11
- sdf0008_e12
- sdf0008_f1
- sdf0008_f2
- sdf0008_f3
- sdf0008_f4
- sdf0008_f5
- sdf0008_f6
- sdf0008_f7
- sdf0008_f8
- sdf0008_f9
- sdf0008_f10
- sdf0008_f11
- sdf0008_f12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 40 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

Tempo até aplicação do extrato = 5 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

Dissolução em AF = Boa

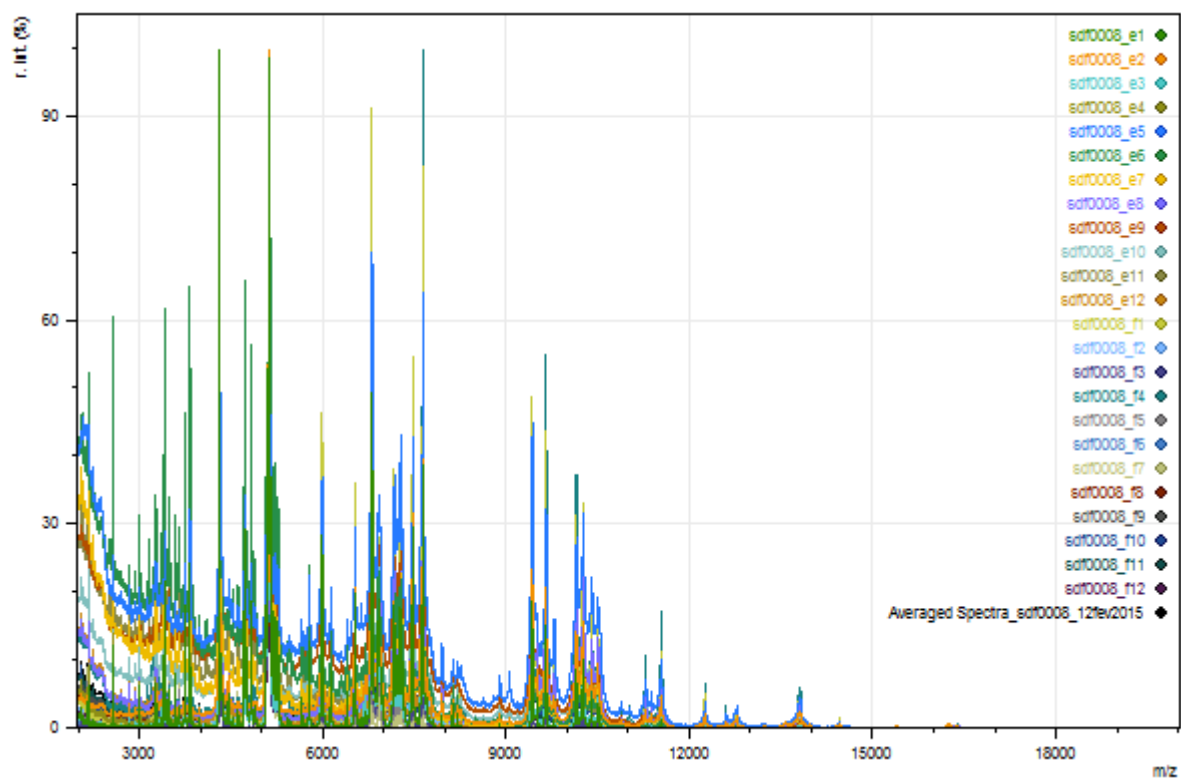
Cultivos = 6

Origem = RP 11 - 12fev2015

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0008_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	70

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0008_e1
- sdf0008_e2
- sdf0008_e3
- sdf0008_e4
- sdf0008_e8
- sdf0008_e9
- sdf0008_e10
- sdf0008_e11
- sdf0008_e12
- sdf0008_f1
- sdf0008_f2
- sdf0008_f3
- sdf0008_f4
- sdf0008_f5
- sdf0008_f6
- sdf0008_f7
- sdf0008_f8
- sdf0008_f9
- sdf0008_f10
- sdf0008_f11
- sdf0008_f12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 40 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

Tempo até aplicação do extrato = 5 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

Dissolução em AF = Boa

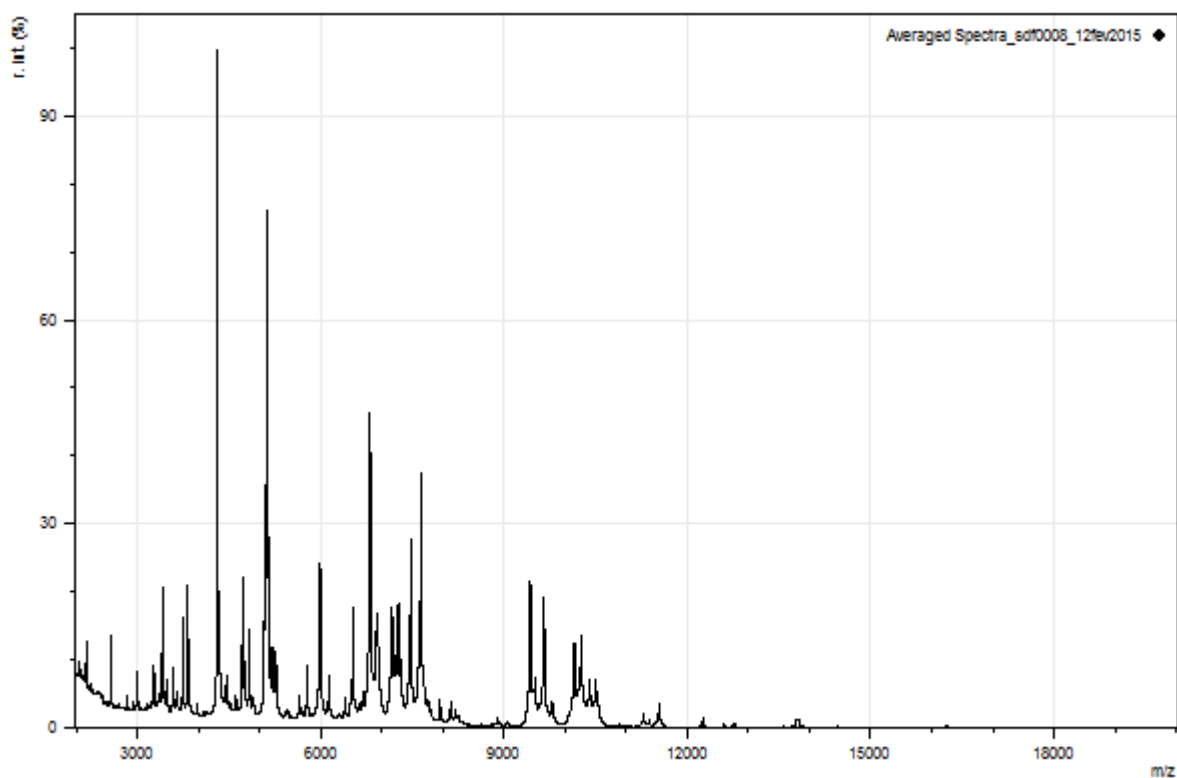
Cultivos = 6

Origem = RP 11 - 12fev2015

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0008_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	70

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0008_e1
- sdf0008_e2
- sdf0008_e3
- sdf0008_e4
- sdf0008_e8
- sdf0008_e9
- sdf0008_e10
- sdf0008_e11
- sdf0008_e12
- sdf0008_f1
- sdf0008_f2
- sdf0008_f3
- sdf0008_f4
- sdf0008_f5
- sdf0008_f6
- sdf0008_f7
- sdf0008_f8
- sdf0008_f9
- sdf0008_f10
- sdf0008_f11
- sdf0008_f12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 40 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

Tempo até aplicação do extrato = 5 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

Dissolução em AF = Boa

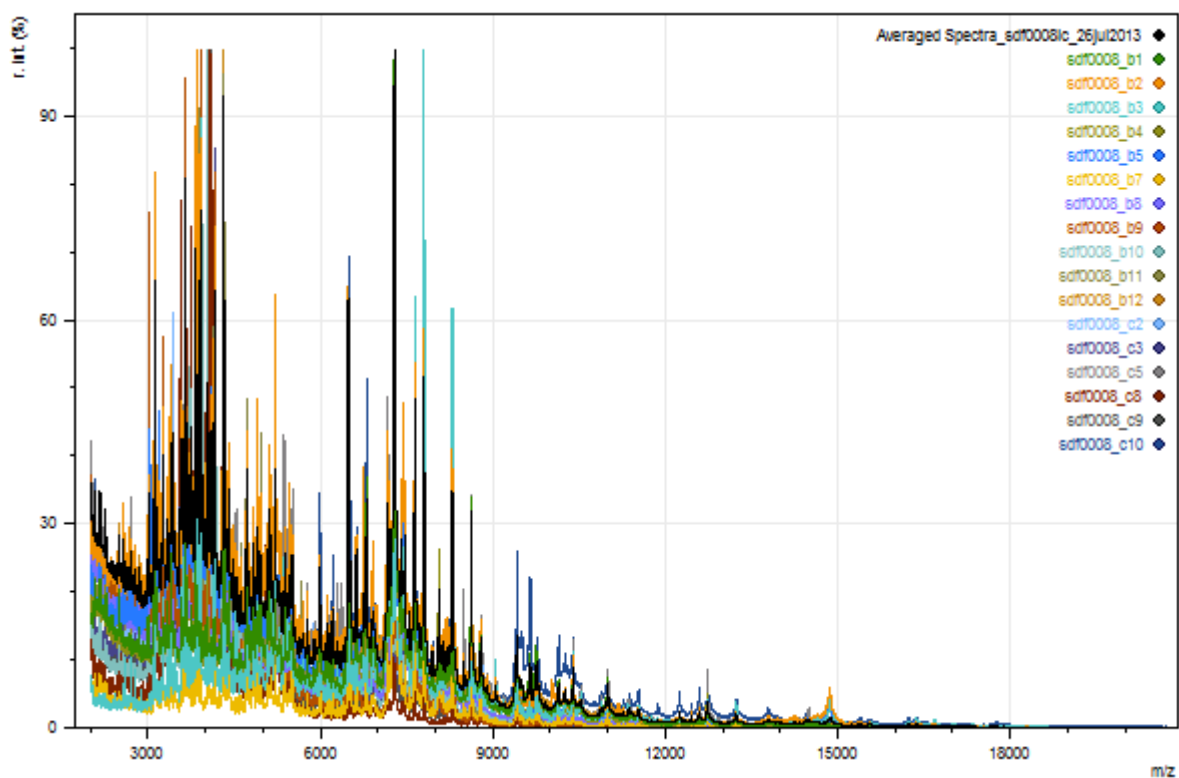
Cultivos = 6

Origem = RP 11 - 12fev2015

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0008ic_26jul2013

Date	26jul2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	141

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0008_b1
- sdf0008_b2
- sdf0008_b3
- sdf0008_b4
- sdf0008_b5
- sdf0008_b7
- sdf0008_b8
- sdf0008_b9
- sdf0008_b10
- sdf0008_b11
- sdf0008_b12
- sdf0008_c2
- sdf0008_c3
- sdf0008_c5
- sdf0008_c8
- sdf0008_c9
- sdf0008_c10

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 75 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

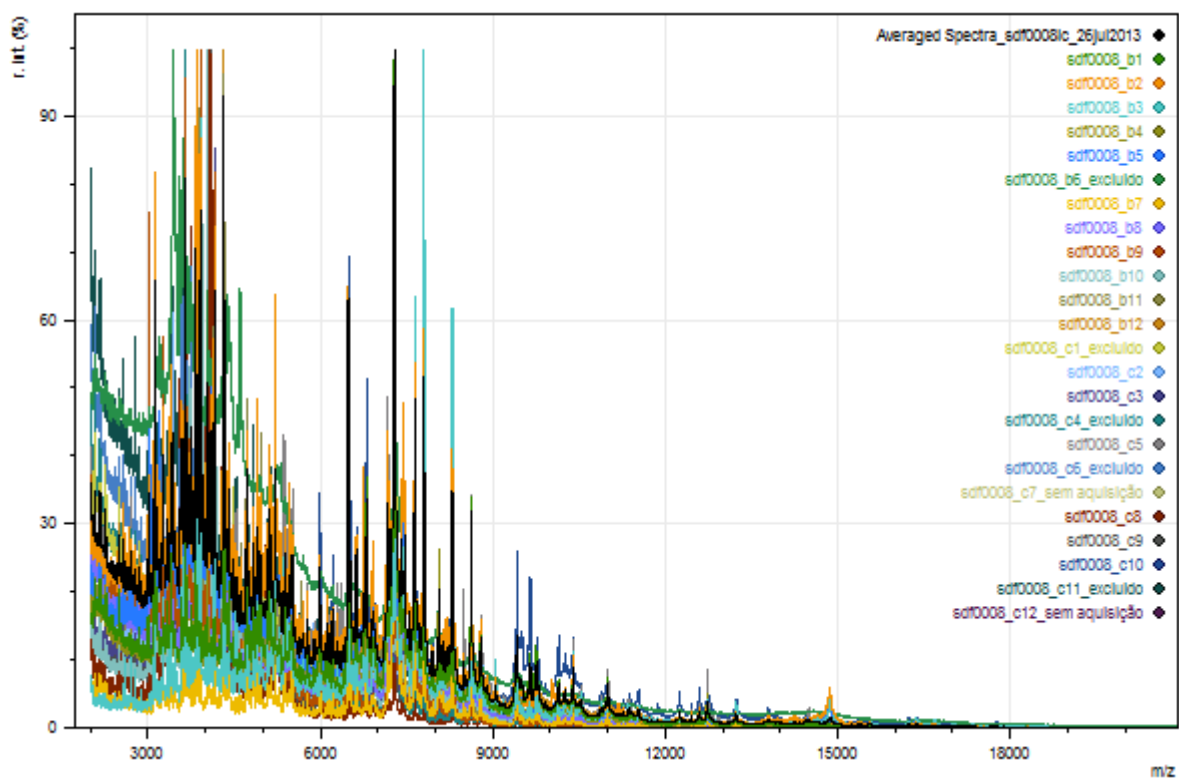
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0008ic_26jul2013

Date	26jul2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	141



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0008_b1
- sdf0008_b2
- sdf0008_b3
- sdf0008_b4
- sdf0008_b5
- sdf0008_b7
- sdf0008_b8
- sdf0008_b9
- sdf0008_b10
- sdf0008_b11
- sdf0008_b12
- sdf0008_c2
- sdf0008_c3
- sdf0008_c5
- sdf0008_c8
- sdf0008_c9
- sdf0008_c10

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 75 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

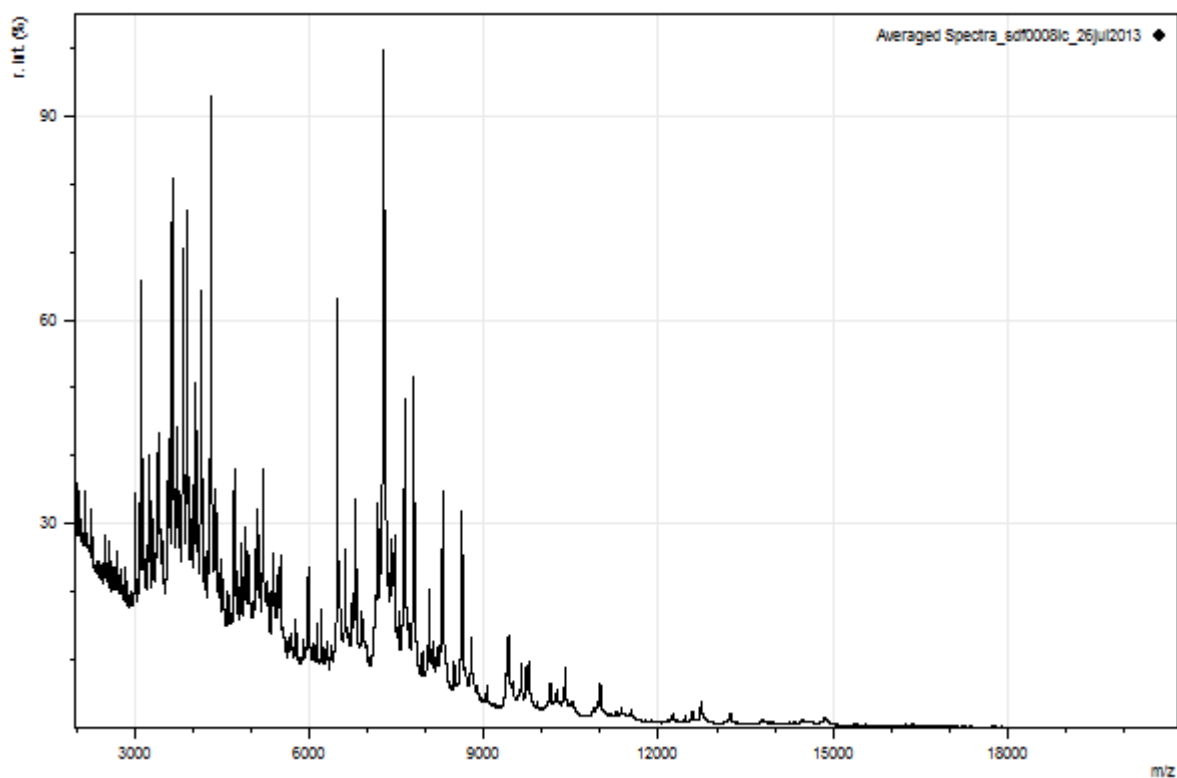
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0008ic_26jul2013

Date	26jul2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0008_b1
- sdf0008_b2
- sdf0008_b3
- sdf0008_b4
- sdf0008_b5
- sdf0008_b7
- sdf0008_b8
- sdf0008_b9
- sdf0008_b10
- sdf0008_b11
- sdf0008_b12
- sdf0008_c2
- sdf0008_c3
- sdf0008_c5
- sdf0008_c8
- sdf0008_c9
- sdf0008_c10

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 75 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

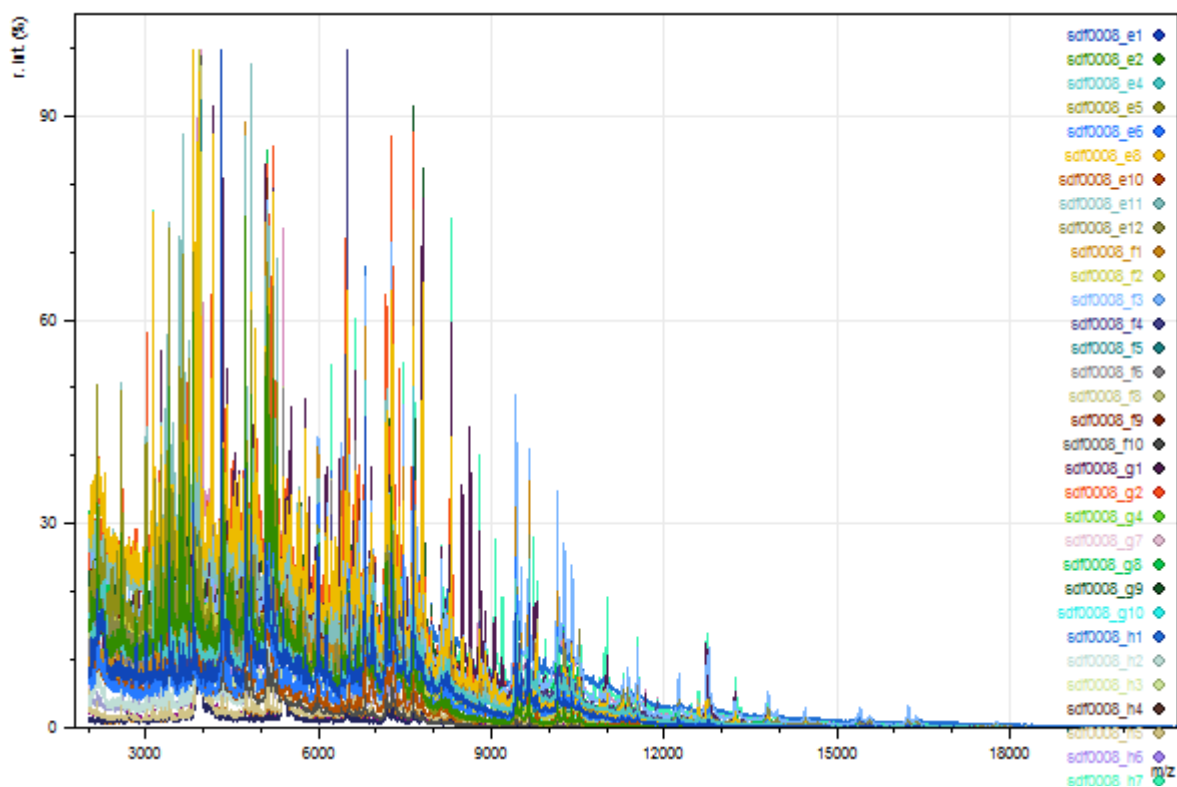
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0008_21jun2013

Date	21jun2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0008_e1
- sdf0008_e2
- sdf0008_e4
- sdf0008_e5
- sdf0008_e6
- sdf0008_e8
- sdf0008_e10
- sdf0008_e11
- sdf0008_e12
- sdf0008_f1
- sdf0008_f2
- sdf0008_f3
- sdf0008_f4
- sdf0008_f5
- sdf0008_f6
- sdf0008_f8
- sdf0008_f9
- sdf0008_f10
- sdf0008_g1
- sdf0008_g2
- sdf0008_g4
- sdf0008_g7

- sdf0008_g8
- sdf0008_g9
- sdf0008_g10
- sdf0008_h1
- sdf0008_h2
- sdf0008_h3
- sdf0008_h4
- sdf0008_h5
- sdf0008_h6
- sdf0008_h7
- sdf0008_h8
- sdf0008_h9
- sdf0008_h10
- sdf0008_h11
- sdf0008_h12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

tc = 51 horas

D = irregular confluyente (partes aleatórias)

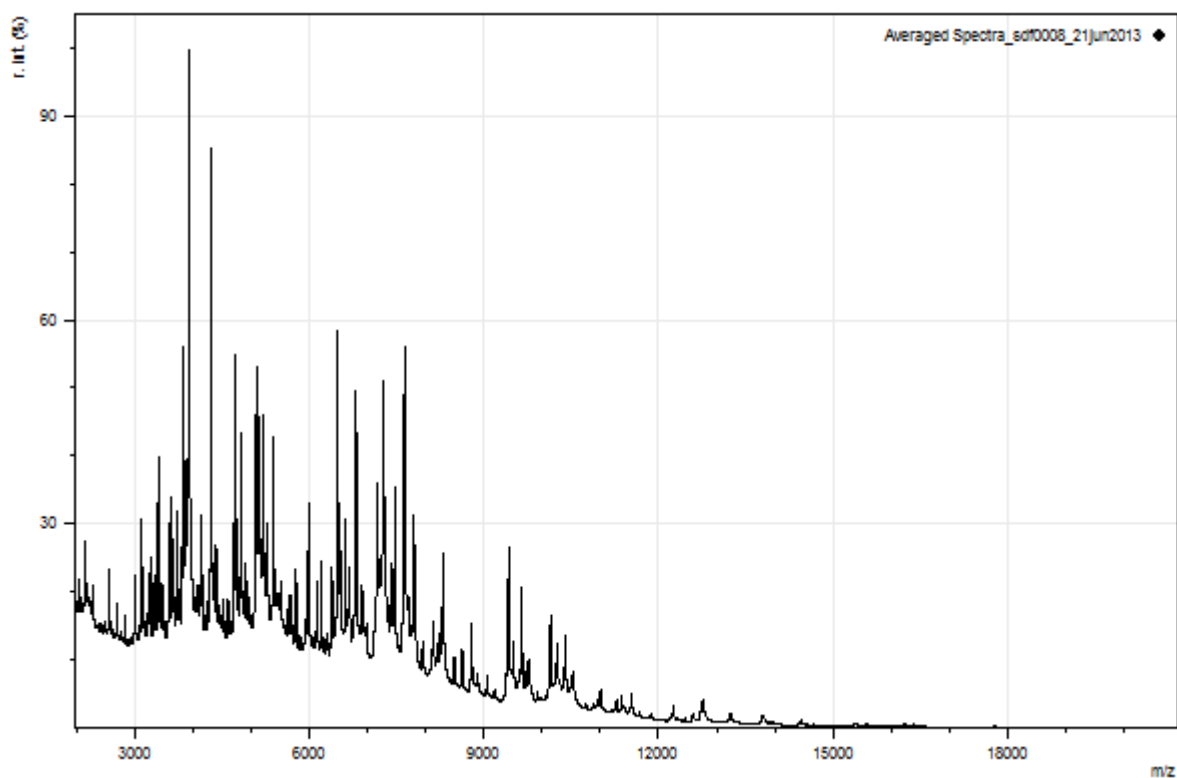
Cultivos = 4

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0008_21jun2013

Date	21jun2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0008_e1
- sdf0008_e2
- sdf0008_e4
- sdf0008_e5
- sdf0008_e6
- sdf0008_e8
- sdf0008_e10
- sdf0008_e11
- sdf0008_e12
- sdf0008_f1
- sdf0008_f2
- sdf0008_f3
- sdf0008_f4
- sdf0008_f5
- sdf0008_f6
- sdf0008_f8
- sdf0008_f9
- sdf0008_f10
- sdf0008_g1
- sdf0008_g2
- sdf0008_g4
- sdf0008_g7

- sdf0008_g8
- sdf0008_g9
- sdf0008_g10
- sdf0008_h1
- sdf0008_h2
- sdf0008_h3
- sdf0008_h4
- sdf0008_h5
- sdf0008_h6
- sdf0008_h7
- sdf0008_h8
- sdf0008_h9
- sdf0008_h10
- sdf0008_h11
- sdf0008_h12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

tc = 51 horas

D = irregular confluyente (partes aleatórias)

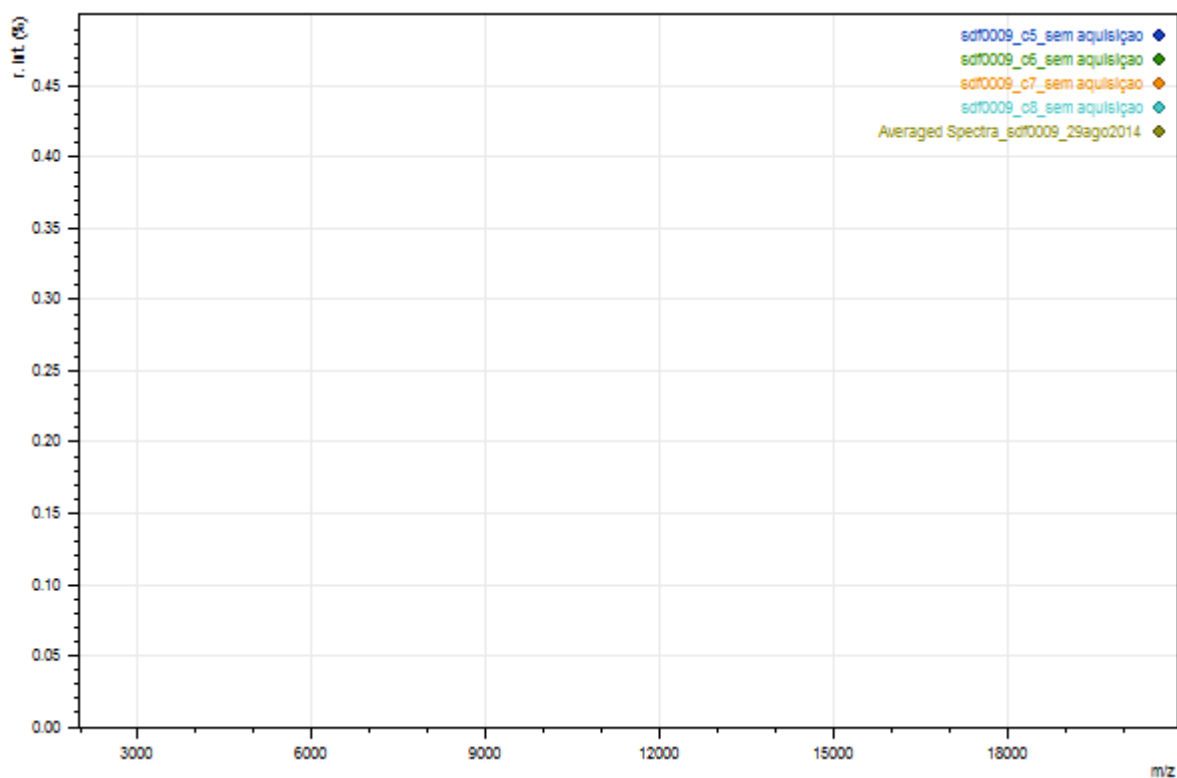
Cultivos = 4

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0009_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0009_c5_sem aquisicao
- sdf0009_c6_sem aquisicao
- sdf0009_c7_sem aquisicao
- sdf0009_c8_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 7 mm (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

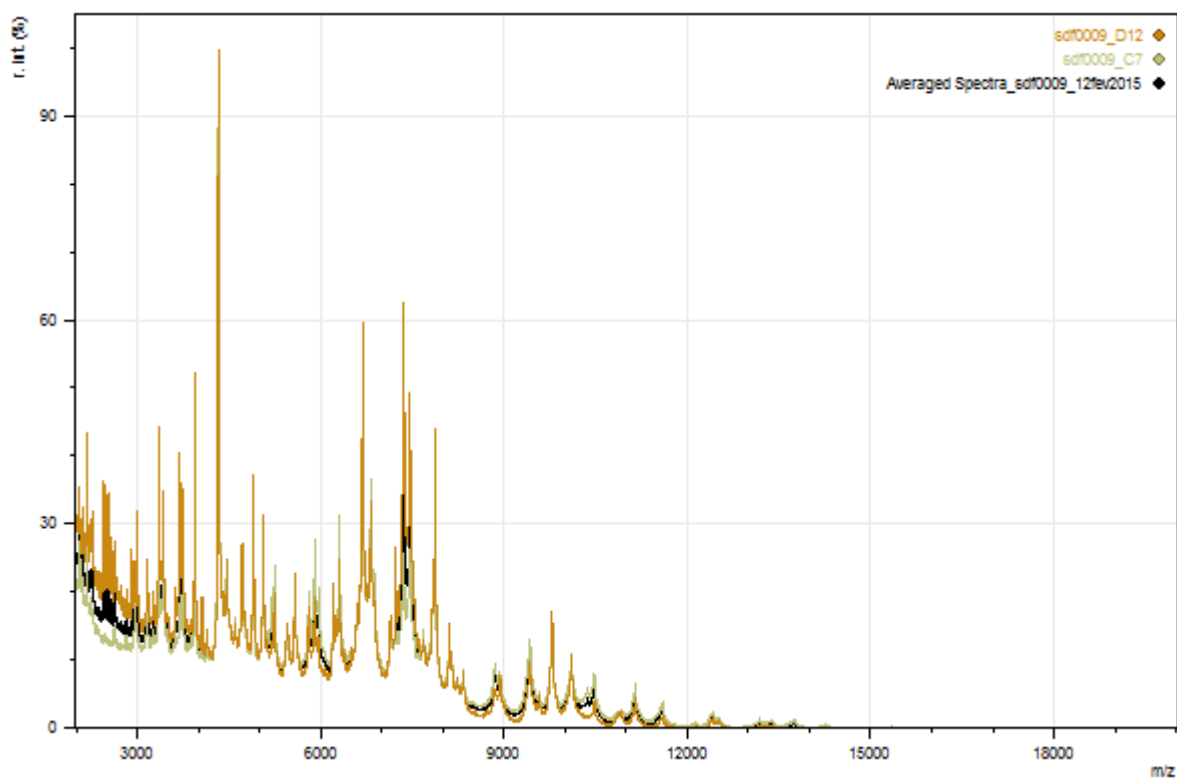
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0009_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	102

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0009_D12

- sdf0009_C7

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 37 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 6 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

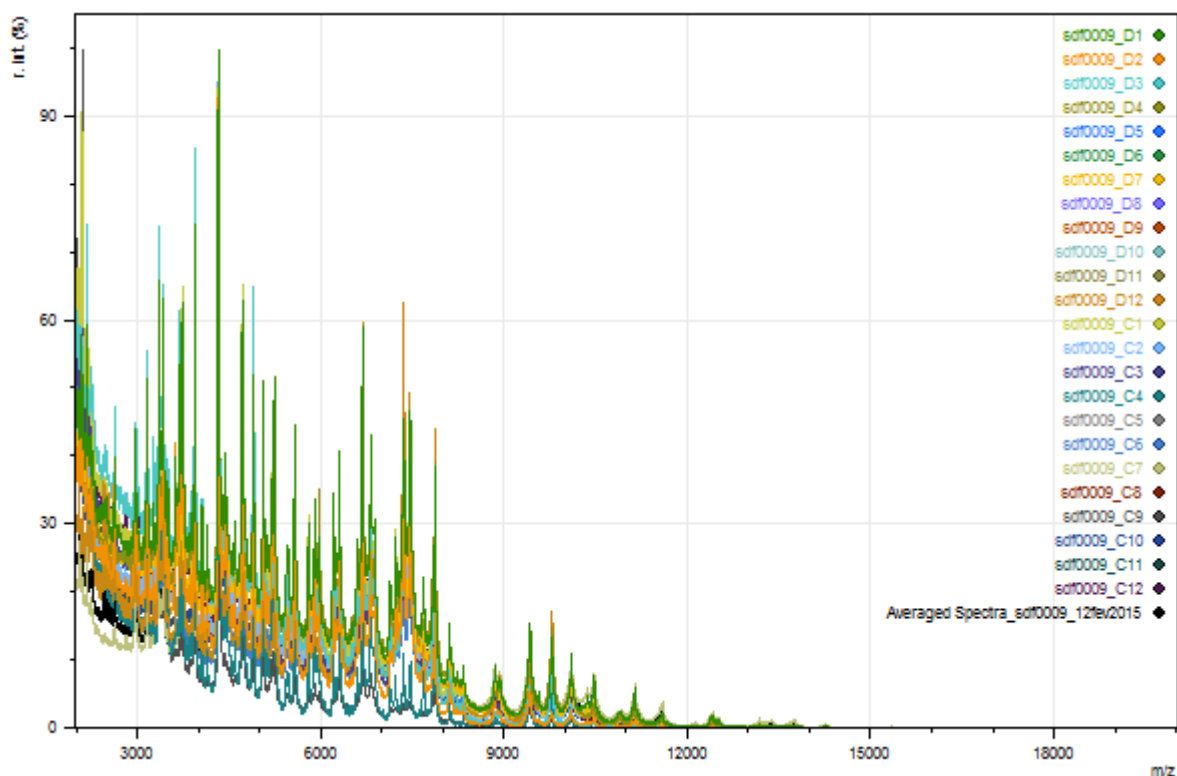
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 6

Origem = RP 11 - 12fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0009_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	102



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0009_D12

- sdf0009_C7

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 37 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 6 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

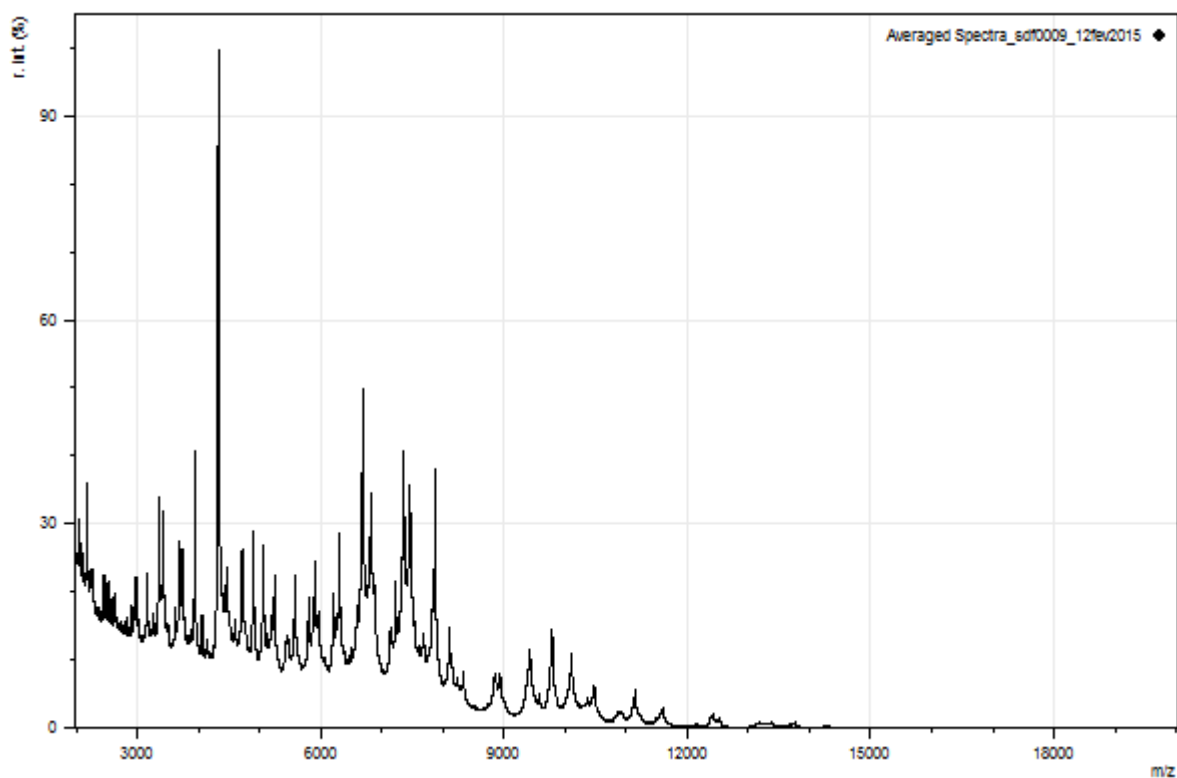
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 6

Origem = RP 11 - 12fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0009_12fev2015

Date	12fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	102

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0009_D12

- sdf0009_C7

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 37 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 6 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

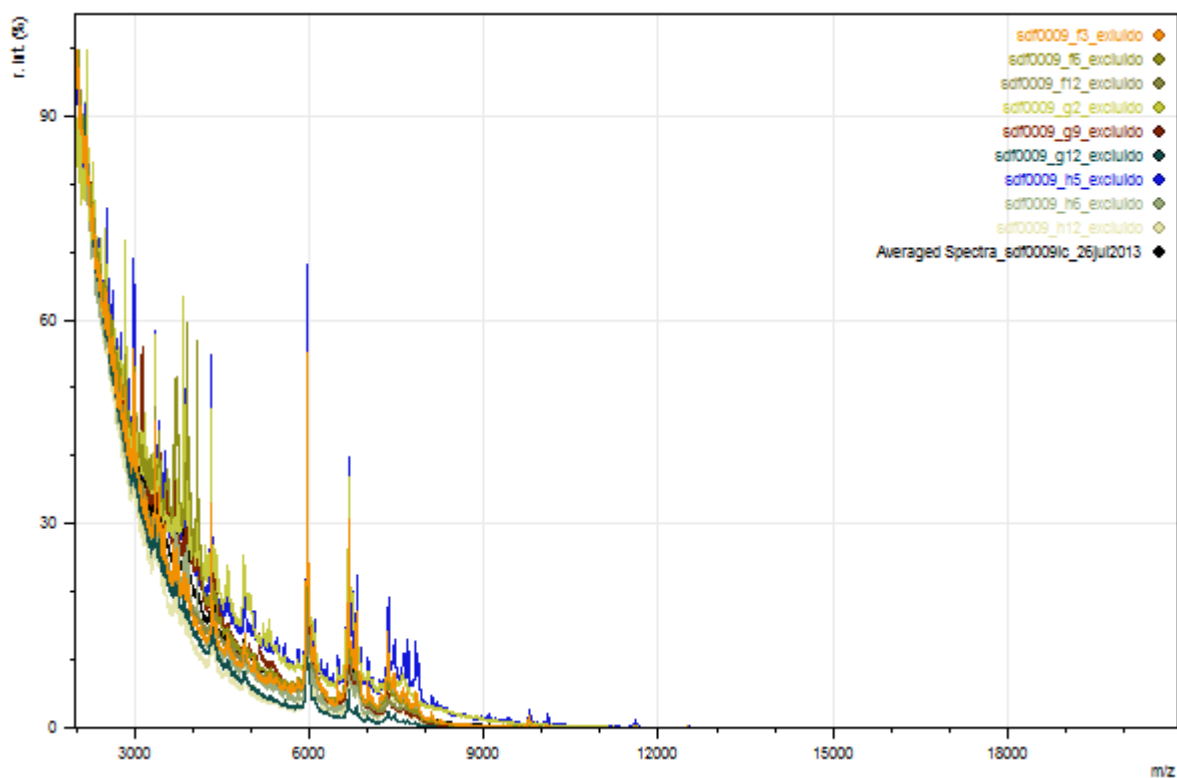
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 6

Origem = RP 11 - 12fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0009ic_26jul2013

Date	26jul2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0009_f3_excluido
- sdf0009_f6_excluido
- sdf0009_f12_excluido
- sdf0009_g2_excluido
- sdf0009_g9_excluido
- sdf0009_g12_excluido
- sdf0009_h5_excluido
- sdf0009_h6_excluido
- sdf0009_h12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = (48 h a 28 °C) + (28 h a 6 °C)

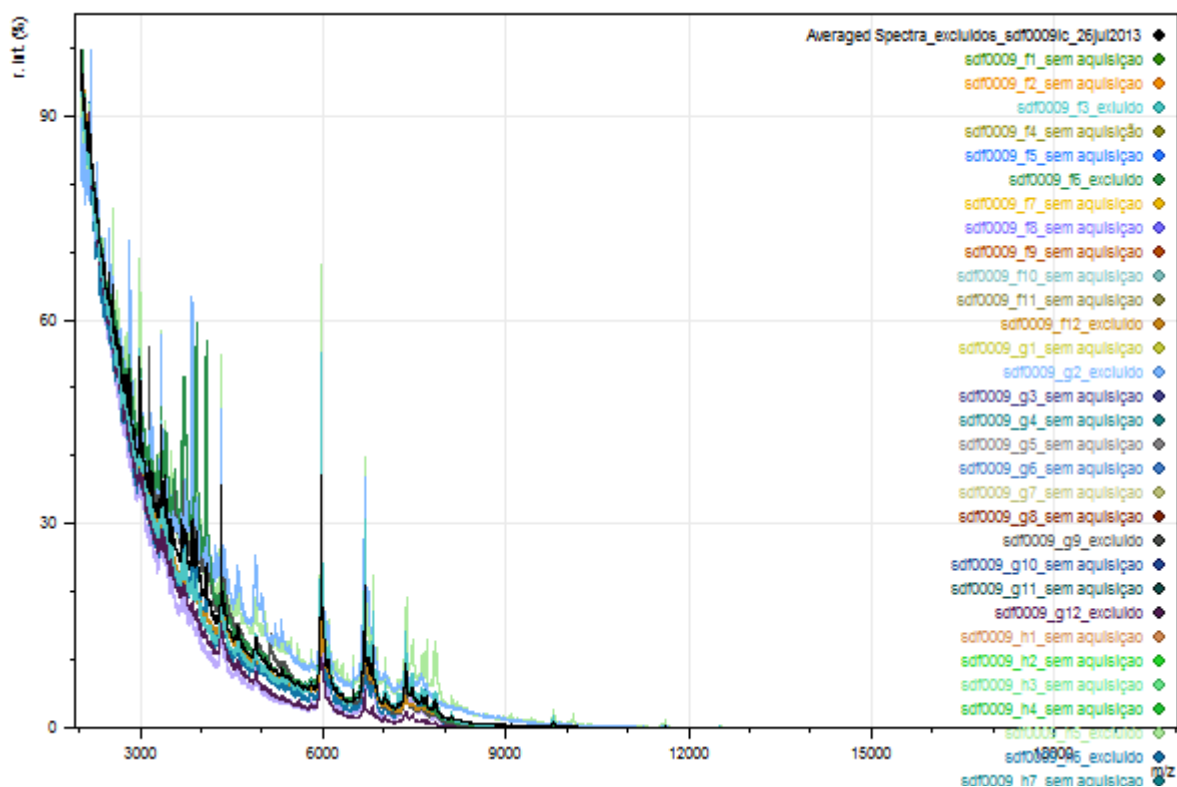
D > 7 mm (bordas)

Cultivos = 3

Origem = alíquota do estoque comum

mMass Report: Averaged Spectra_excluidos_sdf0009ic_26jul2013

Date	26jul2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	14



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0009_f3_excluido
- sdf0009_f6_excluido
- sdf0009_f12_excluido
- sdf0009_g2_excluido
- sdf0009_g9_excluido
- sdf0009_g12_excluido
- sdf0009_h5_excluido
- sdf0009_h6_excluido
- sdf0009_h12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = (48 h a 28 °C) + (28 h a 6 °C)

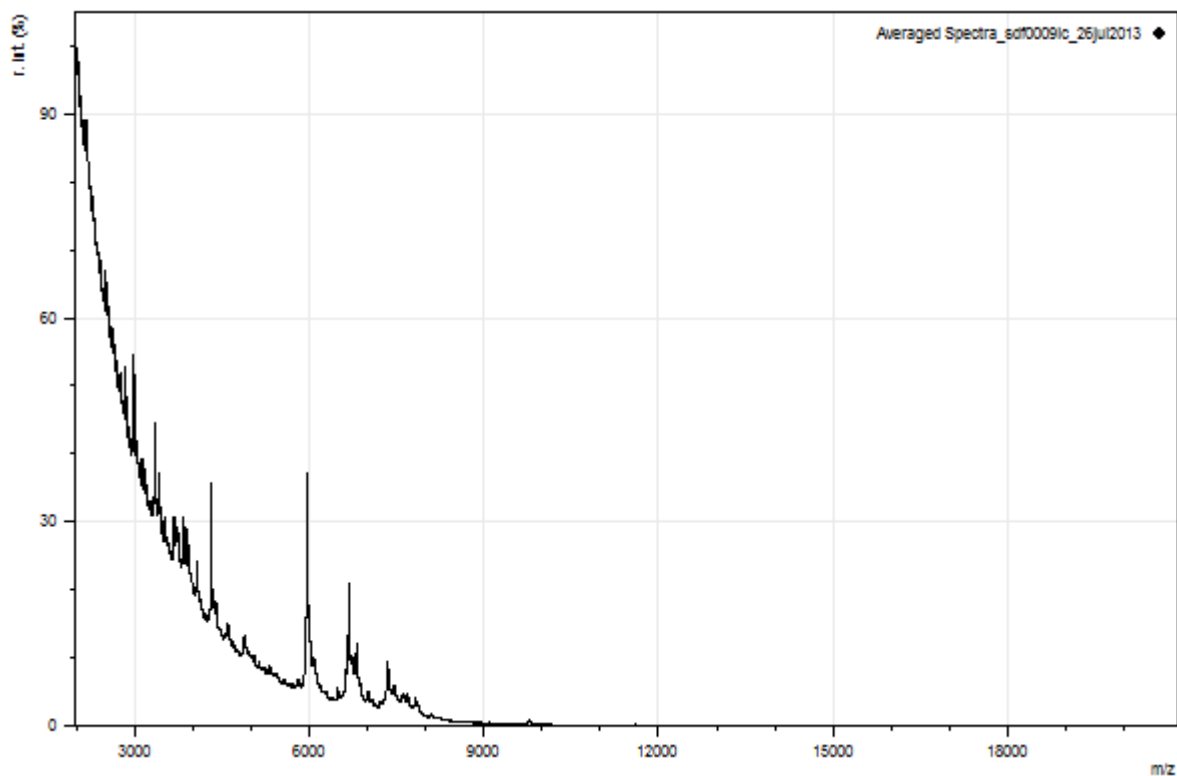
D > 7 mm (bordas)

Cultivos = 3

Origem = alíquota do estoque comum

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0009ic_26jul2013

Date	26jul2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0009_f3_excluido
- sdf0009_f6_excluido
- sdf0009_f12_excluido
- sdf0009_g2_excluido
- sdf0009_g9_excluido
- sdf0009_g12_excluido
- sdf0009_h5_excluido
- sdf0009_h6_excluido
- sdf0009_h12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = (48 h a 28 °C) + (28 h a 6 °C)

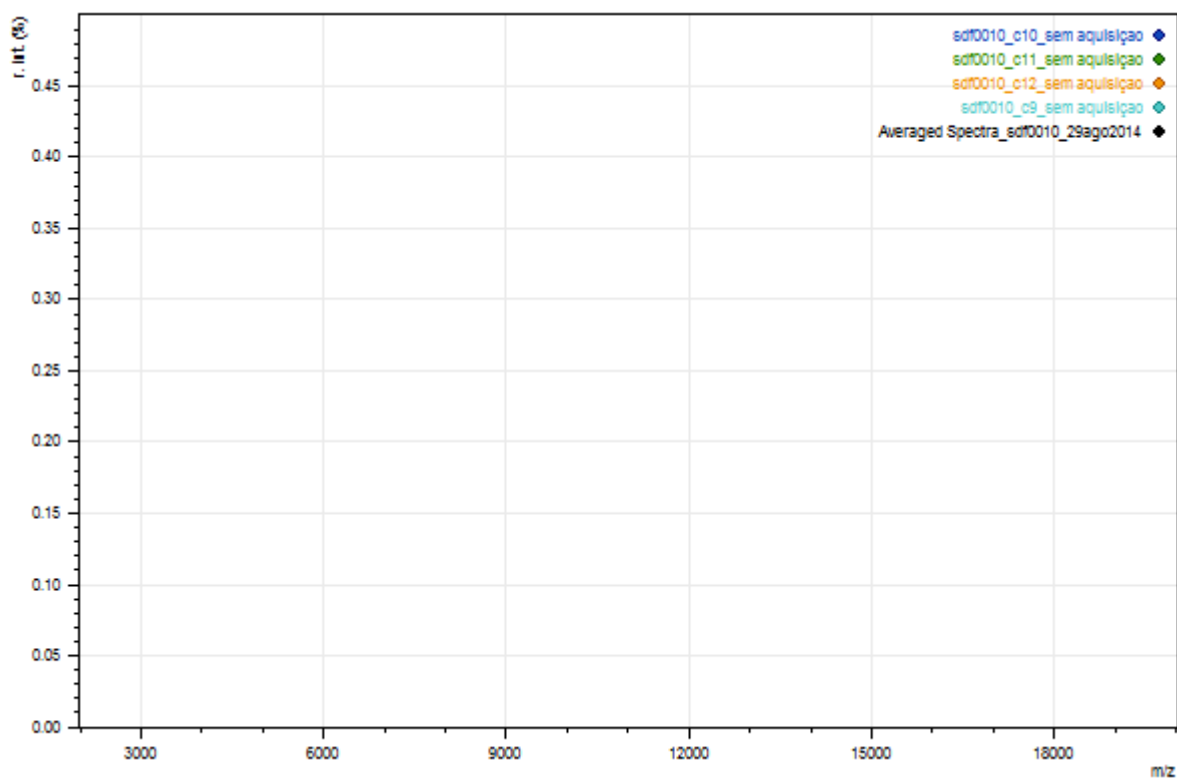
D > 7 mm (bordas)

Cultivos = 3

Origem = alíquota do estoque comum

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0010_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	0



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0010_c10_sem aquisicao
- sdf0010_c11_sem aquisicao
- sdf0010_c12_sem aquisicao
- sdf0010_c9_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

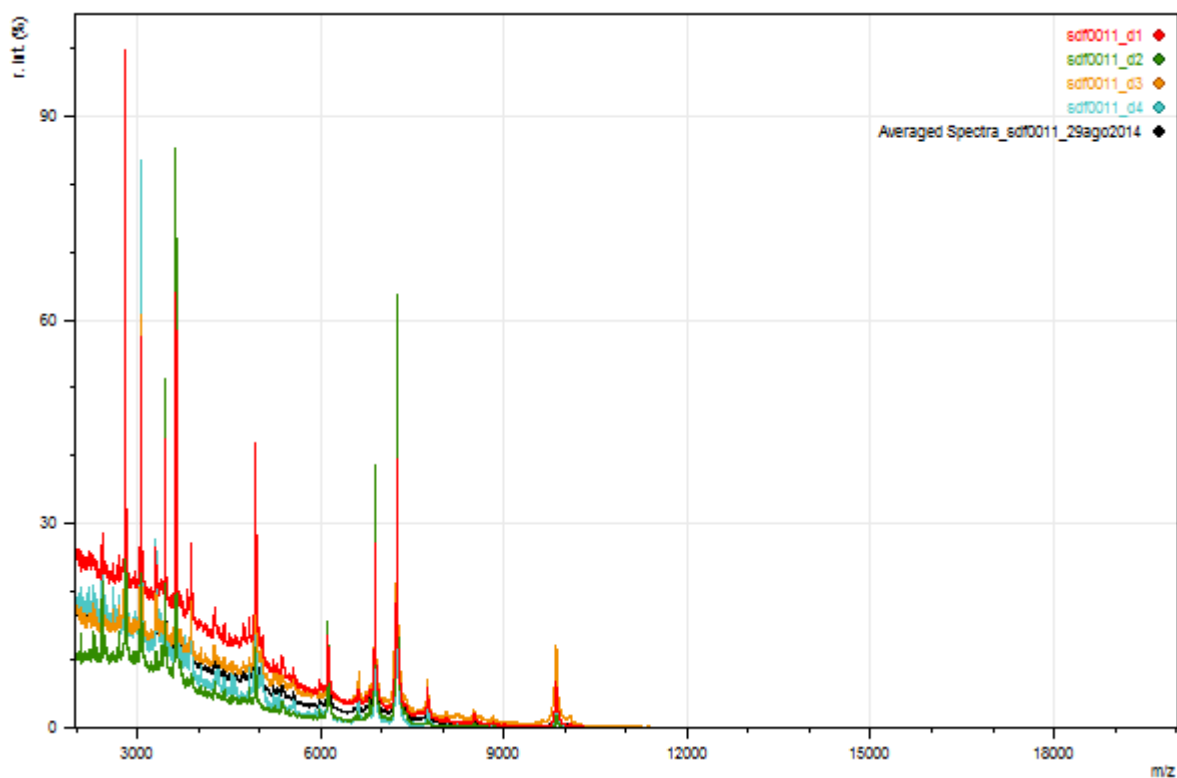
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0011_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	528

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0011_d1
- sdf0011_d2
- sdf0011_d3
- sdf0011_d4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

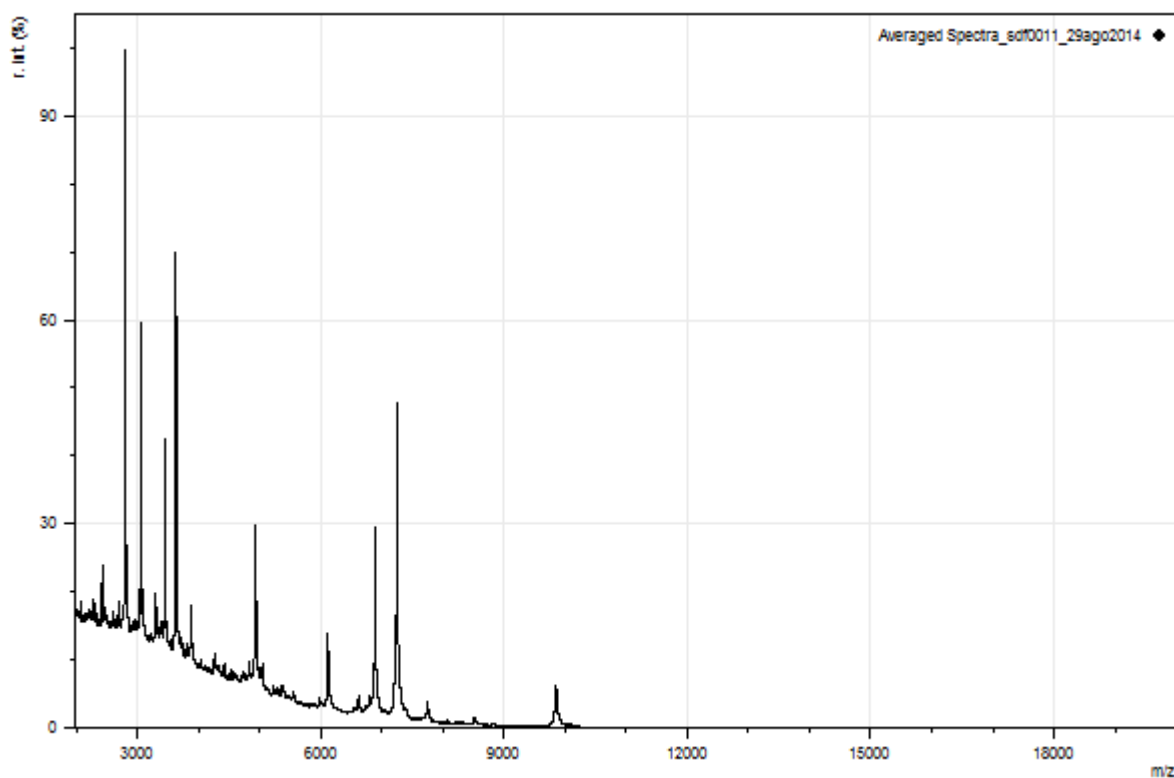
Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = sem registro

Origem = RP 11 - 28ago14

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0011_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	528

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0011_d1
- sdf0011_d2
- sdf0011_d3
- sdf0011_d4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

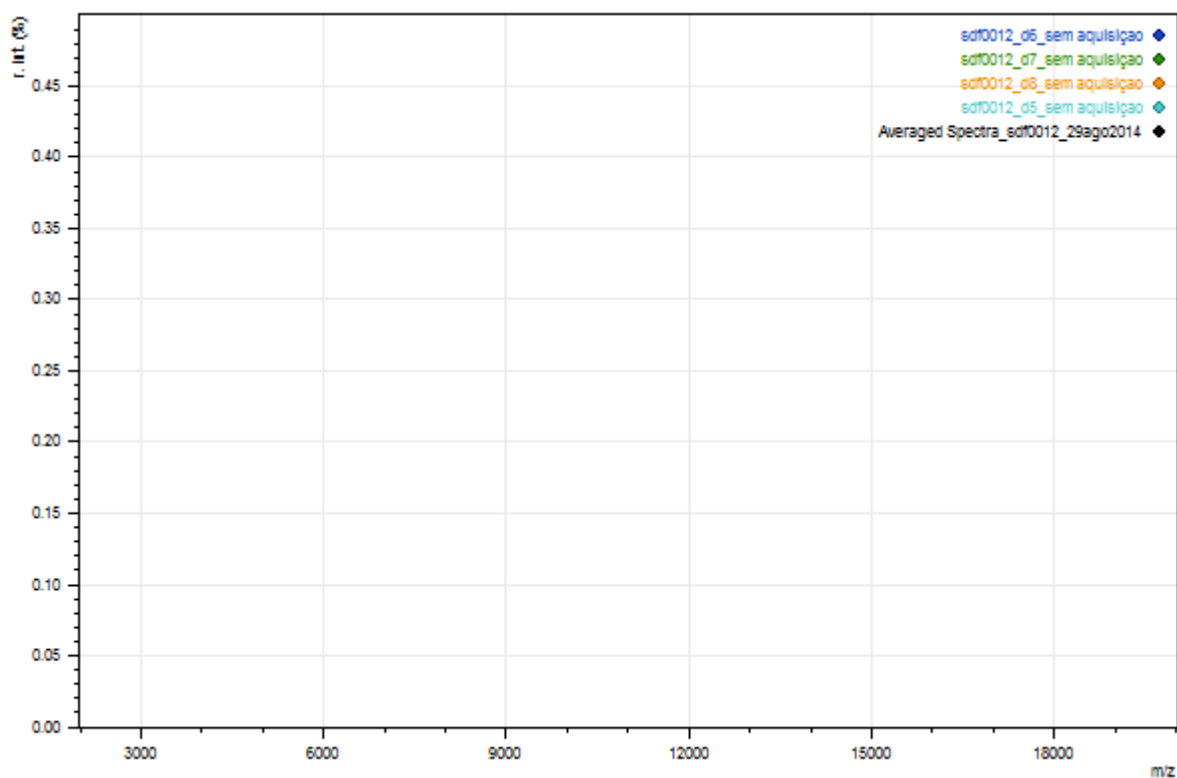
Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = sem registro

Origem = RP 11 - 28ago14

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0012_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	0



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0012_d6_sem aquisicao
- sdf0012_d7_sem aquisicao
- sdf0012_d8_sem aquisicao
- sdf0012_d5_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

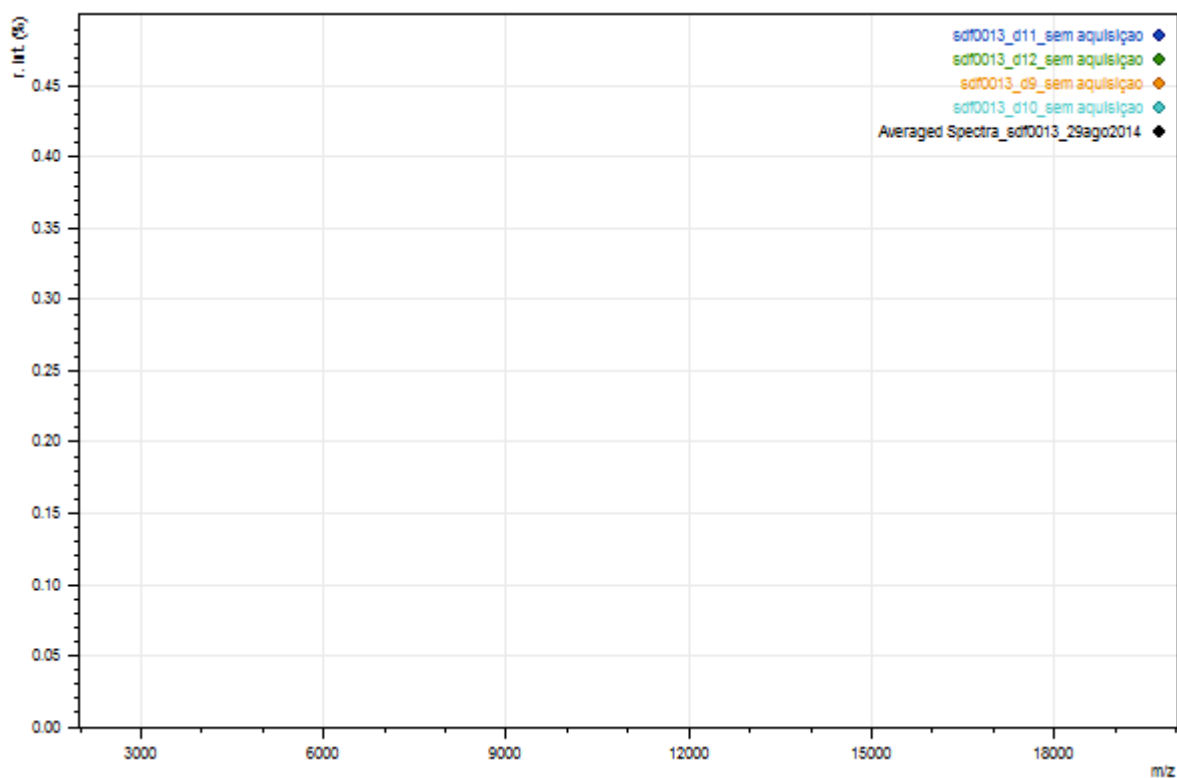
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0013_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0013_d11_sem aquisicao
- sdf0013_d12_sem aquisicao
- sdf0013_d9_sem aquisicao
- sdf0013_d10_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

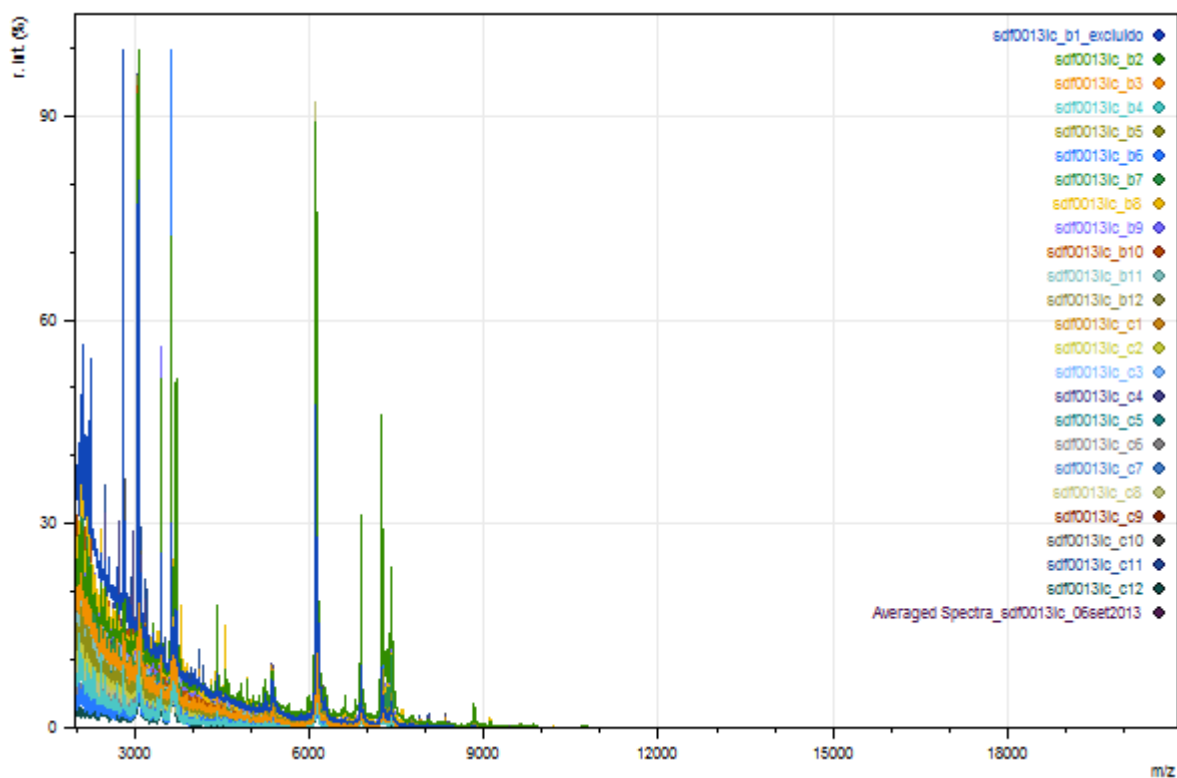
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0013ic_06set2013

Date	06set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0013ic_b2
- sdf0013ic_b3
- sdf0013ic_b4
- sdf0013ic_b5
- sdf0013ic_b6
- sdf0013ic_b7
- sdf0013ic_b8
- sdf0013ic_b9
- sdf0013ic_b10
- sdf0013ic_b11
- sdf0013ic_b12
- sdf0013ic_c1
- sdf0013ic_c2
- sdf0013ic_c3
- sdf0013ic_c4
- sdf0013ic_c5
- sdf0013ic_c6
- sdf0013ic_c7
- sdf0013ic_c8
- sdf0013ic_c9
- sdf0013ic_c10
- sdf0013ic_c11

- sdf0013ic_c12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 40 horas

D = 4 mm (partes centrais)

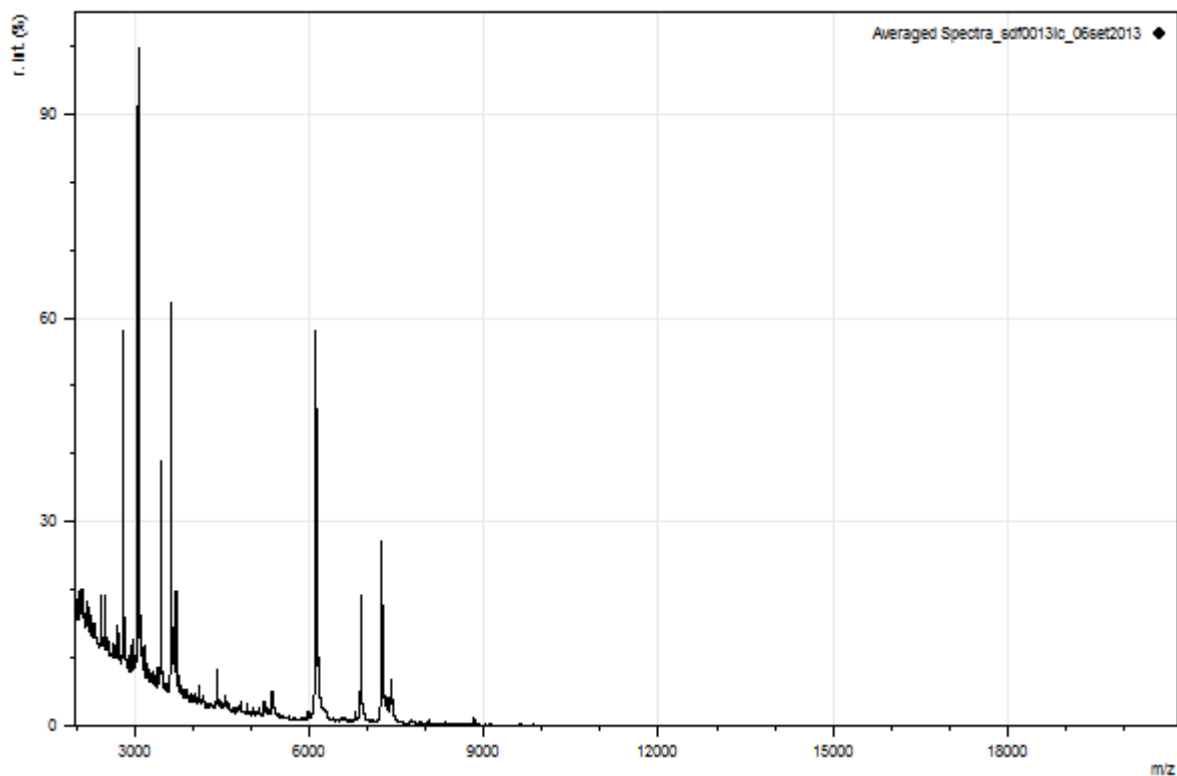
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0013ic_06set2013

Date	06set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0013ic_b2
- sdf0013ic_b3
- sdf0013ic_b4
- sdf0013ic_b5
- sdf0013ic_b6
- sdf0013ic_b7
- sdf0013ic_b8
- sdf0013ic_b9
- sdf0013ic_b10
- sdf0013ic_b11
- sdf0013ic_b12
- sdf0013ic_c1
- sdf0013ic_c2
- sdf0013ic_c3
- sdf0013ic_c4
- sdf0013ic_c5
- sdf0013ic_c6
- sdf0013ic_c7
- sdf0013ic_c8
- sdf0013ic_c9
- sdf0013ic_c10
- sdf0013ic_c11

- sdf0013ic_c12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 40 horas

D = 4 mm (partes centrais)

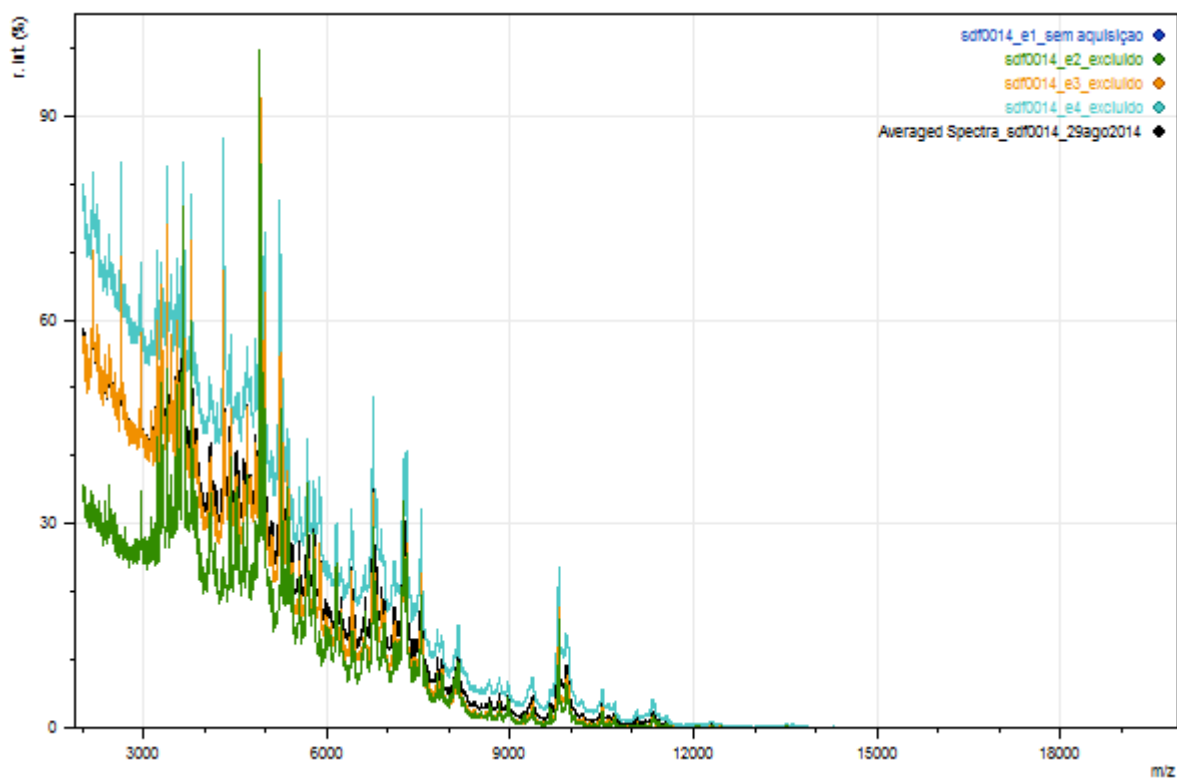
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0014_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	683



Notes

Averaged Spectra:

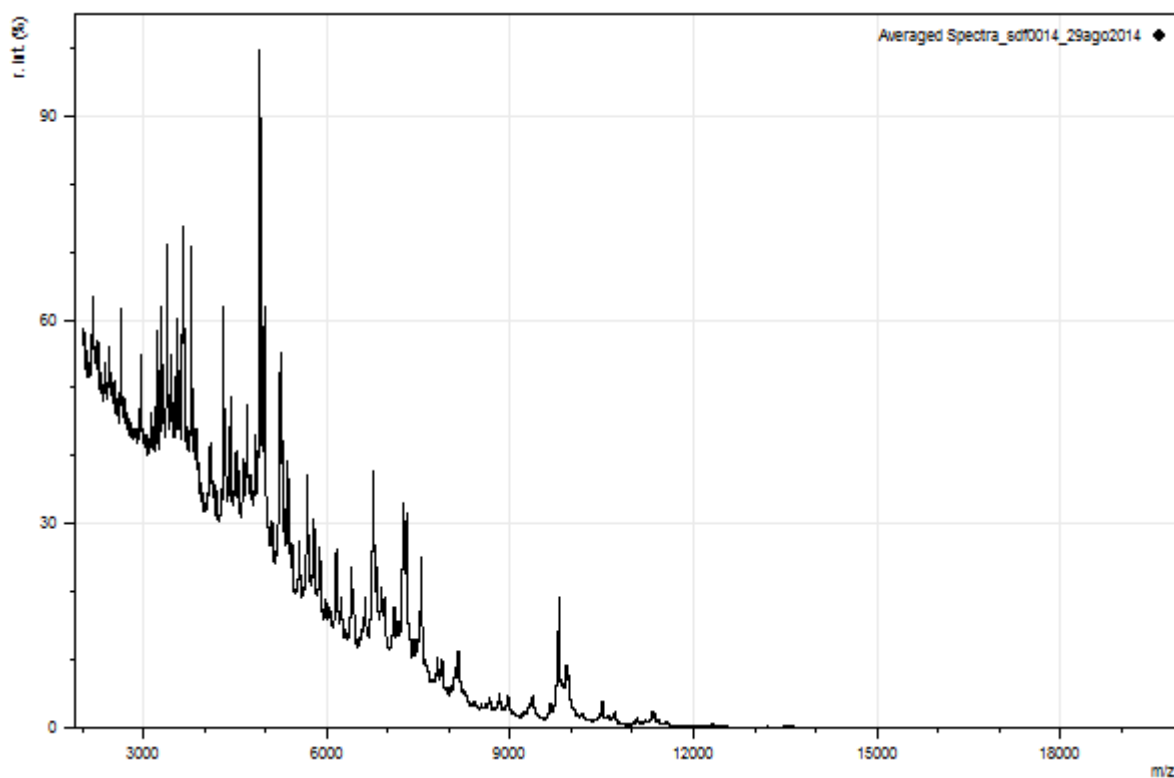
- sdf0014_e2_excluido
- sdf0014_e3_excluido
- sdf0014_e4_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas
D < 1 mm (mais de 1 colônia/extrato)
Tempo até aplicação do extrato = 7h30min
Dissolução em água = sem registro
Dissolução em AcN = Ruim
Dissolução em AF = sem registro
Cultivos = 1
Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0014_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	683

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0014_e2_excluido
- sdf0014_e3_excluido
- sdf0014_e4_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D < 1 mm (mais de 1 colônia/extrato)

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

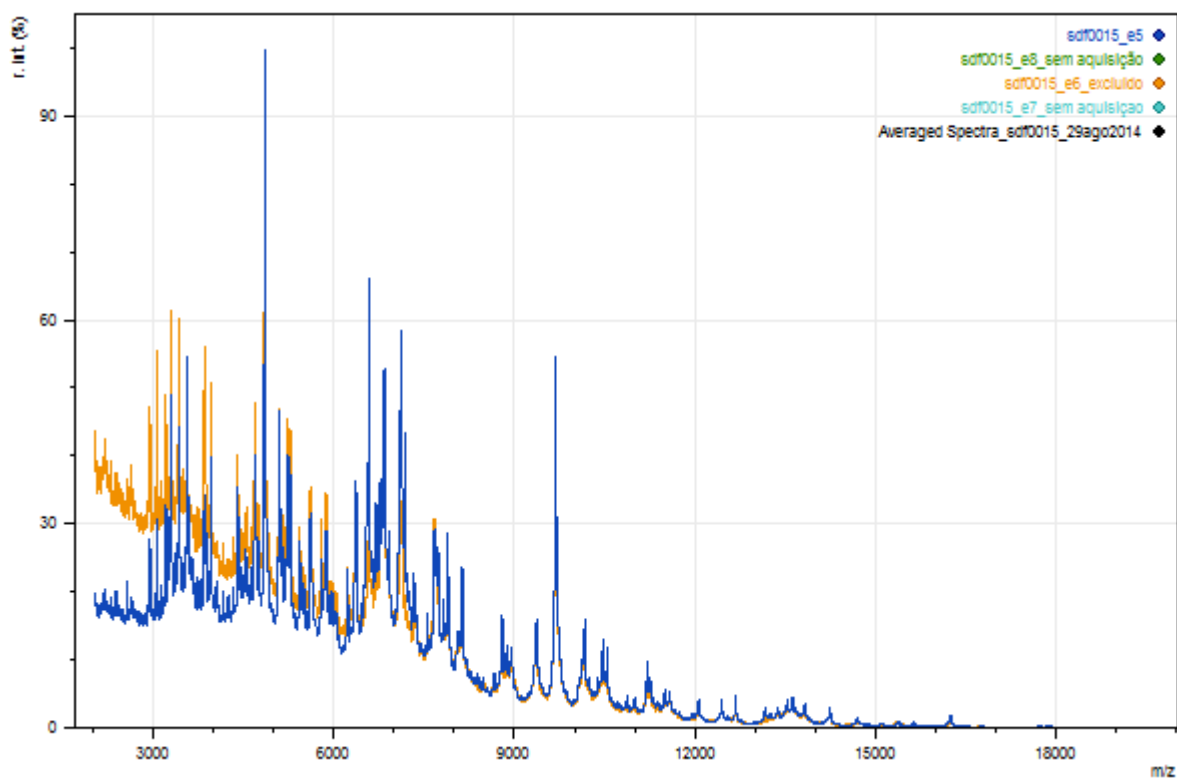
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0015_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	210

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0015_e5

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = sem registro

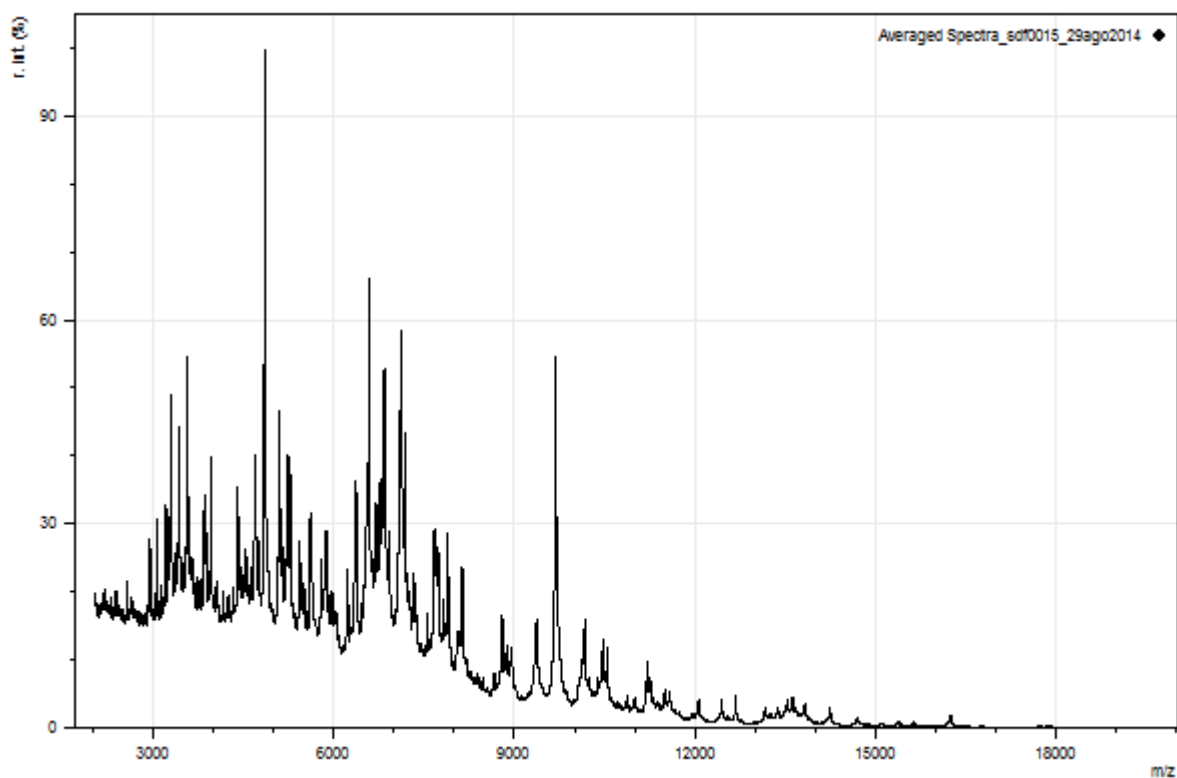
Cultivos = 1

Origem = RP 11 -

Ponto de interrupção = etanol

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0015_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	210

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0015_e5

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = sem registro

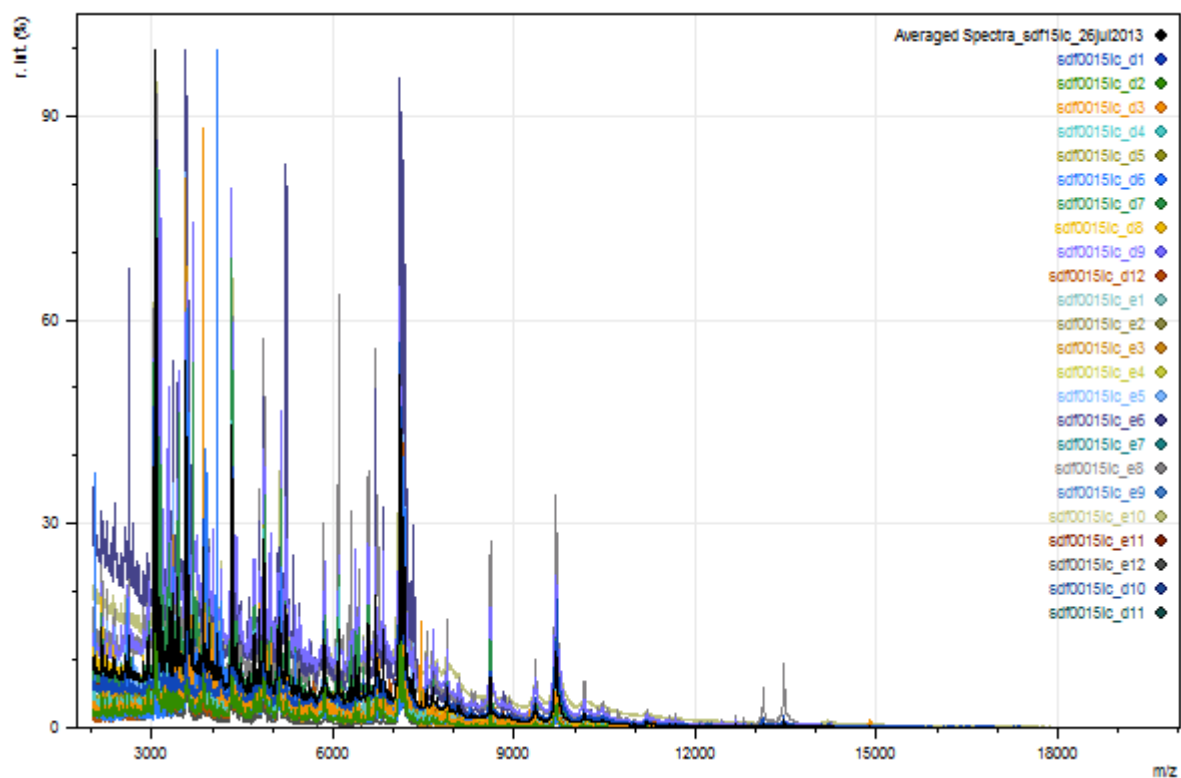
Cultivos = 1

Origem = RP 11 -

Ponto de interrupção = etanol

mMass Report: Averaged Spectra_sdf15ic_26jul2013

Date	26jul2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	221



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0015ic_d1
- sdf0015ic_d2
- sdf0015ic_d3
- sdf0015ic_d4
- sdf0015ic_d5
- sdf0015ic_d6
- sdf0015ic_d7
- sdf0015ic_d8
- sdf0015ic_d9
- sdf0015ic_d10
- sdf0015ic_d11
- sdf0015ic_d12
- sdf0015ic_e1
- sdf0015ic_e2
- sdf0015ic_e3
- sdf0015ic_e4
- sdf0015ic_e5
- sdf0015ic_e6
- sdf0015ic_e7
- sdf0015ic_e8
- sdf0015ic_e9
- sdf0015ic_e10

- sdf0015ic_e11
- sdf0015ic_e12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 75 horas

D = 3 mm

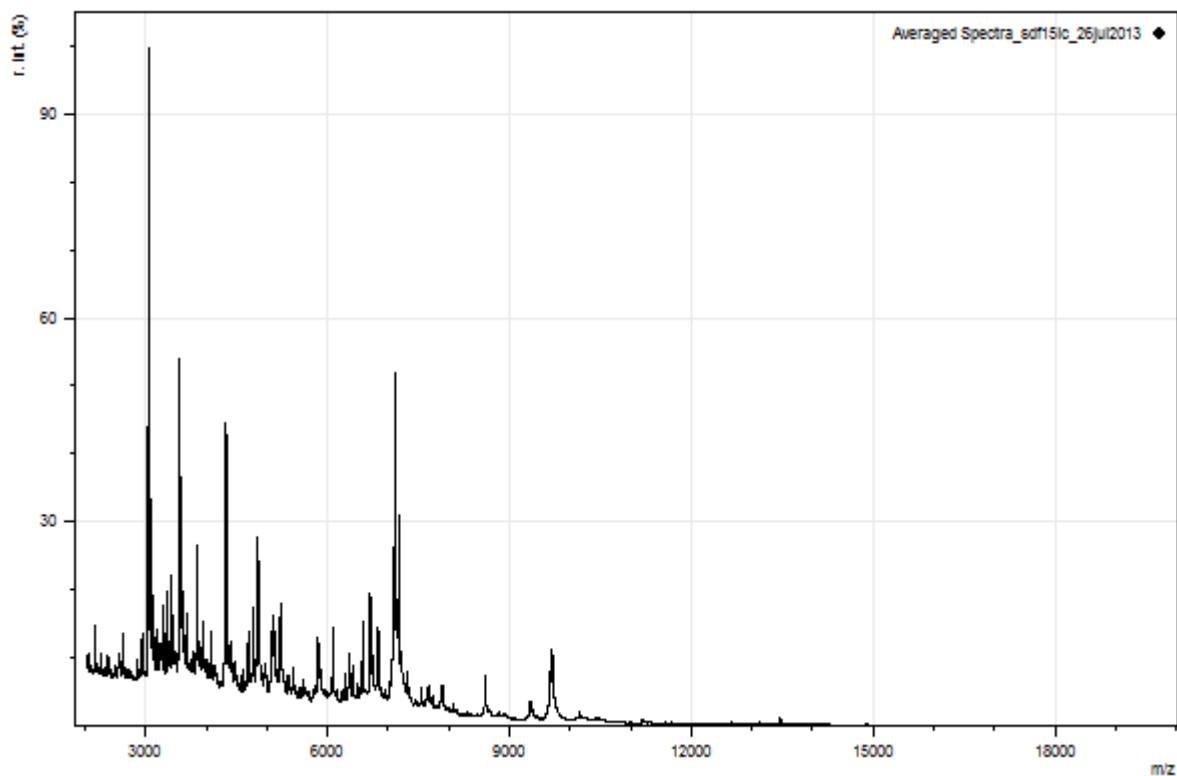
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf15ic_26jul2013

Date	26jul2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	221

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0015ic_d1
- sdf0015ic_d2
- sdf0015ic_d3
- sdf0015ic_d4
- sdf0015ic_d5
- sdf0015ic_d6
- sdf0015ic_d7
- sdf0015ic_d8
- sdf0015ic_d9
- sdf0015ic_d10
- sdf0015ic_d11
- sdf0015ic_d12
- sdf0015ic_e1
- sdf0015ic_e2
- sdf0015ic_e3
- sdf0015ic_e4
- sdf0015ic_e5
- sdf0015ic_e6
- sdf0015ic_e7
- sdf0015ic_e8
- sdf0015ic_e9
- sdf0015ic_e10

- sdf0015ic_e11
- sdf0015ic_e12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 75 horas

D = 3 mm

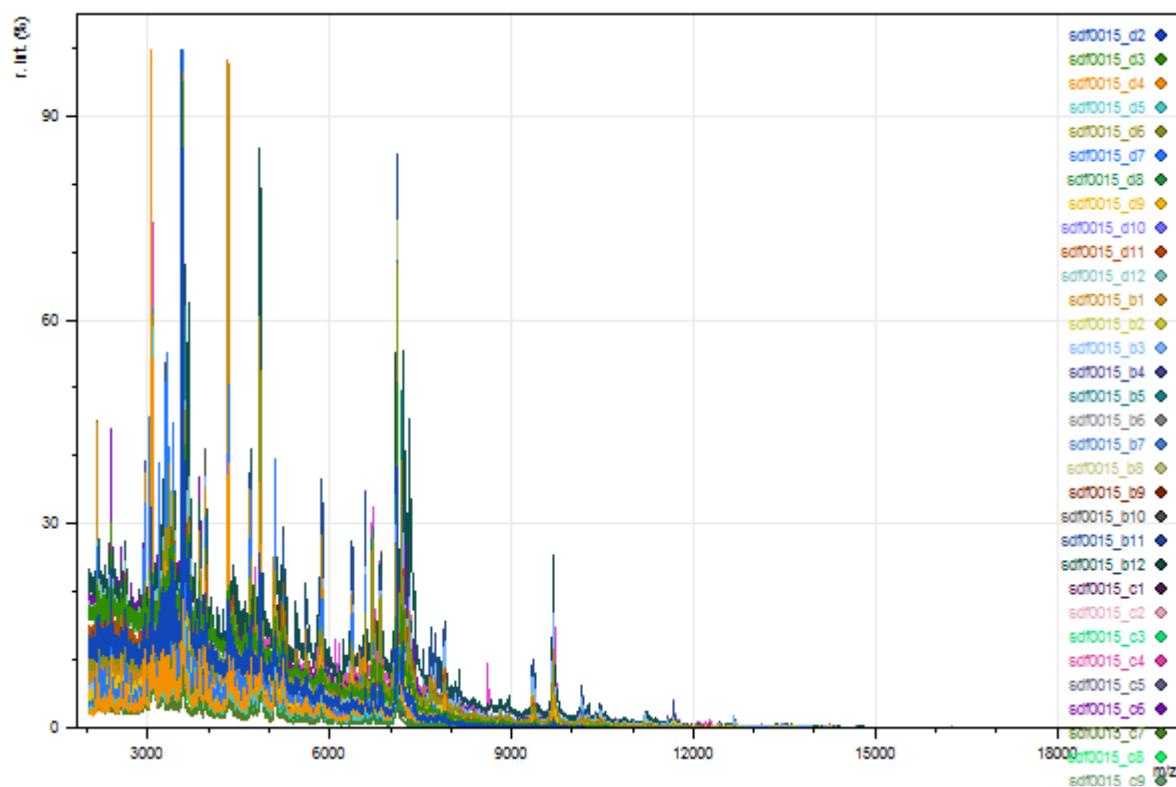
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0015ic_21jun2013

Date	21jun2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	99

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0015_d2
- sdf0015_d3
- sdf0015_d4
- sdf0015_d5
- sdf0015_d6
- sdf0015_d7
- sdf0015_d8
- sdf0015_d9
- sdf0015_d10
- sdf0015_d11
- sdf0015_d12
- sdf0015_b1
- sdf0015_b2
- sdf0015_b3
- sdf0015_b4
- sdf0015_b5
- sdf0015_b6
- sdf0015_b7
- sdf0015_b8
- sdf0015_b9
- sdf0015_b10
- sdf0015_b11

- sdf0015_b12
- sdf0015_c1
- sdf0015_c2
- sdf0015_c3
- sdf0015_c4
- sdf0015_c5
- sdf0015_c6
- sdf0015_c7
- sdf0015_c8
- sdf0015_c9
- sdf0015_c10
- sdf0015_c11
- sdf0015_c12
- sdf0015_d1

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C1)

tc = 51 horas

D = sem registro (bordas)

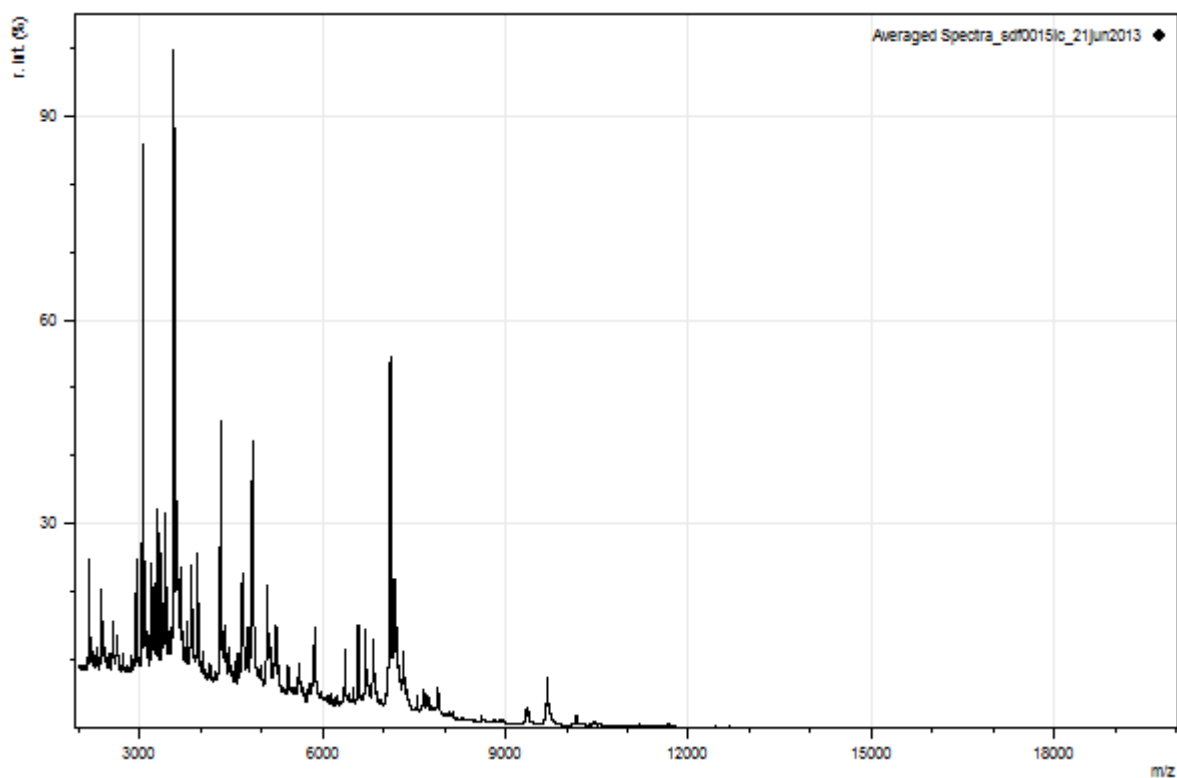
Cultivos = 3

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0015ic_21jun2013

Date	21jun2013	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	99

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0015_d2
- sdf0015_d3
- sdf0015_d4
- sdf0015_d5
- sdf0015_d6
- sdf0015_d7
- sdf0015_d8
- sdf0015_d9
- sdf0015_d10
- sdf0015_d11
- sdf0015_d12
- sdf0015_b1
- sdf0015_b2
- sdf0015_b3
- sdf0015_b4
- sdf0015_b5
- sdf0015_b6
- sdf0015_b7
- sdf0015_b8
- sdf0015_b9
- sdf0015_b10
- sdf0015_b11

- sdf0015_b12
- sdf0015_c1
- sdf0015_c2
- sdf0015_c3
- sdf0015_c4
- sdf0015_c5
- sdf0015_c6
- sdf0015_c7
- sdf0015_c8
- sdf0015_c9
- sdf0015_c10
- sdf0015_c11
- sdf0015_c12
- sdf0015_d1

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

tc = 51 horas

D = sem registro (bordas)

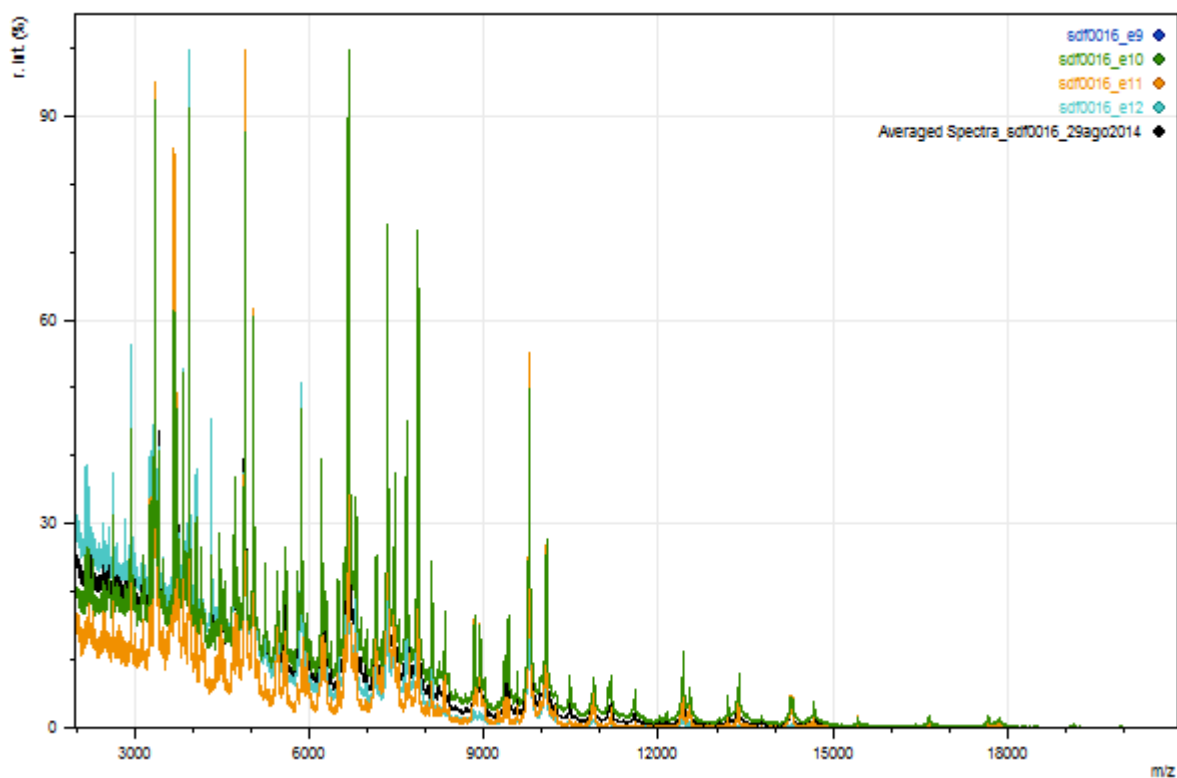
Cultivos = 3

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0016_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0016_e9
- sdf0016_e10
- sdf0016_e11
- sdf0016_e12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

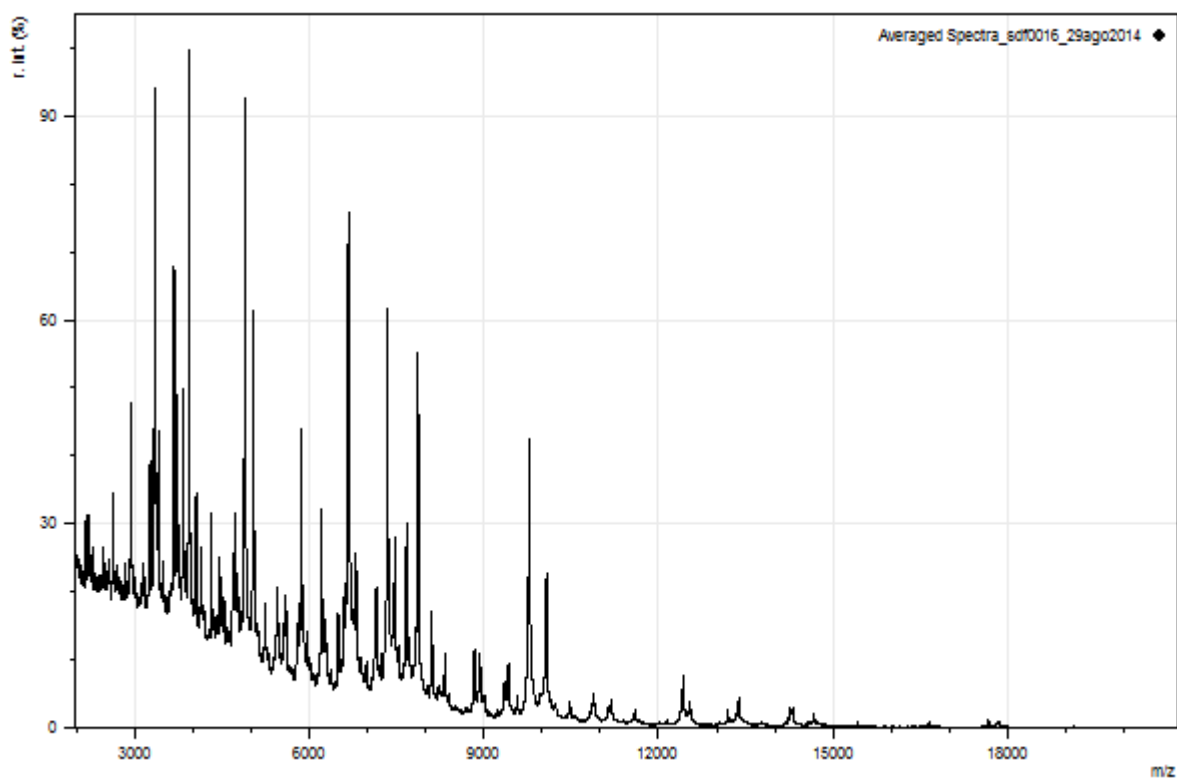
Dissolução em AcN = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0016_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27646
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0016_e9
- sdf0016_e10
- sdf0016_e11
- sdf0016_e12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

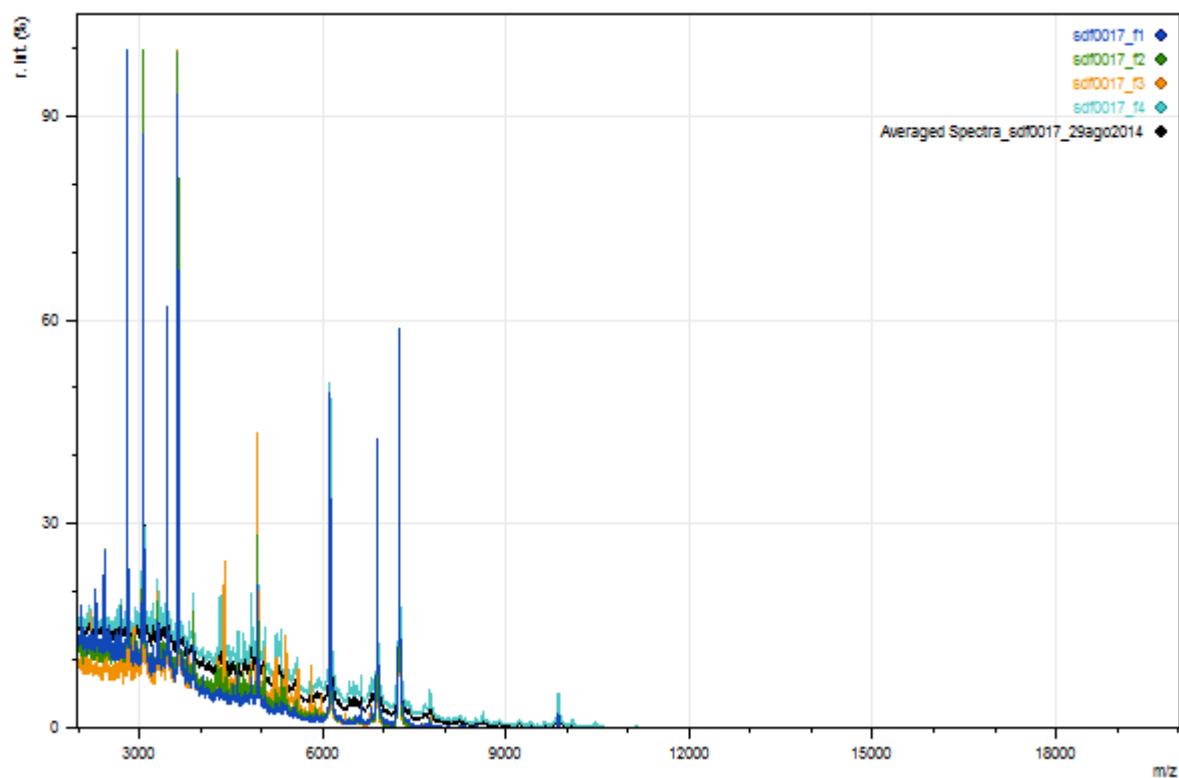
Dissolução em AcN = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0017_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	522

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0017_f1
- sdf0017_f2
- sdf0017_f3
- sdf0017_f4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

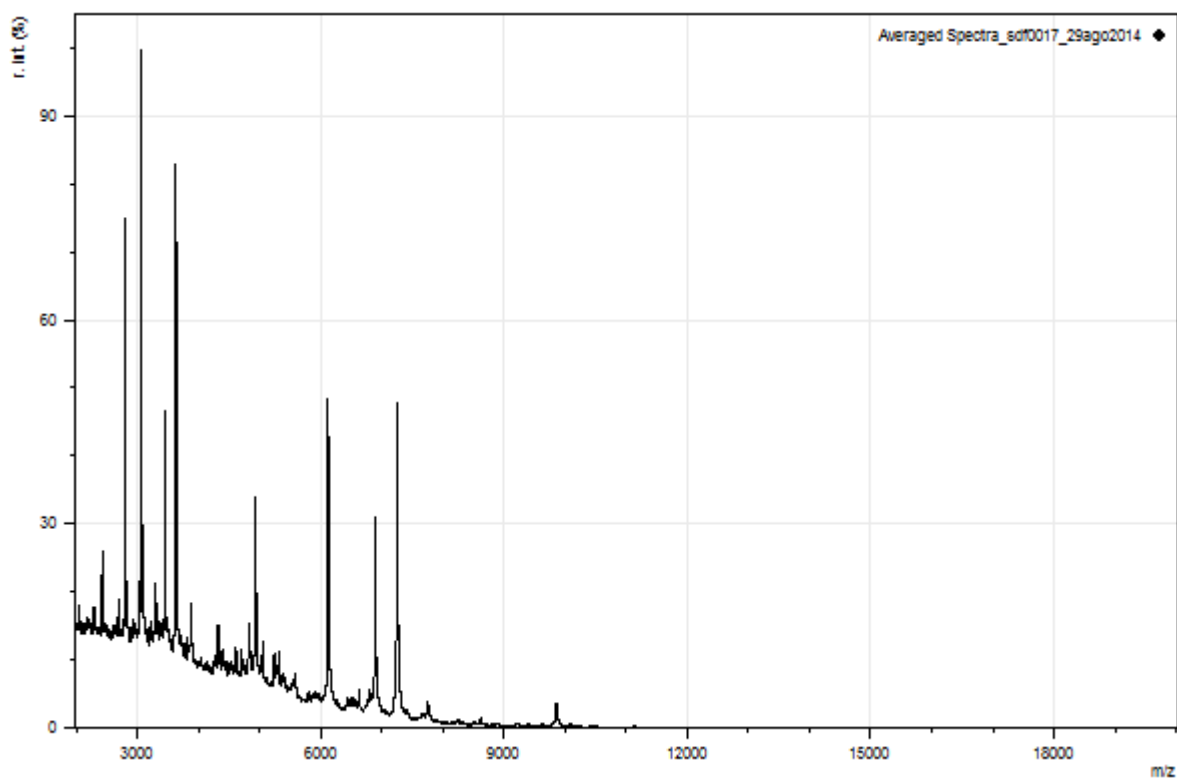
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 29ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0017_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	522

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0017_f1
- sdf0017_f2
- sdf0017_f3
- sdf0017_f4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 7h30min

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

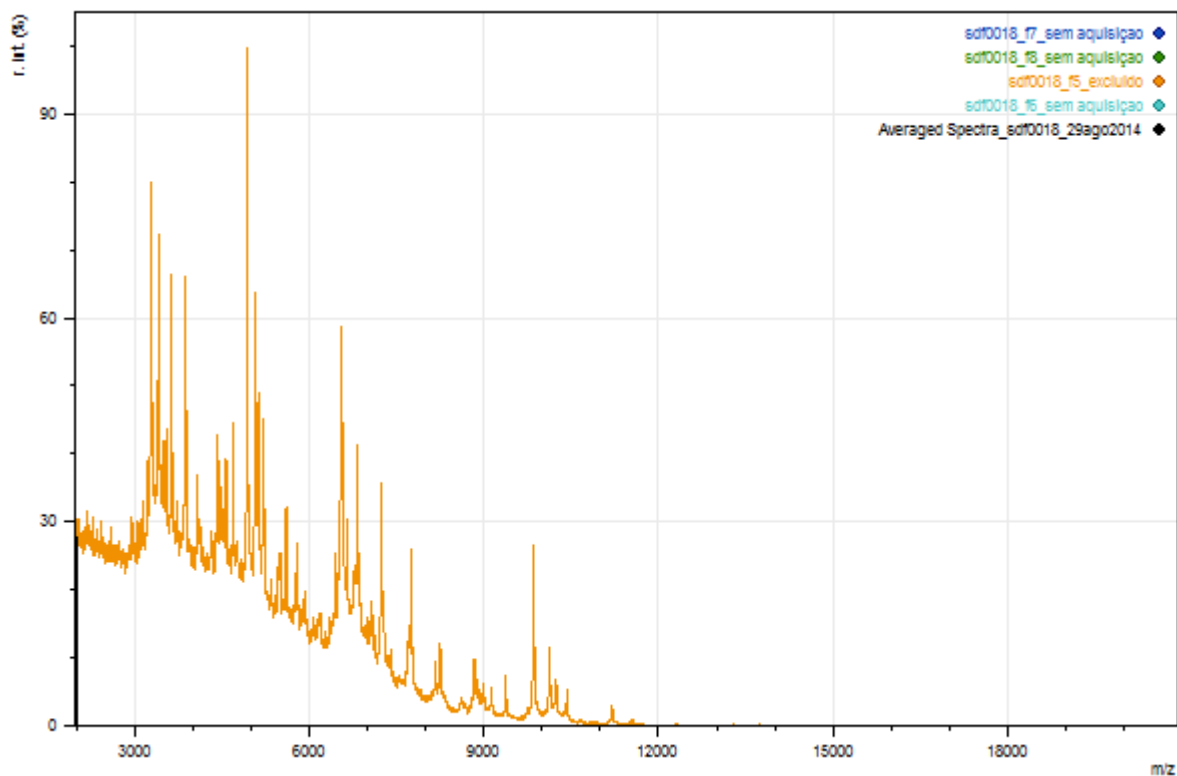
Dissolução em AF = sem registro

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 29ago2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0018_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27648
		Peak List	0



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0018_f7_sem aquisicao
- sdf0018_f8_sem aquisicao
- sdf0018_f5_excluido
- sdf0018_f6_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = sem registro

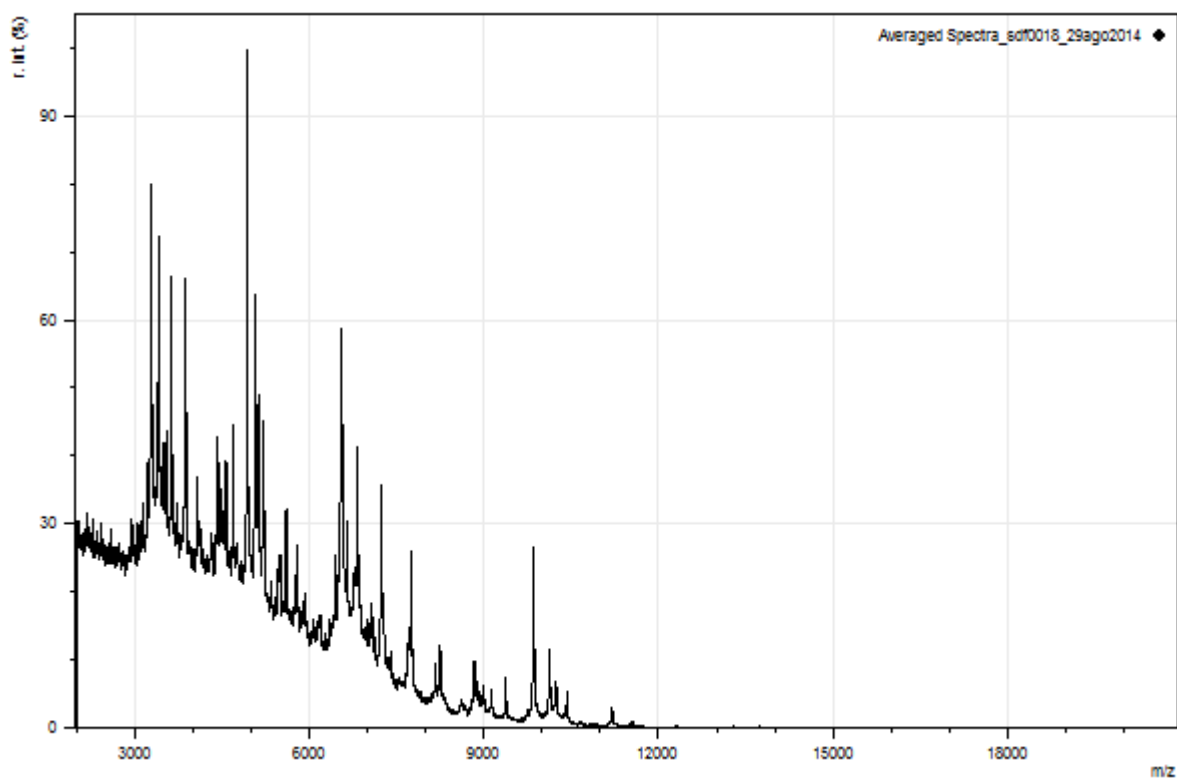
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

Ponto de interrupção = Et

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0018_29ago2014

Date	29ago2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	27648
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0018_f7_sem aquisicao
- sdf0018_f8_sem aquisicao
- sdf0018_f5_excluido
- sdf0018_f6_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 36 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = sem registro

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = sem registro

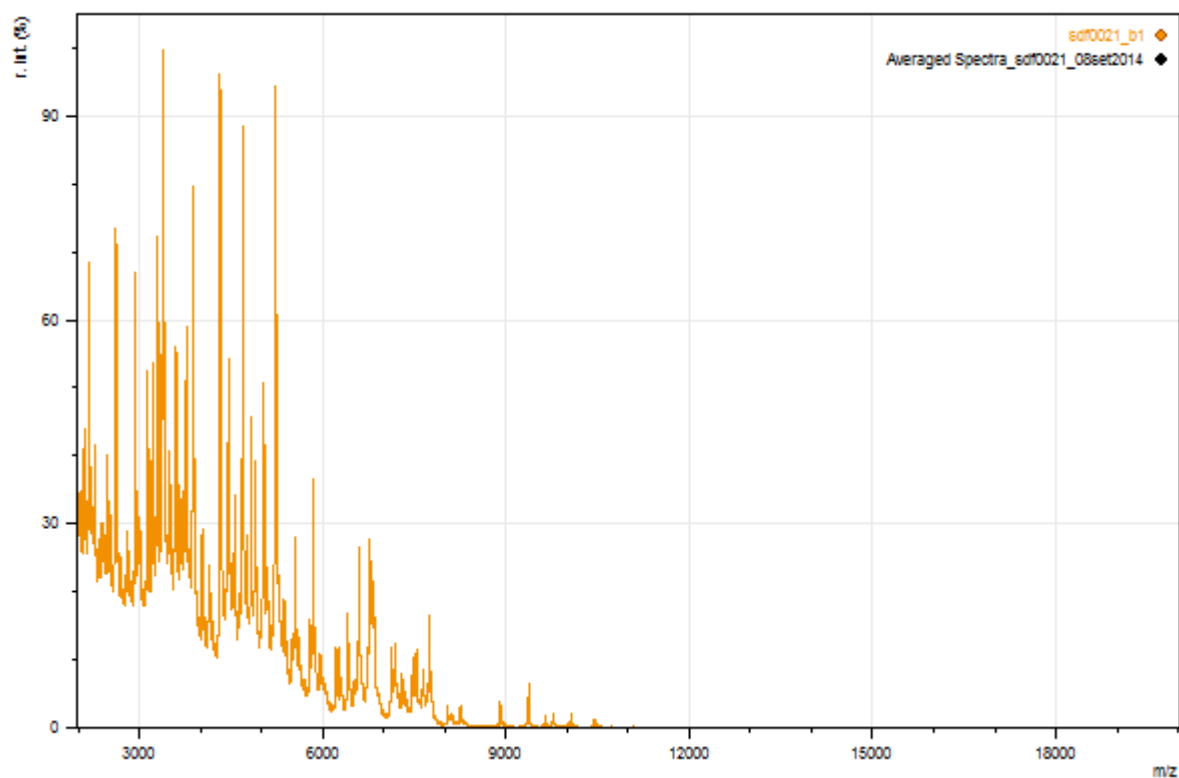
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 28ago2014

Ponto de interrupção = Et

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0021_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	233

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0021_b1

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

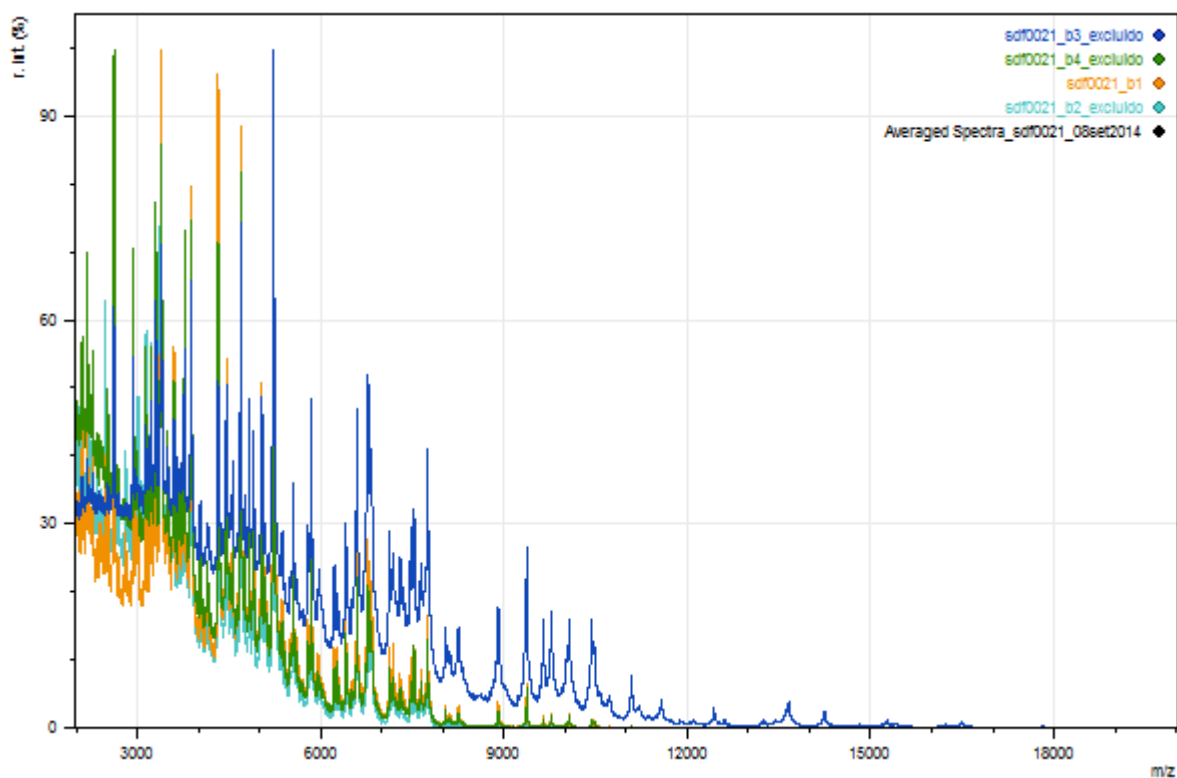
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0021_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	233



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0021_b1

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

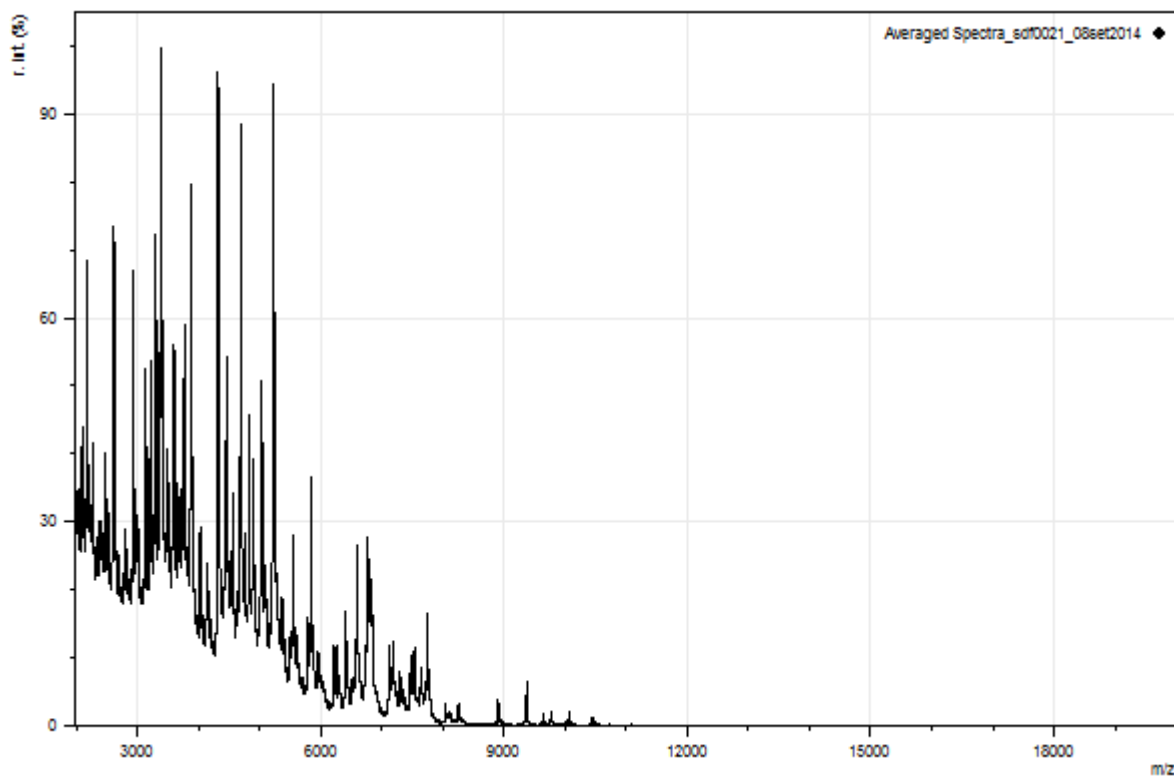
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0021_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	233



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0021_b1

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

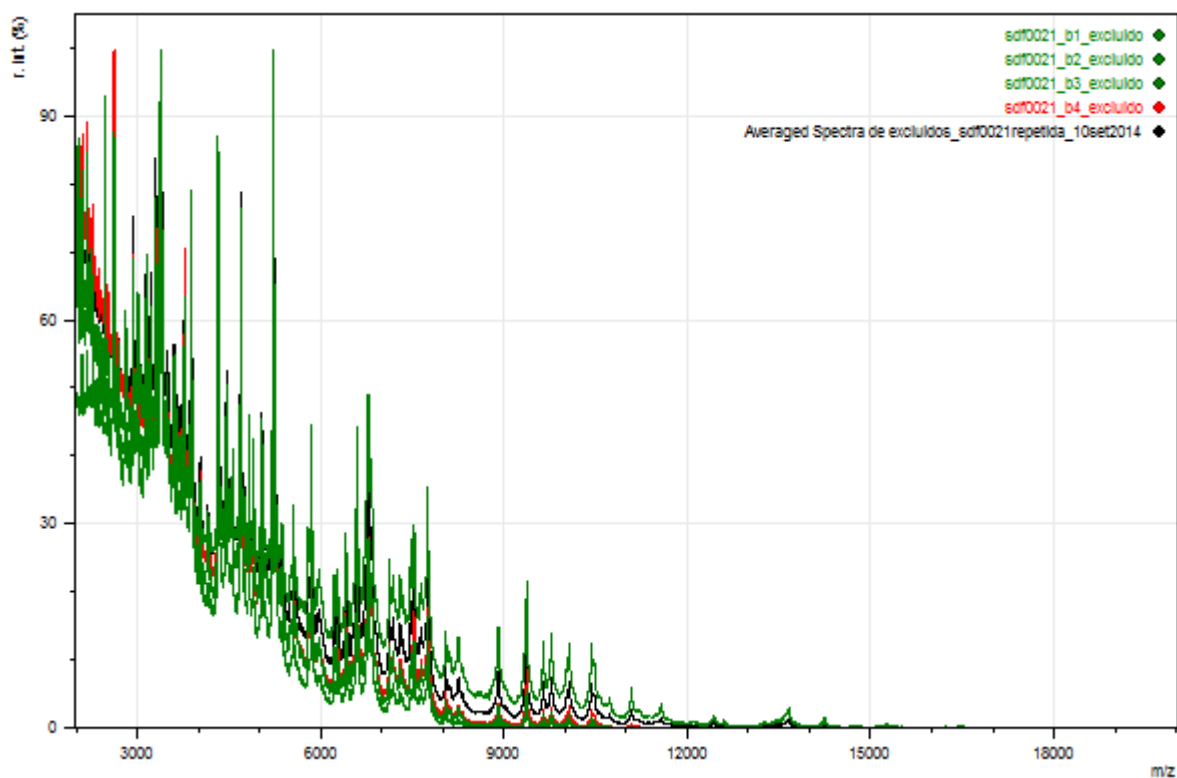
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra de excluidos_sdf0021repetida_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	505



Notes

Averaged Spectra: ANÁLISE REPETIDA APÓS

- sdf0021_b1_excluido
- sdf0021_b2_excluido
- sdf0021_b3_excluido
- sdf0021_b4_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS - análise repetida da mesma placa analisadora de 08set2014

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

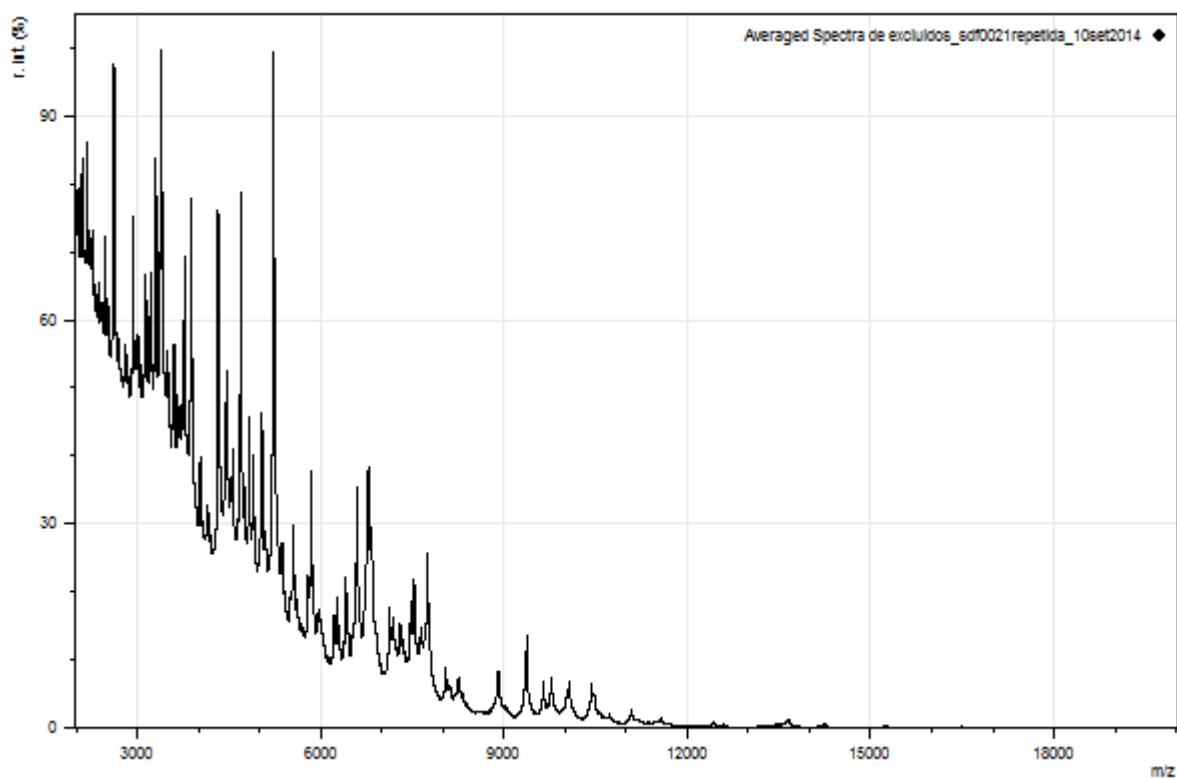
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra de excluidos_sdf0021repetida_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	505



Notes

Averaged Spectra: ANÁLISE REPETIDA APÓS

- sdf0021_b1_excluido
- sdf0021_b2_excluido
- sdf0021_b3_excluido
- sdf0021_b4_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS - análise repetida da mesma placa analisadora de 08set2014

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

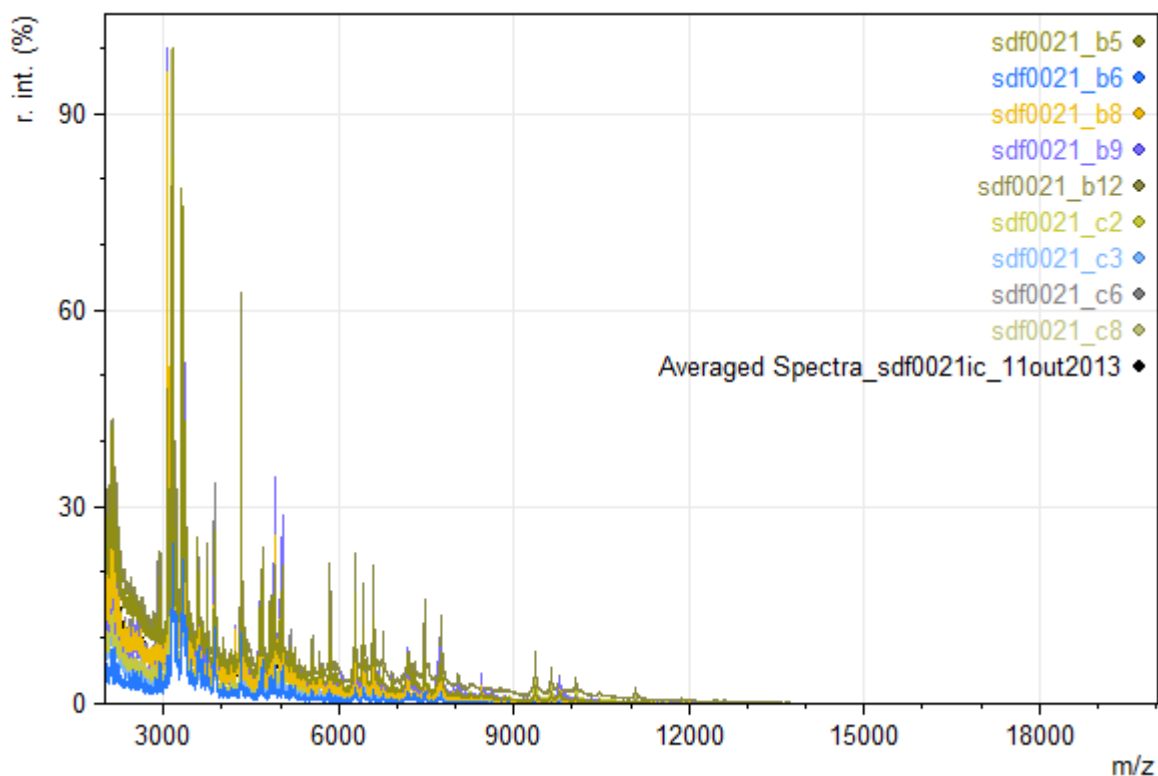
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0021ic_11out2013

Date	11out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26823
		Peak List	308



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0021_b5
- sdf0021_b6
- sdf0021_b8
- sdf0021_b9
- sdf0021_b12
- sdf0021_c2
- sdf0021_c3
- sdf0021_c6
- sdf0021_c8

Condições experimentais - Cl:

tc = 44 horas (com interrupção de 4 h da incubação para transporte)

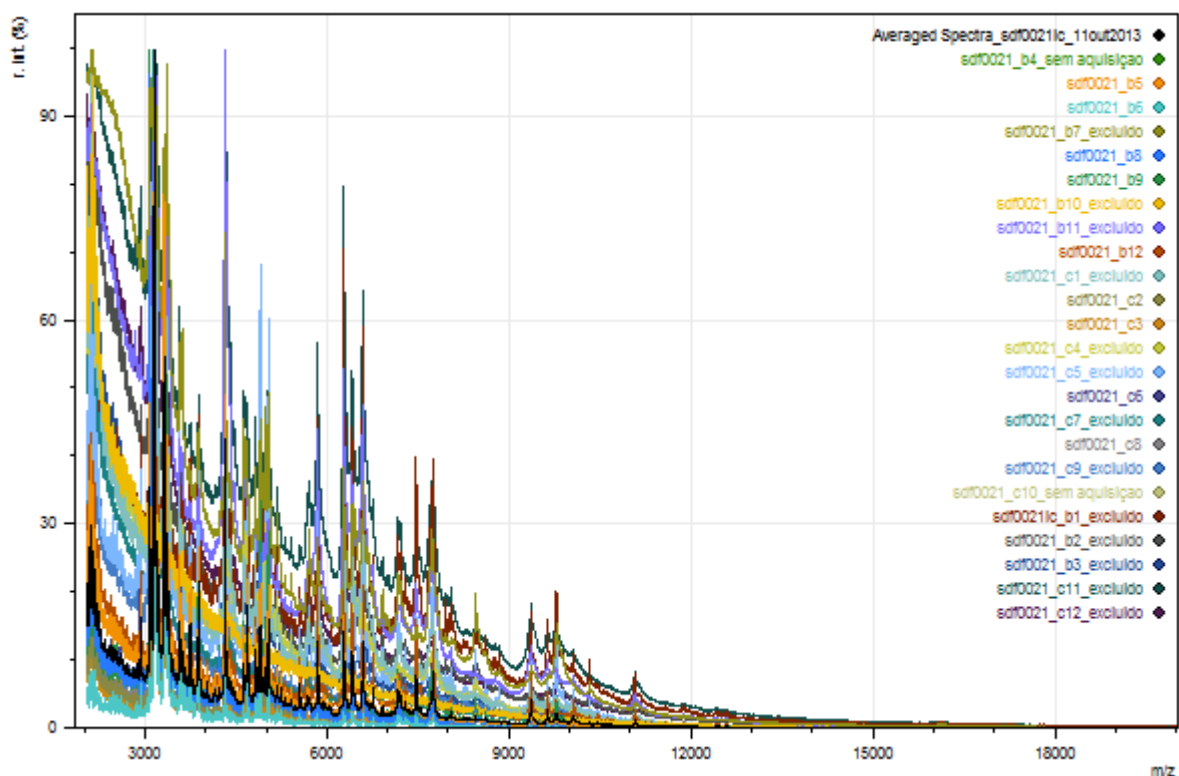
D > 5 mm (bordas)

Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0021ic_11out2013

Date	11out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26823
		Peak List	308



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0021_b5
- sdf0021_b6
- sdf0021_b8
- sdf0021_b9
- sdf0021_b12
- sdf0021_c2
- sdf0021_c3
- sdf0021_c6
- sdf0021_c8

Condições experimentais - CI:

tc = 44 horas (com interrupção de 4 h da incubação para transporte)

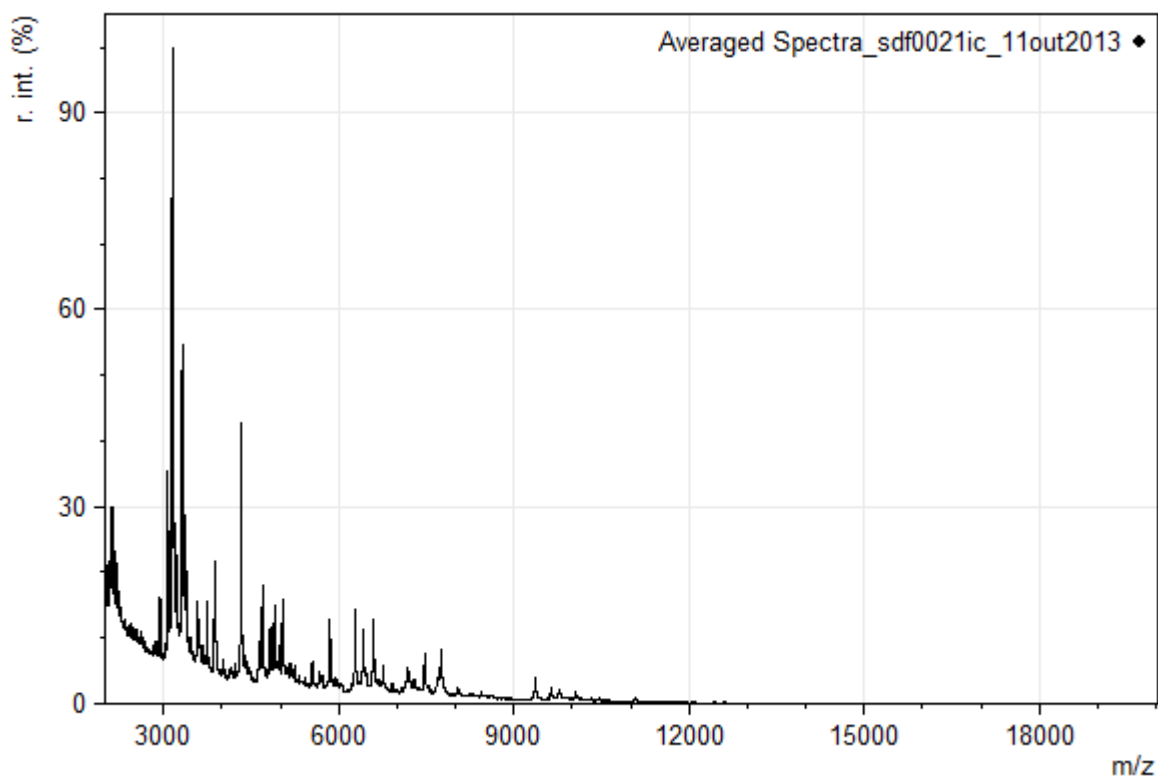
D > 5 mm (bordas)

Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0021ic_11out2013

Date	11out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26823
		Peak List	308

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0021_b5
- sdf0021_b6
- sdf0021_b8
- sdf0021_b9
- sdf0021_b12
- sdf0021_c2
- sdf0021_c3
- sdf0021_c6
- sdf0021_c8

Condições experimentais - Cl:

tc = 44 horas (com interrupção de 4 h da incubação para transporte)

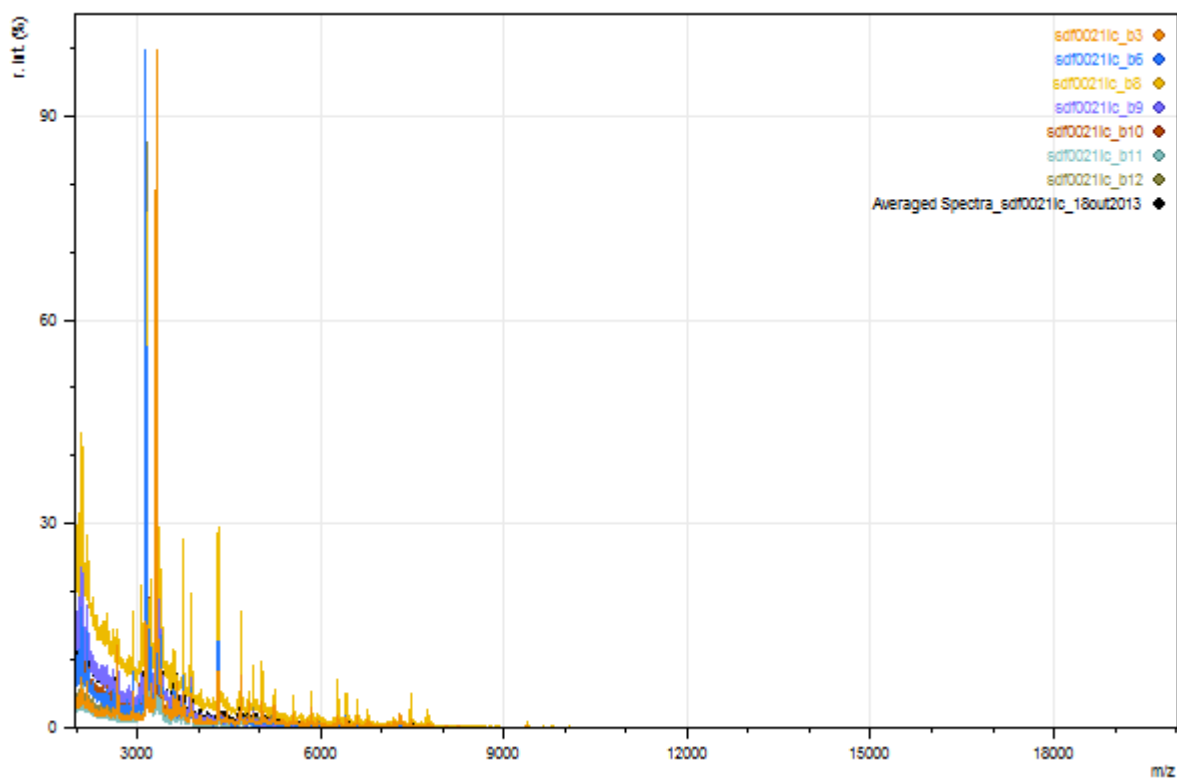
D > 5 mm (bordas)

Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0021ic_18out2013

Date	18out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	348



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0021ic_b3
- sdf0021ic_b6
- sdf0021ic_b8
- sdf0021ic_b9
- sdf0021ic_b10
- sdf0021ic_b11
- sdf0021ic_b12

Condições experimentais (CI)

tc = 22 horas

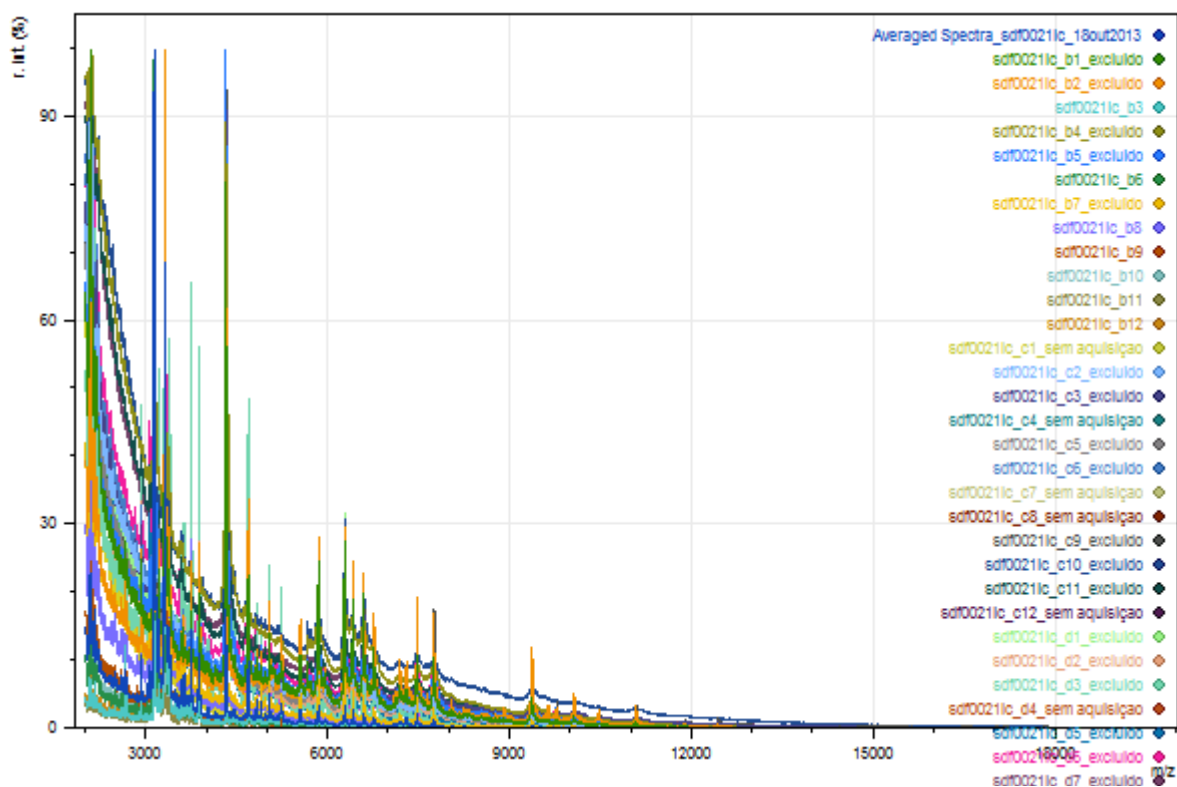
D > 4 mm (bordas)

Cultivos = 3

Origem = aliquota estoque comum

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0021ic_18out2013

Date	18out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	348



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0021ic_b3
- sdf0021ic_b6
- sdf0021ic_b8
- sdf0021ic_b9
- sdf0021ic_b10
- sdf0021ic_b11
- sdf0021ic_b12

Condições experimentais (CI)

tc = 22 horas

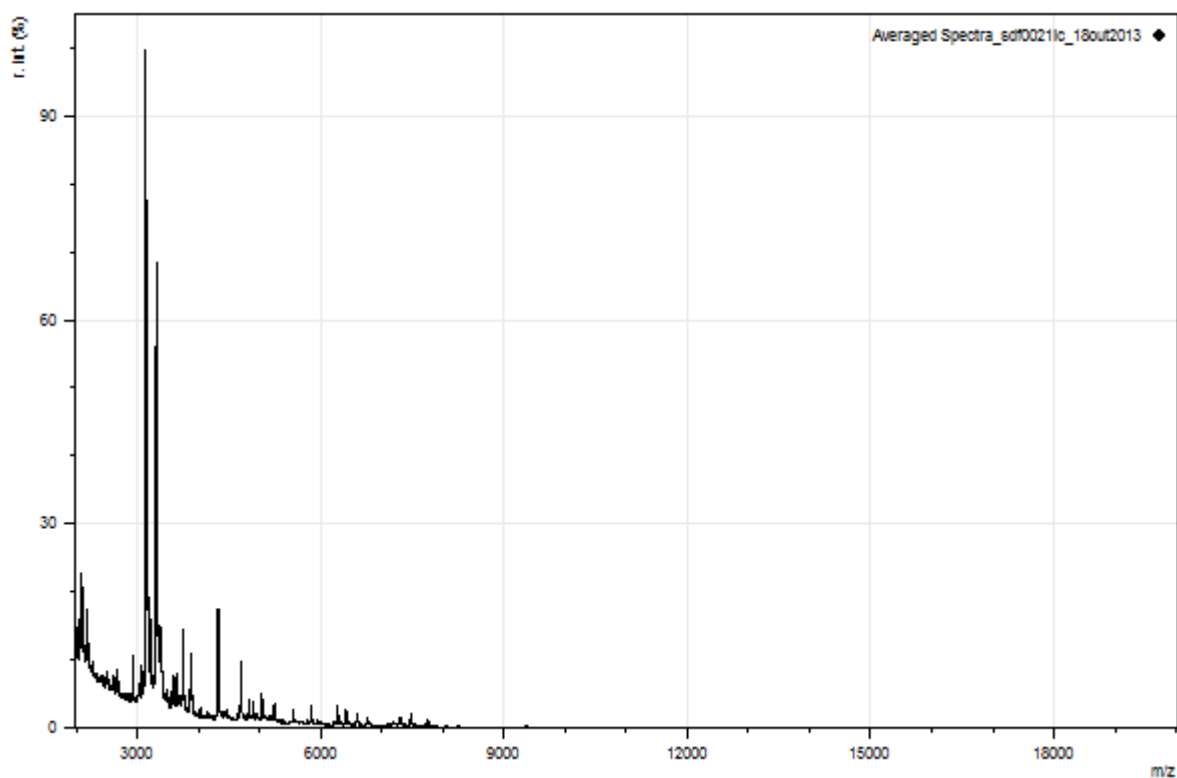
D > 4 mm (bordas)

Cultivos = 3

Origem = aliquota estoque comum

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0021ic_18out2013

Date	18out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	348



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0021ic_b3
- sdf0021ic_b6
- sdf0021ic_b8
- sdf0021ic_b9
- sdf0021ic_b10
- sdf0021ic_b11
- sdf0021ic_b12

Condições experimentais (CI)

tc = 22 horas

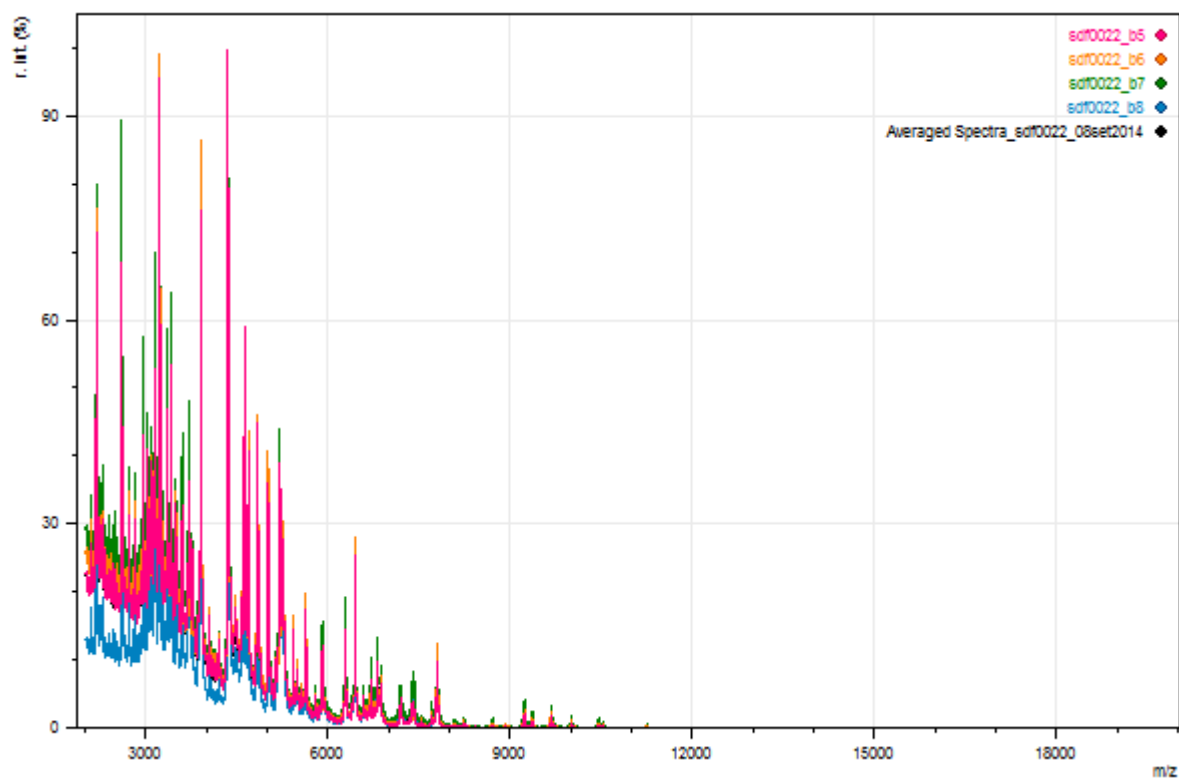
D > 4 mm (bordas)

Cultivos = 3

Origem = aliquota estoque comum

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0022_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	390

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0022_b5
- sdf0022_b6
- sdf0022_b7
- sdf0022_b8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

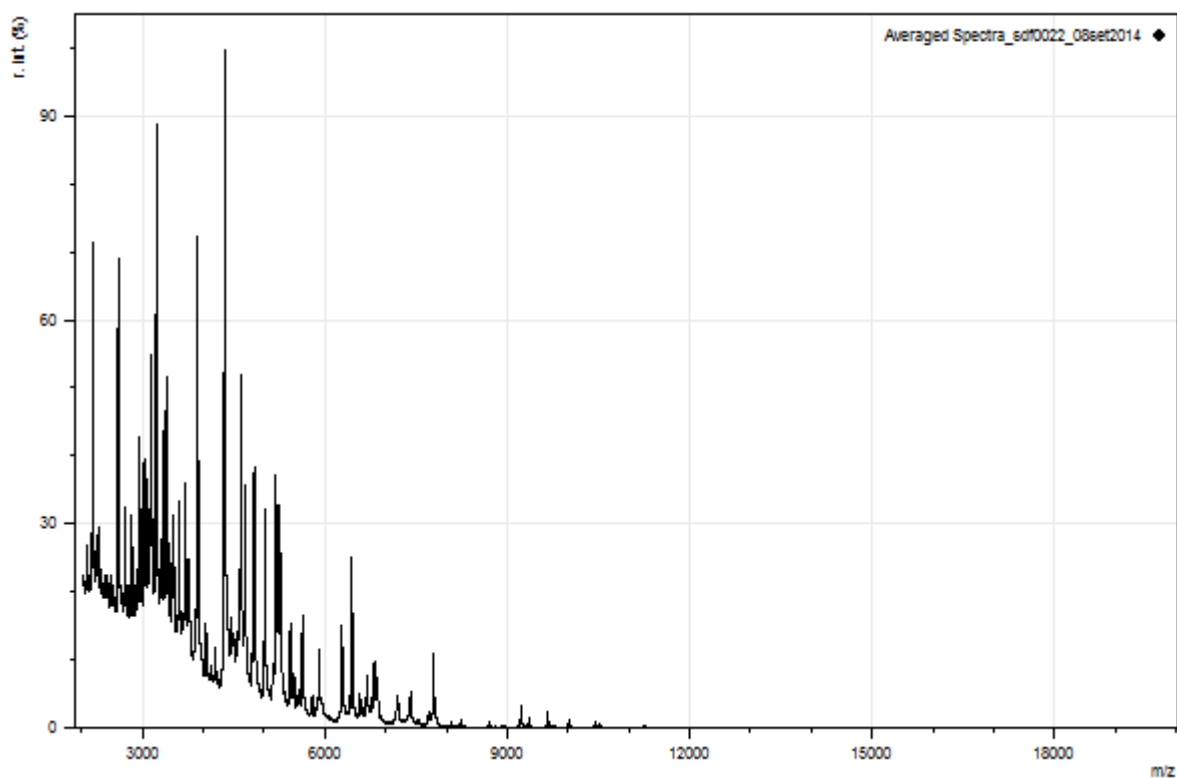
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0022_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	390

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0022_b5
- sdf0022_b6
- sdf0022_b7
- sdf0022_b8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

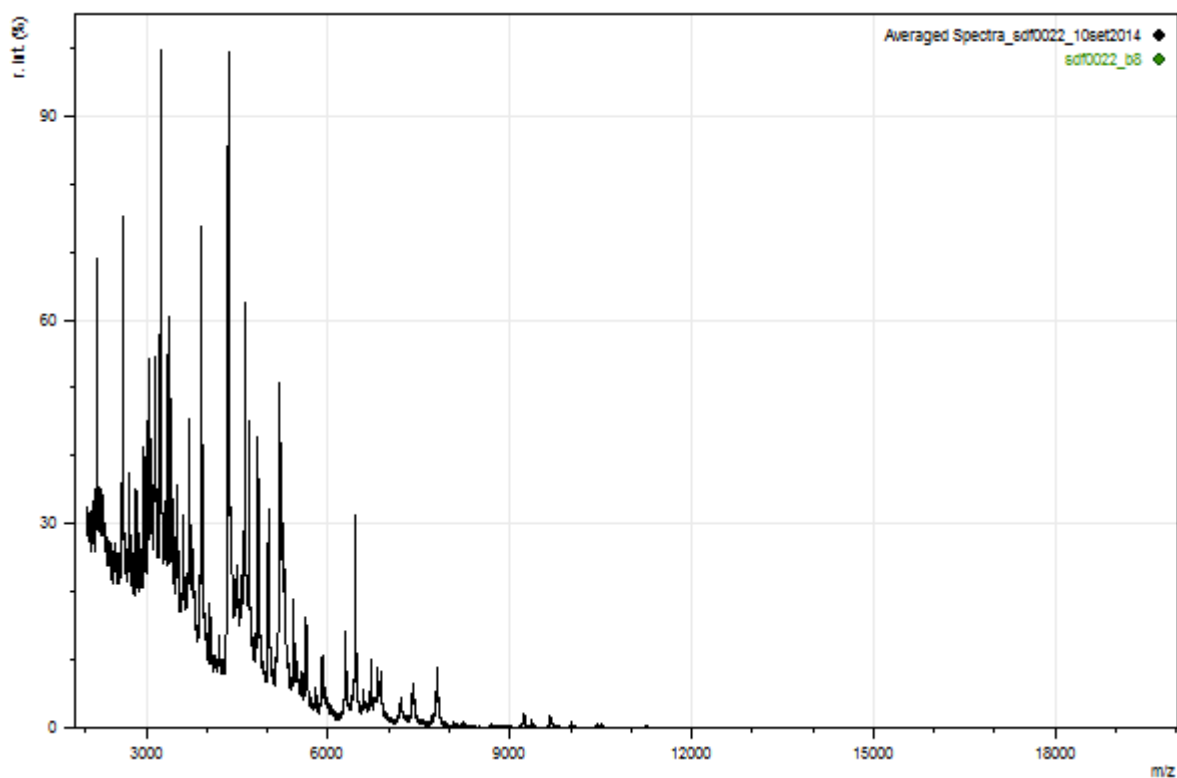
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0022_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	259

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0022_b8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS - Análise repetida da placa analisadora de 8set14

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

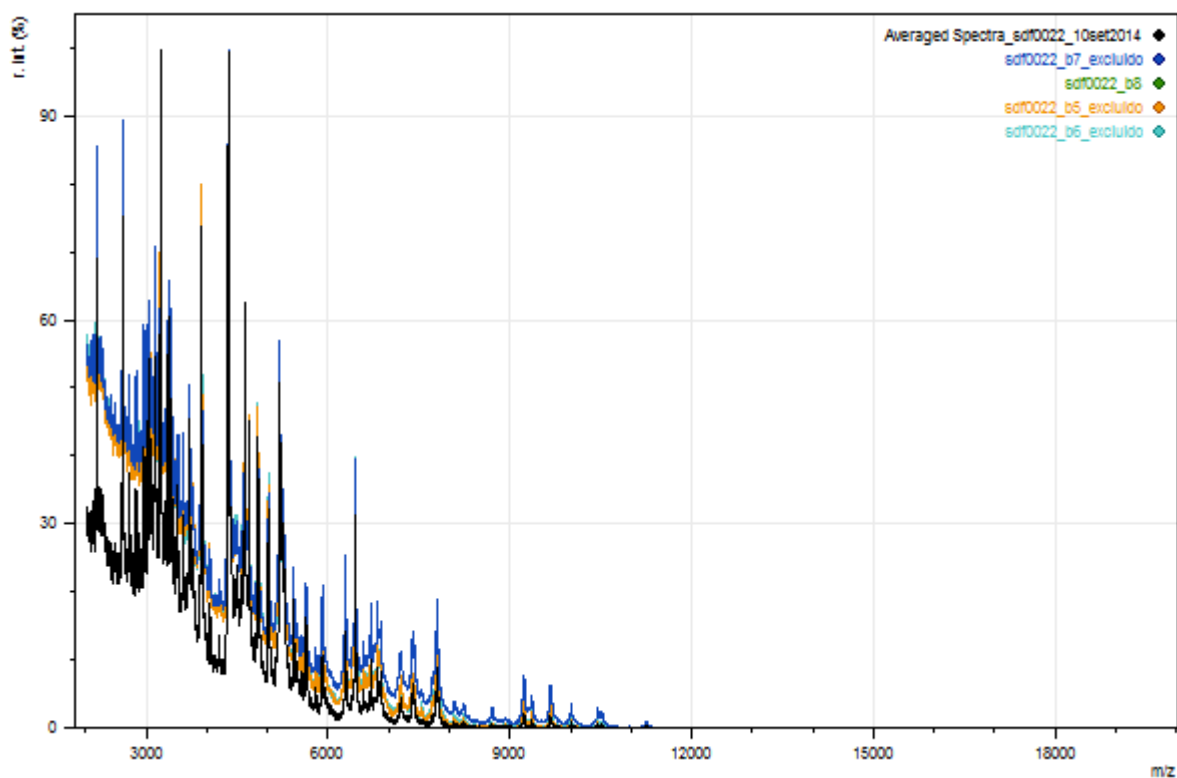
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0022_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	259



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0022_b8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS - Análise repetida da placa analisadora de 8set14

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

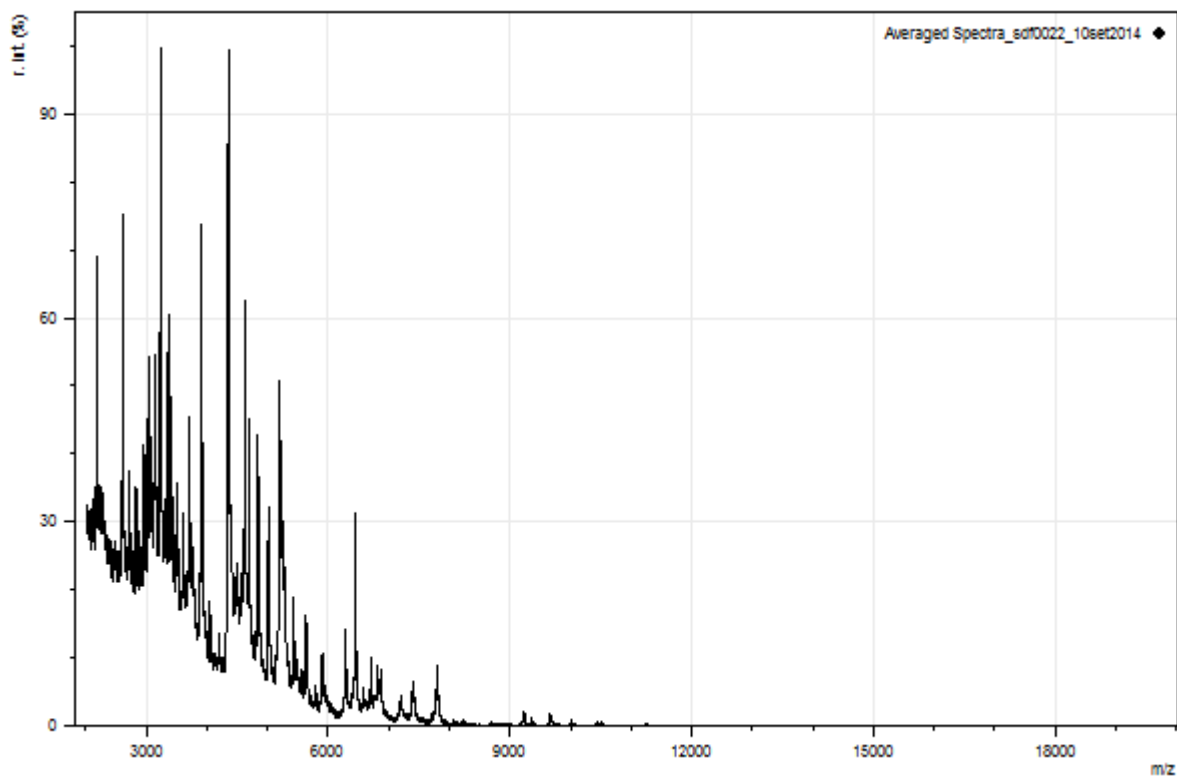
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0022_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	259

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0022_b8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS - Análise repetida da placa analisadora de 8set14

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

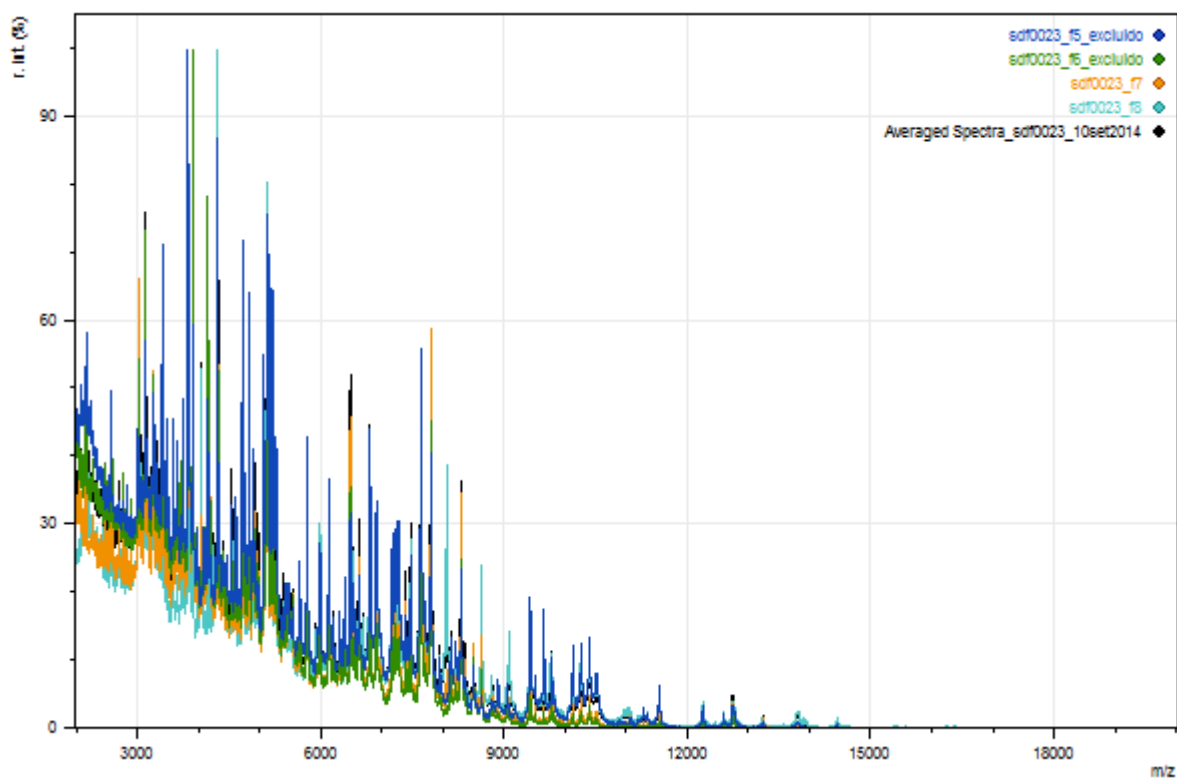
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0023_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	502

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0023_f7

- sdf0023_f8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas

D = confluyente (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = 3 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

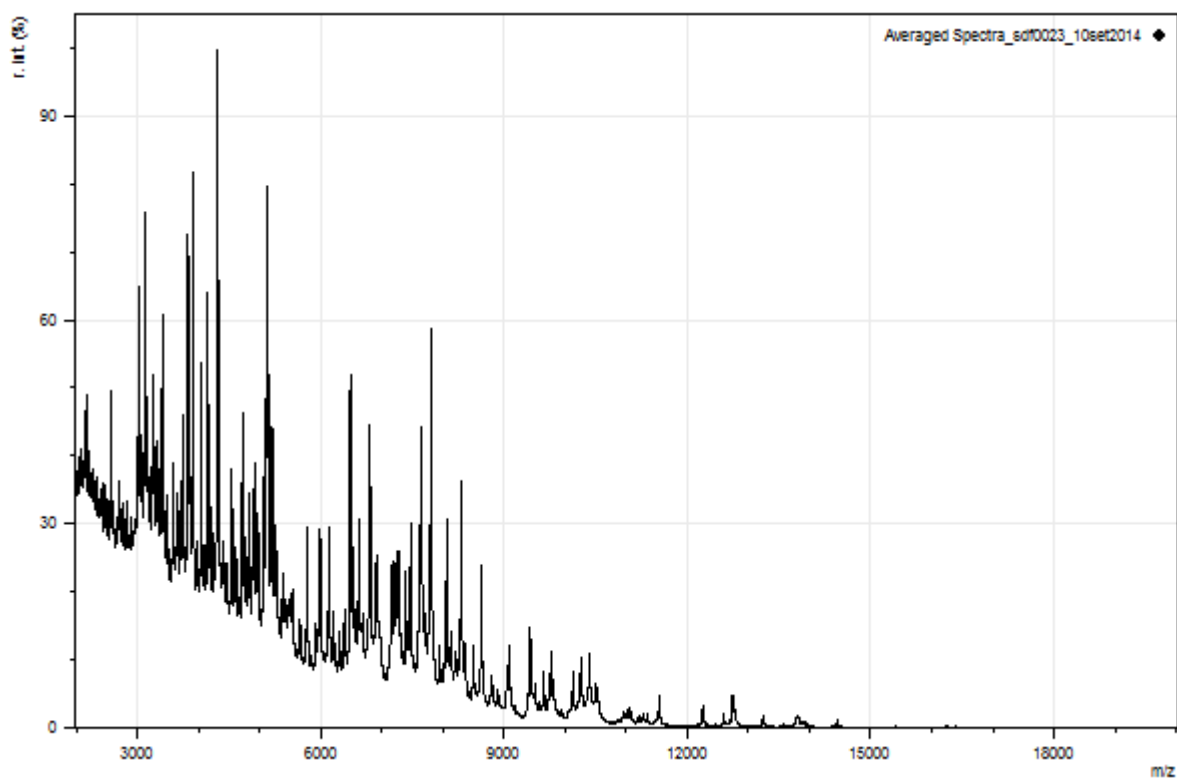
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0023_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	502

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0023_f7

- sdf0023_f8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas

D = confluyente (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = 3 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

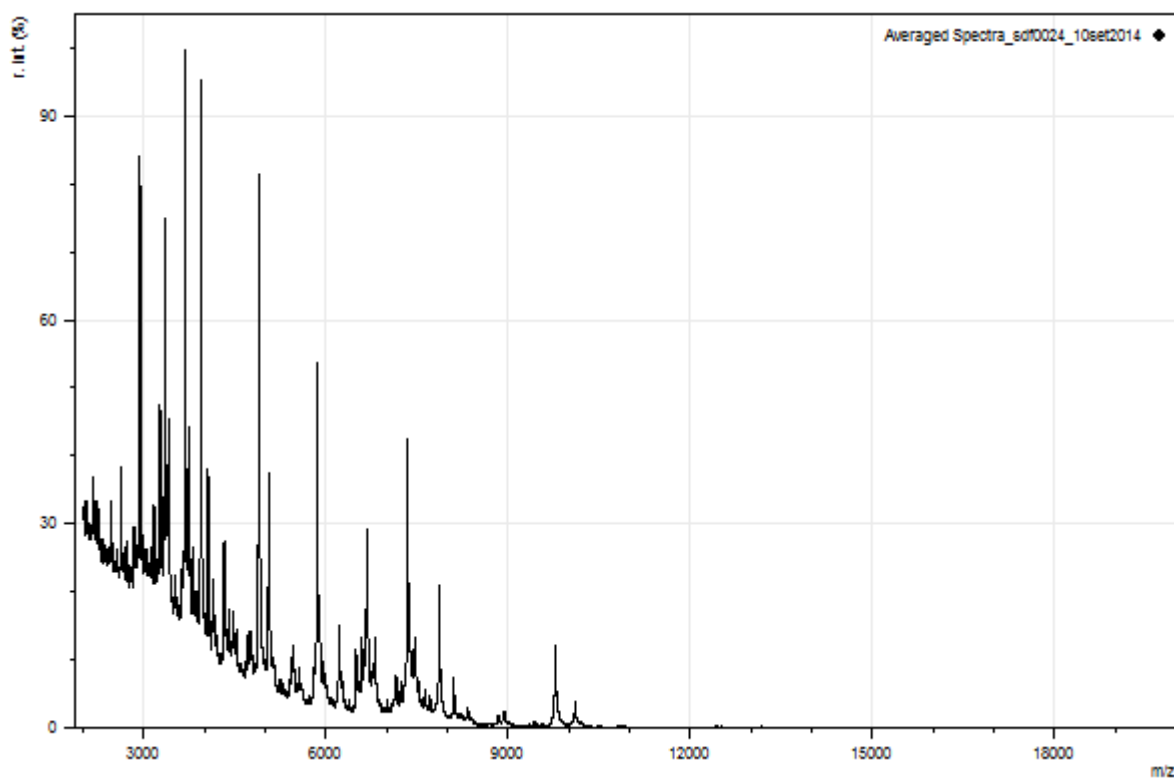
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0024_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	185

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0024_e9

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 3 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

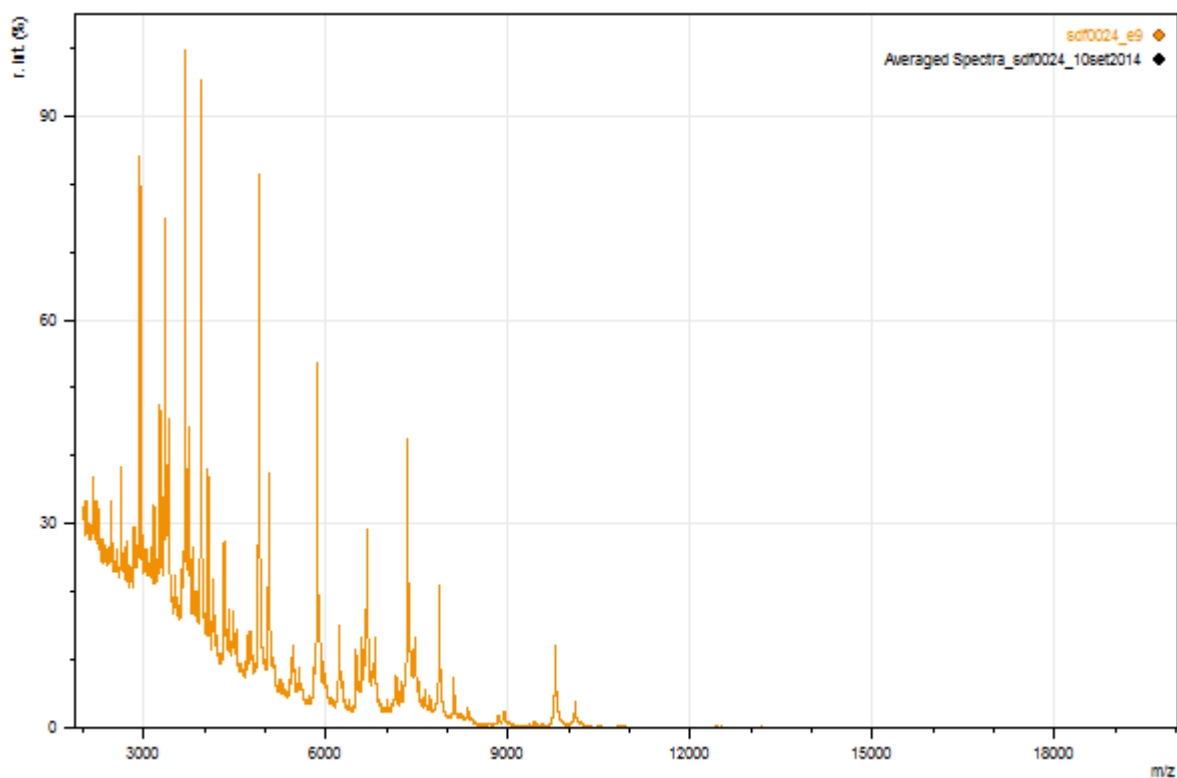
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0024_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	185



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0024_e9

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 3 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

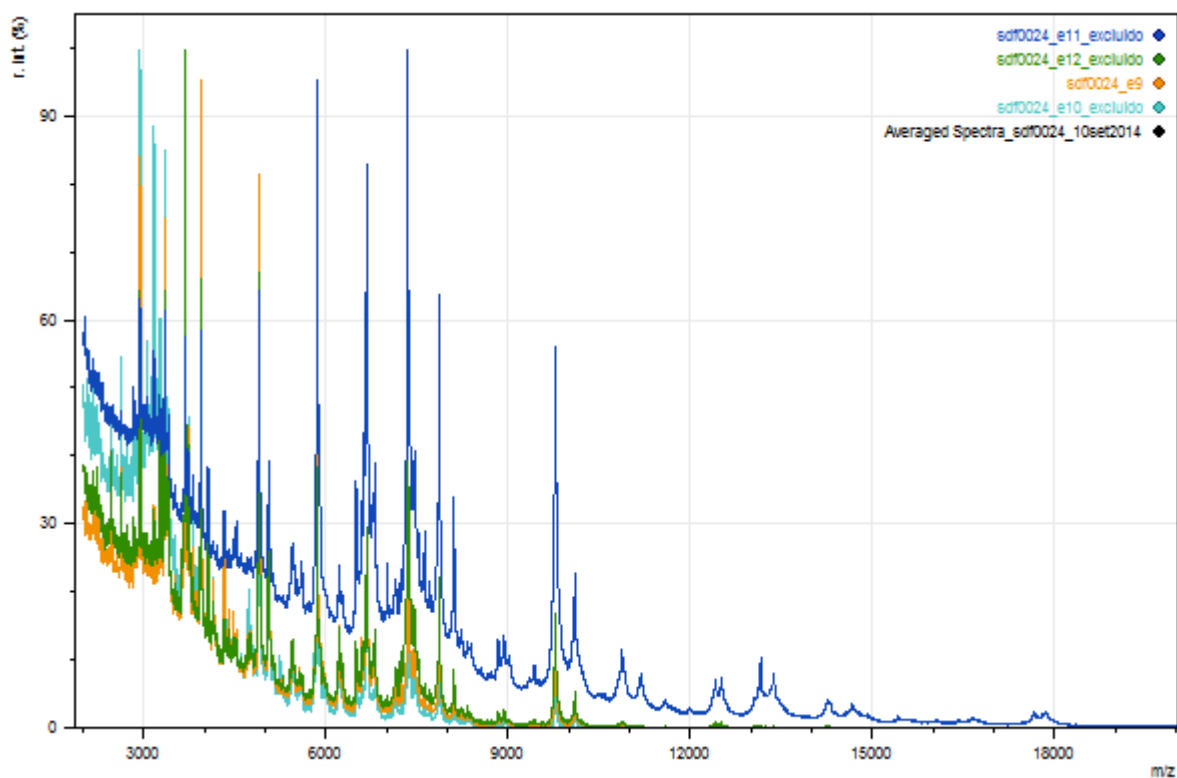
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0024_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	185



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0024_e9

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 3 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

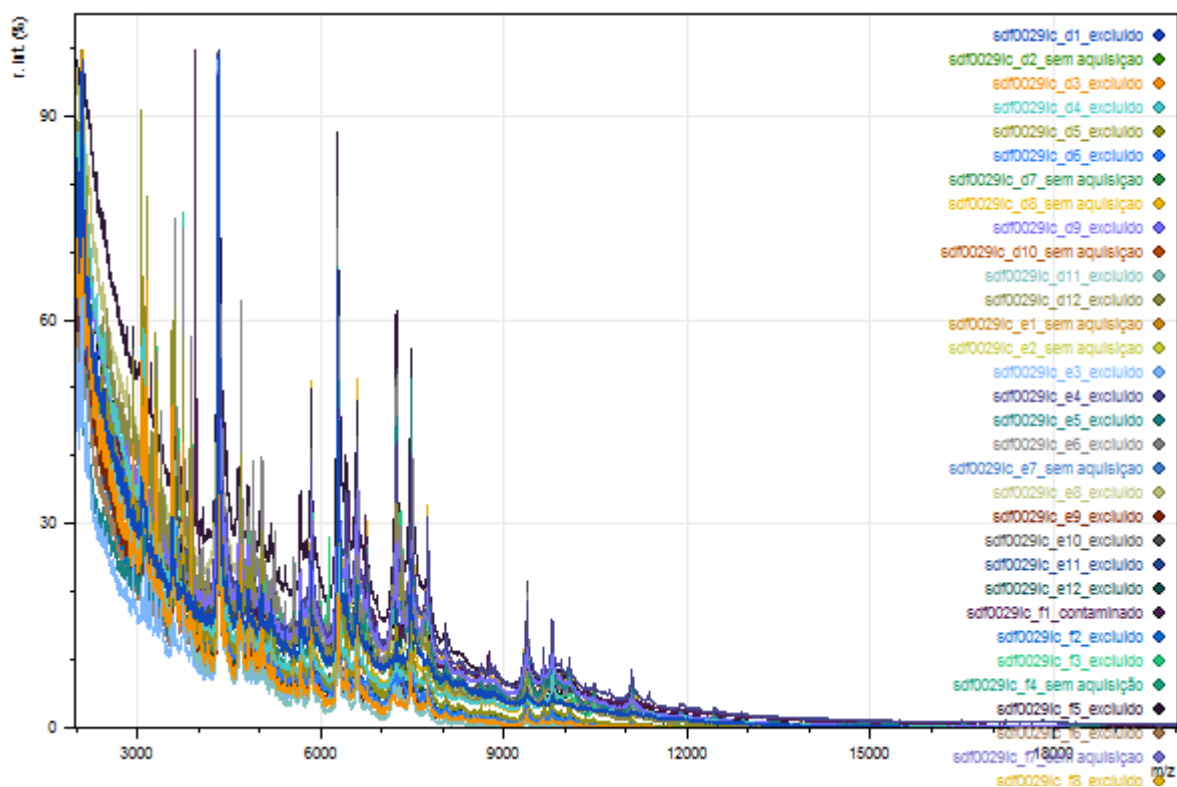
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_de excluidos_sdf0029ic_04out2013

Date	04out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	31



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0029ic_d1_excluido
- sdf0029ic_d3_excluido
- sdf0029ic_d4_excluido
- sdf0029ic_d5_excluido
- sdf0029ic_d6_excluido
- sdf0029ic_d9_excluido
- sdf0029ic_d11_excluido
- sdf0029ic_d12_excluido
- sdf0029ic_e3_excluido
- sdf0029ic_e4_excluido
- sdf0029ic_e5_excluido
- sdf0029ic_e6_excluido
- sdf0029ic_e8_excluido
- sdf0029ic_e9_excluido
- sdf0029ic_e10_excluido
- sdf0029ic_e11_excluido
- sdf0029ic_e12_excluido
- sdf0029ic_f2_excluido
- sdf0029ic_f3_excluido
- sdf0029ic_f5_excluido
- sdf0029ic_f6_excluido
- sdf0029ic_f8_excluido

- sdf0029ic_f11_excluido
- sdf0029ic_f12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 44 horas

D > 4 mm (bordas)

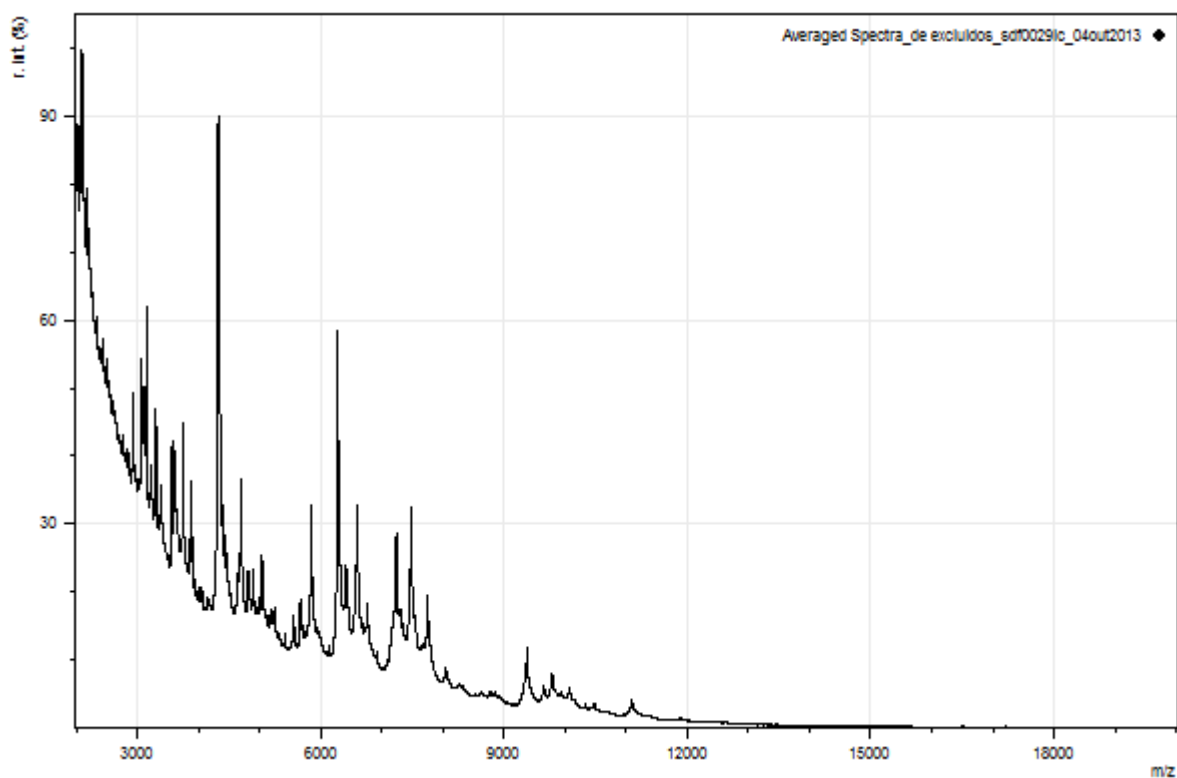
Cultivos = 3

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_de excluidos_sdf0029ic_04out2013

Date	04out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	31

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0029ic_d1_excluido
- sdf0029ic_d3_excluido
- sdf0029ic_d4_excluido
- sdf0029ic_d5_excluido
- sdf0029ic_d6_excluido
- sdf0029ic_d9_excluido
- sdf0029ic_d11_excluido
- sdf0029ic_d12_excluido
- sdf0029ic_e3_excluido
- sdf0029ic_e4_excluido
- sdf0029ic_e5_excluido
- sdf0029ic_e6_excluido
- sdf0029ic_e8_excluido
- sdf0029ic_e9_excluido
- sdf0029ic_e10_excluido
- sdf0029ic_e11_excluido
- sdf0029ic_e12_excluido
- sdf0029ic_f2_excluido
- sdf0029ic_f3_excluido
- sdf0029ic_f5_excluido
- sdf0029ic_f6_excluido
- sdf0029ic_f8_excluido

- sdf0029ic_f11_excluido
- sdf0029ic_f12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 44 horas

D > 4 mm (bordas)

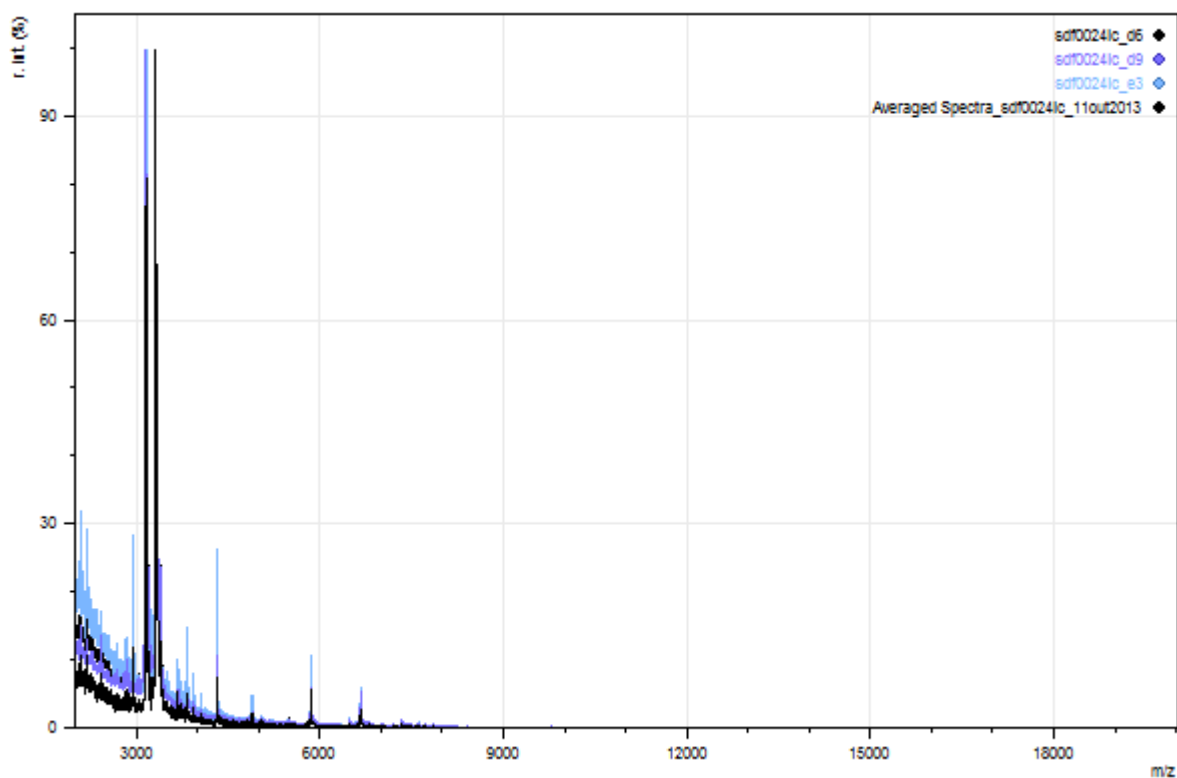
Cultivos = 3

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0024ic_11out2013

Date	11out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26823
		Peak List	495

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0024ic_d6
- sdf0024ic_d9
- sdf0024ic_e3

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 46 horas de incubação (interrupção de 4h para transporte)

D = confluyente (bordas)

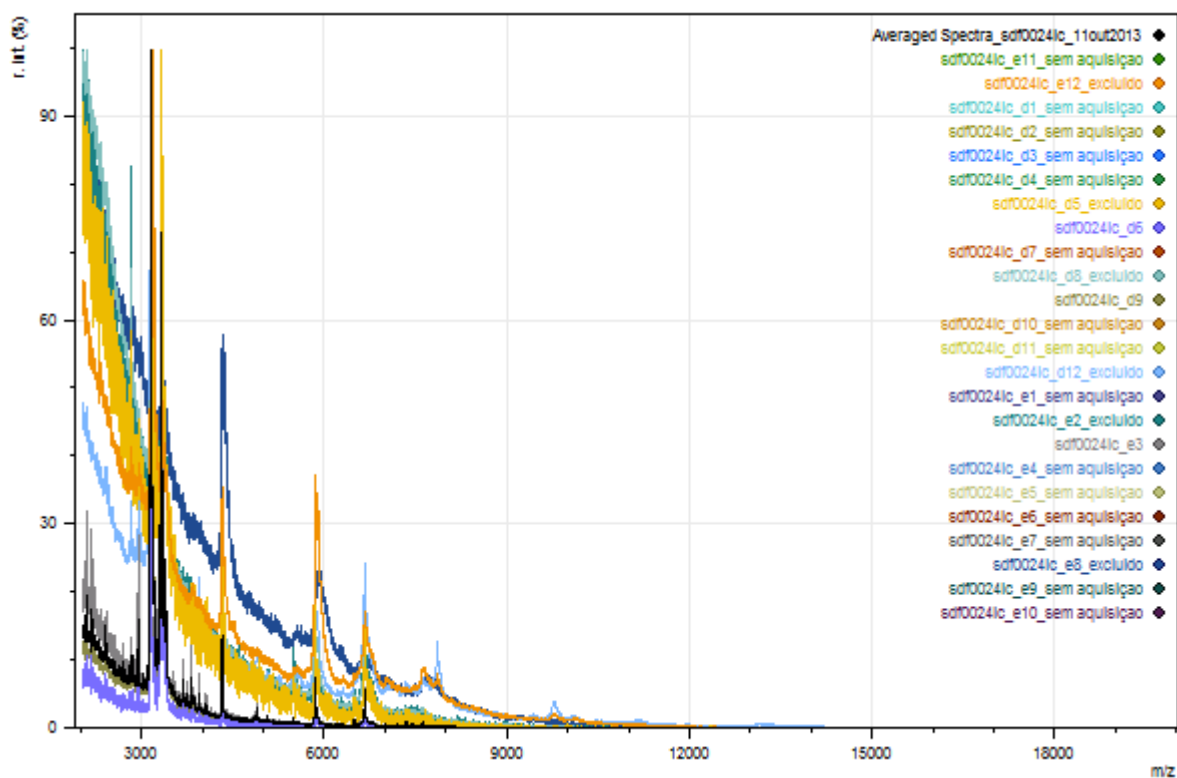
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Matriz = 1,2 mL por poço.

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0024ic_11out2013

Date	11out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26823
		Peak List	495



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0024ic_d6
- sdf0024ic_d9
- sdf0024ic_e3

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 46 horas de incubação (interrupção de 4h para transporte)

D = confluyente (bordas)

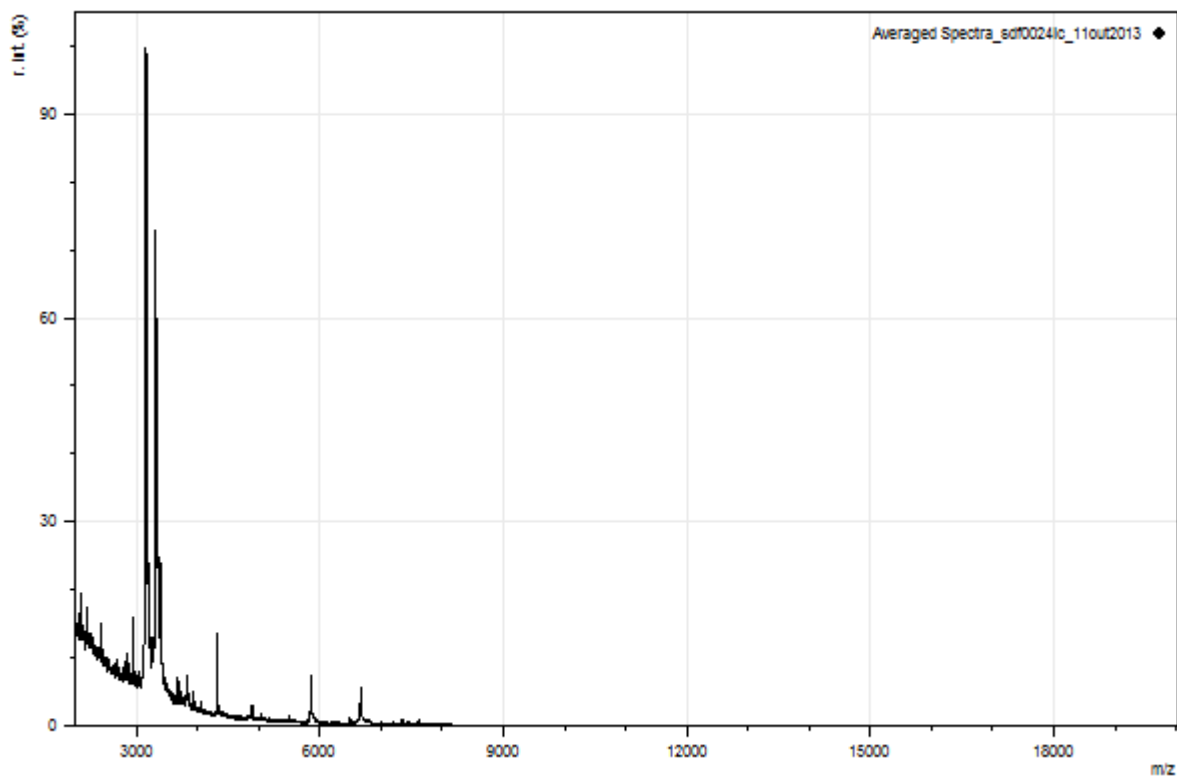
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Matriz = 1,2 mL por poço.

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0024ic_11out2013

Date	11out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26823
		Peak List	495

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0024ic_d6
- sdf0024ic_d9
- sdf0024ic_e3

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 46 horas de incubação (interrupção de 4h para transporte)

D = confluyente (bordas)

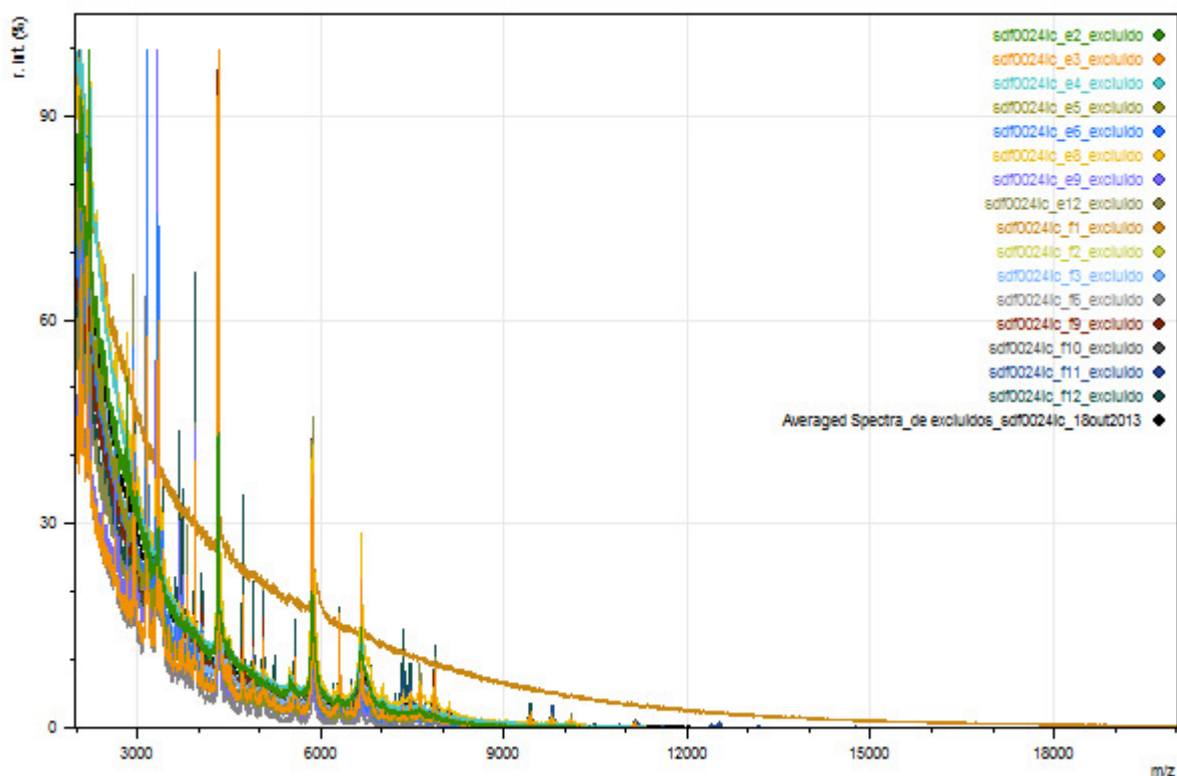
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Matriz = 1,2 mL por poço.

mMass Report: Averaged Spectra_de excluidos_sdf0024ic_18out2013

Date	18out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	332



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0024ic_e2_excluido
- sdf0024ic_e3_excluido
- sdf0024ic_e4_excluido
- sdf0024ic_e5_excluido
- sdf0024ic_e6_excluido
- sdf0024ic_e8_excluido
- sdf0024ic_e9_excluido
- sdf0024ic_e12_excluido
- sdf0024ic_f1_excluido
- sdf0024ic_f2_excluido
- sdf0024ic_f3_excluido
- sdf0024ic_f6_excluido
- sdf0024ic_f9_excluido
- sdf0024ic_f10_excluido
- sdf0024ic_f11_excluido
- sdf0024ic_f12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

tc = 32 horas

D = 3 mm

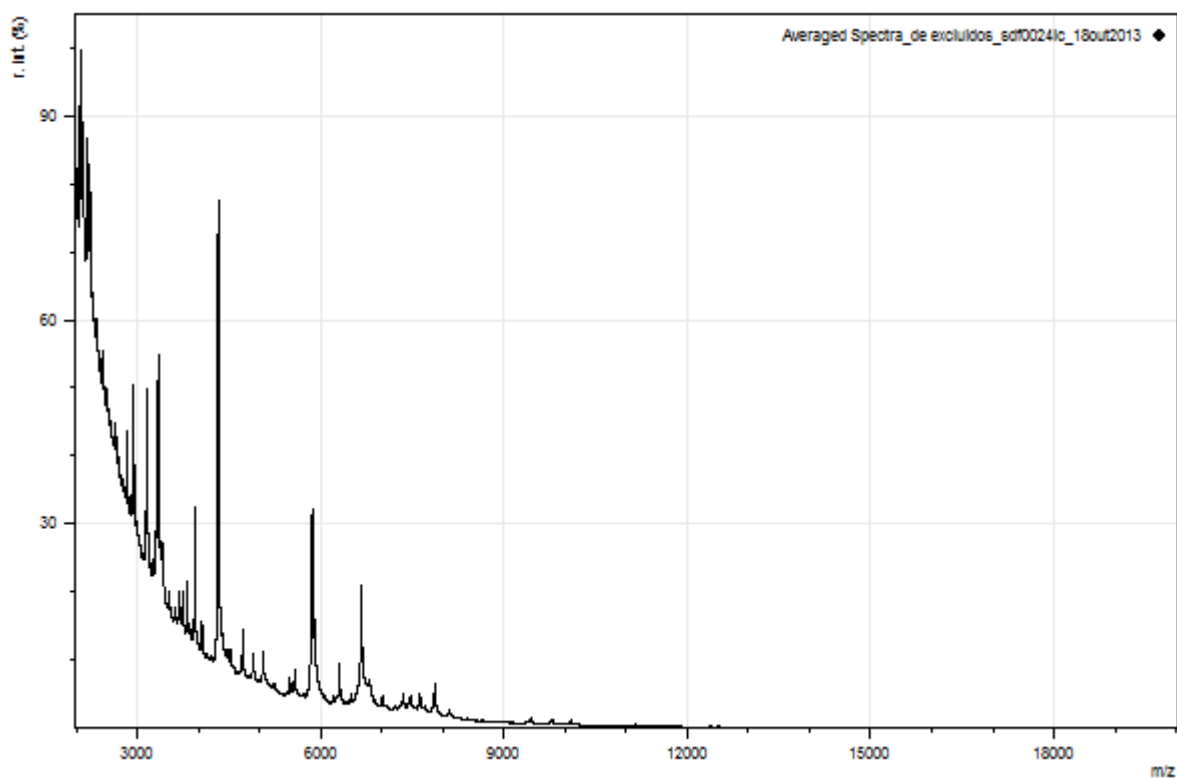
Cultivos = 2

Origem = aliquota estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_de excluidos_sdf0024ic_18out2013

Date	18out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	332

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0024ic_e2_excluido
- sdf0024ic_e3_excluido
- sdf0024ic_e4_excluido
- sdf0024ic_e5_excluido
- sdf0024ic_e6_excluido
- sdf0024ic_e8_excluido
- sdf0024ic_e9_excluido
- sdf0024ic_e12_excluido
- sdf0024ic_f1_excluido
- sdf0024ic_f2_excluido
- sdf0024ic_f3_excluido
- sdf0024ic_f6_excluido
- sdf0024ic_f9_excluido
- sdf0024ic_f10_excluido
- sdf0024ic_f11_excluido
- sdf0024ic_f12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

tc = 32 horas

D = 3 mm

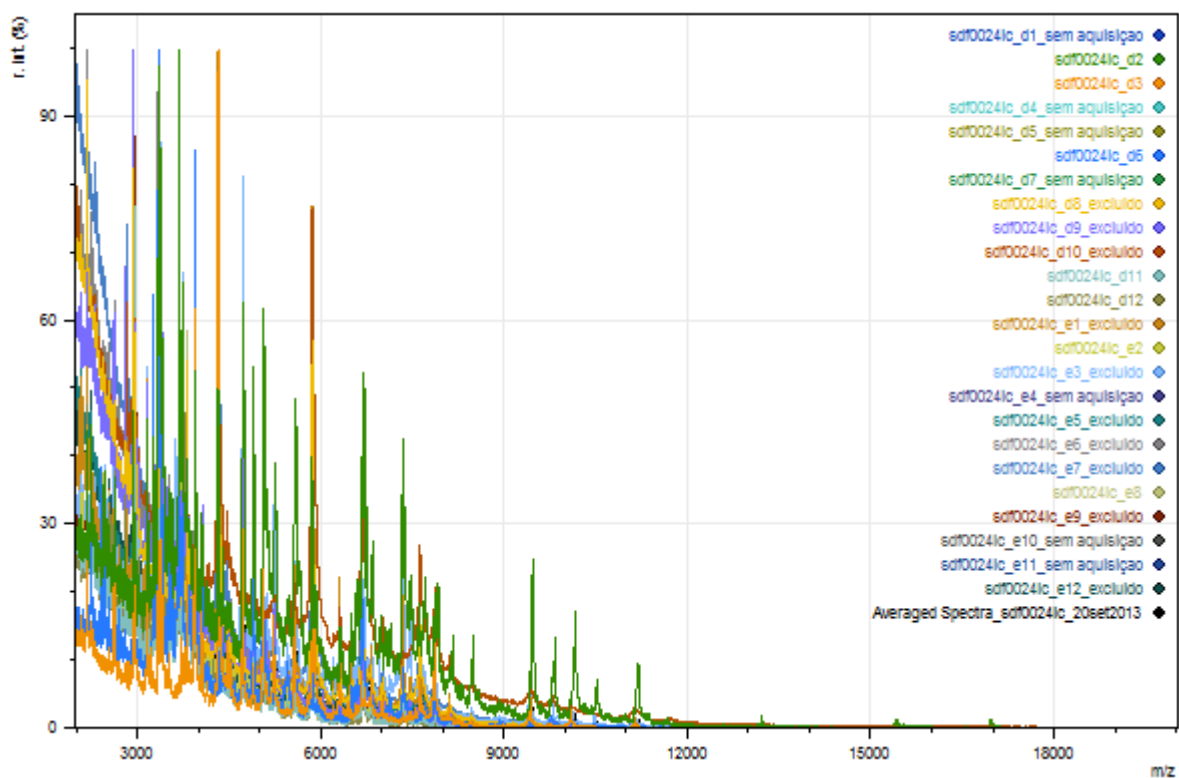
Cultivos = 2

Origem = aliquota estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0024ic_20set2013

Date	20set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	386



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0024ic_d2
- sdf0024ic_d3
- sdf0024ic_d6
- sdf0024ic_d11
- sdf0024ic_d12
- sdf0024ic_e2
- sdf0024ic_e8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 50 horas

D > 4 mm (bordas)

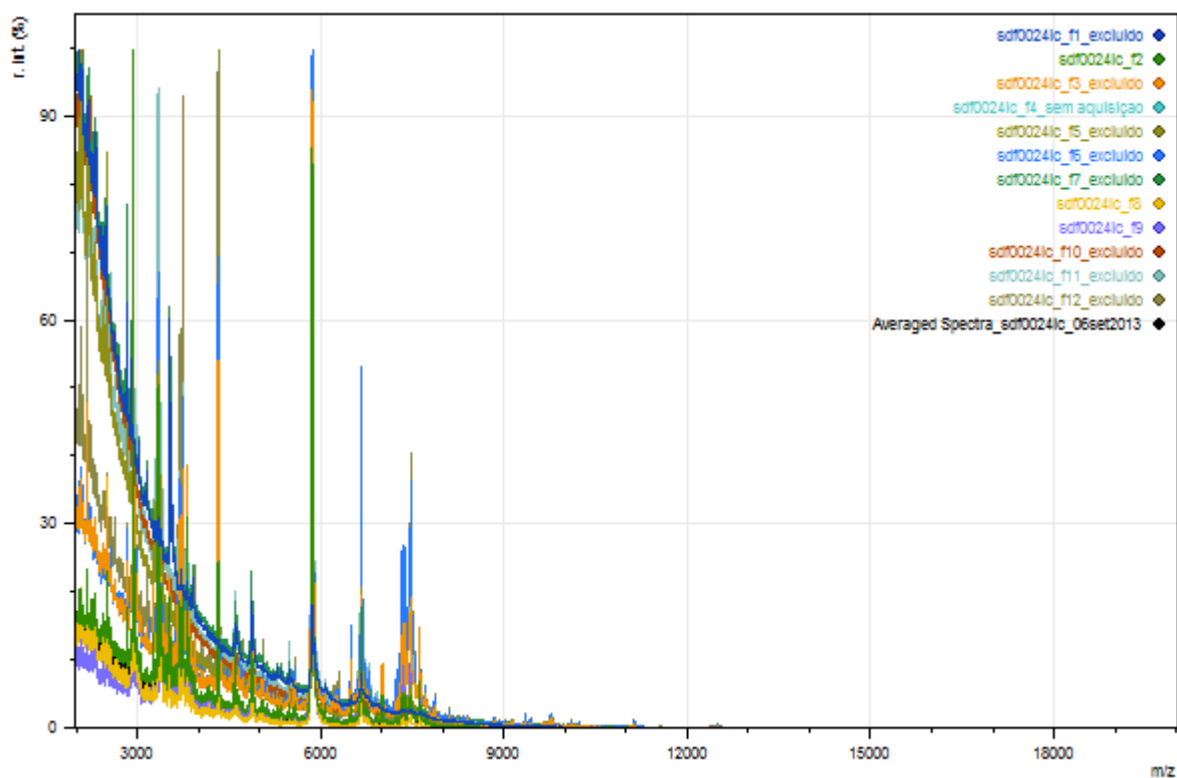
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Matriz = 1,2 mL por poço

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0024ic_06set2013

Date	06set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	445



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0024ic_f2
- sdf0024ic_f8
- sdf0024ic_f9

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 22 horas

D = 2 mm

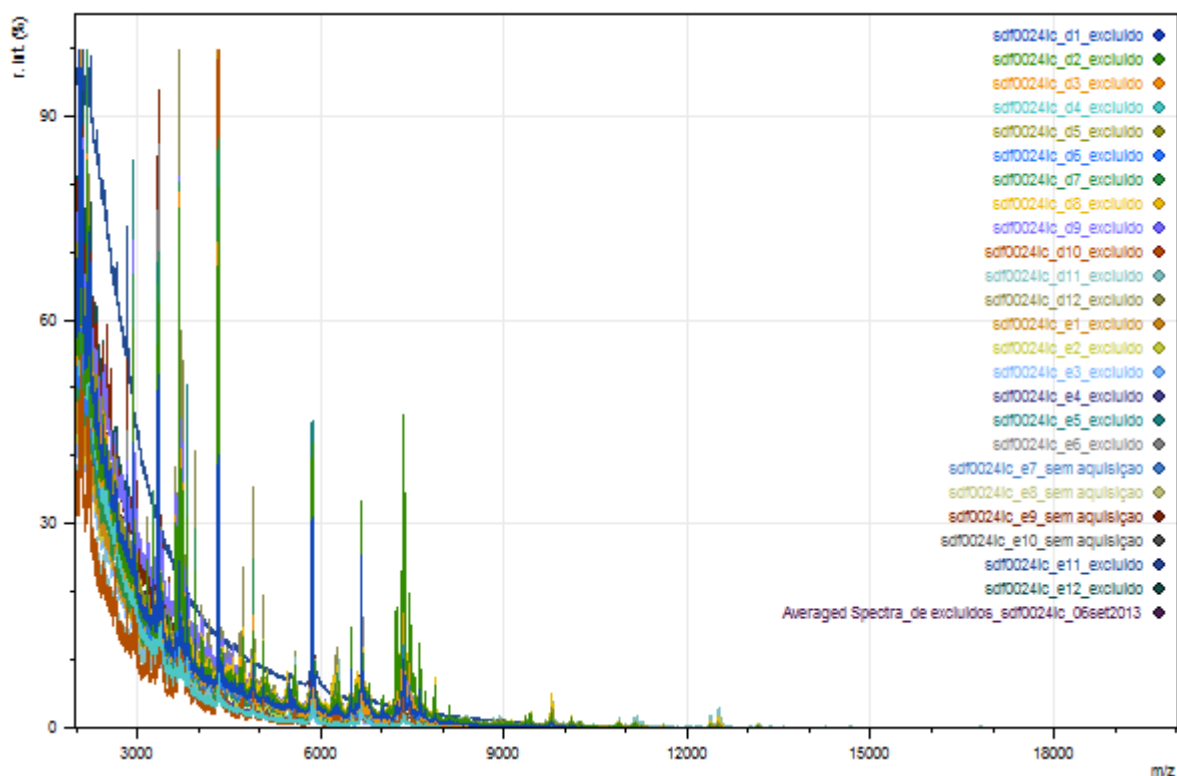
Cultivos = 1

Origem = repiques de cultivo da Juliana

Cultivo resfriado

mMass Report: Averaged Spectra_de excluidos_sdf0024ic_06set2013

Date	06set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	285



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0024ic_d1_excluido
- sdf0024ic_d2_excluido
- sdf0024ic_d3_excluido
- sdf0024ic_d4_excluido
- sdf0024ic_d5_excluido
- sdf0024ic_d6_excluido
- sdf0024ic_d7_excluido
- sdf0024ic_d8_excluido
- sdf0024ic_d9_excluido
- sdf0024ic_d10_excluido
- sdf0024ic_d11_excluido
- sdf0024ic_d12_excluido
- sdf0024ic_e1_excluido
- sdf0024ic_e2_excluido
- sdf0024ic_e3_excluido
- sdf0024ic_e4_excluido
- sdf0024ic_e5_excluido
- sdf0024ic_e6_excluido
- sdf0024ic_e11_excluido
- sdf0024ic_e12_excluido

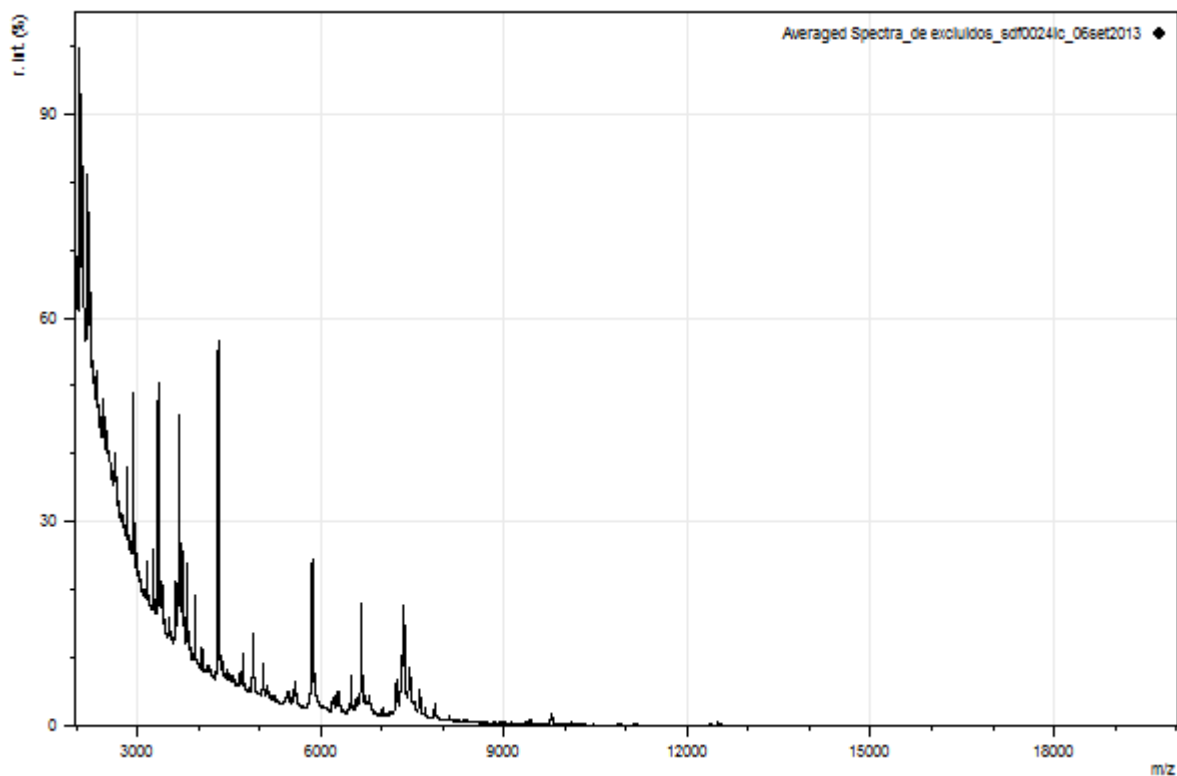
CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

tc = 22 horas
D = 2 mm
Cultivos = 2
Origem = Reisolado de repique de cultivo da Juliana

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_de excluidos_sdf0024ic_06set2013

Date	06set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	285

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0024ic_d1_excluido
- sdf0024ic_d2_excluido
- sdf0024ic_d3_excluido
- sdf0024ic_d4_excluido
- sdf0024ic_d5_excluido
- sdf0024ic_d6_excluido
- sdf0024ic_d7_excluido
- sdf0024ic_d8_excluido
- sdf0024ic_d9_excluido
- sdf0024ic_d10_excluido
- sdf0024ic_d11_excluido
- sdf0024ic_d12_excluido
- sdf0024ic_e1_excluido
- sdf0024ic_e2_excluido
- sdf0024ic_e3_excluido
- sdf0024ic_e4_excluido
- sdf0024ic_e5_excluido
- sdf0024ic_e6_excluido
- sdf0024ic_e11_excluido
- sdf0024ic_e12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

tc = 22 horas

D = 2 mm

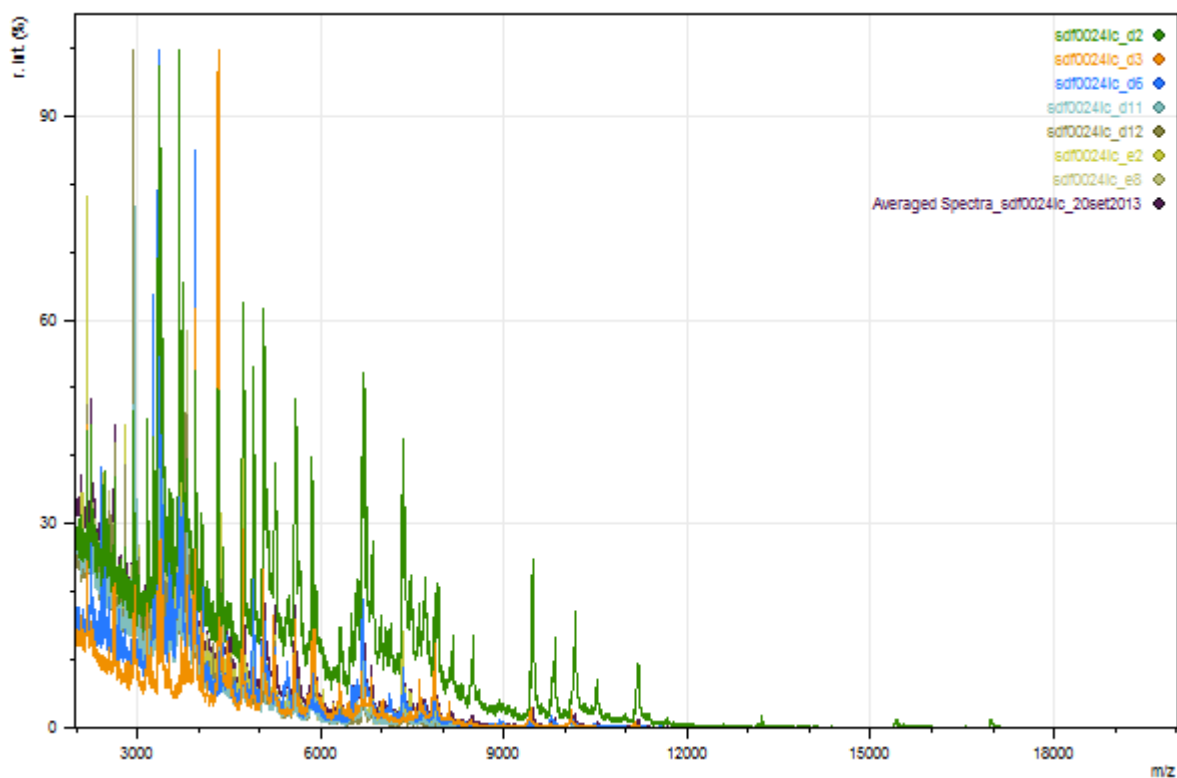
Cultivos = 2

Origem = Reisolado de repique de cultivo da Juliana

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0024ic_20set2013

Date	20set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	386



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0024ic_d2
- sdf0024ic_d3
- sdf0024ic_d6
- sdf0024ic_d11
- sdf0024ic_d12
- sdf0024ic_e2
- sdf0024ic_e8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 50 horas

D > 4 mm (bordas)

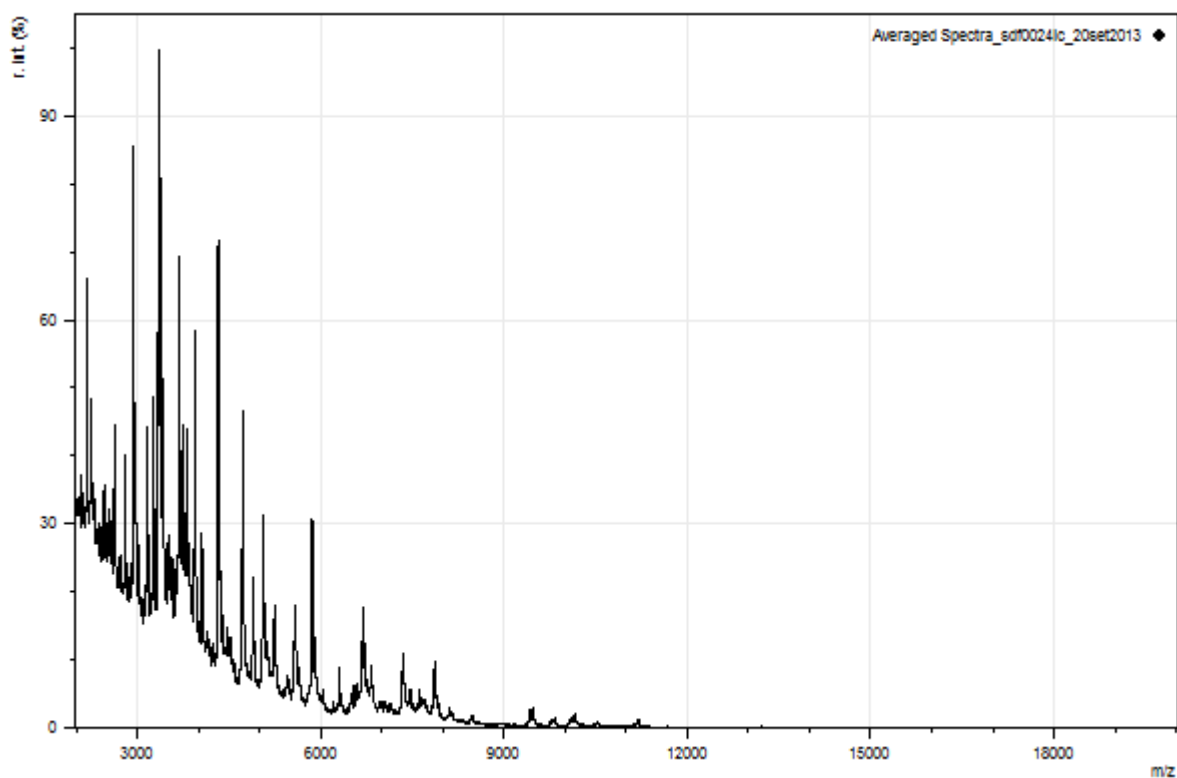
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Matriz = 1,2 mL por poço

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0024ic_20set2013

Date	20set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	386



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0024ic_d2
- sdf0024ic_d3
- sdf0024ic_d6
- sdf0024ic_d11
- sdf0024ic_d12
- sdf0024ic_e2
- sdf0024ic_e8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 50 horas

D > 4 mm (bordas)

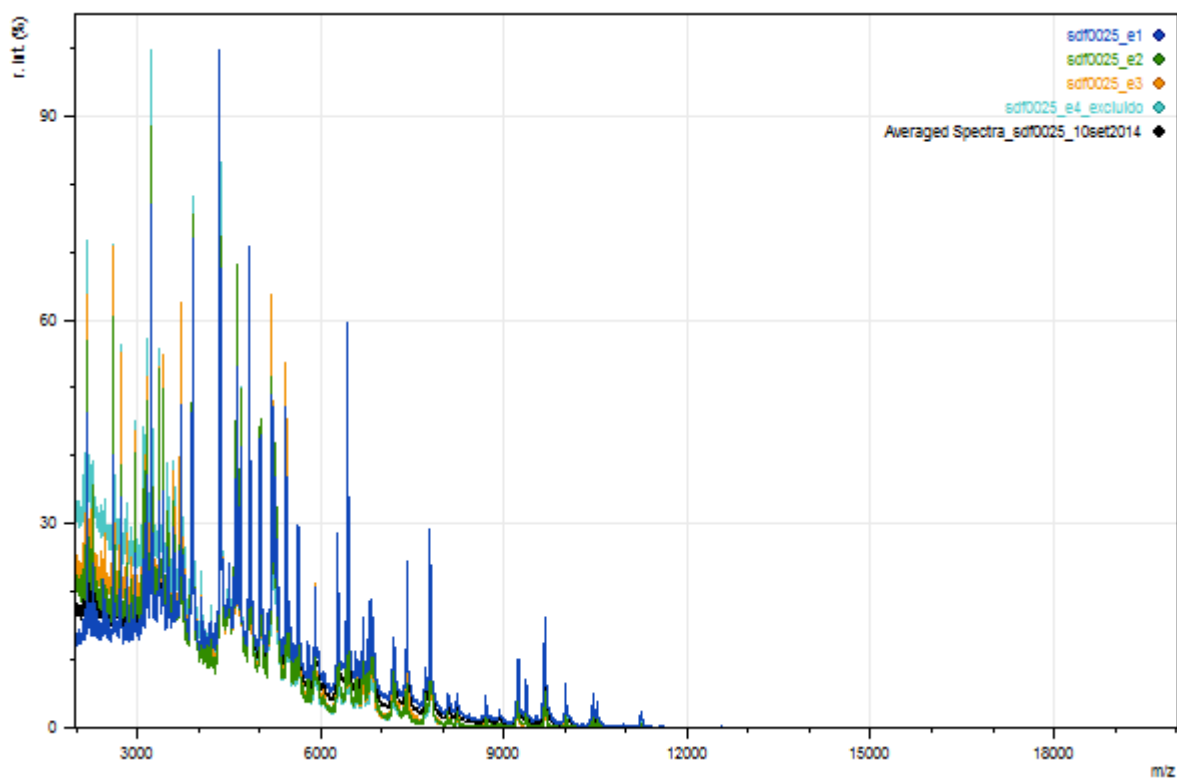
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Matriz = 1,2 mL por poço

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0025_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	118

**Notes**

Averaged Spectra:

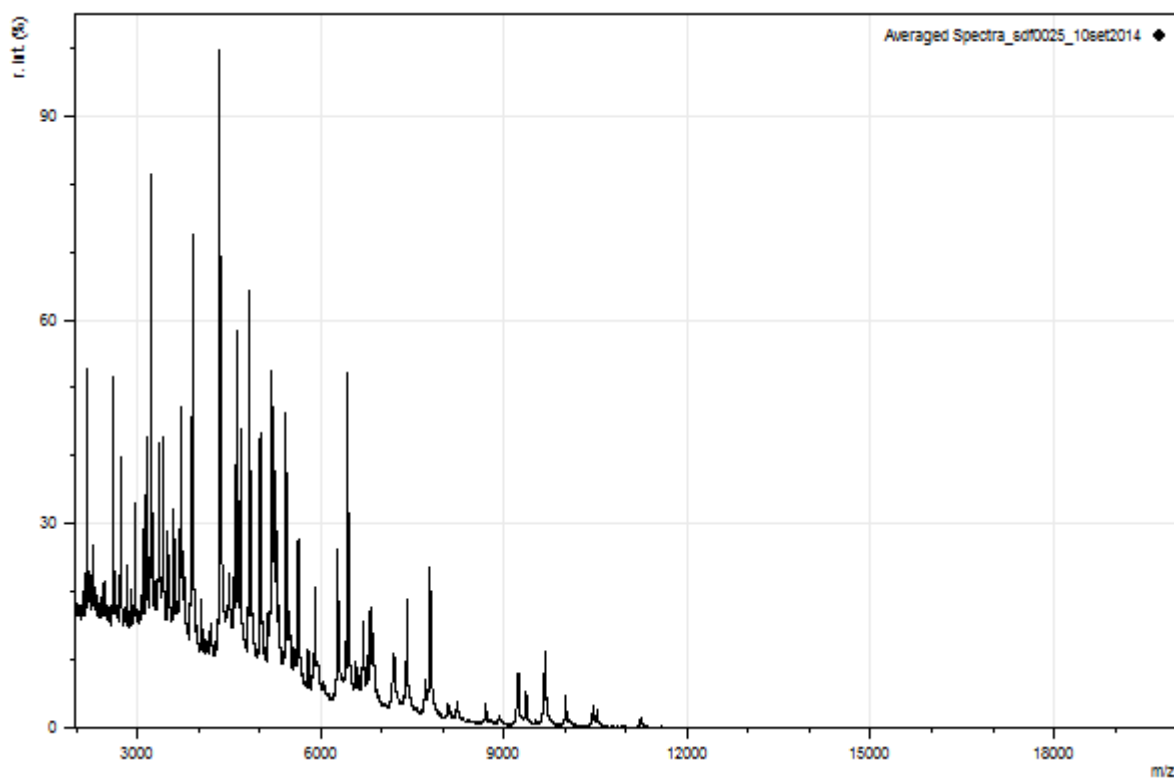
- sdf0025_e1
- sdf0025_e2
- sdf0025_e3

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas
D = 10 mm (bordas)
Tempo até aplicação do extrato = 3 horas
Dissolução em água = Boa
Dissolução em AcN = Ruim
Dissolução em AF = Boa
Cultivos = 1
Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0025_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	118

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0025_e1
- sdf0025_e2
- sdf0025_e3

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas

D = 10 mm (bordas)

Tempo até aplicação do extrato = 3 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

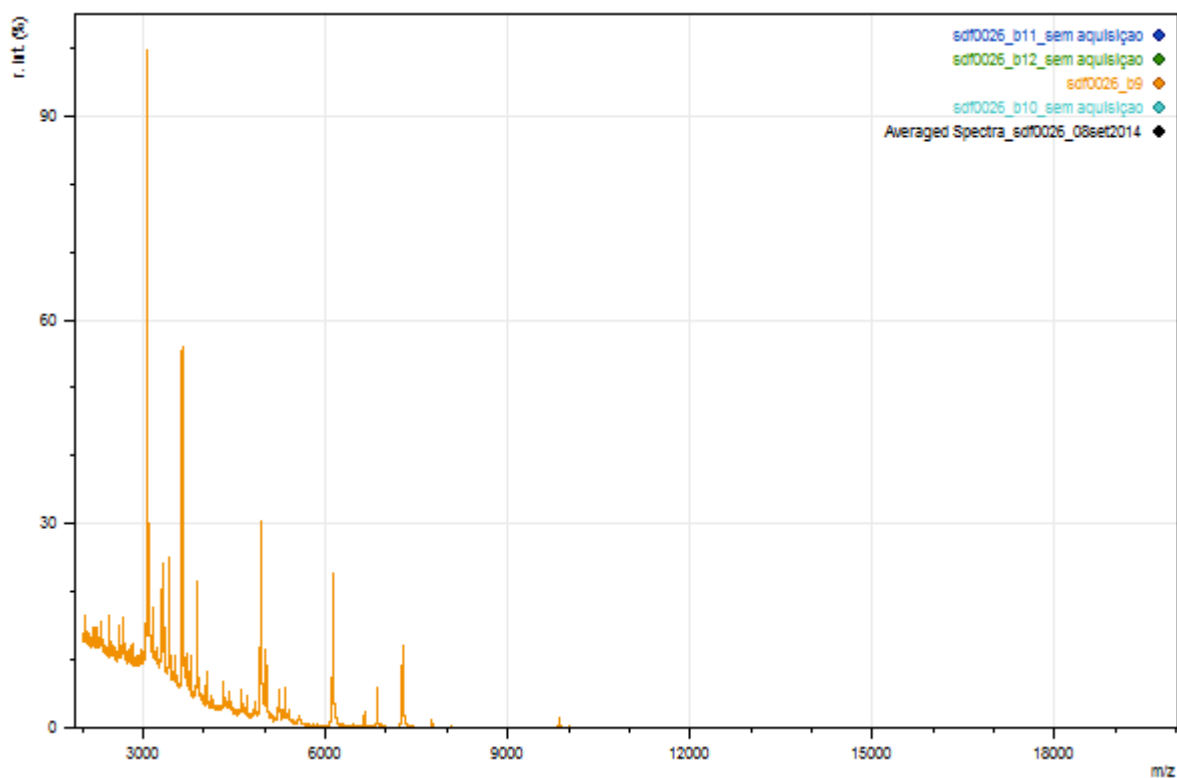
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0026_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	168

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0026_b9

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

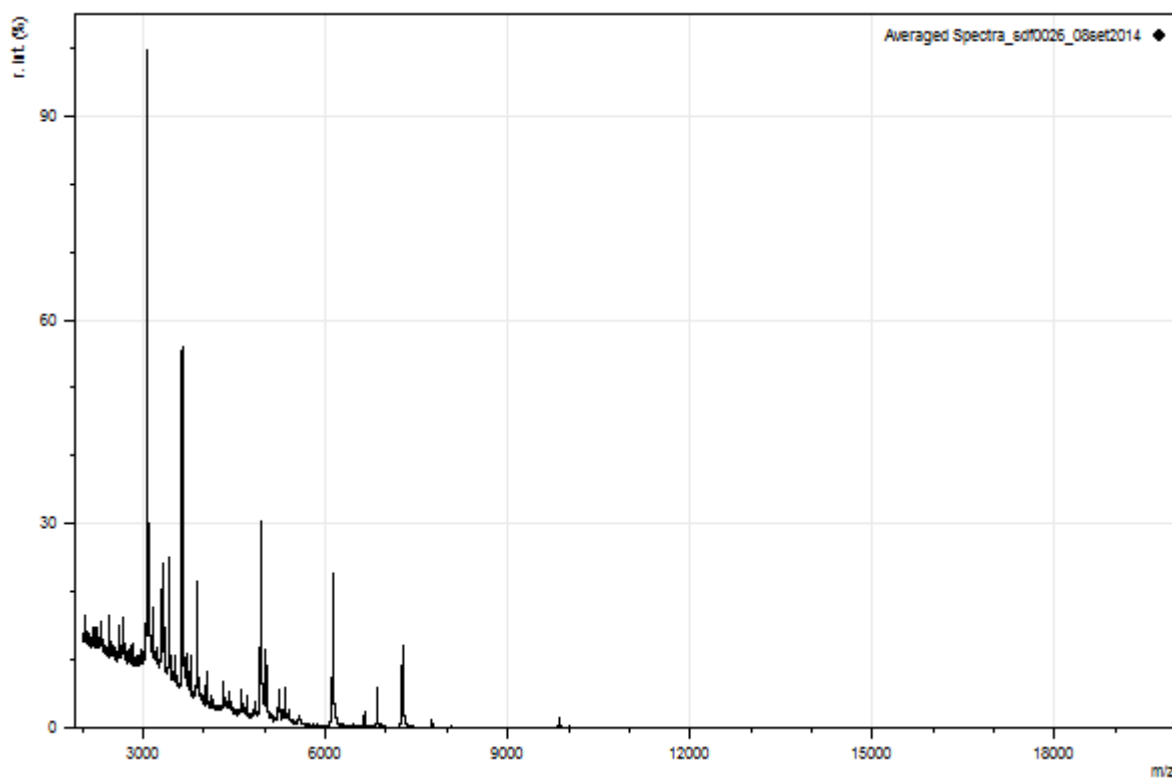
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0026_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	168

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0026_b9

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

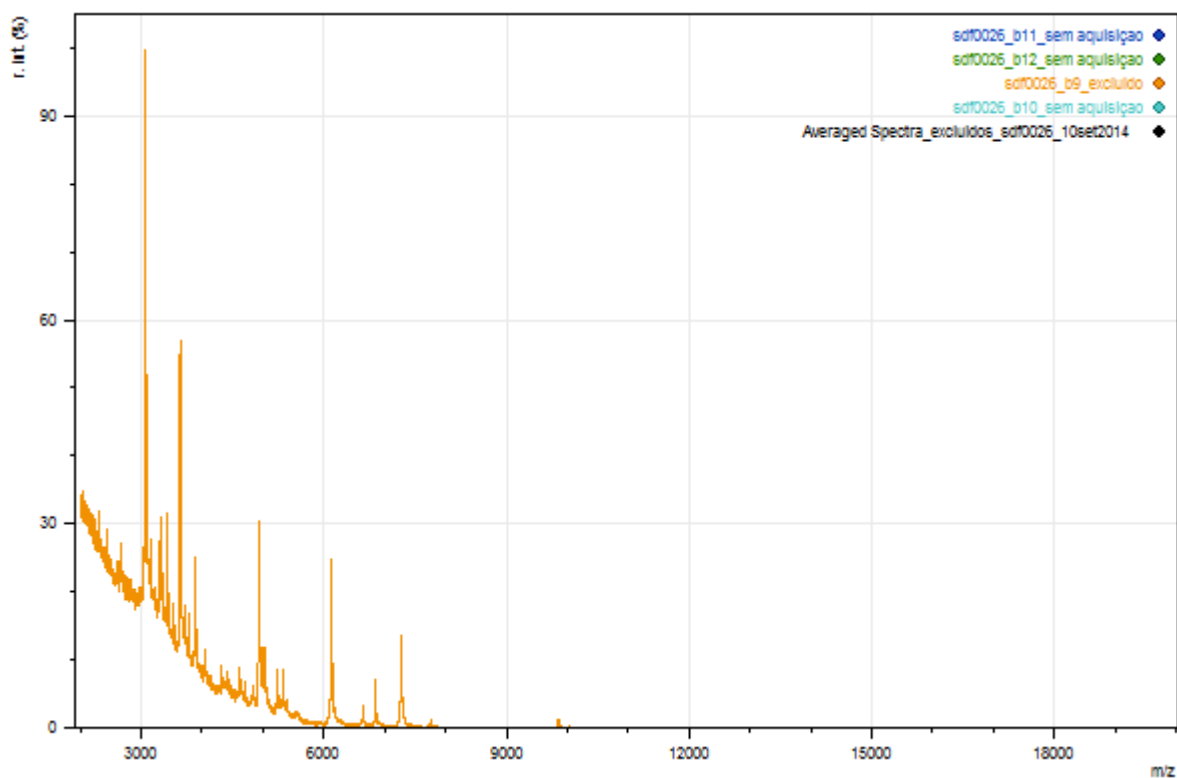
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_excluidos_sdf0026_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	210

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0026_b9_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Boa

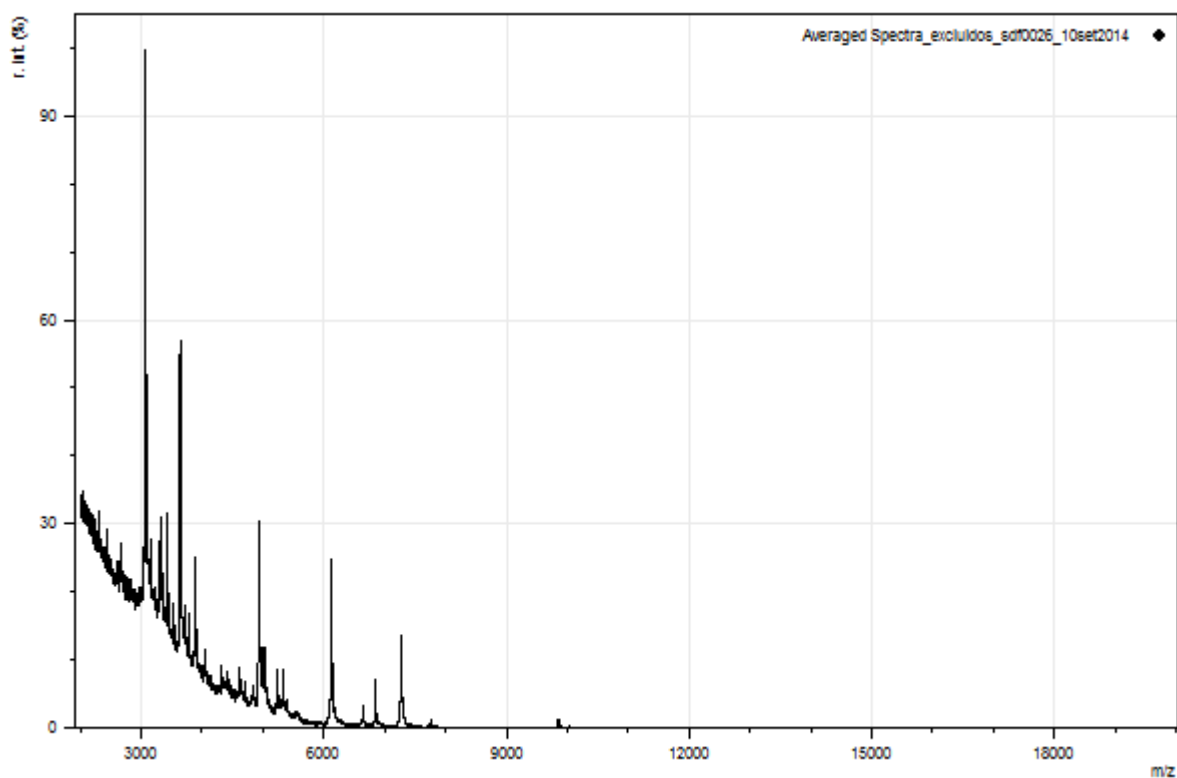
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

Reanálise da mesma placa analisadora de 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_excluidos_sdf0026_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	210

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0026_b9_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Boa

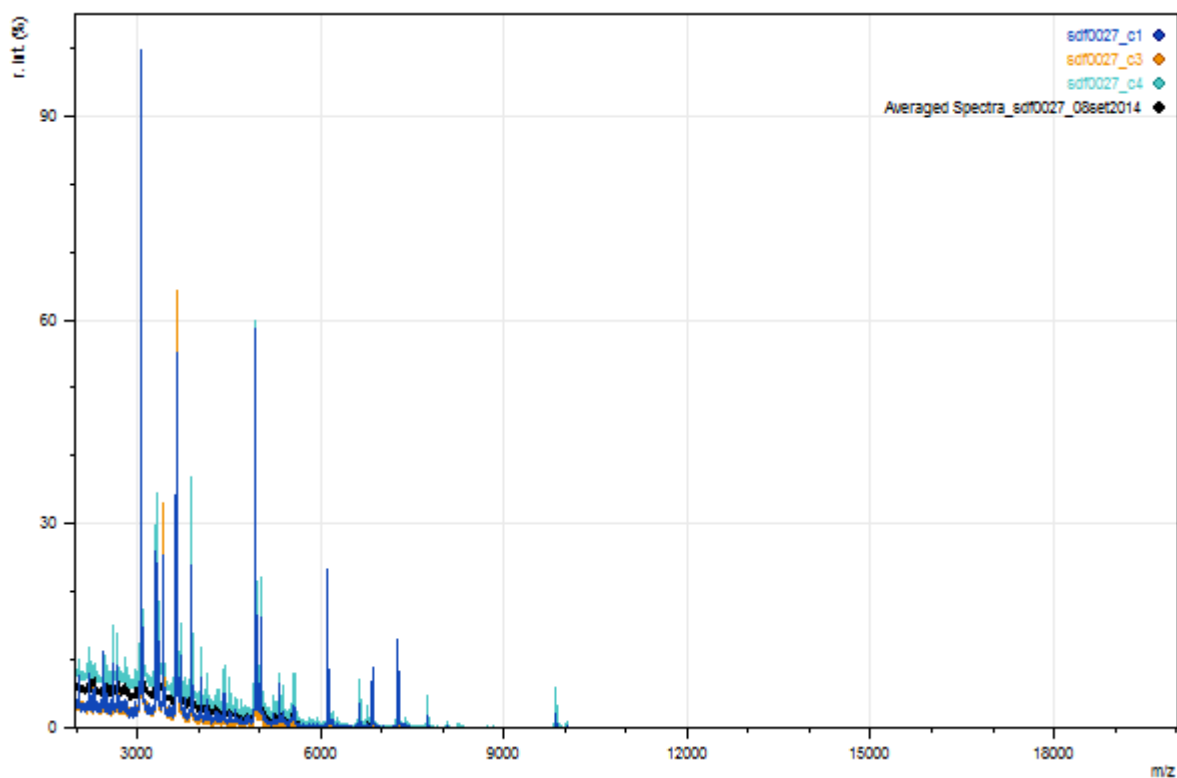
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

Reanálise da mesma placa analisadora de 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0027_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	105

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0027_c1
- sdf0027_c3
- sdf0027_c4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

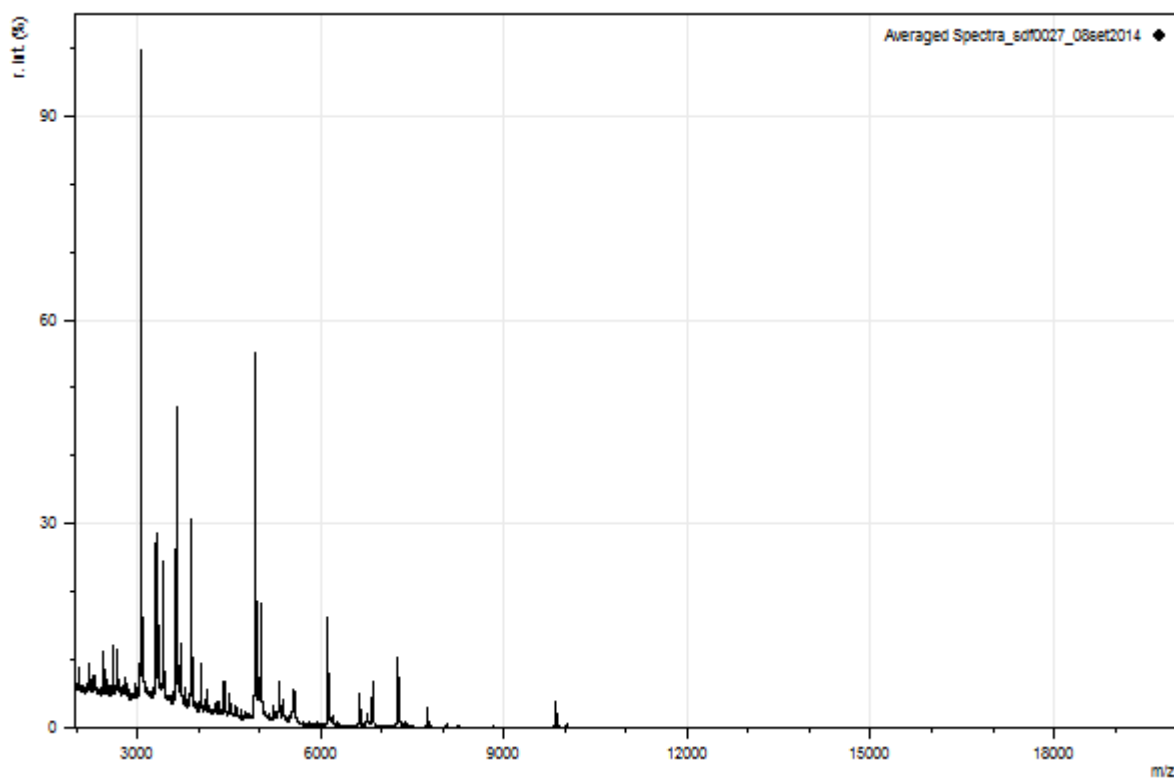
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0027_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	105

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0027_c1
- sdf0027_c3
- sdf0027_c4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

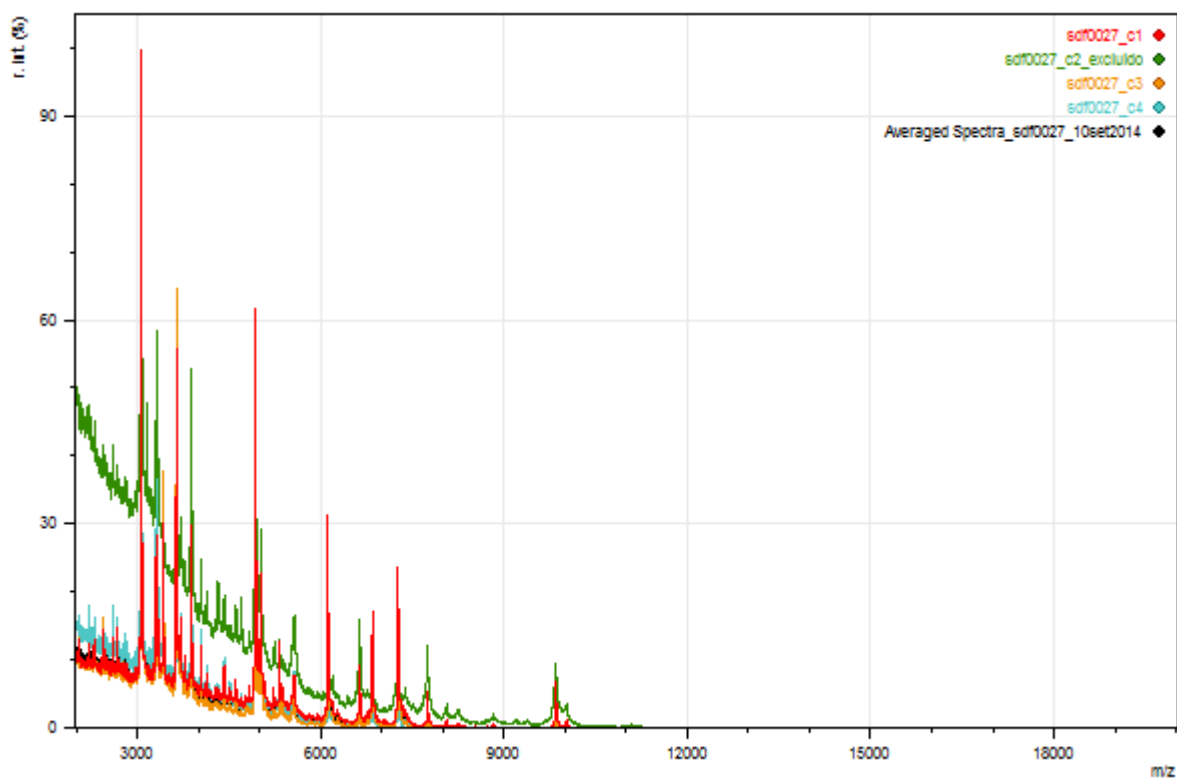
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0027_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	76

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0027_c1
- sdf0027_c3
- sdf0027_c4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Boa

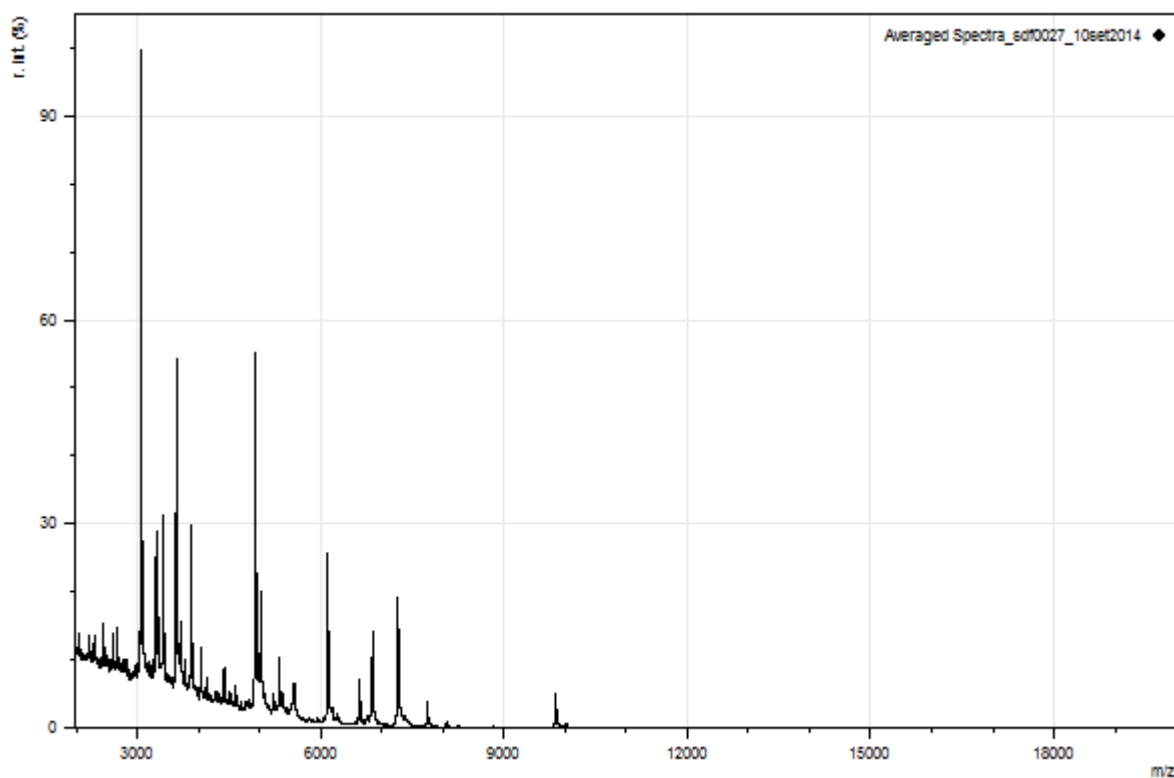
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

Reanálise da mesma placa analisadora de 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0027_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	76

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0027_c1
- sdf0027_c3
- sdf0027_c4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Boa

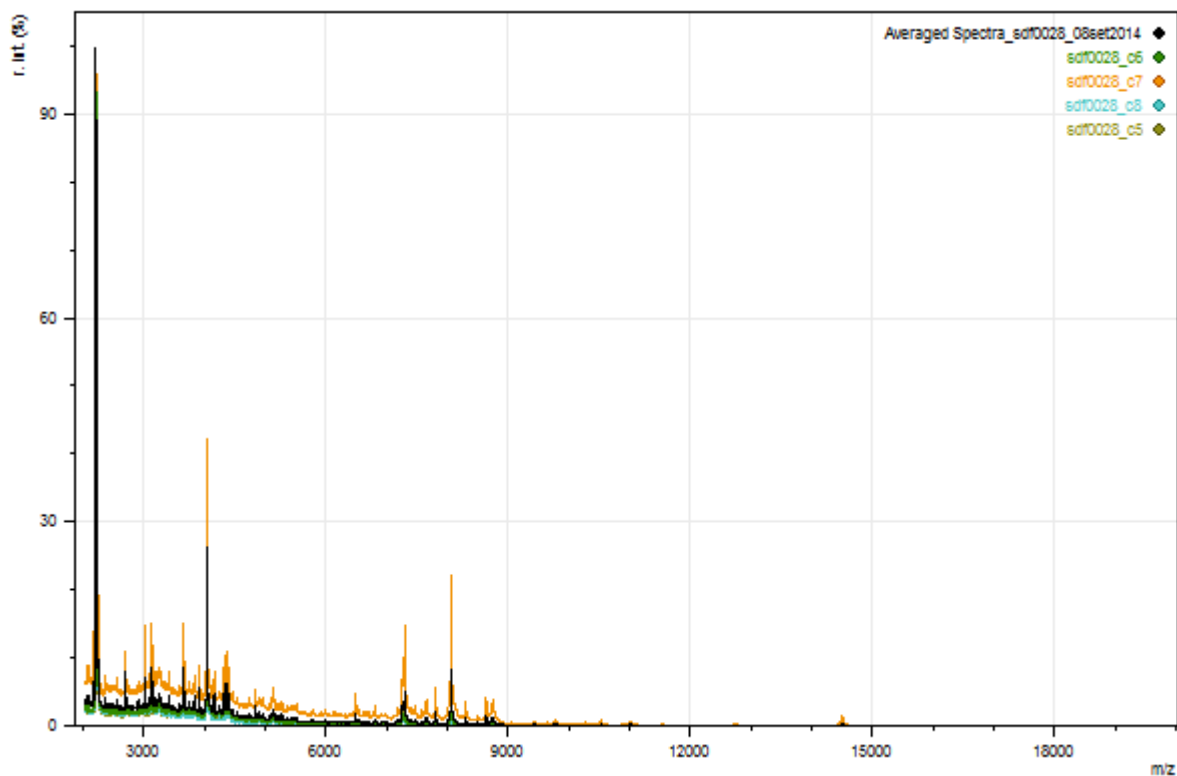
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

Reanálise da mesma placa analisadora de 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0028_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	51

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0028_c5
- sdf0028_c6
- sdf0028_c7
- sdf0028_c8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 70 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

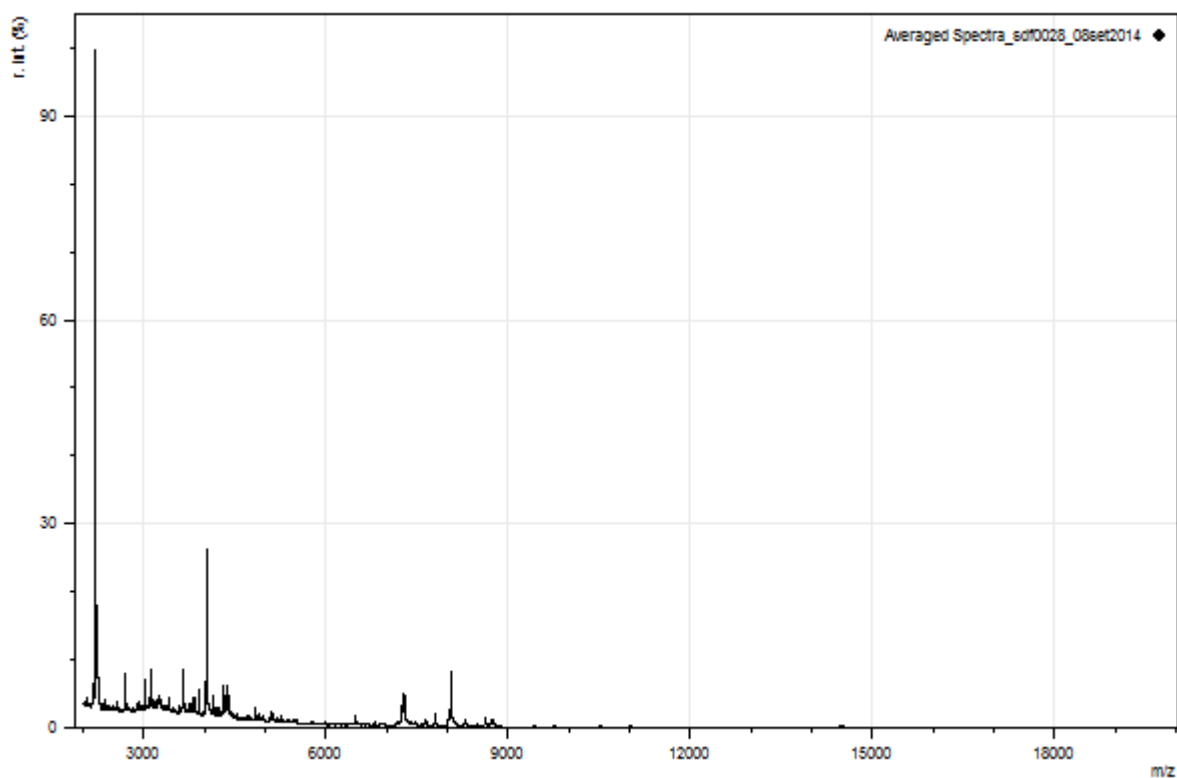
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0028_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	51

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0028_c5
- sdf0028_c6
- sdf0028_c7
- sdf0028_c8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 70 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

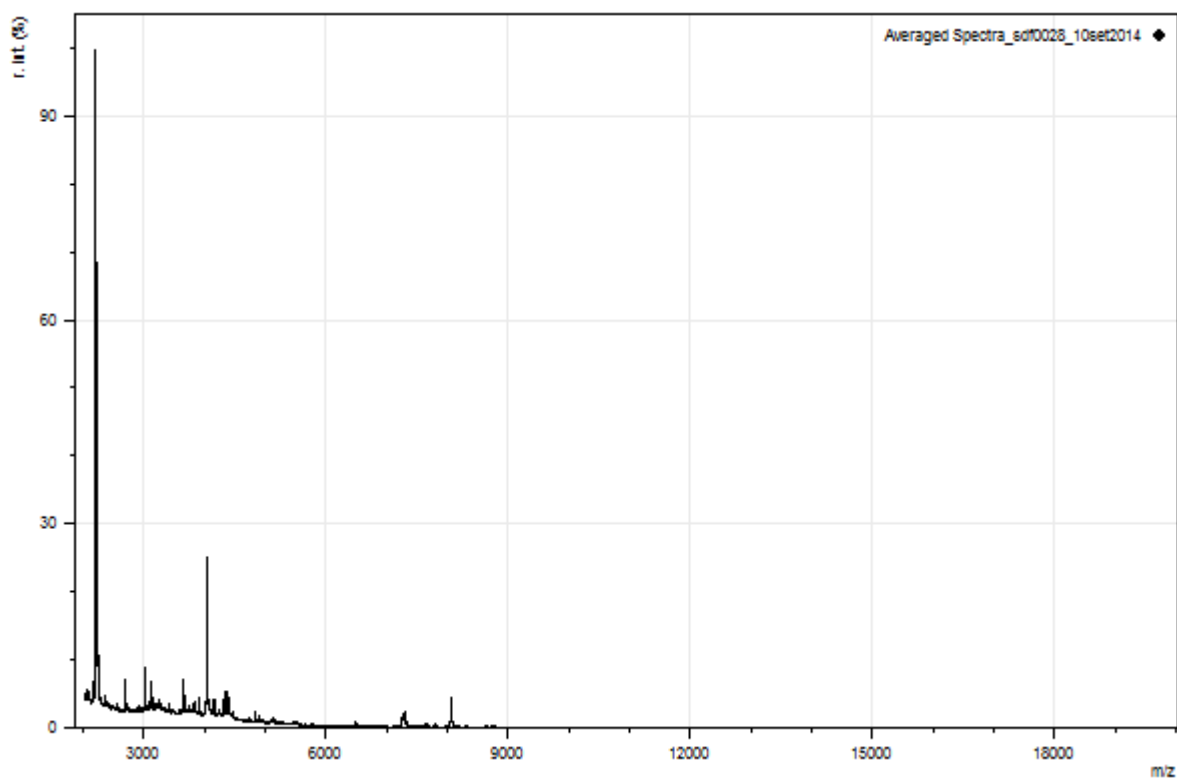
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0028_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	45

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0028_c5
- sdf0028_c6
- sdf0028_c7
- sdf0028_c8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 70 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

Dissolução em AF = Ruim

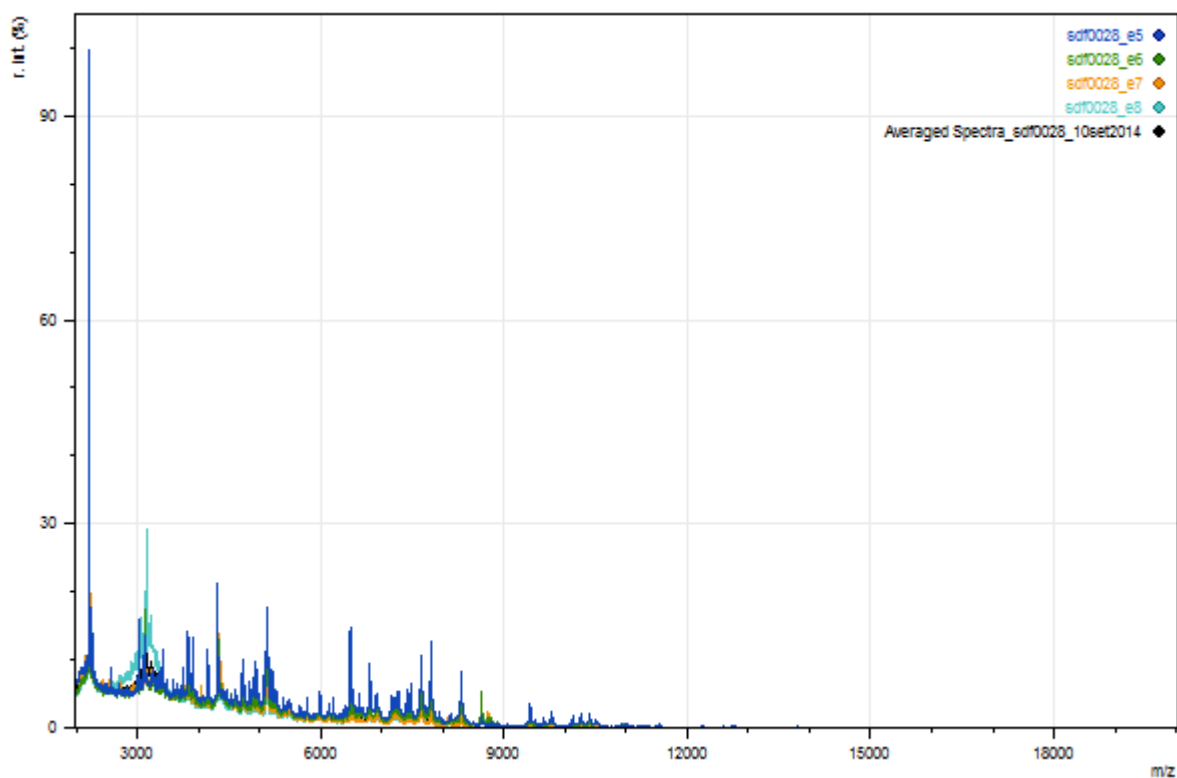
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

Reanálise da mesma placa analisadora de 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0028_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	65

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0028_e5
- sdf0028_e6
- sdf0028_e7
- sdf0028_e8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

Tempo até aplicação do extrato = 3 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

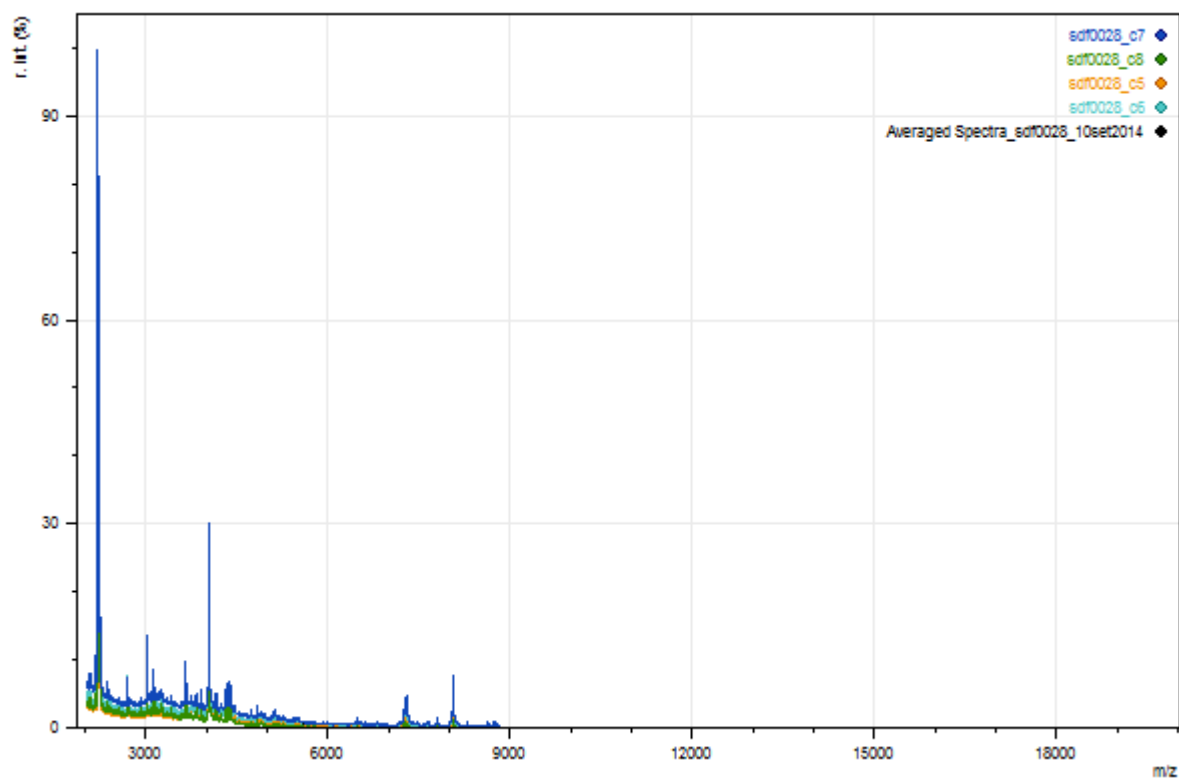
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0028_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	45

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0028_c5
- sdf0028_c6
- sdf0028_c7
- sdf0028_c8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 70 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

Dissolução em AF = Ruim

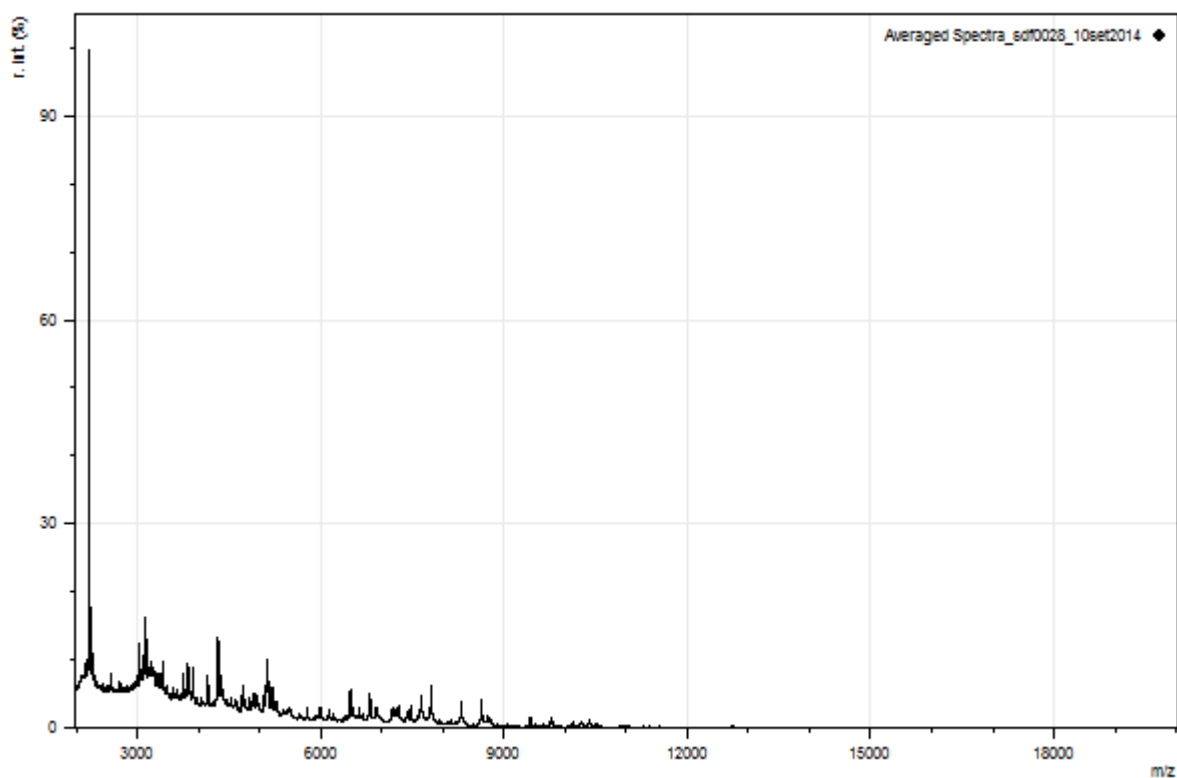
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

Reanálise da mesma placa analisadora de 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0028_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	65



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0028_e5
- sdf0028_e6
- sdf0028_e7
- sdf0028_e8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 49 horas

D = irregular, confluyente (partes aleatórias)

Tempo até aplicação do extrato = 3 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

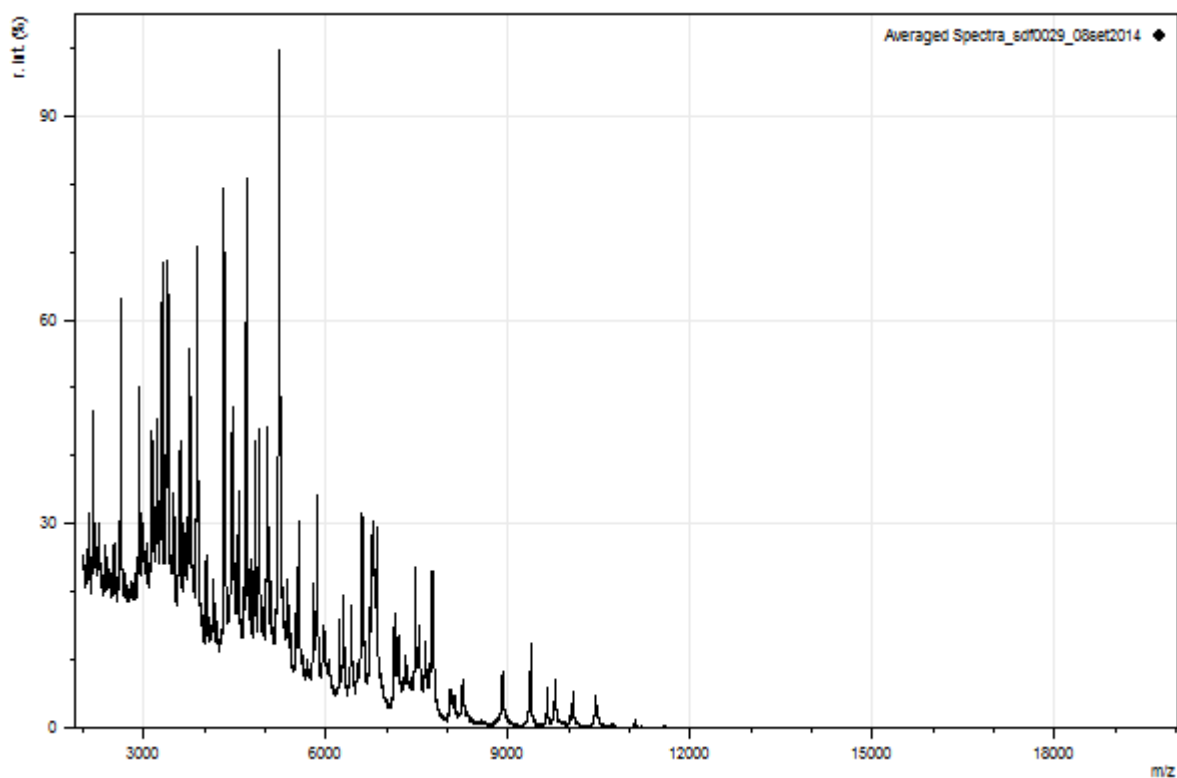
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0029_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	225

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0029_d2

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

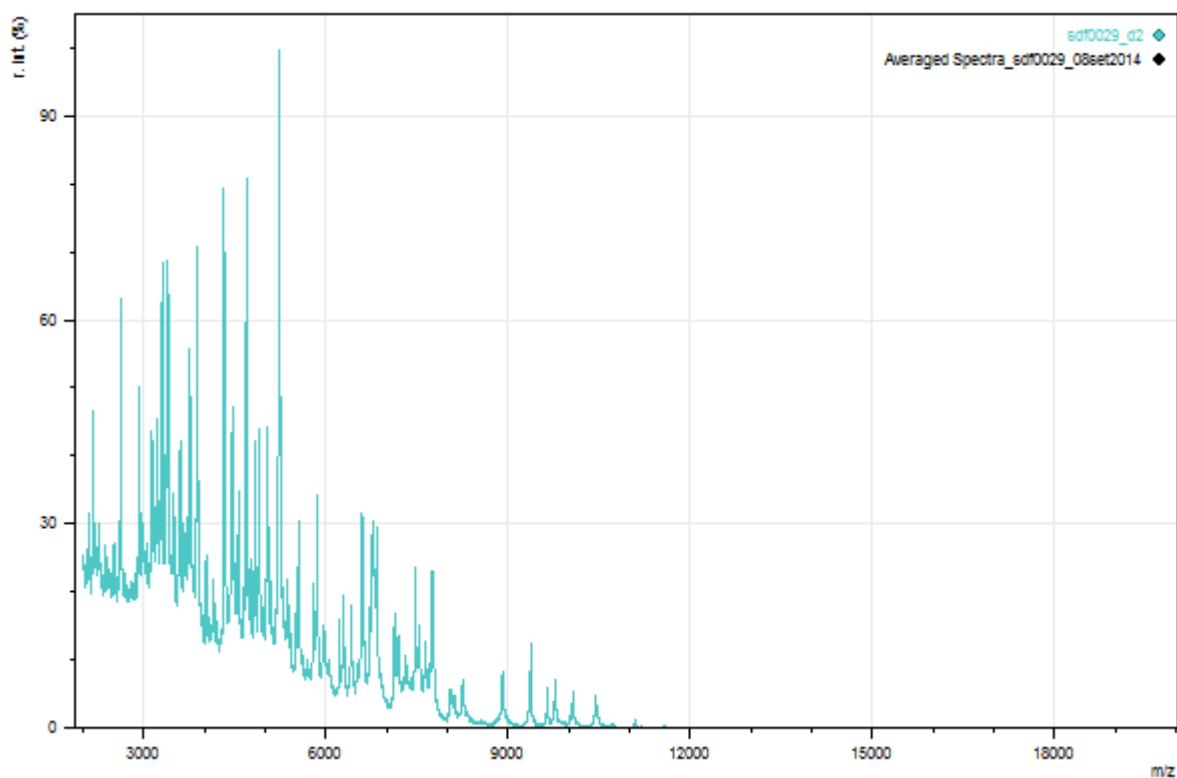
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0029_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	225



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0029_d2

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

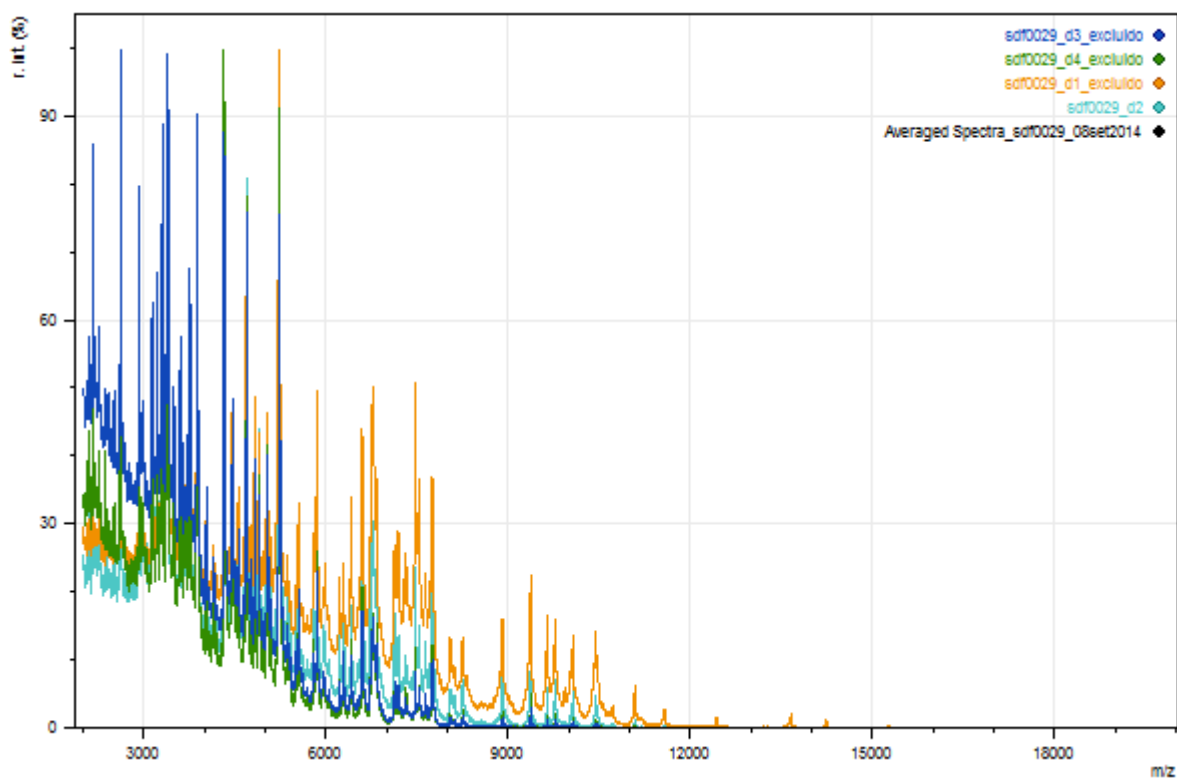
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0029_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	225



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0029_d2

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

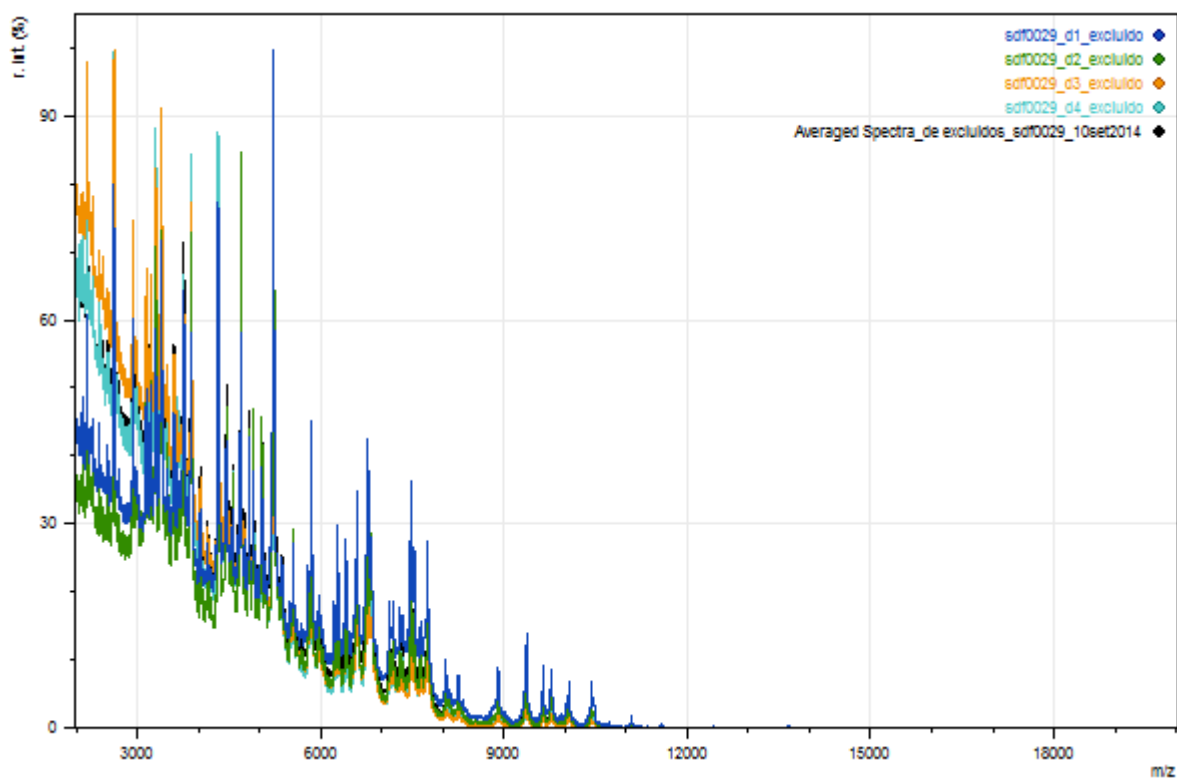
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_de excluidos_sdf0029_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	85



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0029_d1_excluido
- sdf0029_d2_excluido
- sdf0029_d3_excluido
- sdf0029_d4_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Boa

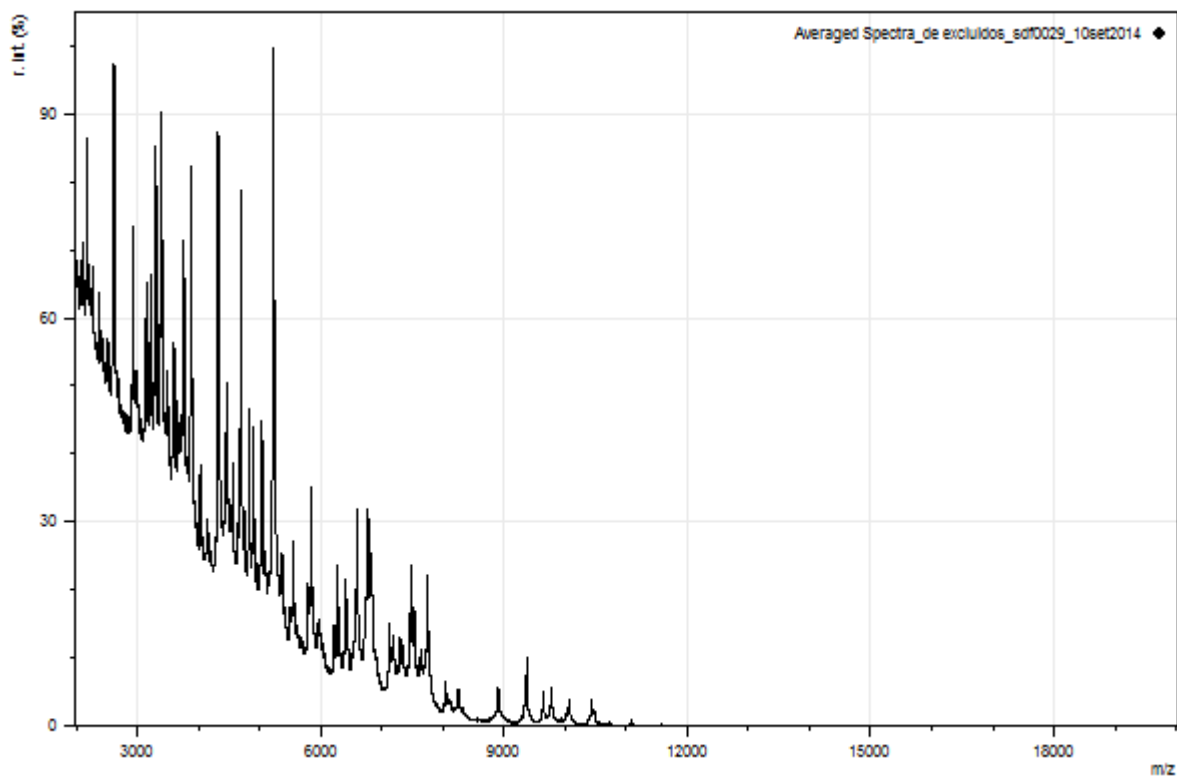
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

Reanálise da mesma placa analisadora de 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_de excluidos_sdf0029_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	85

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0029_d1_excluido
- sdf0029_d2_excluido
- sdf0029_d3_excluido
- sdf0029_d4_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Boa

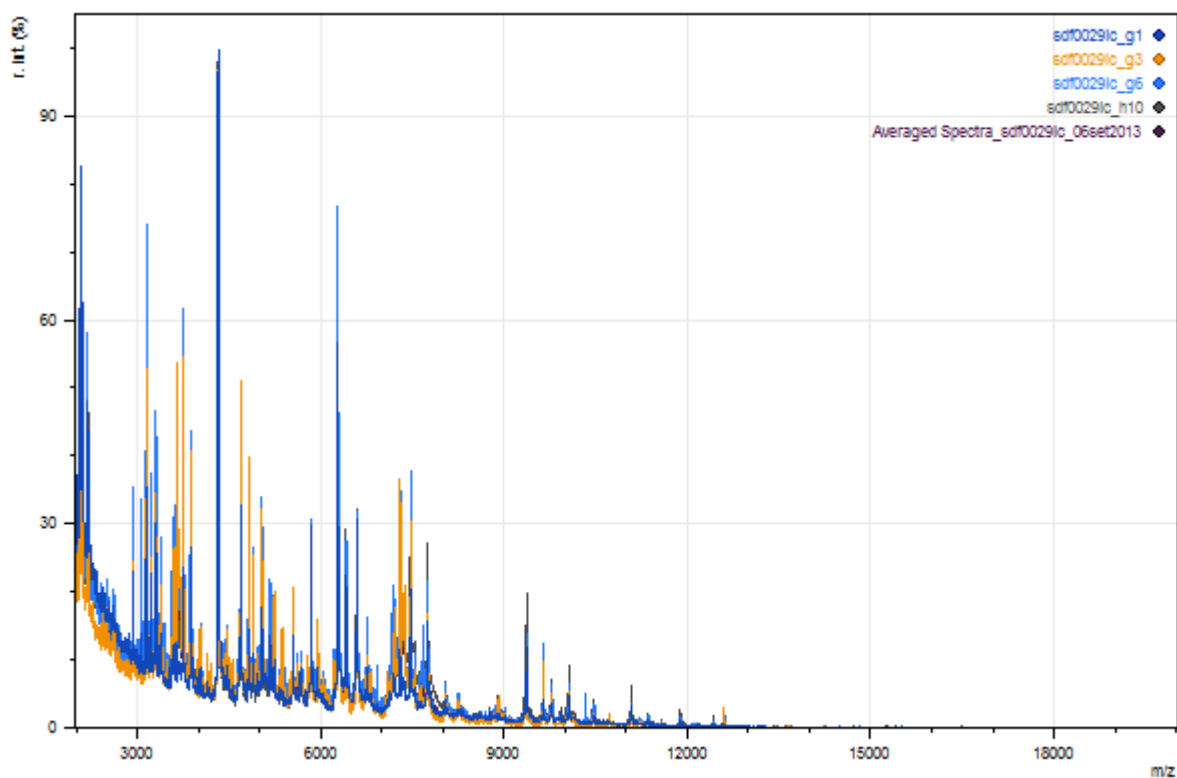
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

Reanálise da mesma placa analisadora de 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0029ic_06set2013

Date	06set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	85



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0029ic_g1
- sdf0029ic_g3
- sdf0029ic_g6
- sdf0029ic_h10

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

tc = 40 horas

D > 4 mm (bordas)

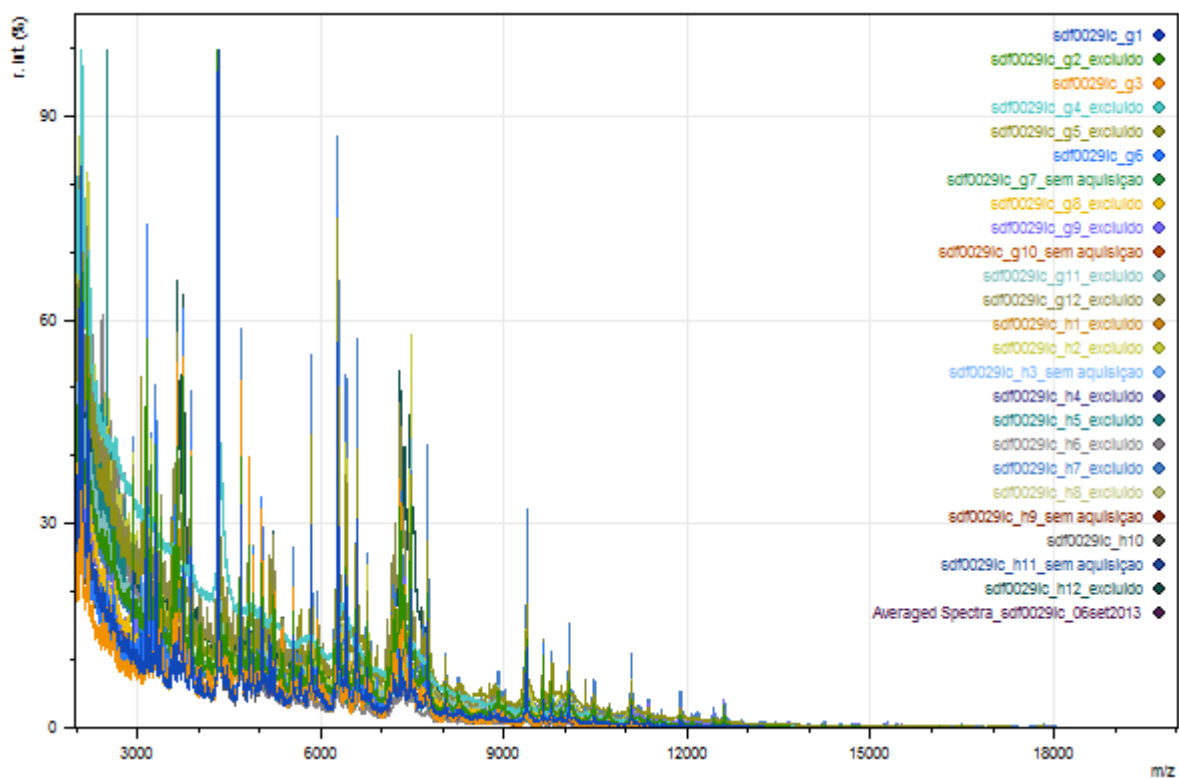
Cultivos = 2

Origem = aliquota do estoque comum

Culturas resfriadas por 24 horas.

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0029ic_06set2013

Date	06set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	85



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0029ic_g1
- sdf0029ic_g3
- sdf0029ic_g6
- sdf0029ic_h10

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

tc = 40 horas

D > 4 mm (bordas)

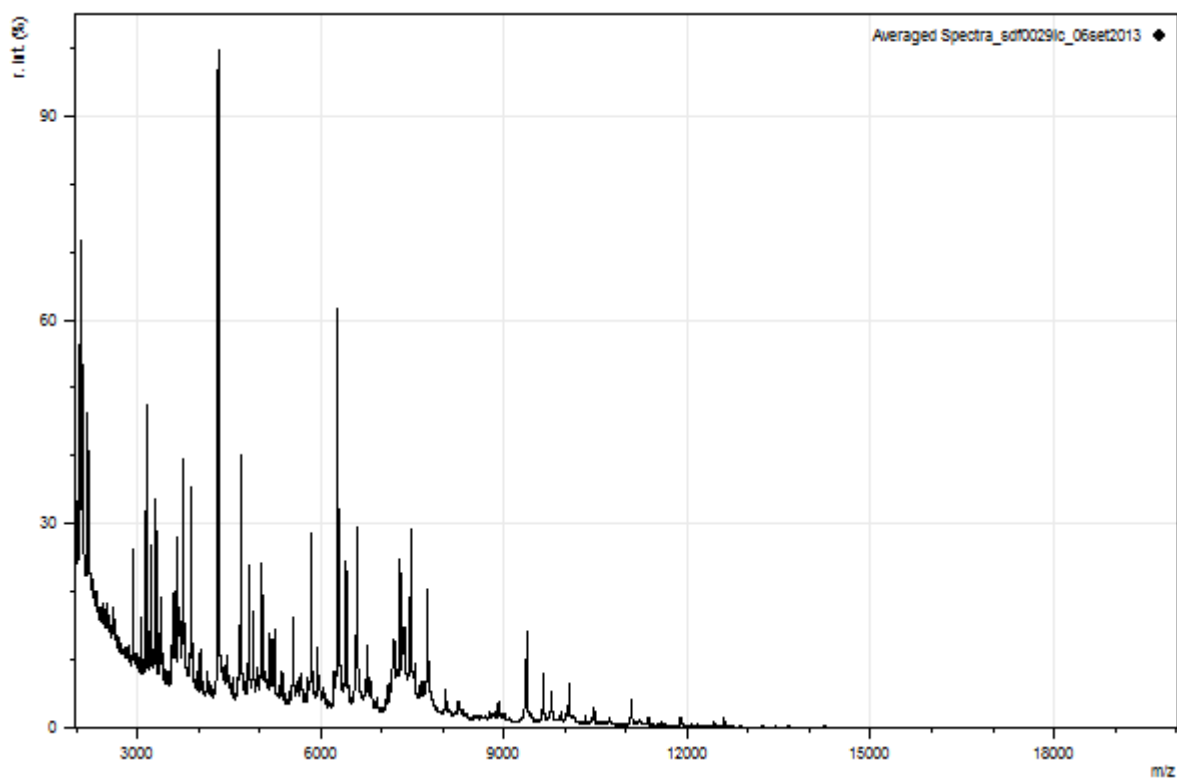
Cultivos = 2

Origem = aliquota do estoque comum

Culturas resfriadas por 24 horas.

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0029ic_06set2013

Date	06set2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	85

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0029ic_g1
- sdf0029ic_g3
- sdf0029ic_g6
- sdf0029ic_h10

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (C)

tc = 40 horas

D > 4 mm (bordas)

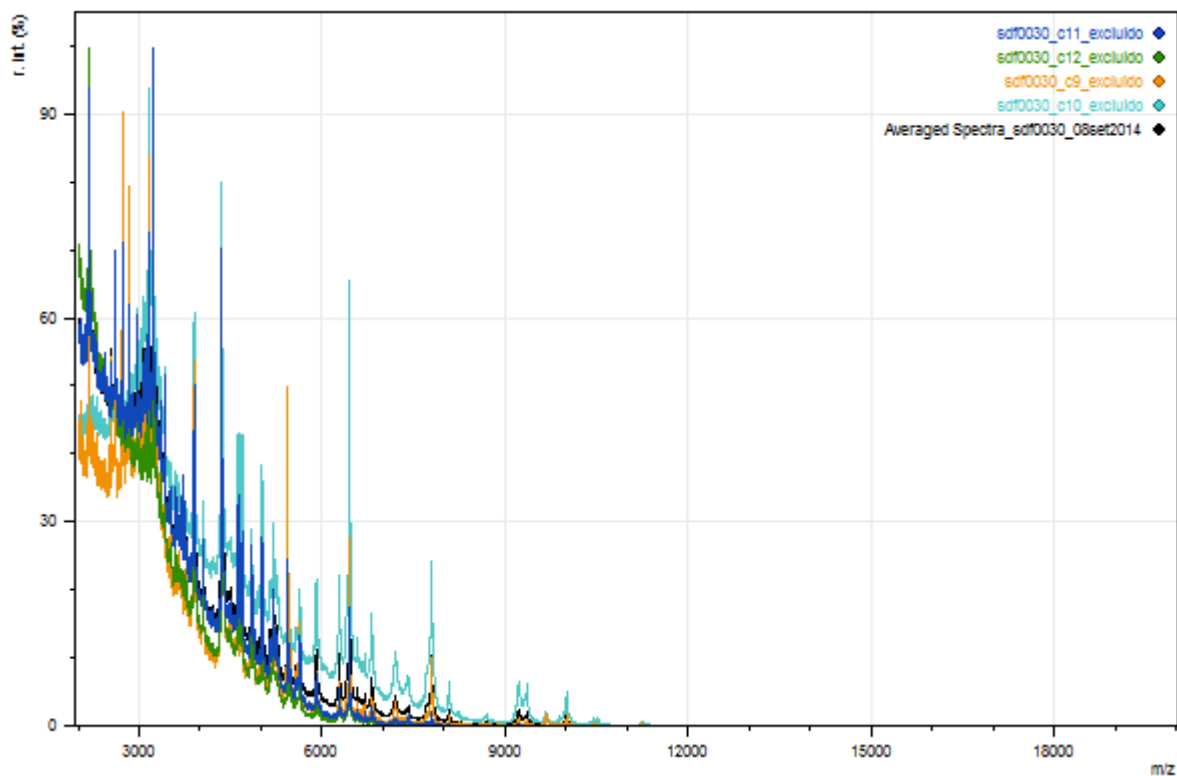
Cultivos = 2

Origem = aliquota do estoque comum

Culturas resfriadas por 24 horas.

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0030_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	48

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0030_c9_excluido
- sdf0030_c10_excluido
- sdf0030_c11_excluido
- sdf0030_c12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

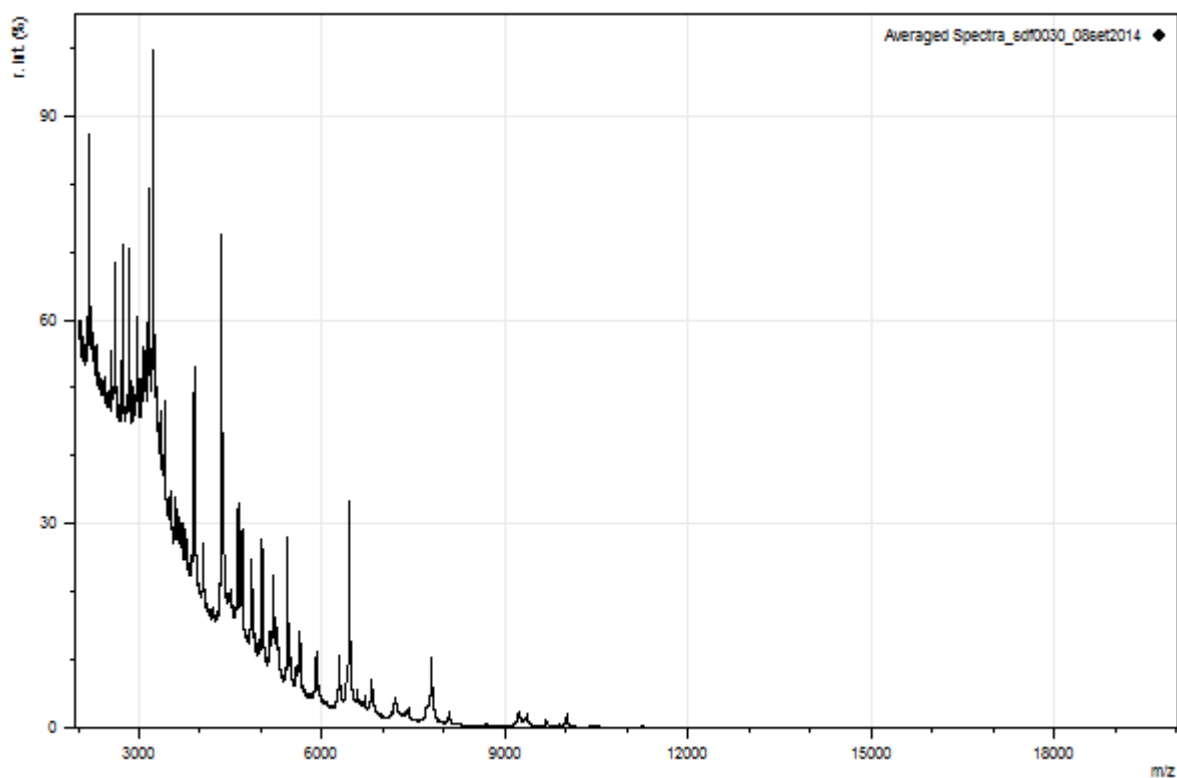
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0030_08set2014

Date	08set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	48

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0030_c9_excluido
- sdf0030_c10_excluido
- sdf0030_c11_excluido
- sdf0030_c12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

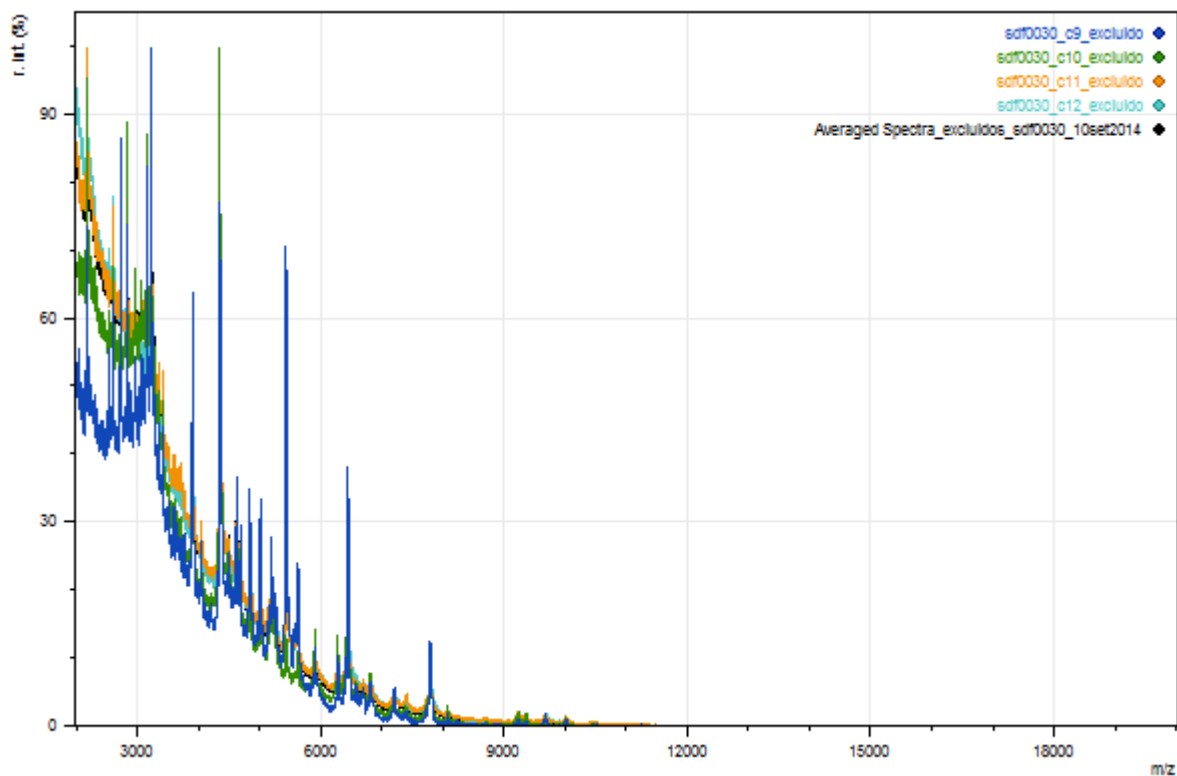
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_excluidos_sdf0030_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	27



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0030_c9_excluido
- sdf0030_c10_excluido
- sdf0030_c11_excluido
- sdf0030_c12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Boa

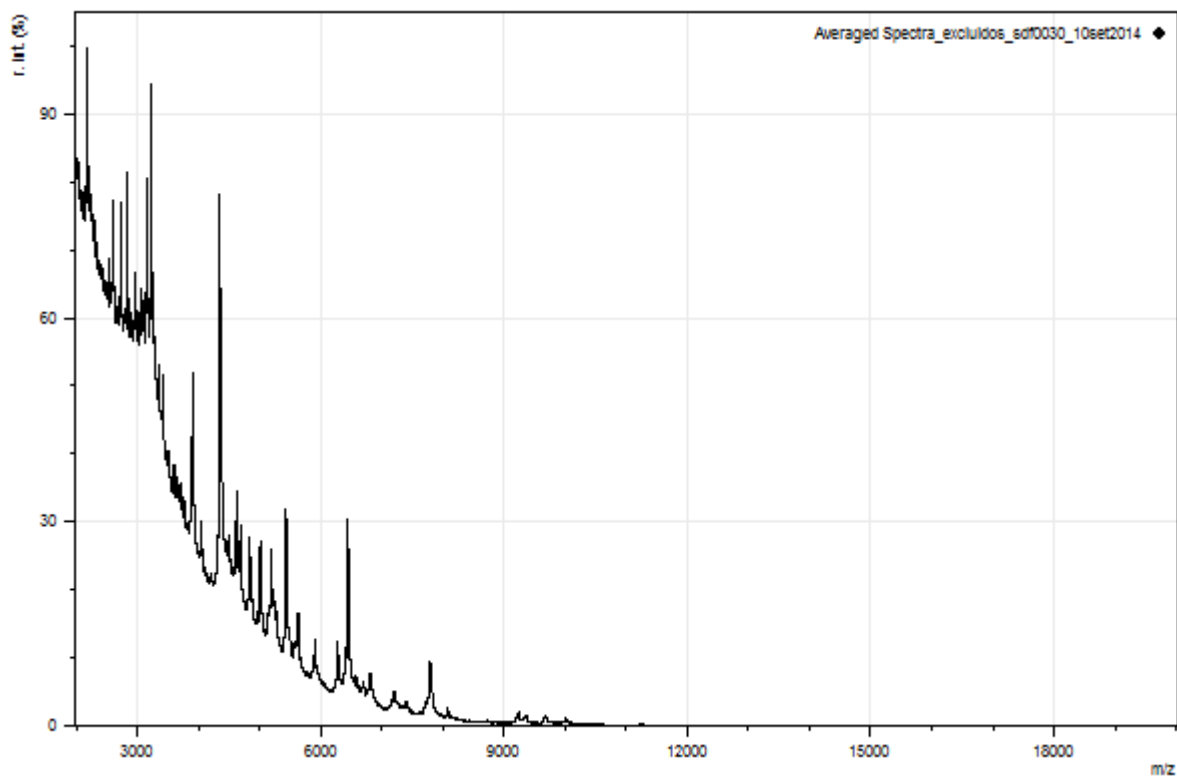
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

Reanálise da mesma placa analisadora de 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_excluidos_sdf0030_10set2014

Date	10set2014	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	27



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0030_c9_excluido
- sdf0030_c10_excluido
- sdf0030_c11_excluido
- sdf0030_c12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 21 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

Dissolução em AF = Boa

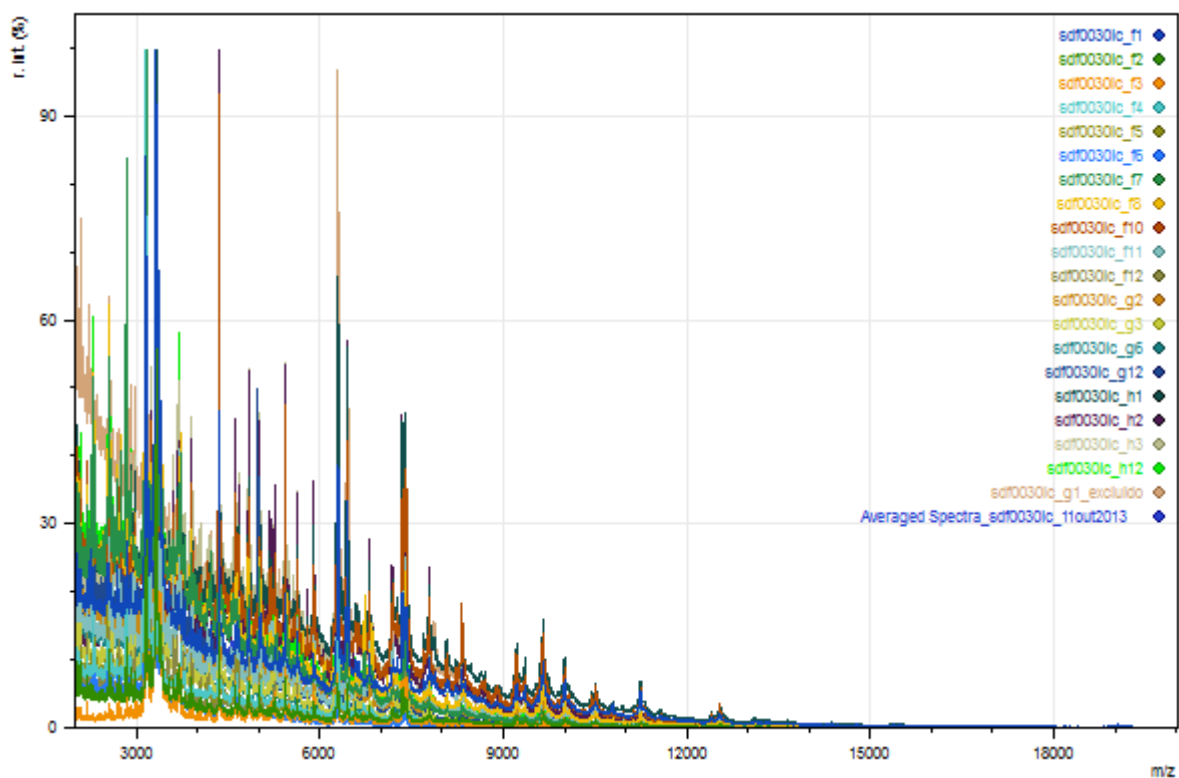
Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 08set2014

Reanálise da mesma placa analisadora de 08set2014

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0030ic_11out2013

Date	11out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26823
		Peak List	100



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0030ic_f1
- sdf0030ic_f2
- sdf0030ic_f3
- sdf0030ic_f4
- sdf0030ic_f5
- sdf0030ic_f6
- sdf0030ic_f7
- sdf0030ic_f8
- sdf0030ic_f10
- sdf0030ic_f11
- sdf0030ic_f12
- sdf0030ic_g2
- sdf0030ic_g3
- sdf0030ic_g6
- sdf0030ic_g12
- sdf0030ic_h1
- sdf0030ic_h2
- sdf0030ic_h3
- sdf0030ic_h12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 46 horas (interrupção de 4 horas para transporte)

D > 4 mm (bordas)

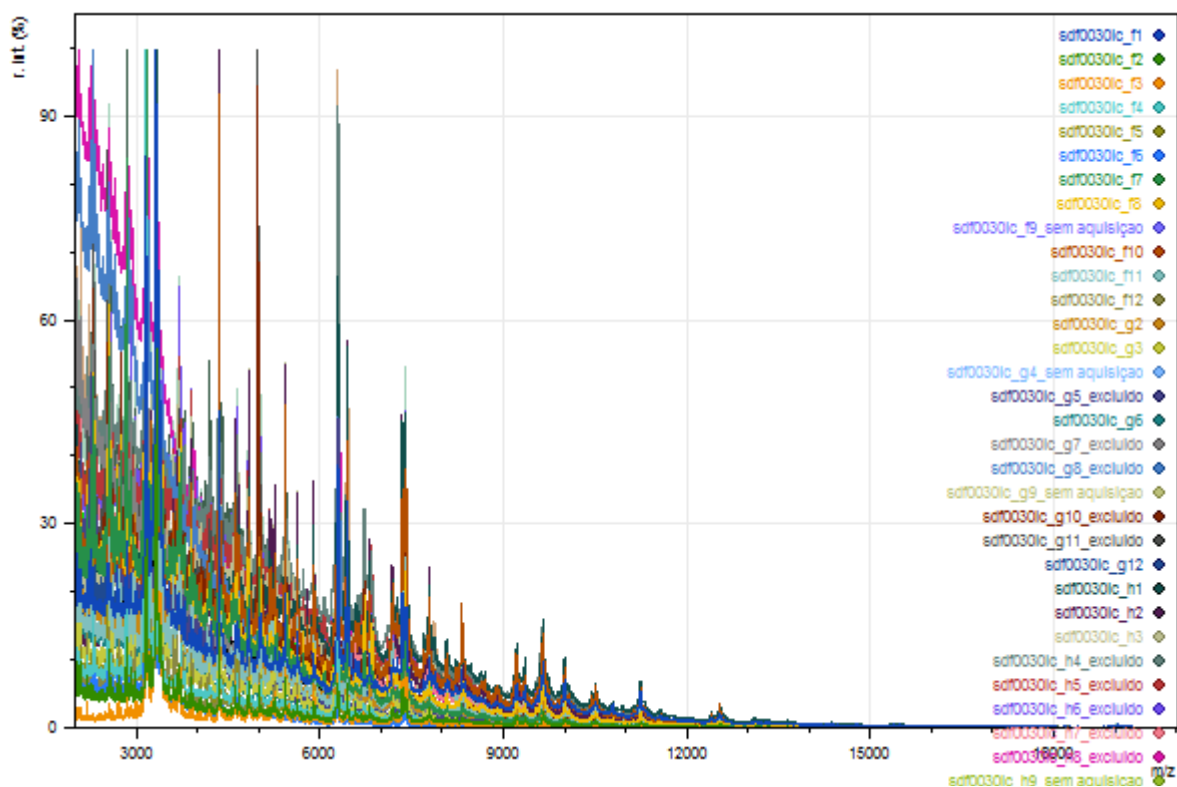
Cultivos = 3

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0030ic_11out2013

Date	11out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26823
		Peak List	100



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0030ic_f1
- sdf0030ic_f2
- sdf0030ic_f3
- sdf0030ic_f4
- sdf0030ic_f5
- sdf0030ic_f6
- sdf0030ic_f7
- sdf0030ic_f8
- sdf0030ic_f10
- sdf0030ic_f11
- sdf0030ic_f12
- sdf0030ic_g2
- sdf0030ic_g3
- sdf0030ic_g6
- sdf0030ic_g12
- sdf0030ic_h1
- sdf0030ic_h2
- sdf0030ic_h3
- sdf0030ic_h12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 46 horas (interrupção de 4 horas para transporte)

D > 4 mm (bordas)

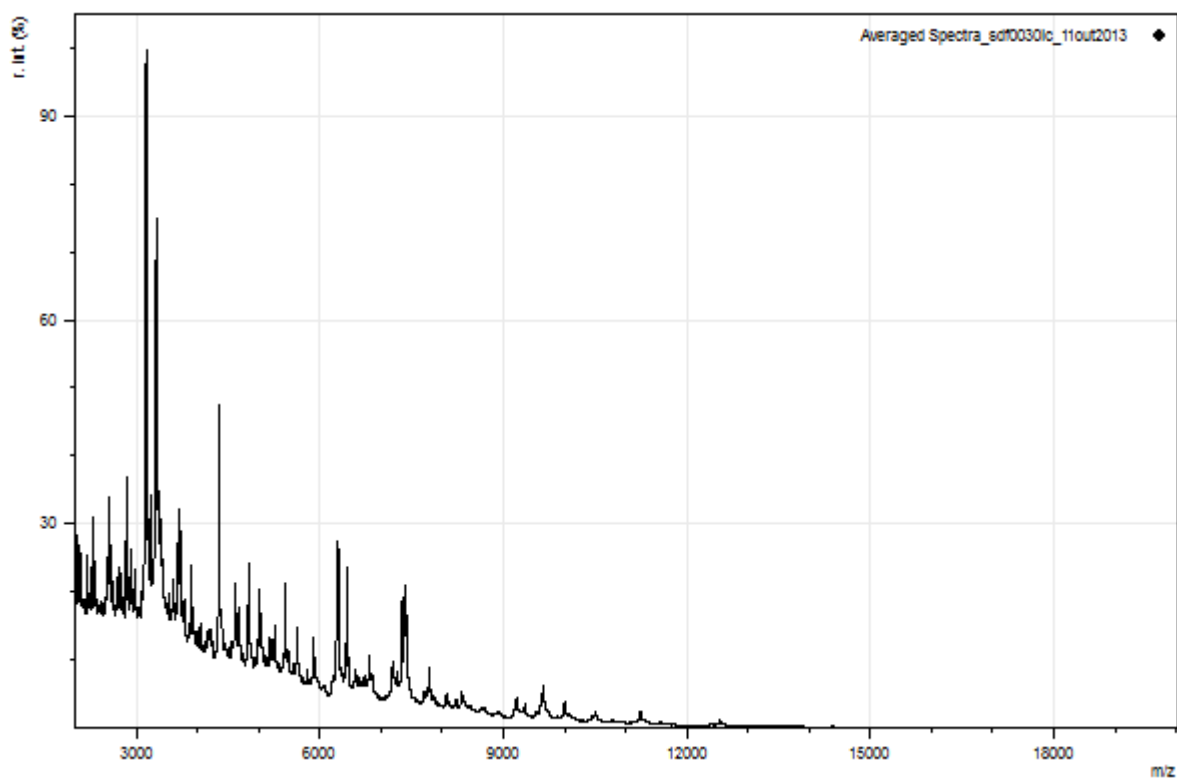
Cultivos = 3

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0030ic_11out2013

Date	11out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26823
		Peak List	100

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0030ic_f1
- sdf0030ic_f2
- sdf0030ic_f3
- sdf0030ic_f4
- sdf0030ic_f5
- sdf0030ic_f6
- sdf0030ic_f7
- sdf0030ic_f8
- sdf0030ic_f10
- sdf0030ic_f11
- sdf0030ic_f12
- sdf0030ic_g2
- sdf0030ic_g3
- sdf0030ic_g6
- sdf0030ic_g12
- sdf0030ic_h1
- sdf0030ic_h2
- sdf0030ic_h3
- sdf0030ic_h12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 46 horas (interrupção de 4 horas para transporte)

D > 4 mm (bordas)

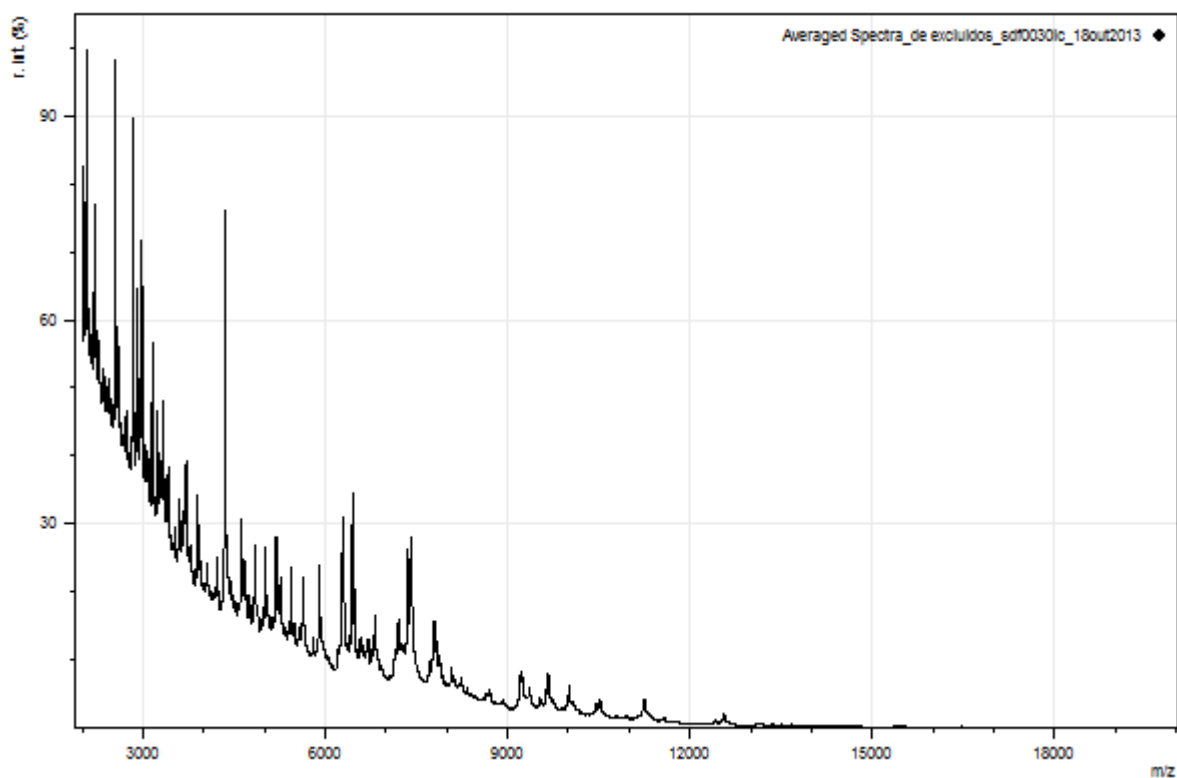
Cultivos = 3

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmash.org

mMass Report: Averaged Spectra_de excluidos_sdf0030ic_18out2013

Date	18out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	46

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0030ic_g1_excluido
- sdf0030ic_g2_excluido
- sdf0030ic_g3_excluido
- sdf0030ic_g4_excluido
- sdf0030ic_g5_excluido
- sdf0030ic_g6_excluido
- sdf0030ic_g7_excluido
- sdf0030ic_g8_excluido
- sdf0030ic_g9_excluido
- sdf0030ic_g10_excluido
- sdf0030ic_g11_excluido
- sdf0030ic_g12_excluido
- sdf0030ic_h1_excluido
- sdf0030ic_h2_excluido
- sdf0030ic_h3_excluido
- sdf0030ic_h4_excluido
- sdf0030ic_h5_excluido
- sdf0030ic_h6_excluido
- sdf0030ic_h7_excluido
- sdf0030ic_h8_excluido
- sdf0030ic_h9_excluido
- sdf0030ic_h10_excluido

- sdf0030ic_h12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 46 horas (interrupção de 4h para transporte)

D > 5 mm (bordas)

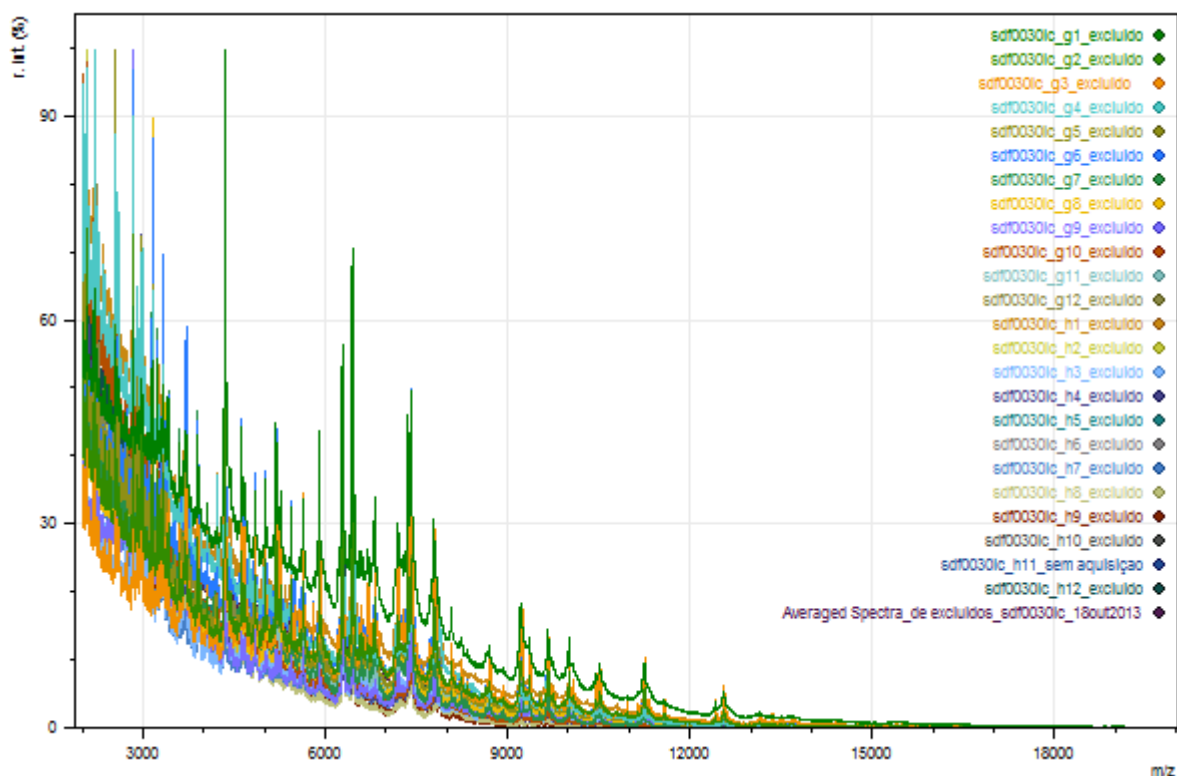
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_de excluidos_sdf0030ic_18out2013

Date	18out2013	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	46

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0030ic_g1_excluido
- sdf0030ic_g2_excluido
- sdf0030ic_g3_excluido
- sdf0030ic_g4_excluido
- sdf0030ic_g5_excluido
- sdf0030ic_g6_excluido
- sdf0030ic_g7_excluido
- sdf0030ic_g8_excluido
- sdf0030ic_g9_excluido
- sdf0030ic_g10_excluido
- sdf0030ic_g11_excluido
- sdf0030ic_g12_excluido
- sdf0030ic_h1_excluido
- sdf0030ic_h2_excluido
- sdf0030ic_h3_excluido
- sdf0030ic_h4_excluido
- sdf0030ic_h5_excluido
- sdf0030ic_h6_excluido
- sdf0030ic_h7_excluido
- sdf0030ic_h8_excluido
- sdf0030ic_h9_excluido
- sdf0030ic_h10_excluido

- sdf0030ic_h12_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (CI)

tc = 46 horas (interrupção de 4h para transporte)

D > 5 mm (bordas)

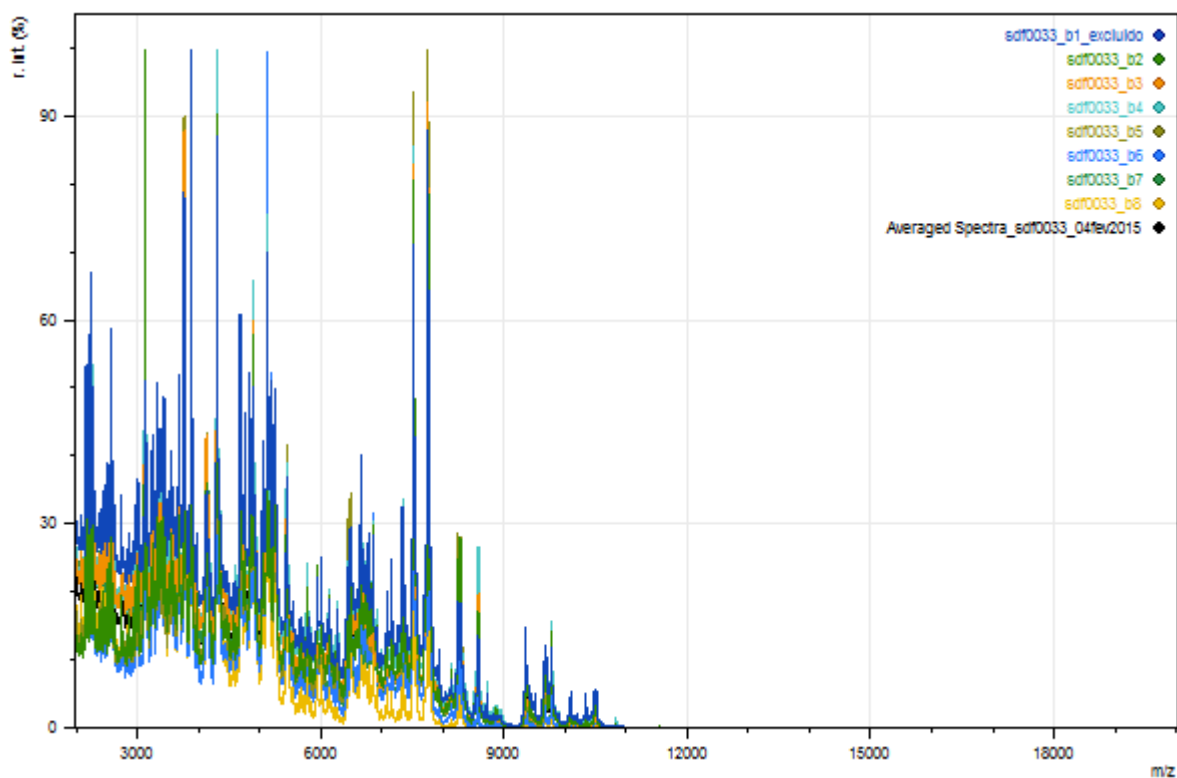
Cultivos = 2

Origem = alíquota do estoque comum

Generated by mMass • Open Source Mass Spectrometry Tool • www.mmass.org

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0033_04fev2015

Date	04fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	113



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0033_b2
- sdf0033_b3
- sdf0033_b4
- sdf0033_b5
- sdf0033_b6
- sdf0033_b7
- sdf0033_b8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 57 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 4 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

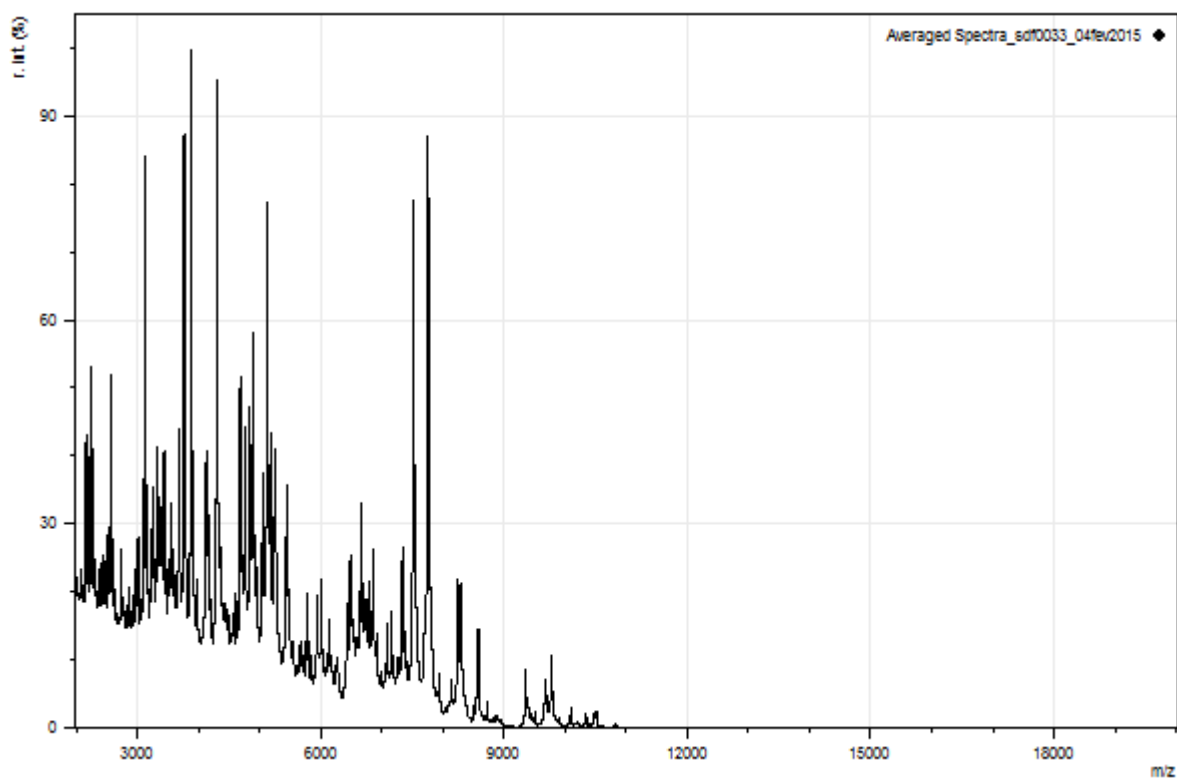
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 04fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0033_04fev2015

Date	04fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	113

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0033_b2
- sdf0033_b3
- sdf0033_b4
- sdf0033_b5
- sdf0033_b6
- sdf0033_b7
- sdf0033_b8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 57 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 4 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

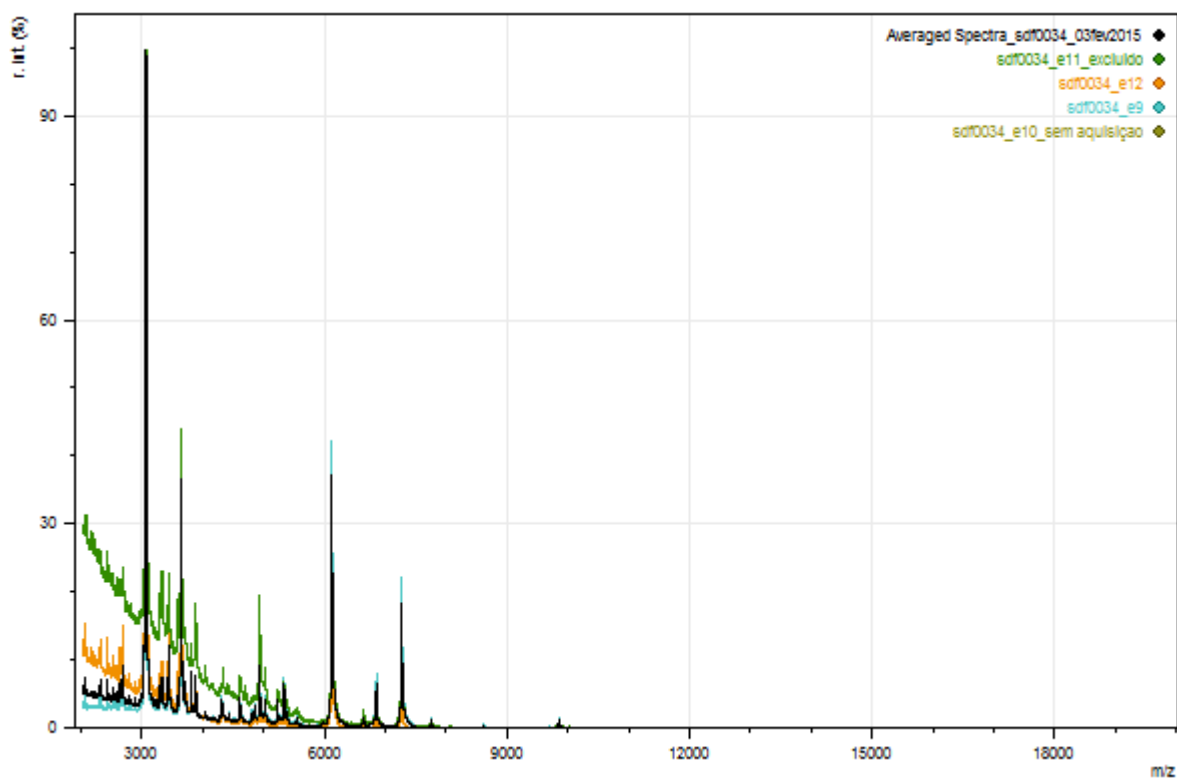
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 04fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0034_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	52

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0034_e9

- sdf0034_e12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 34 horas

D = 1 mm (mais de 1 col/extrato)

Tempo até aplicação do extrato = 7 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

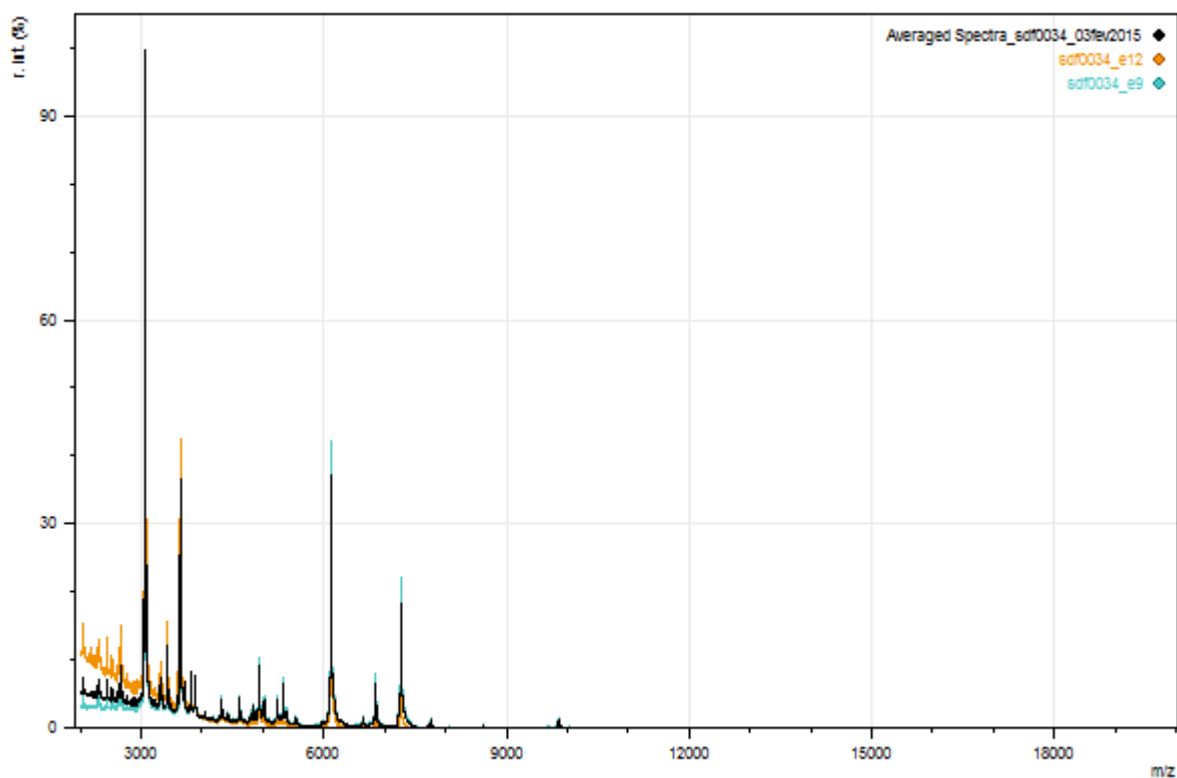
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0034_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	52

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0034_e9

- sdf0034_e12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 34 horas

D = 1 mm (mais de 1 col/extrato)

Tempo até aplicação do extrato = 7 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

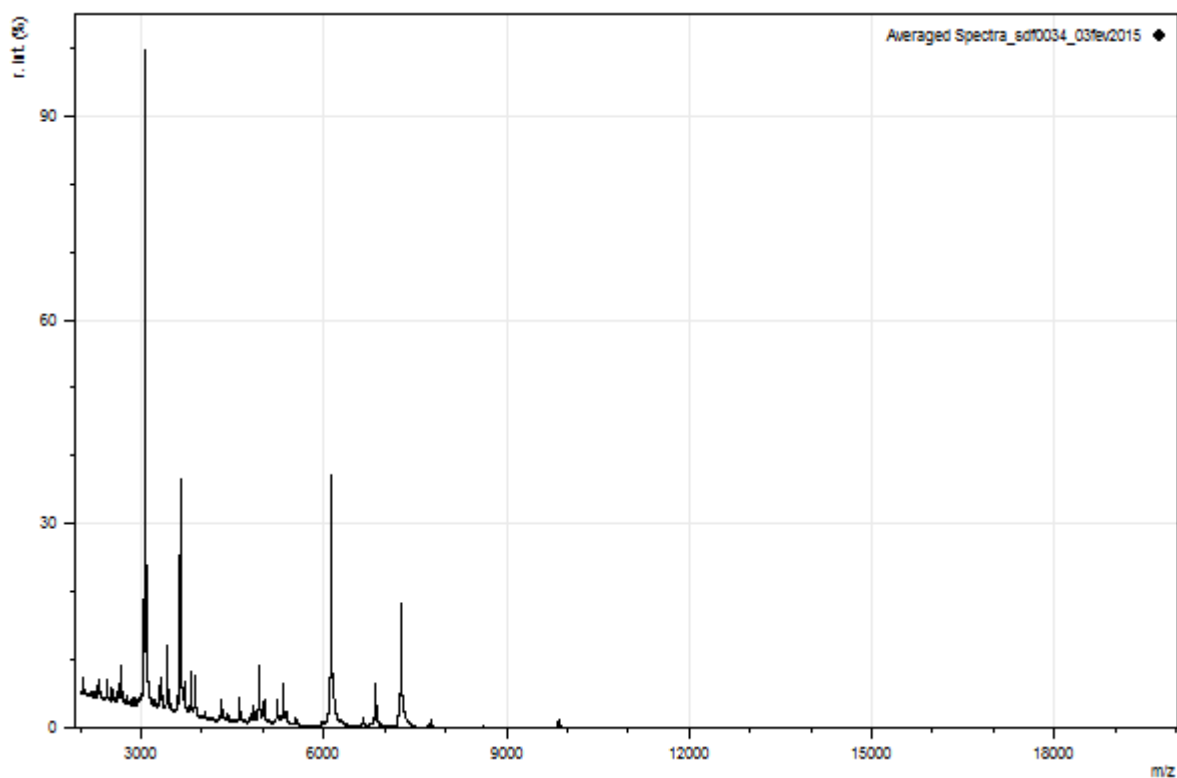
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0034_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	52

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0034_e9

- sdf0034_e12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 34 horas

D = 1 mm (mais de 1 col/extrato)

Tempo até aplicação do extrato = 7 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

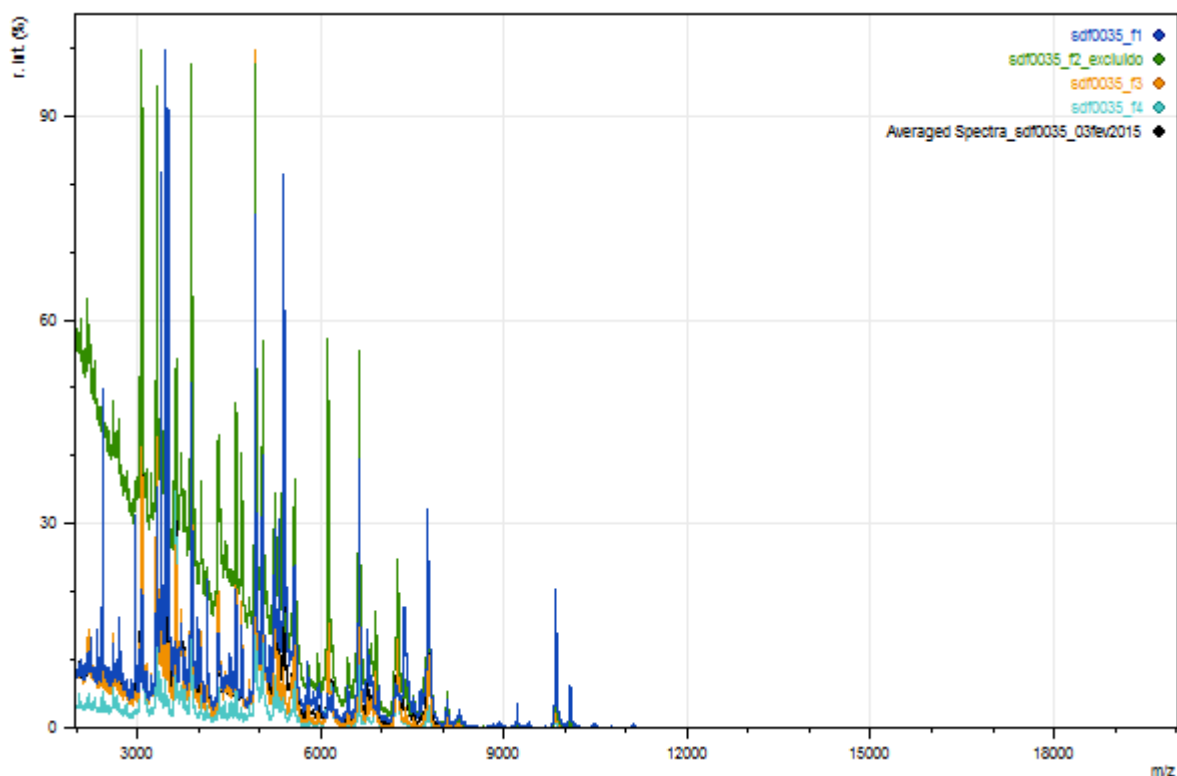
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0035_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	107



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0035_f1
- sdf0035_f3
- sdf0035_f4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 34 horas

D < 1 mm (mais de 1 col/extrato)

Tempo até aplicação do extrato = 7 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

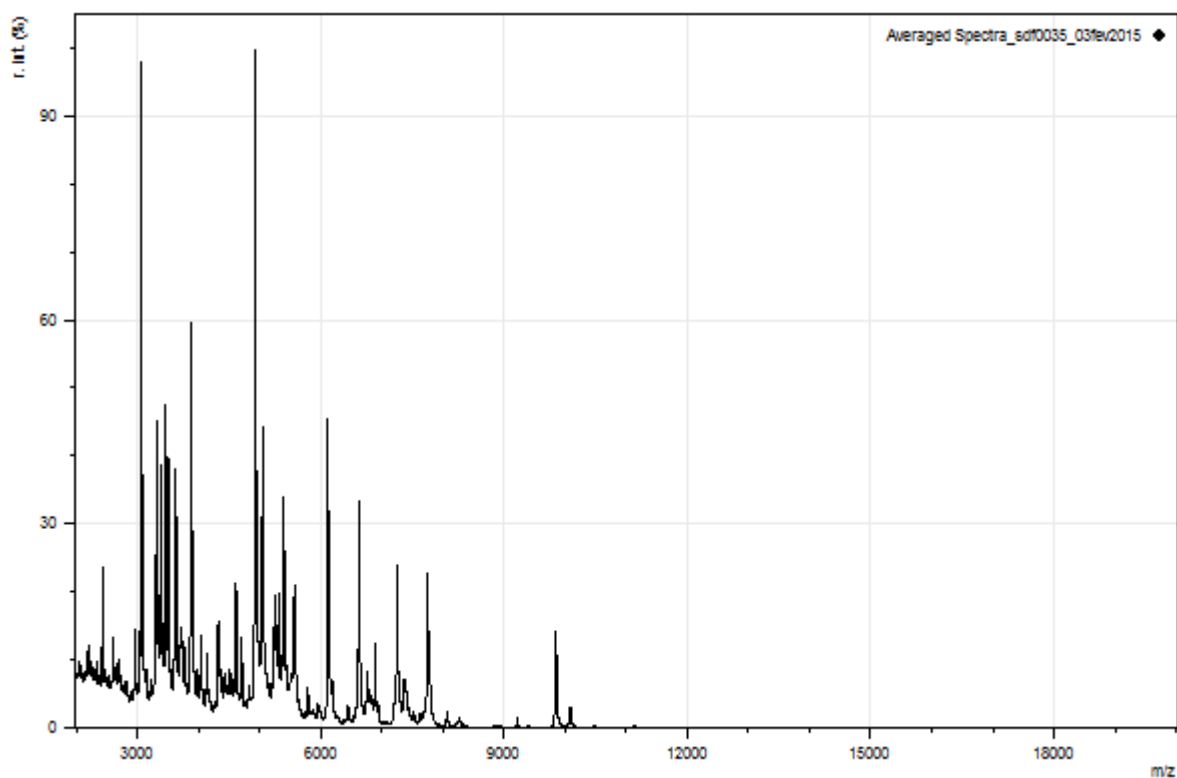
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0035_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	107

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0035_f1
- sdf0035_f3
- sdf0035_f4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 34 horas

D < 1 mm (mais de 1 col/extrato)

Tempo até aplicação do extrato = 7 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

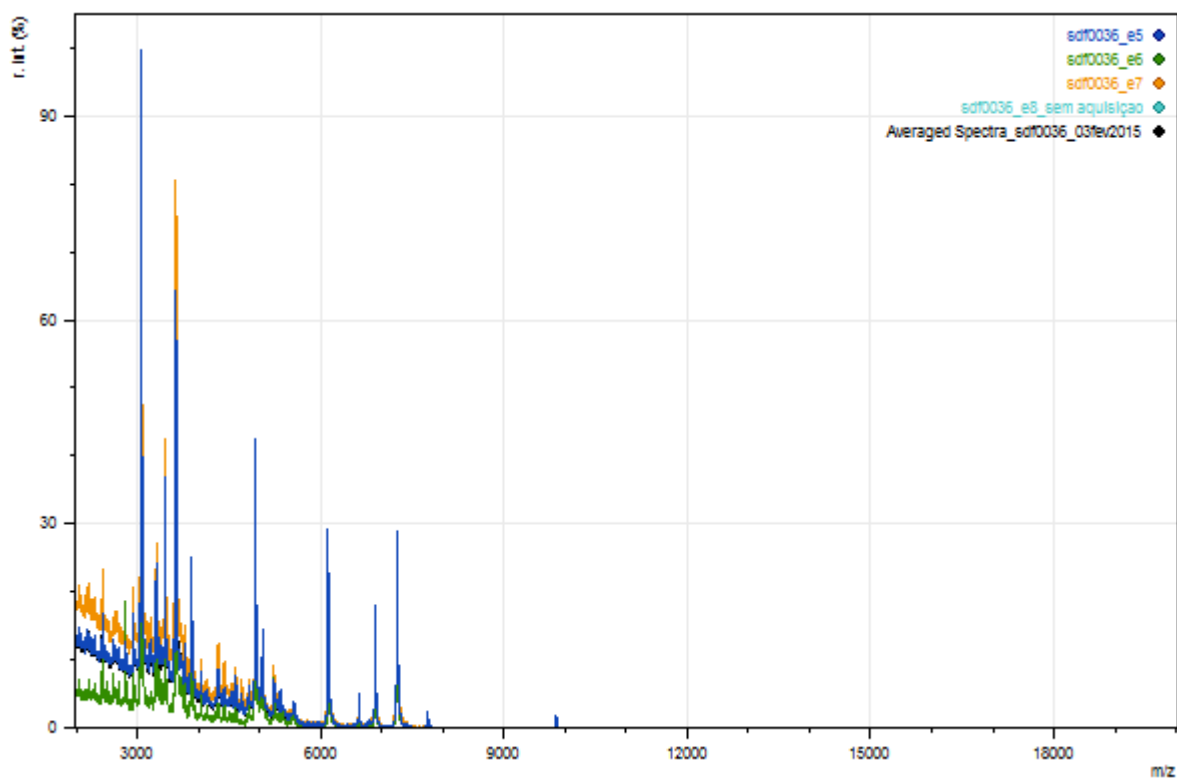
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0036_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	82

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0036_e5
- sdf0036_e6
- sdf0036_e7

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 33 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

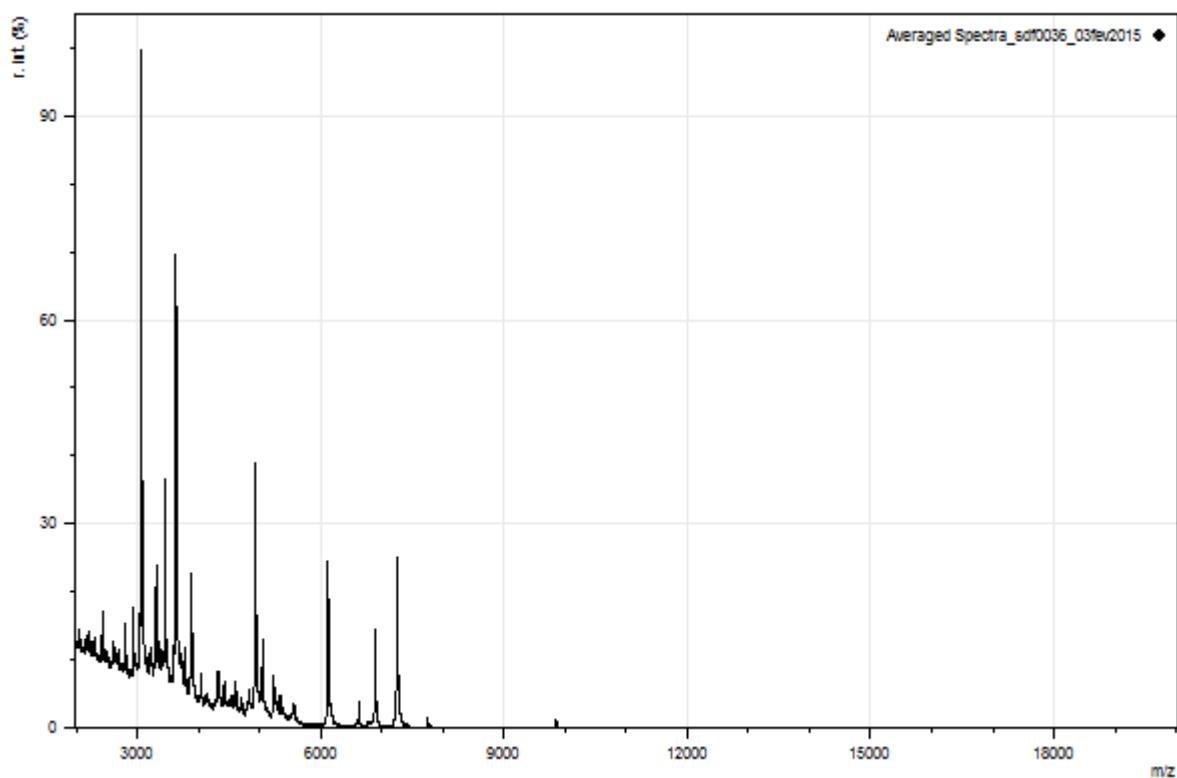
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0036_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	82

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0036_e5
- sdf0036_e6
- sdf0036_e7

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 33 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

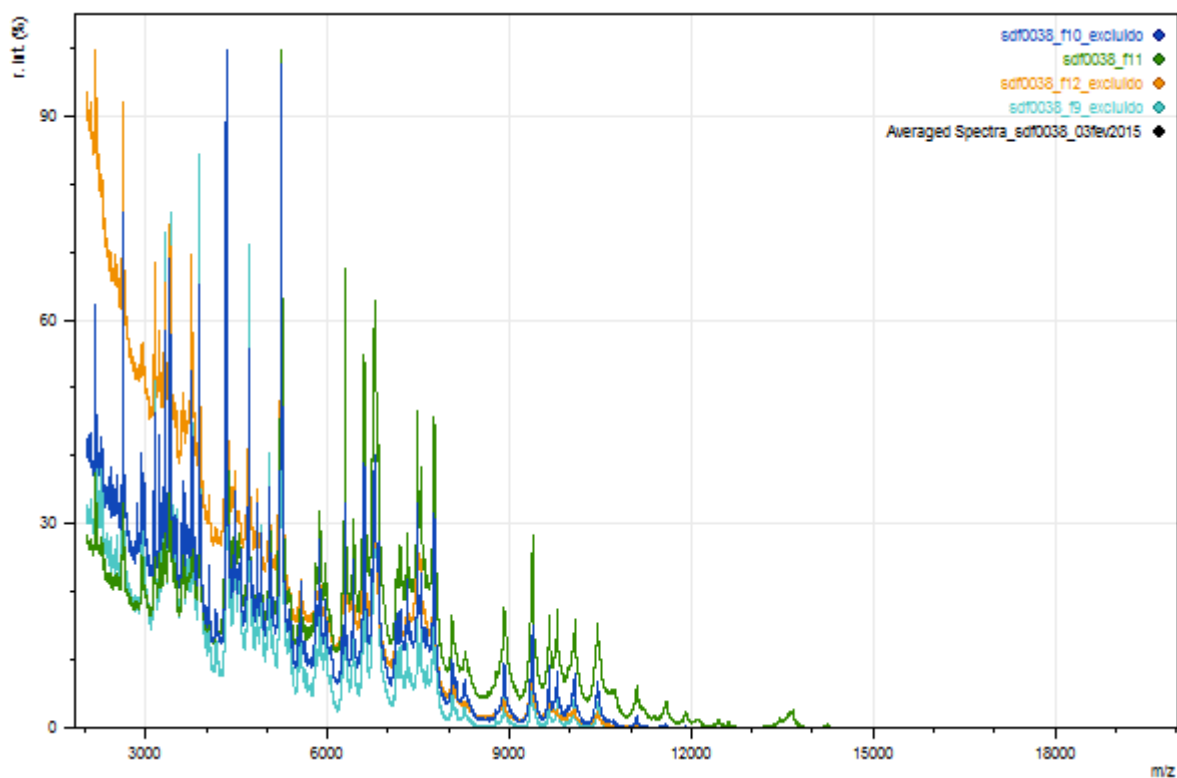
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0038_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	103



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0038_f11

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 34 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 6 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

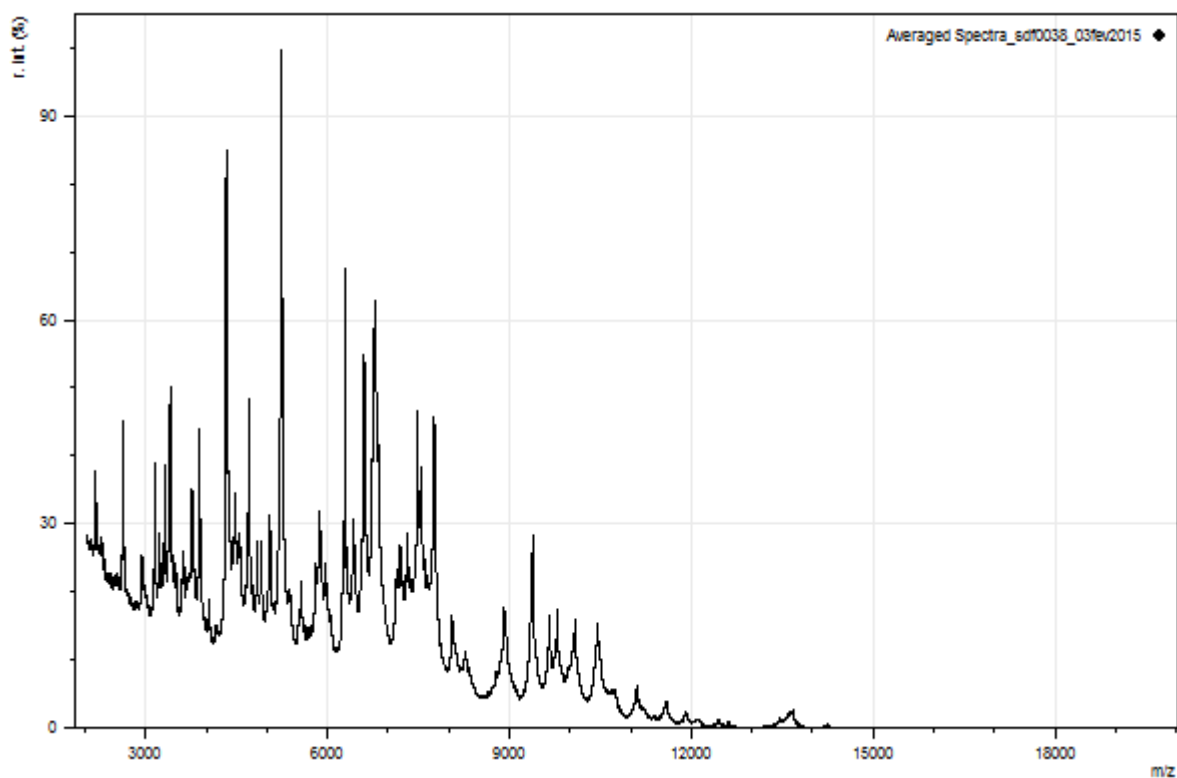
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0038_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	103

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0038_f11

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 34 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 6 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

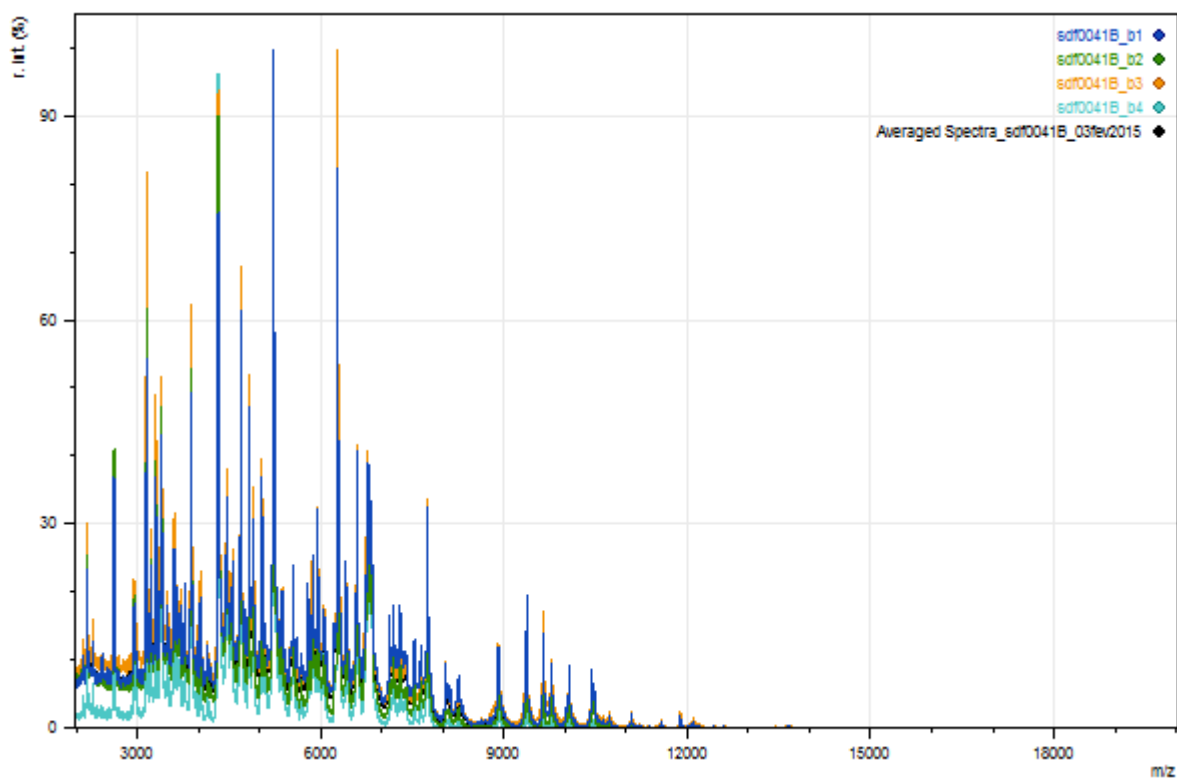
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0041B_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	103

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0041B_b1
- sdf0041B_b2
- sdf0041B_b3
- sdf0041B_b4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 31 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 9 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

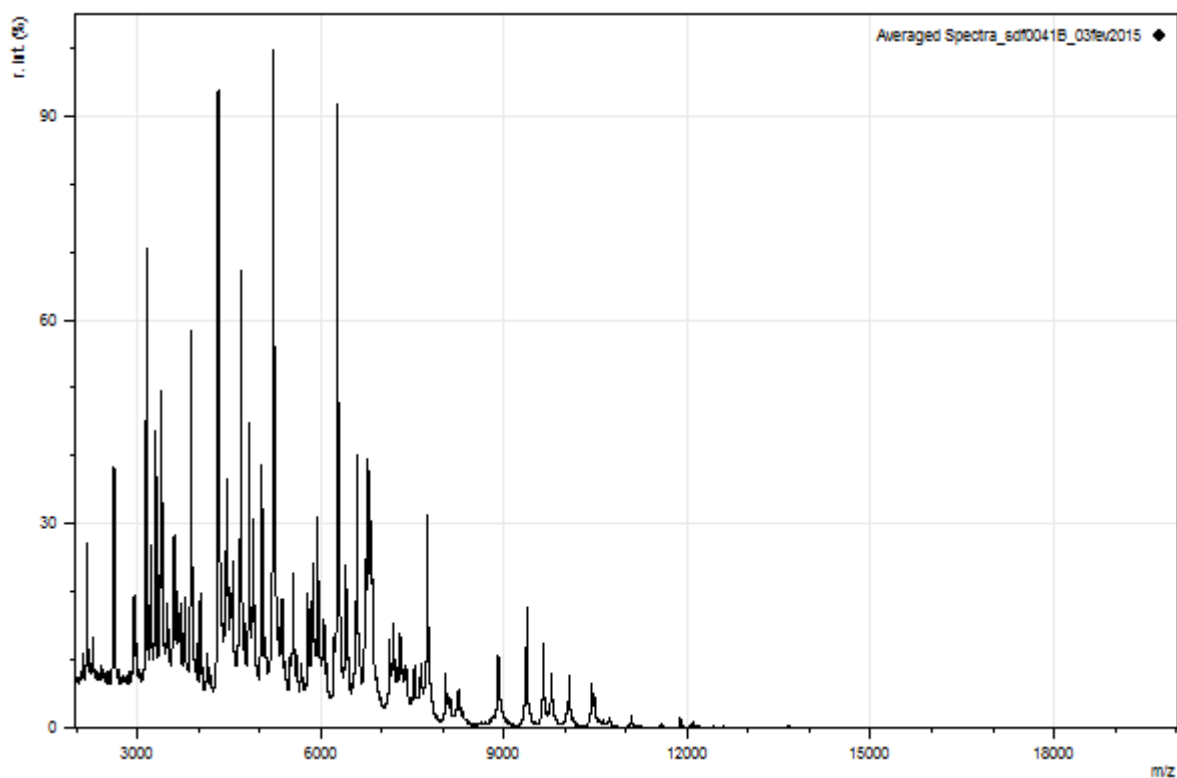
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0041B_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	103

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0041B_b1
- sdf0041B_b2
- sdf0041B_b3
- sdf0041B_b4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 31 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 9 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

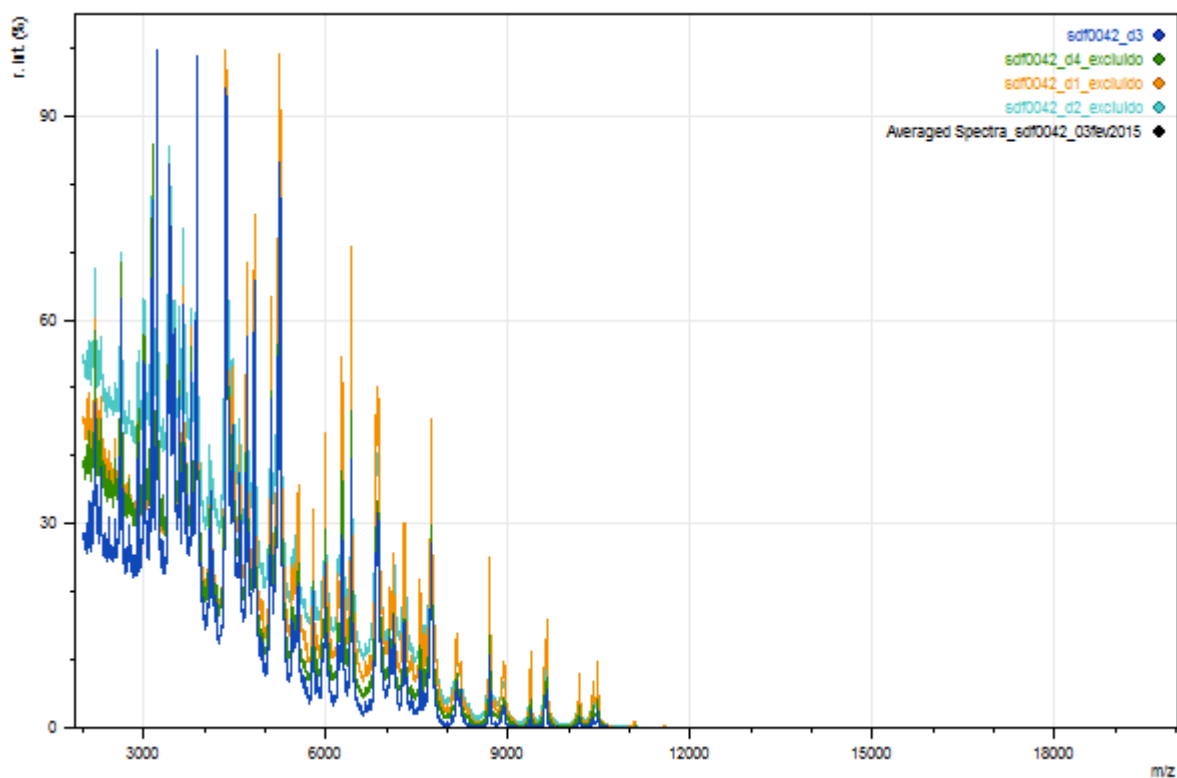
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0042_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	212

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0042_d3

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

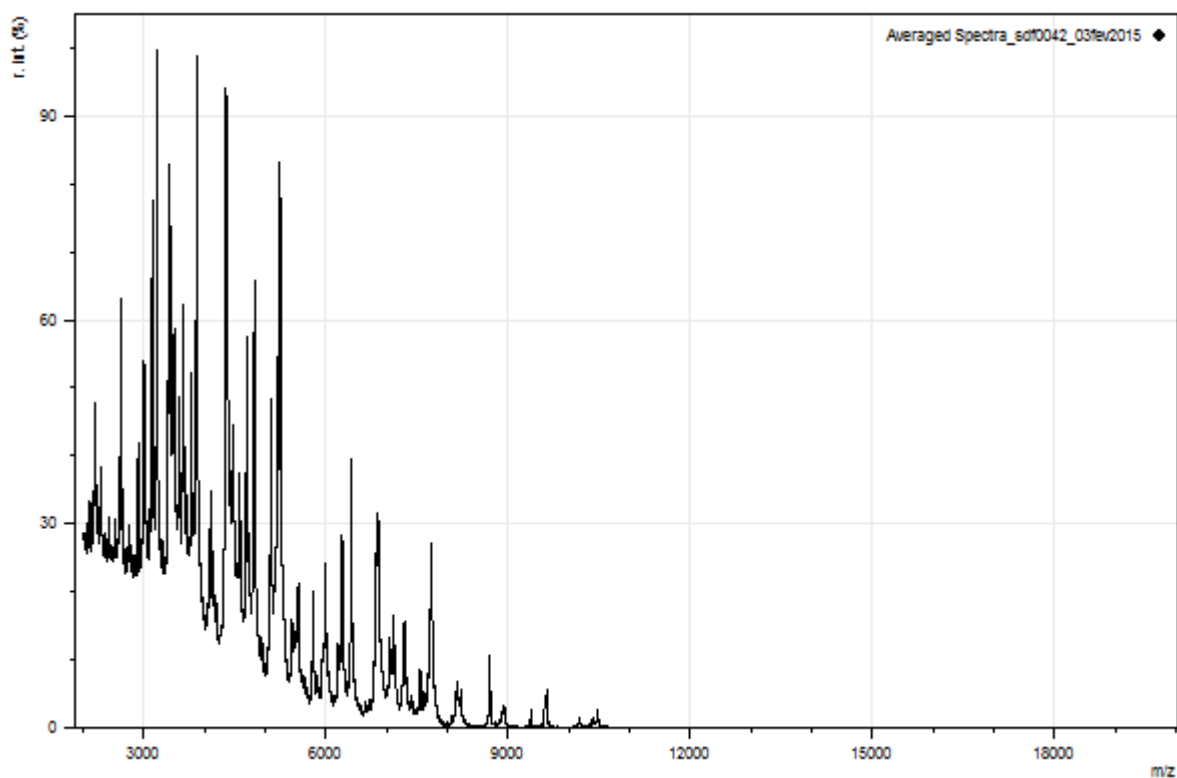
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0042_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	212

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0042_d3

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

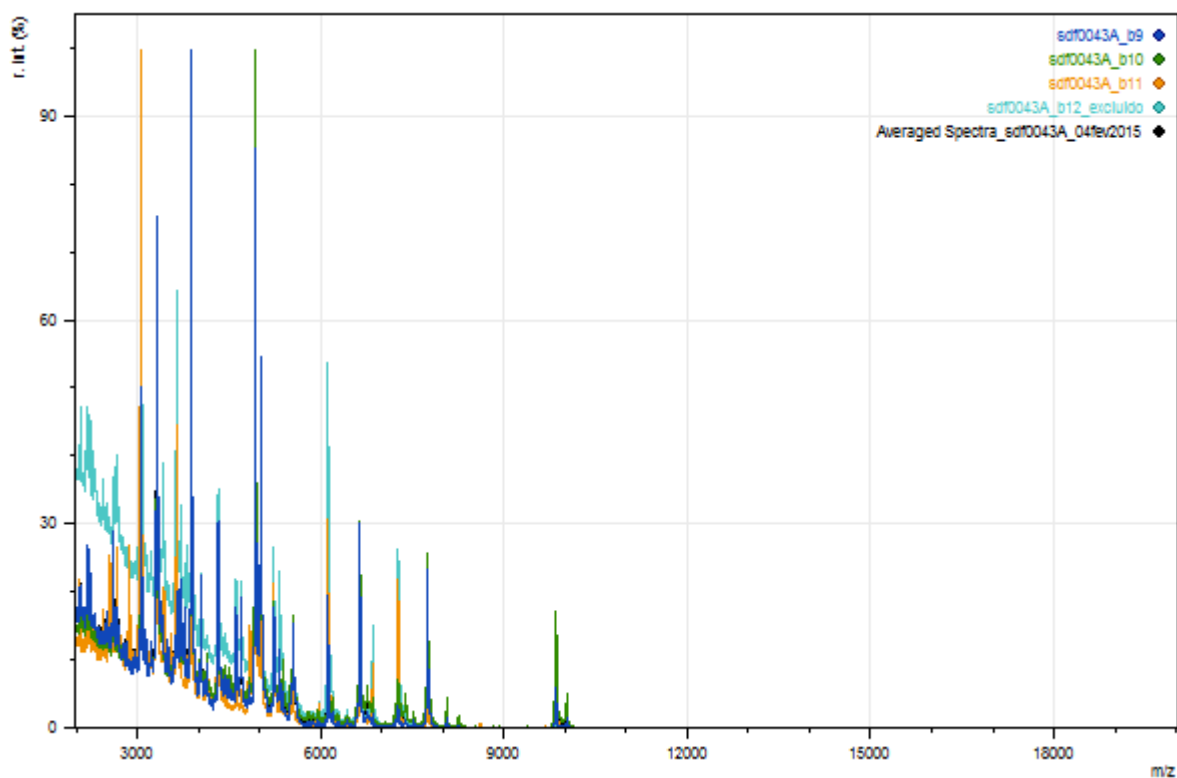
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0043A_04fev2015

Date	04fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	75

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0043A_b9
- sdf0043A_b10
- sdf0043A_b11

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 57 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 4 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Ruim

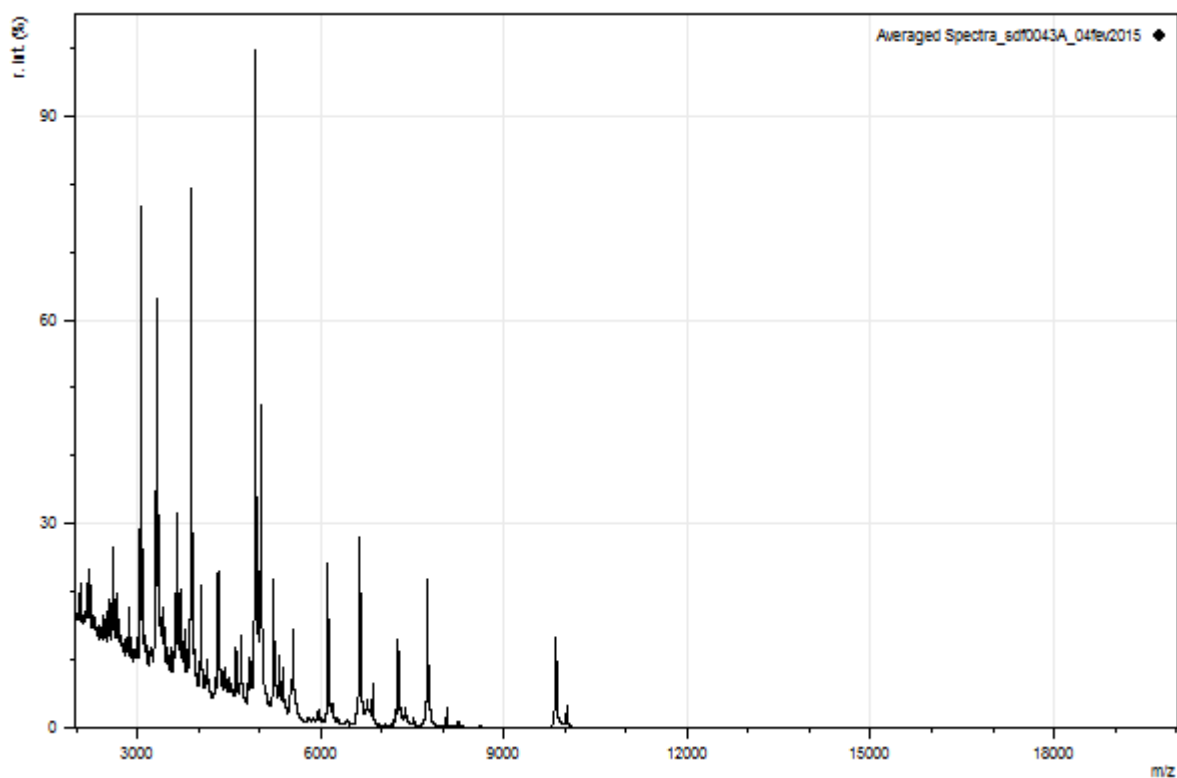
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 04fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0043A_04fev2015

Date	04fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	75

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0043A_b9
- sdf0043A_b10
- sdf0043A_b11

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 57 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 4 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Ruim

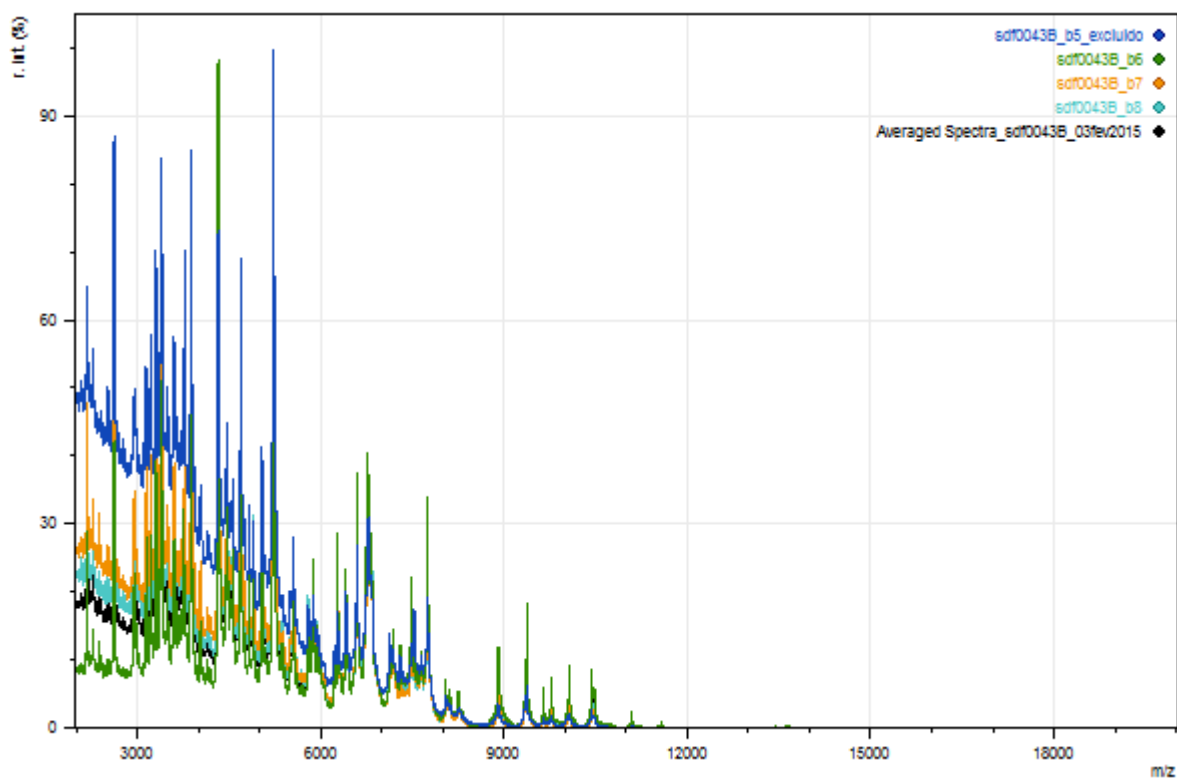
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 04fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0043B_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	94

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0043B_b6
- sdf0043B_b7
- sdf0043B_b8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 31 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 9 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

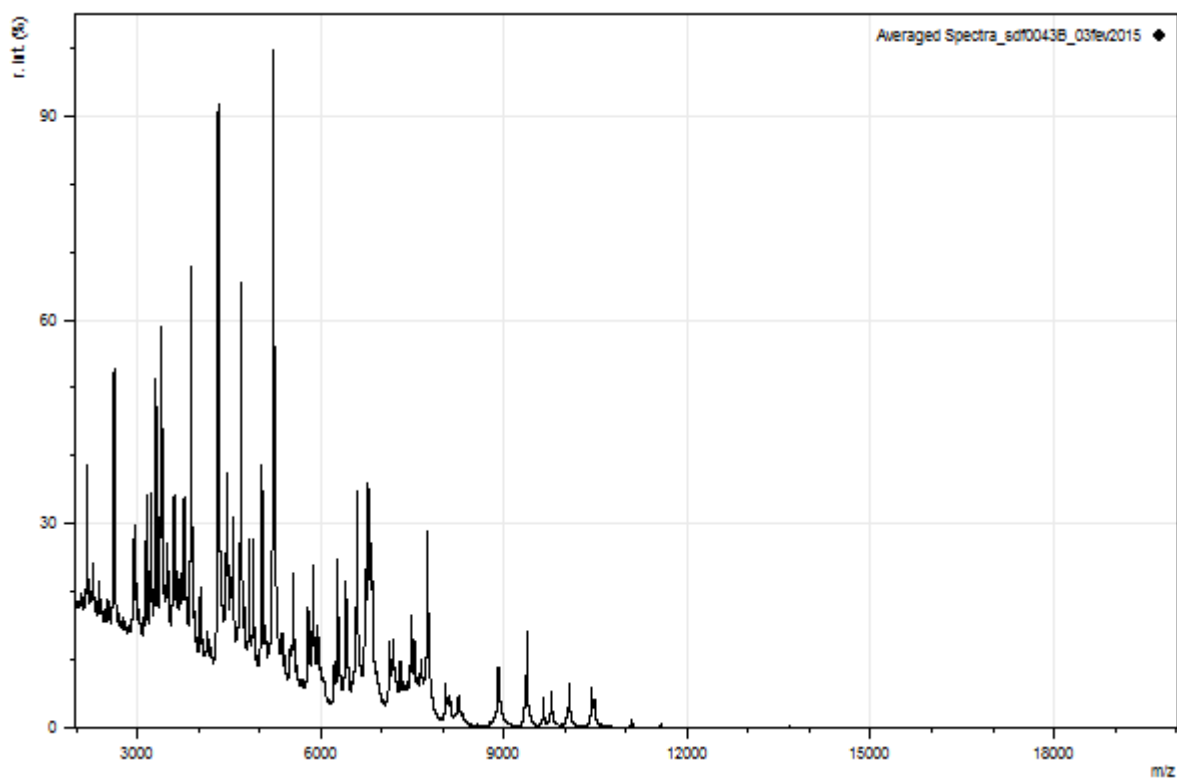
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0043B_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	94

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0043B_b6
- sdf0043B_b7
- sdf0043B_b8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 31 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 9 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

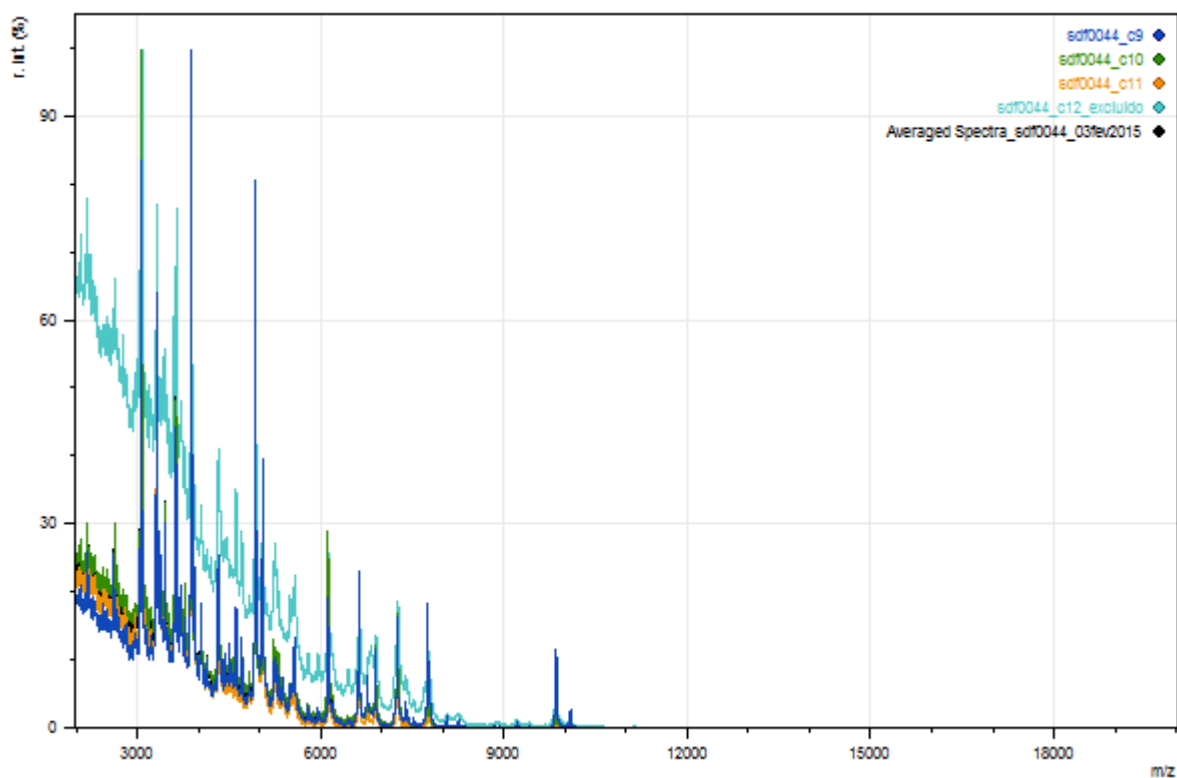
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0044_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	65

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0044_c9
- sdf0044_c10
- sdf0044_c11

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 9 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

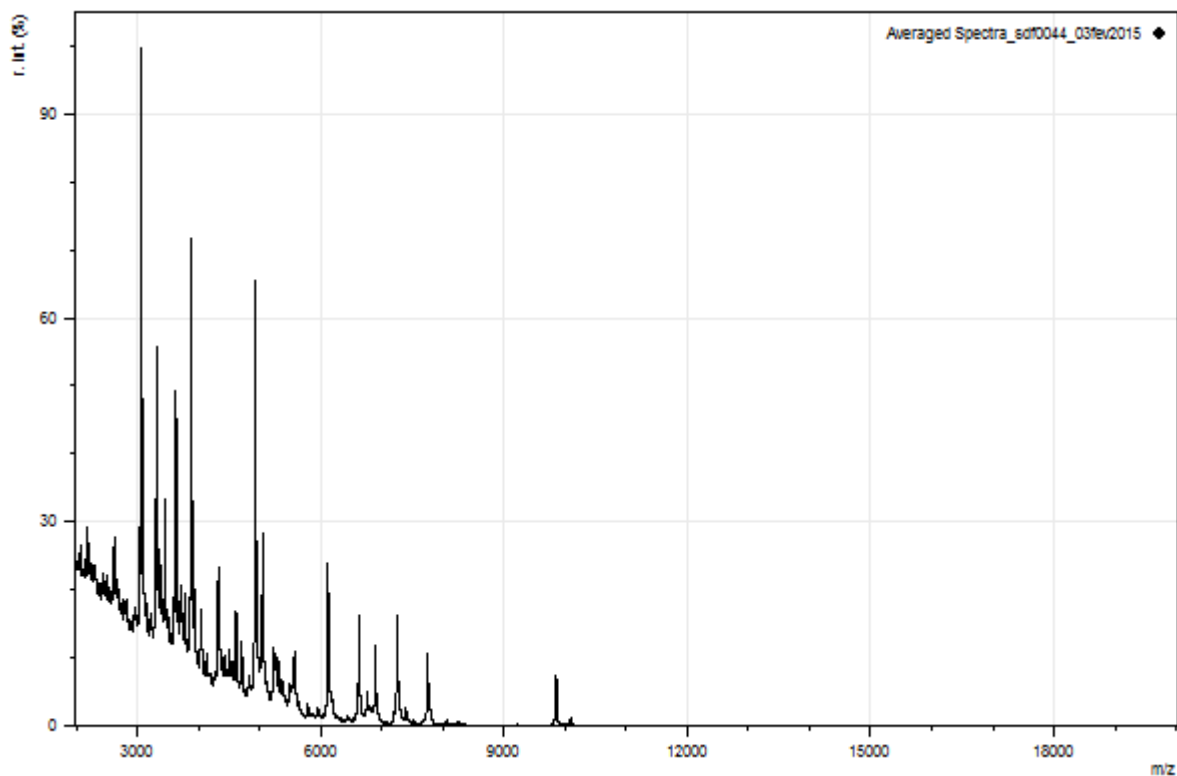
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0044_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	65

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0044_c9
- sdf0044_c10
- sdf0044_c11

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 9 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

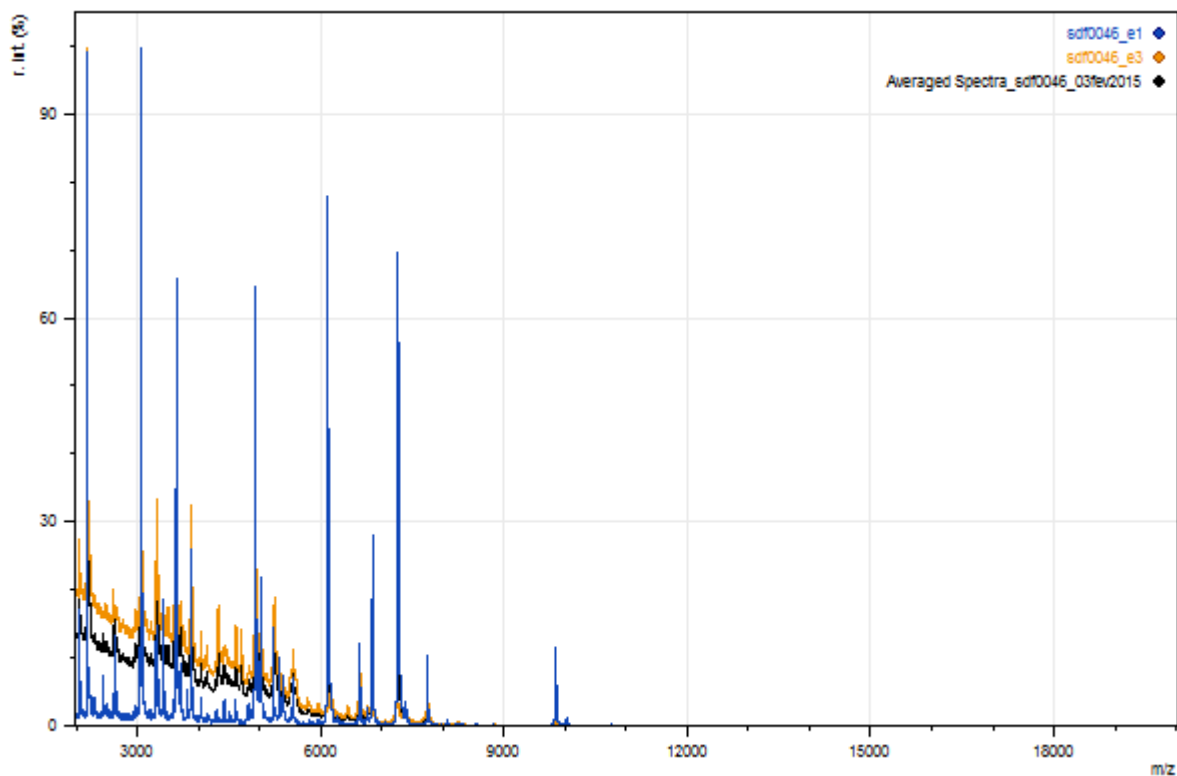
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0046_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	79

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0046_e1

- sdf0046_e3

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 1 mm (mais de 1 col/extrato)

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Ruim

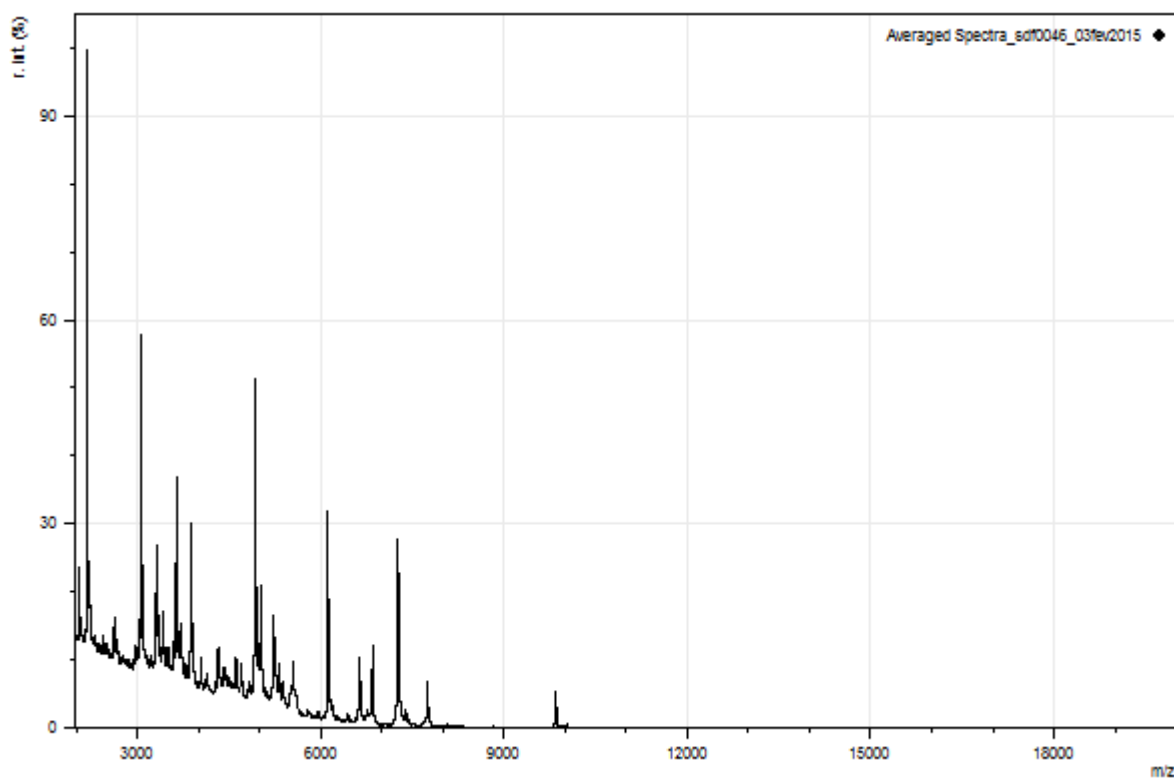
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0046_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	79

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0046_e1

- sdf0046_e3

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 1 mm (mais de 1 col/extrato)

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Ruim

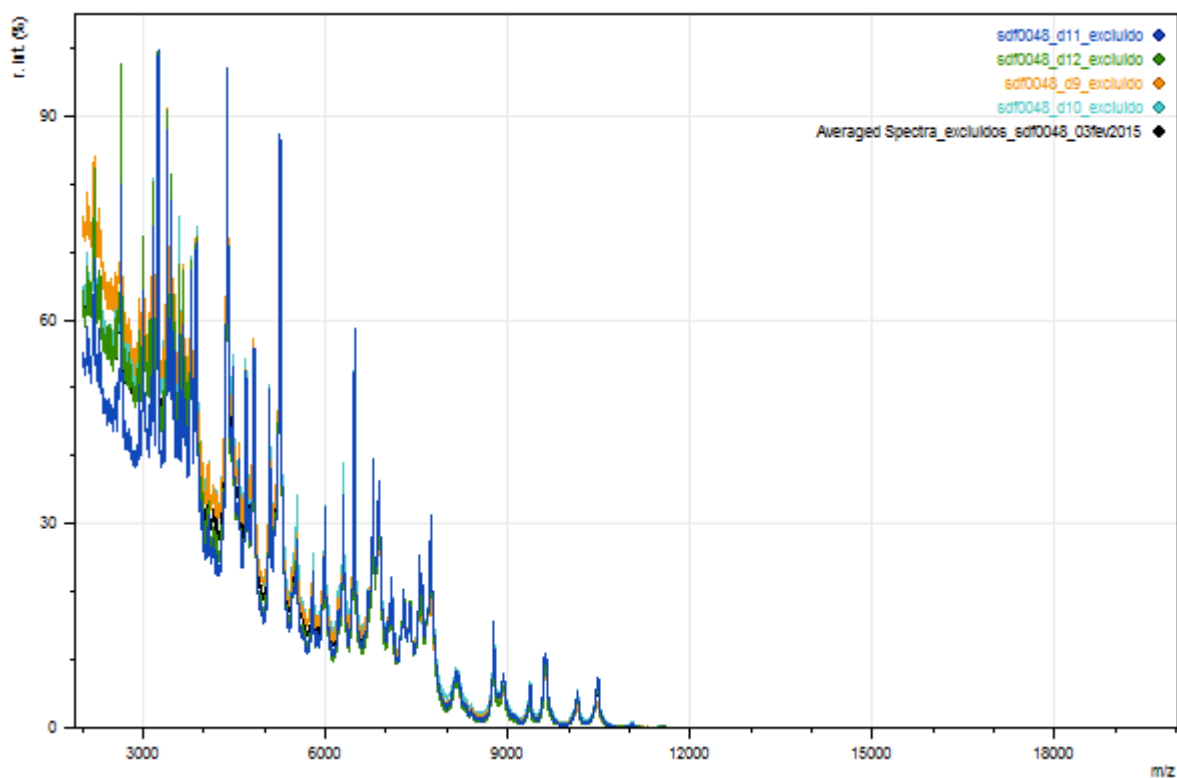
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_excluidos_sdf0048_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	96



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0048_d11_excluido
- sdf0048_d12_excluido
- sdf0048_d9_excluido
- sdf0048_d10_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

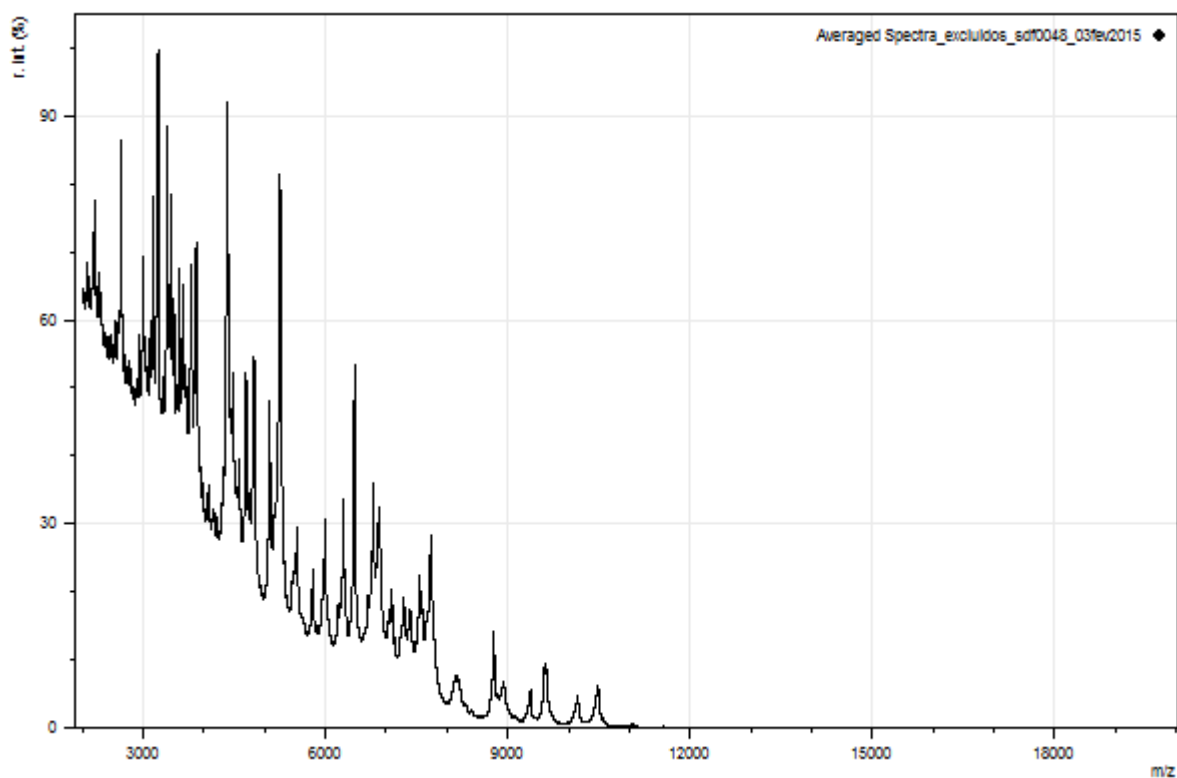
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_excluidos_sdf0048_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	96

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0048_d11_excluido
- sdf0048_d12_excluido
- sdf0048_d9_excluido
- sdf0048_d10_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

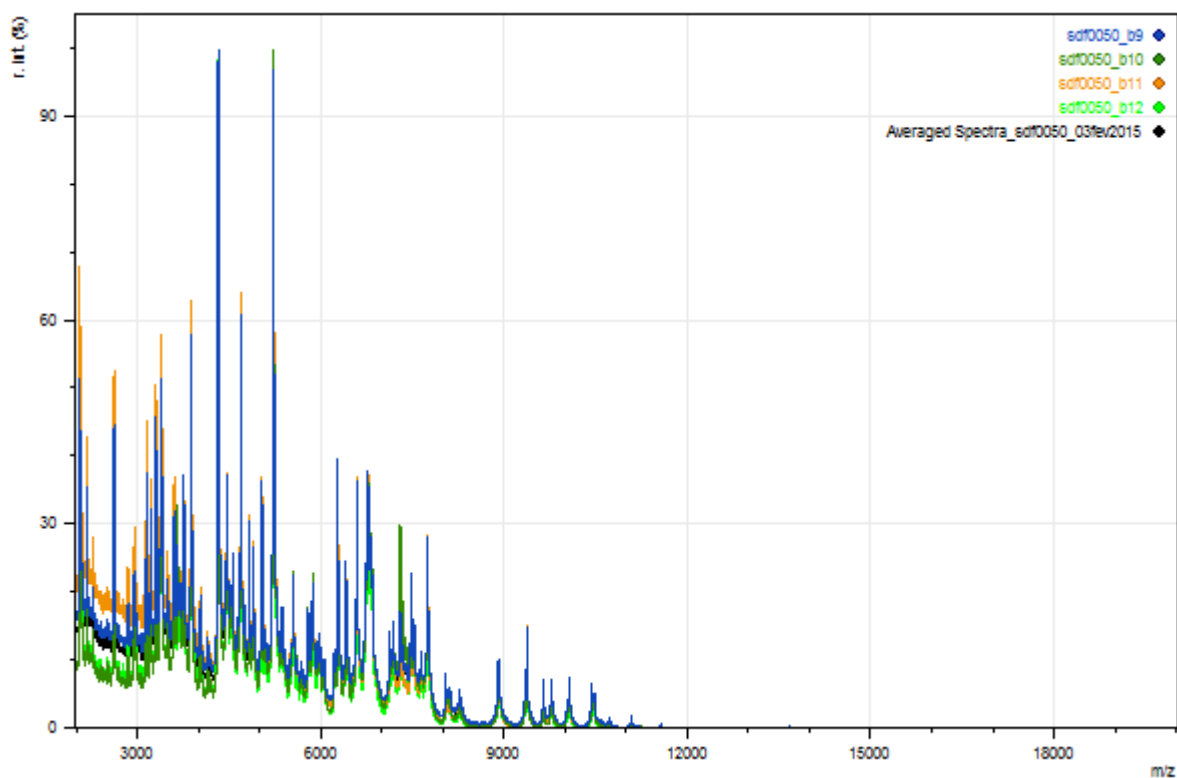
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0050_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	87

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0050_b9
- sdf0050_b10
- sdf0050_b11
- sdf0050_b12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 9 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

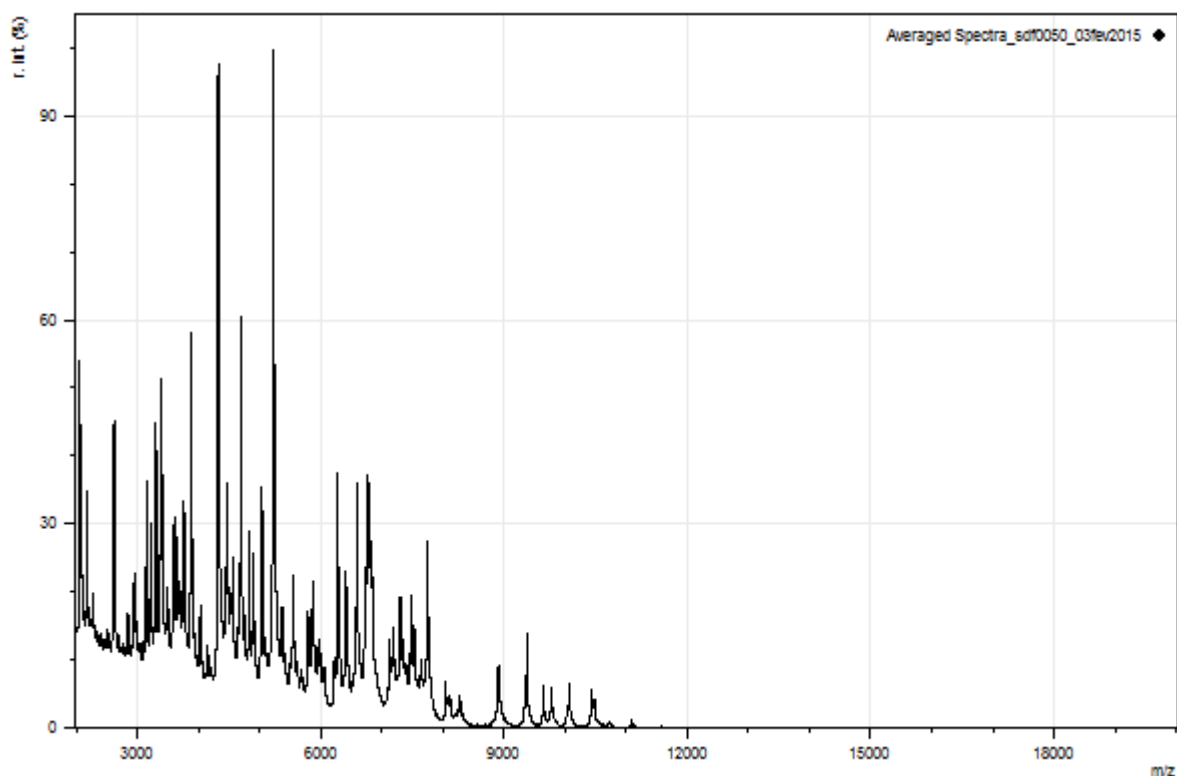
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0050_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	87

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0050_b9
- sdf0050_b10
- sdf0050_b11
- sdf0050_b12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 9 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

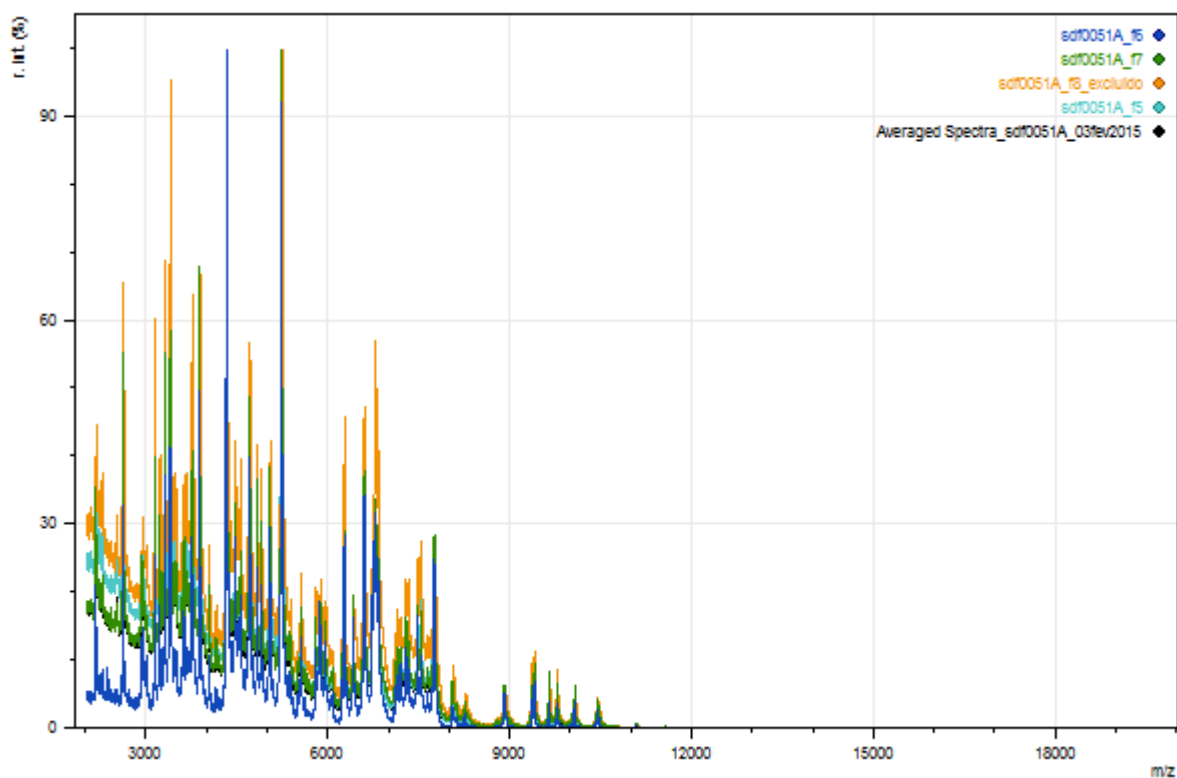
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0051A_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	84

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0051A_f5
- sdf0051A_f6
- sdf0051A_f7

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 34 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 6 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

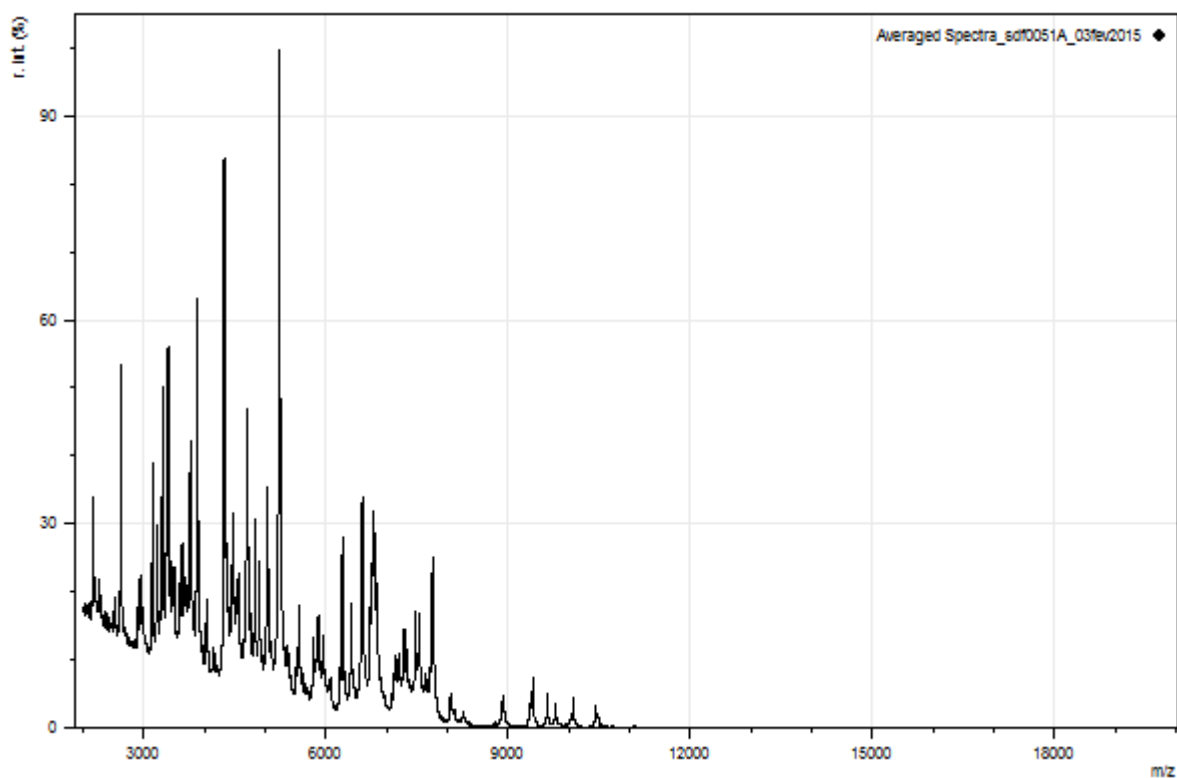
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0051A_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	84

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0051A_f5
- sdf0051A_f6
- sdf0051A_f7

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 34 horas

D = 3 mm

Tempo até aplicação do extrato = 6 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

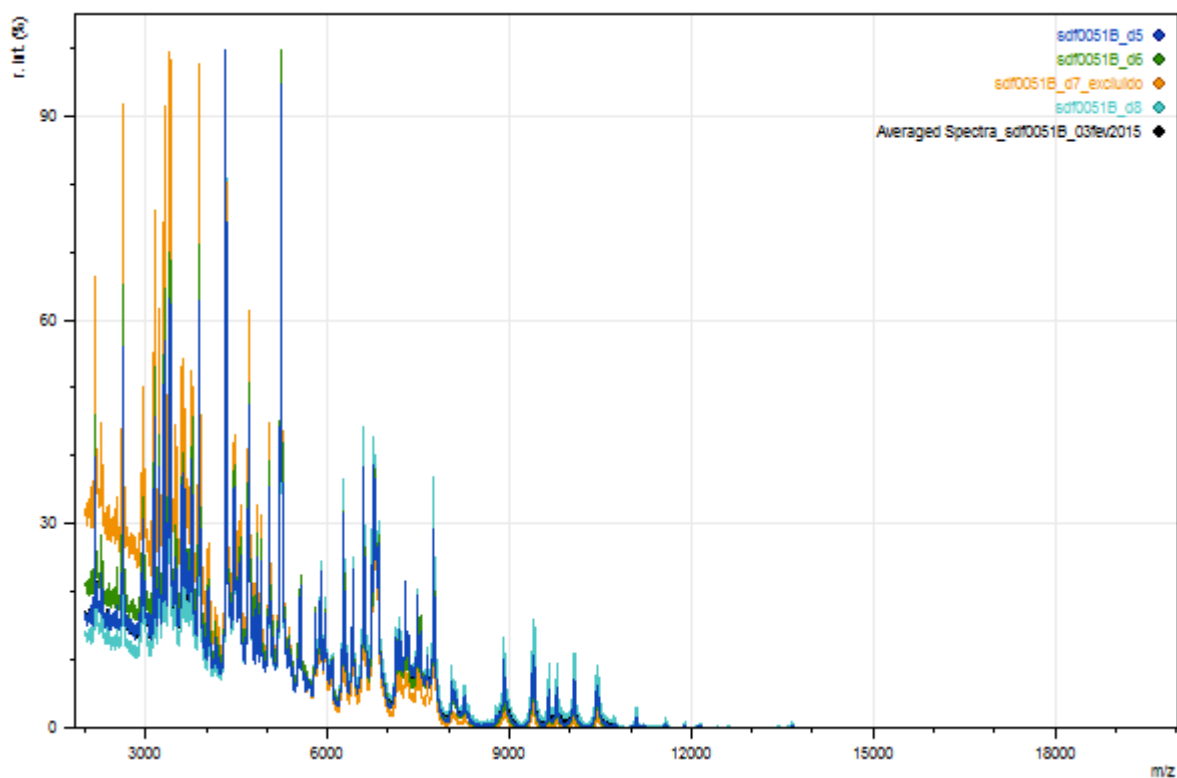
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0051B_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	108

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0051B_d5
- sdf0051B_d6
- sdf0051B_d8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

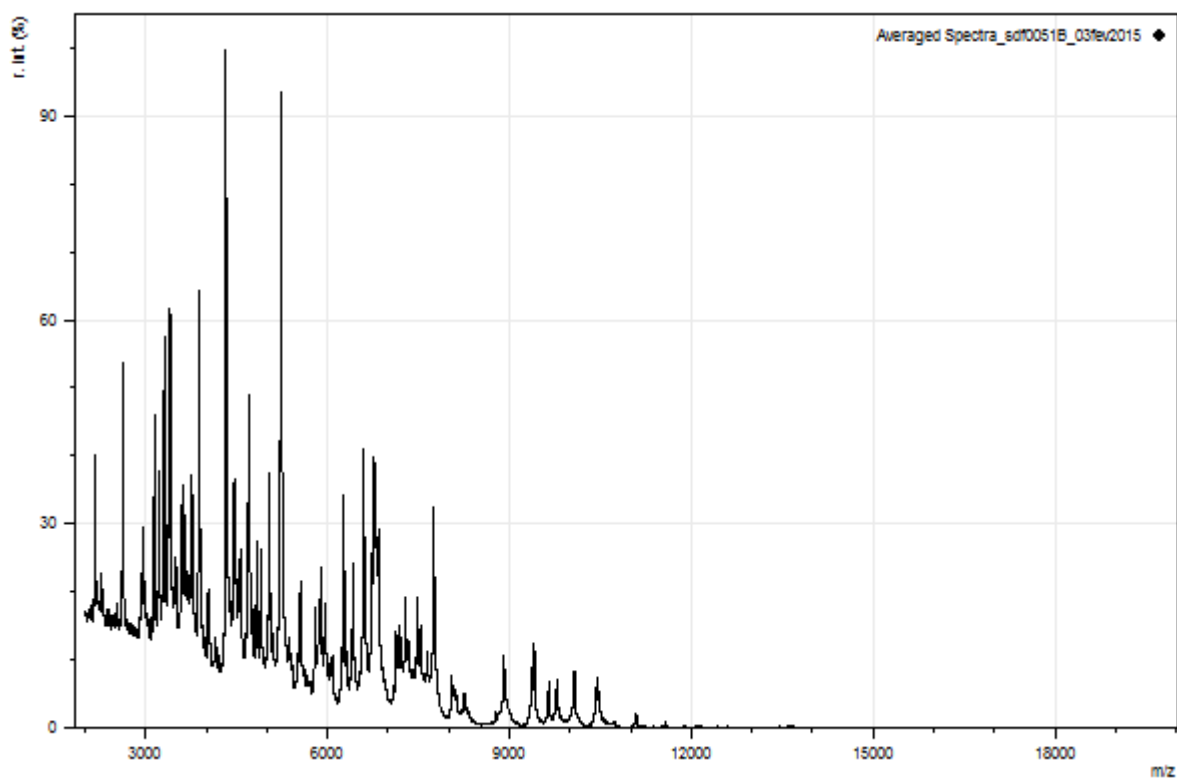
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0051B_03fev2015

Date	03fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	108

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0051B_d5
- sdf0051B_d6
- sdf0051B_d8

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 32 horas

D = 2 mm

Tempo até aplicação do extrato = 8 horas

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

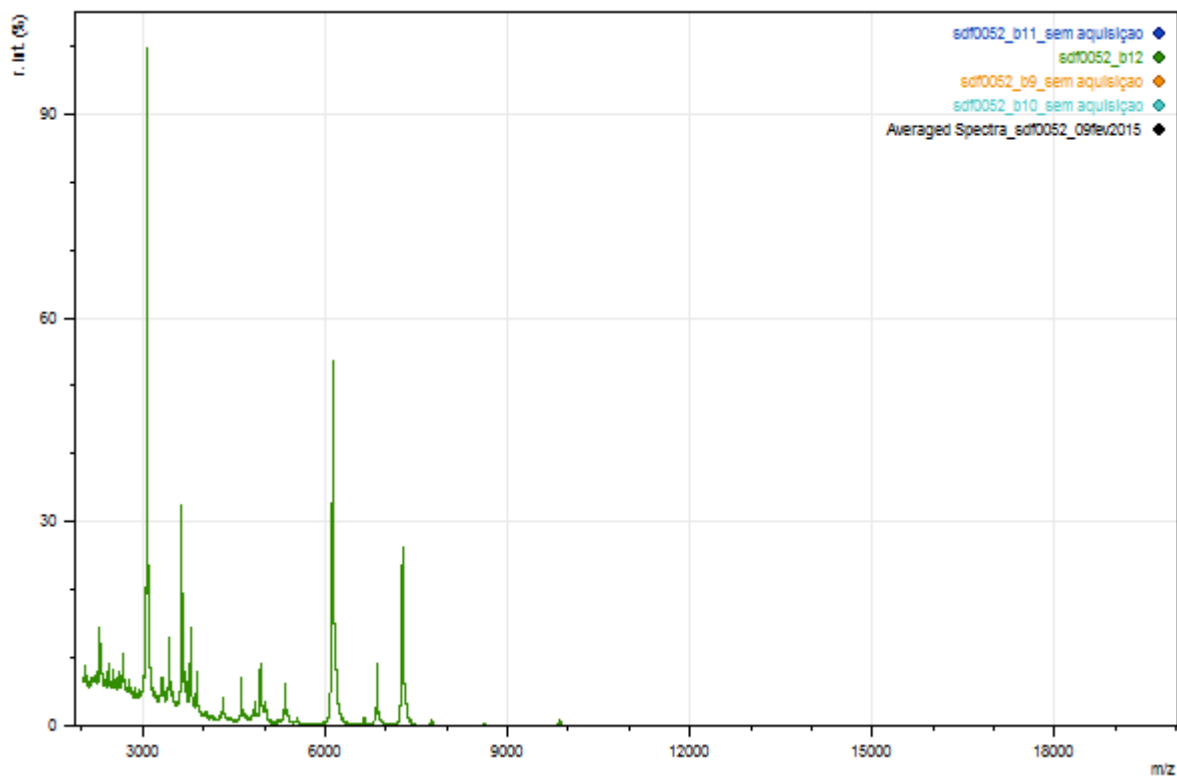
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 03fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0052_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	94



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0052_b12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 27 horas

D < 1 mm (mais de 1 col/extrato)

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Ruim

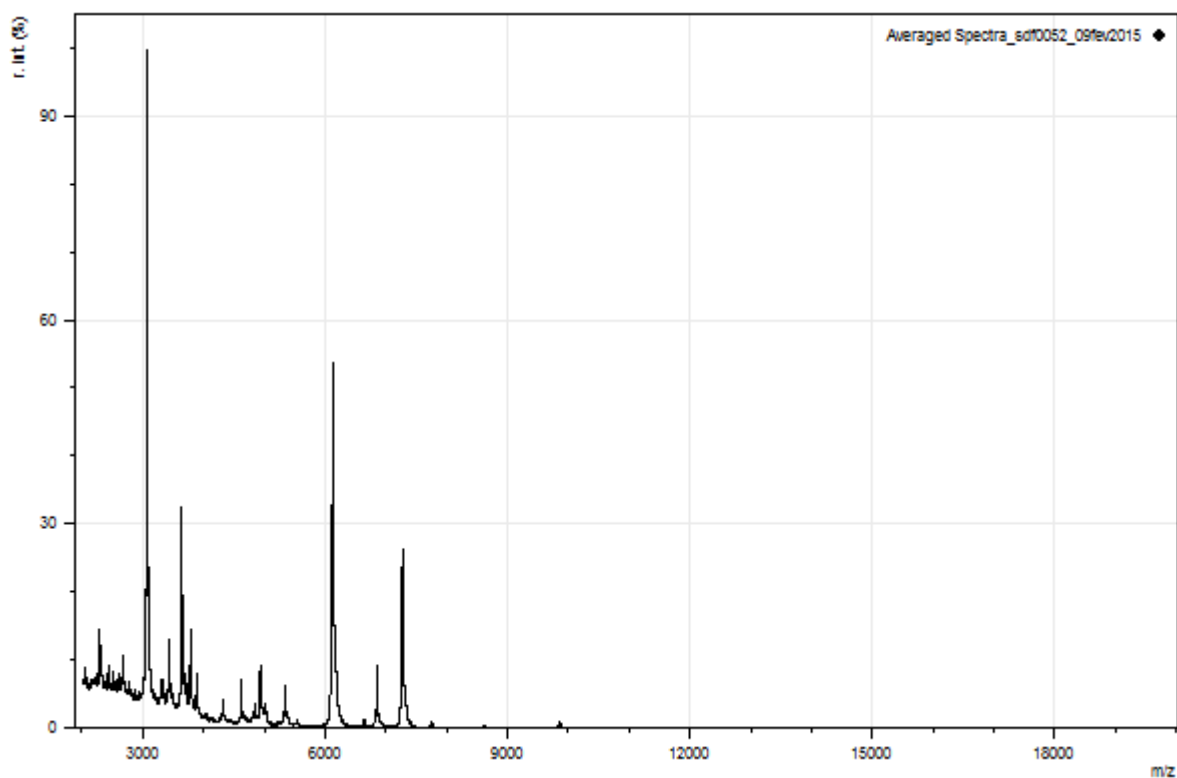
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0052_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	94

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0052_b12

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 27 horas

D < 1 mm (mais de 1 col/extrato)

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Ruim

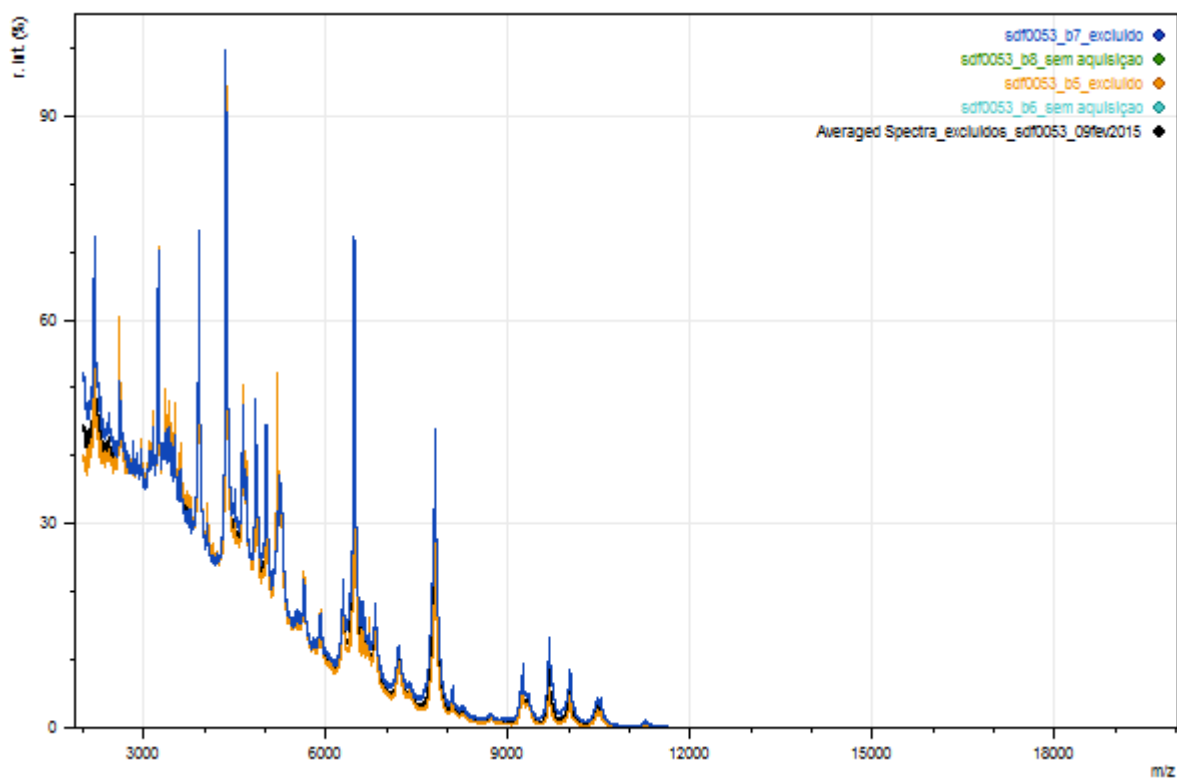
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_excluidos_sdf0053_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	124



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0053_b5_excluido

- sdf0053_b7_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 27 horas

D = 3 mm

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

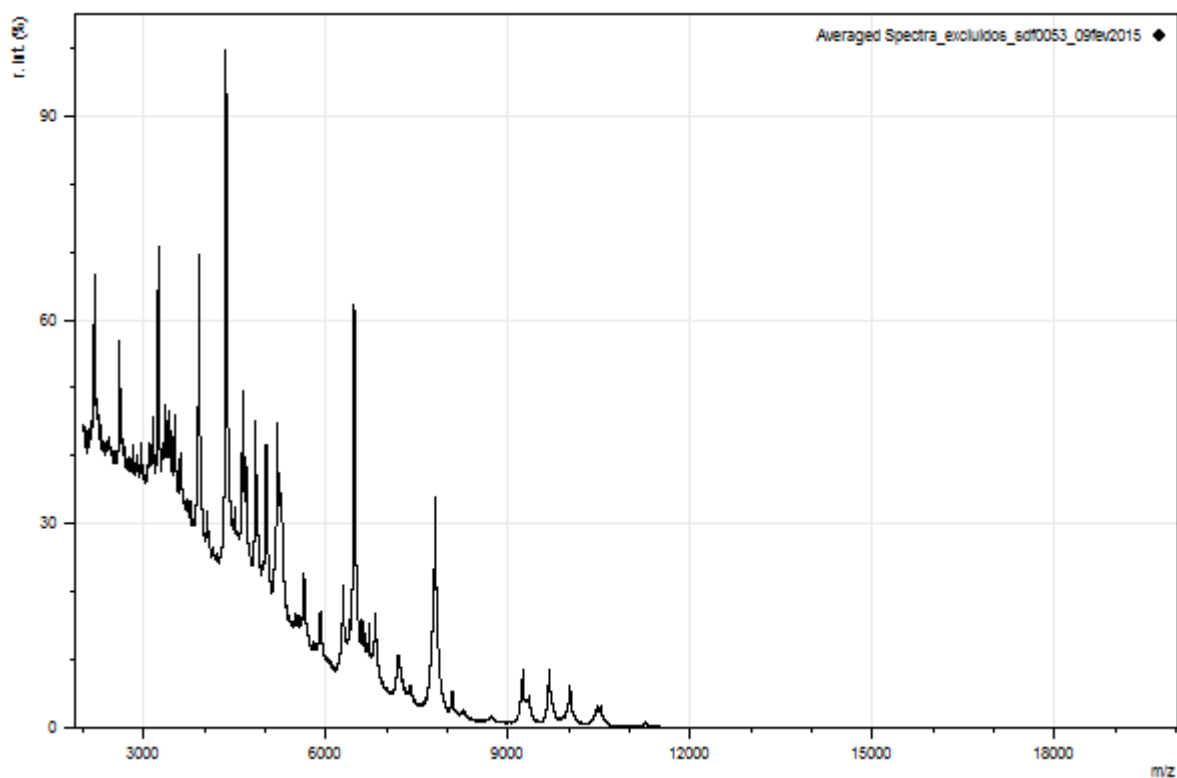
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_excluidos_sdf0053_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	124

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0053_b5_excluido

- sdf0053_b7_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 27 horas

D = 3 mm

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

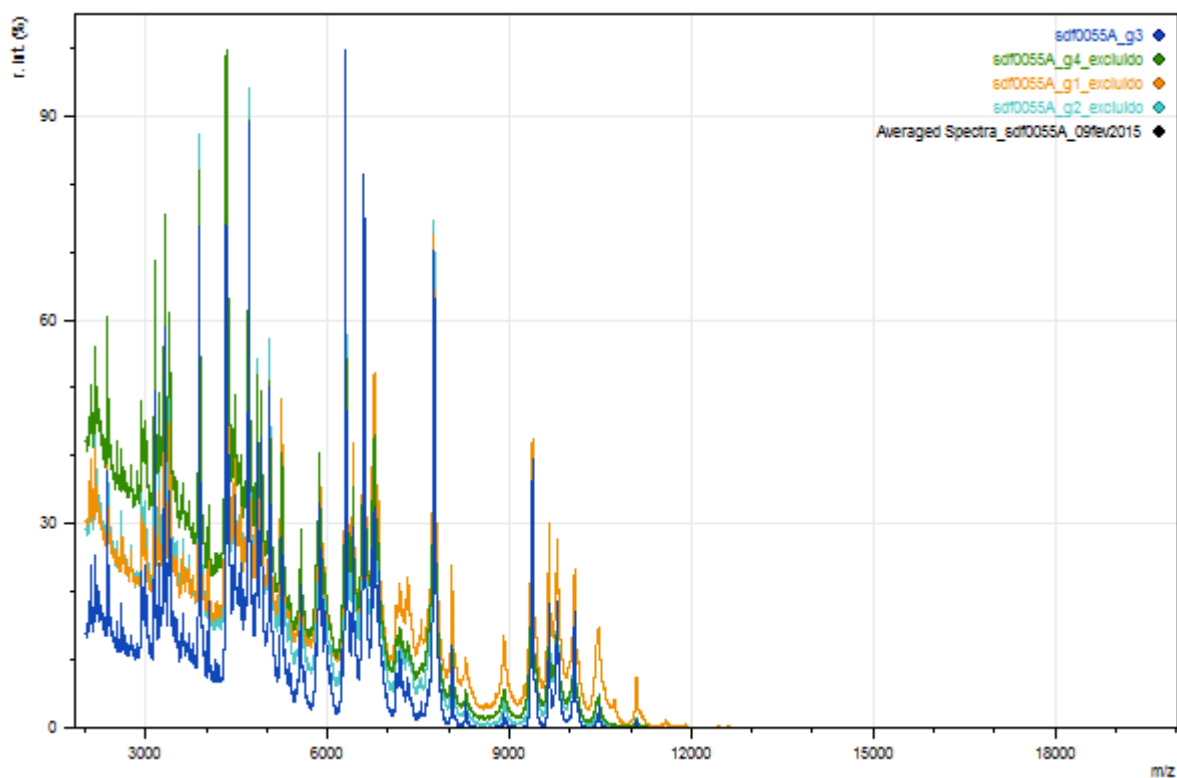
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0055A_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	154

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0055A_g3

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 30 horas

D = 2 mm

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

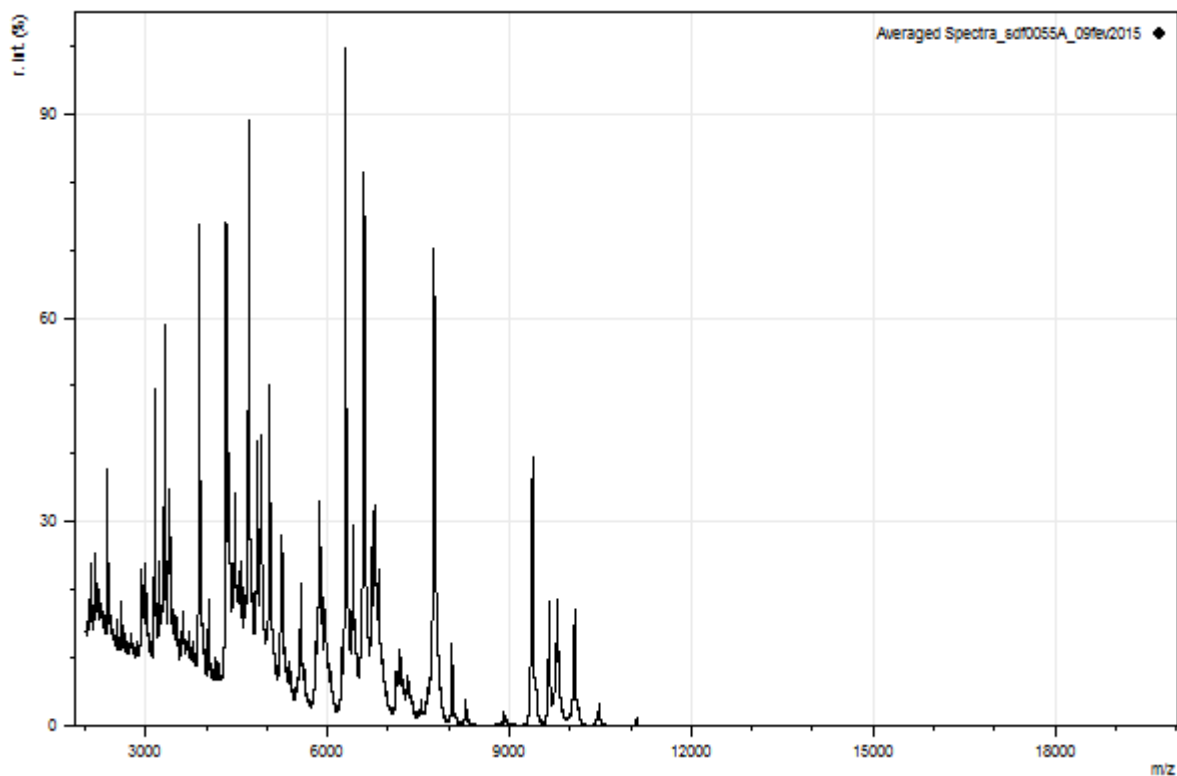
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0055A_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	154

**Notes**

Averaged Spectra:
- sdf0055A_g3

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 30 horas

D = 2 mm

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

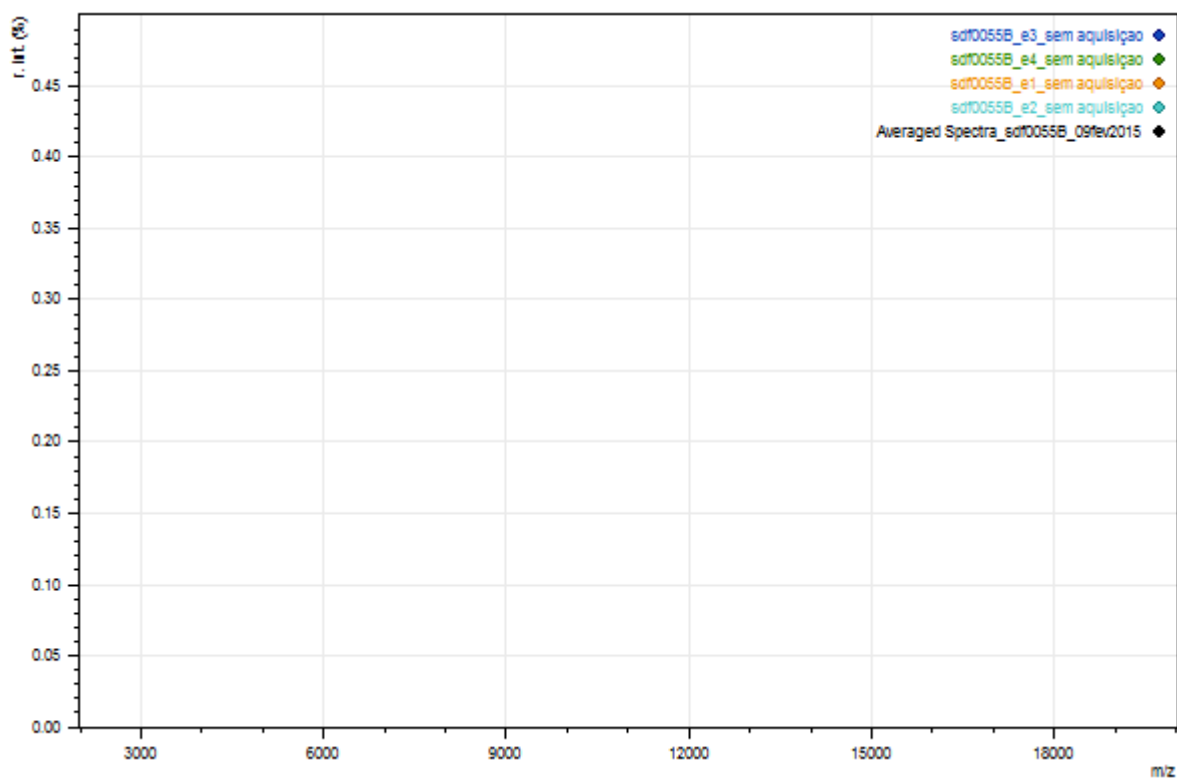
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0055B_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0055B_e3_sem aquisicao
- sdf0055B_e4_sem aquisicao
- sdf0055B_e1_sem aquisicao
- sdf0055B_e2_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 29 horas

D = 2 mm

Dissolução em água = Ruim

Dissolução em AcN = Boa

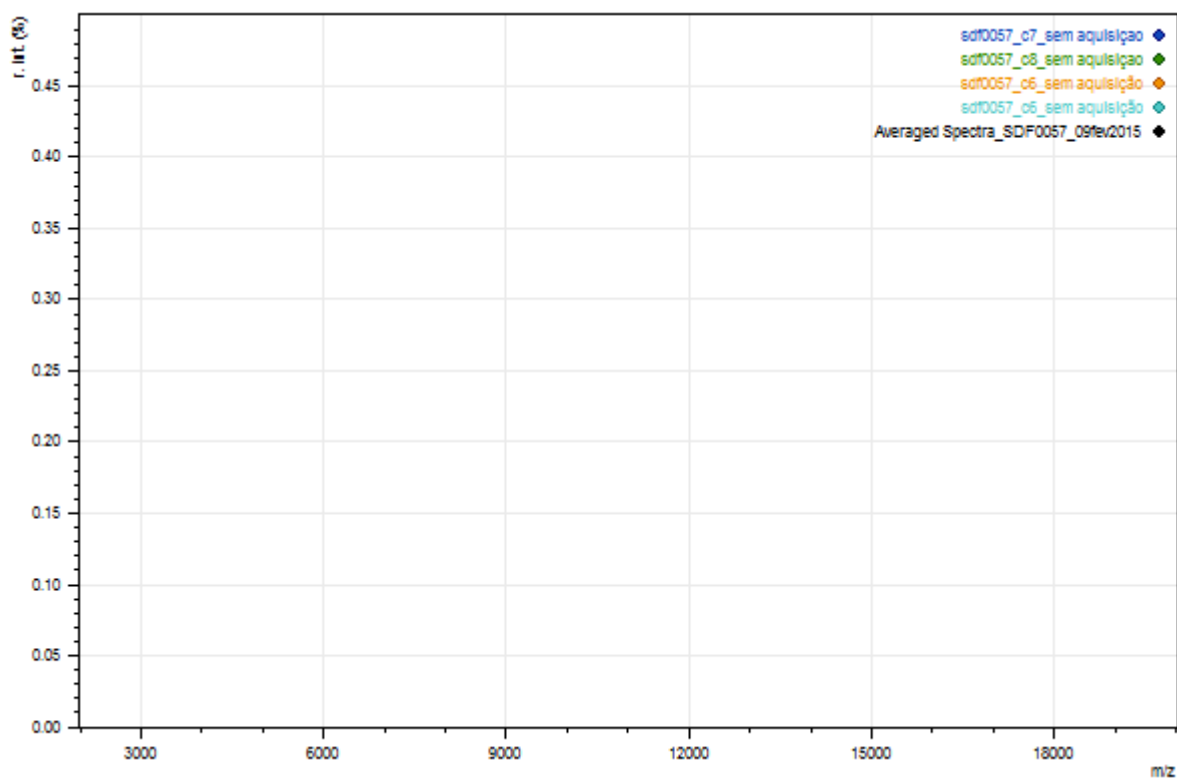
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_SDF0057_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	0



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0057_c7_sem aquisicao
- sdf0057_c8_sem aquisicao
- sdf0057_c6_sem aquisicao
- sdf0057_c6_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 28 horas

D = 2 mm

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

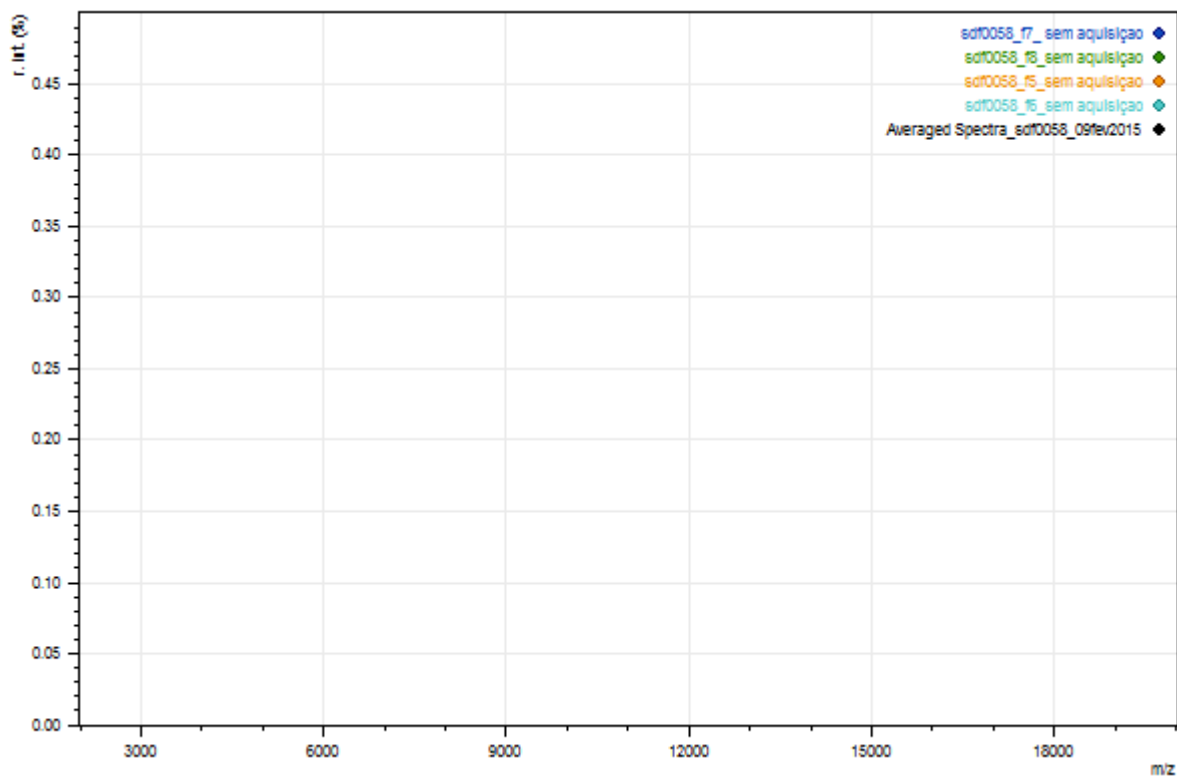
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0058_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	0



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0058_f7_sem aquisicao
- sdf0058_f8_sem aquisicao
- sdf0058_f5_sem aquisicao
- sdf0058_f6_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 30 horas

D = 2 mm

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Não

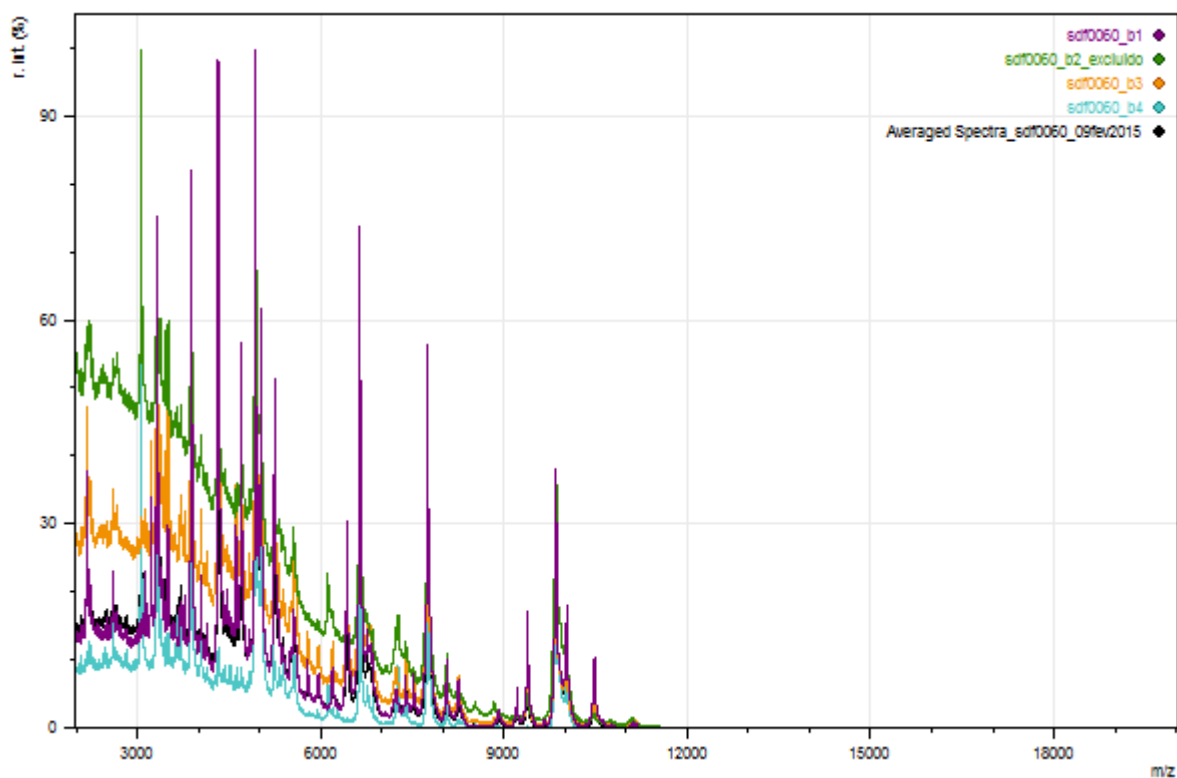
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0060_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	86

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0060_b1
- sdf0060_b3
- sdf0060_b4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 27 horas

D < 1 mm (mais de 1 col/extrato)

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

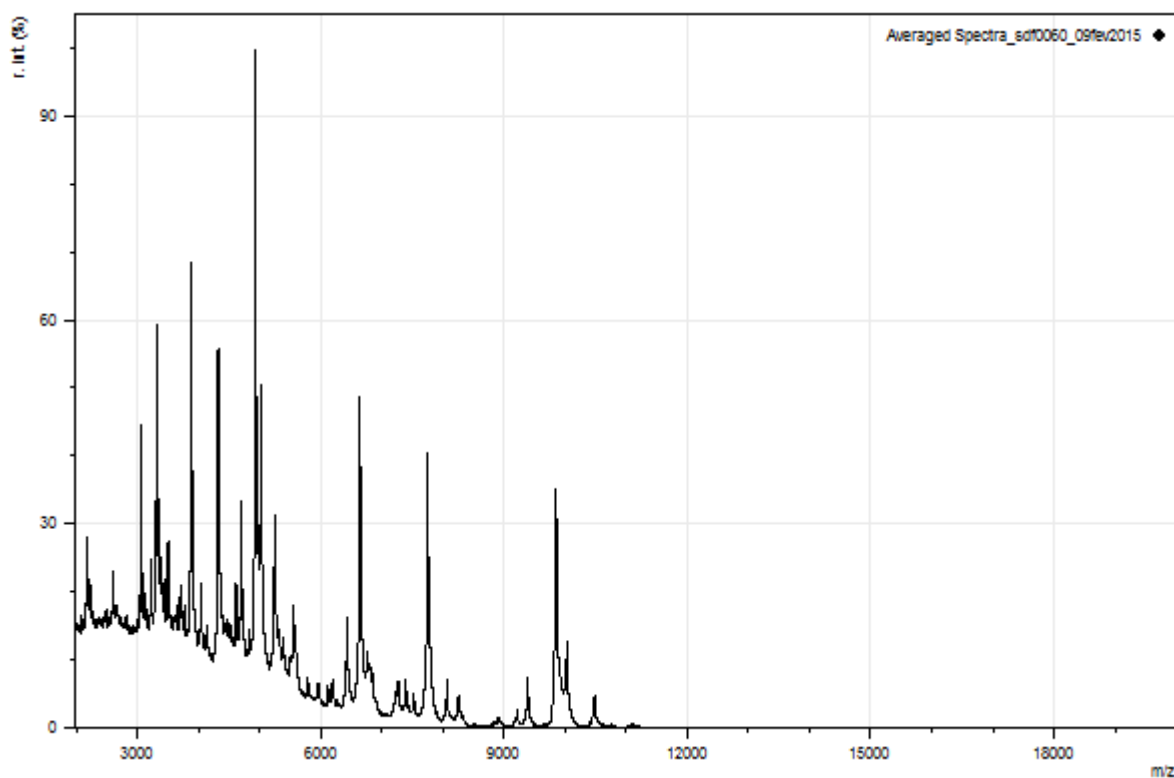
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0060_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex Analysis	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	86

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0060_b1
- sdf0060_b3
- sdf0060_b4

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 27 horas

D < 1 mm (mais de 1 col/extrato)

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

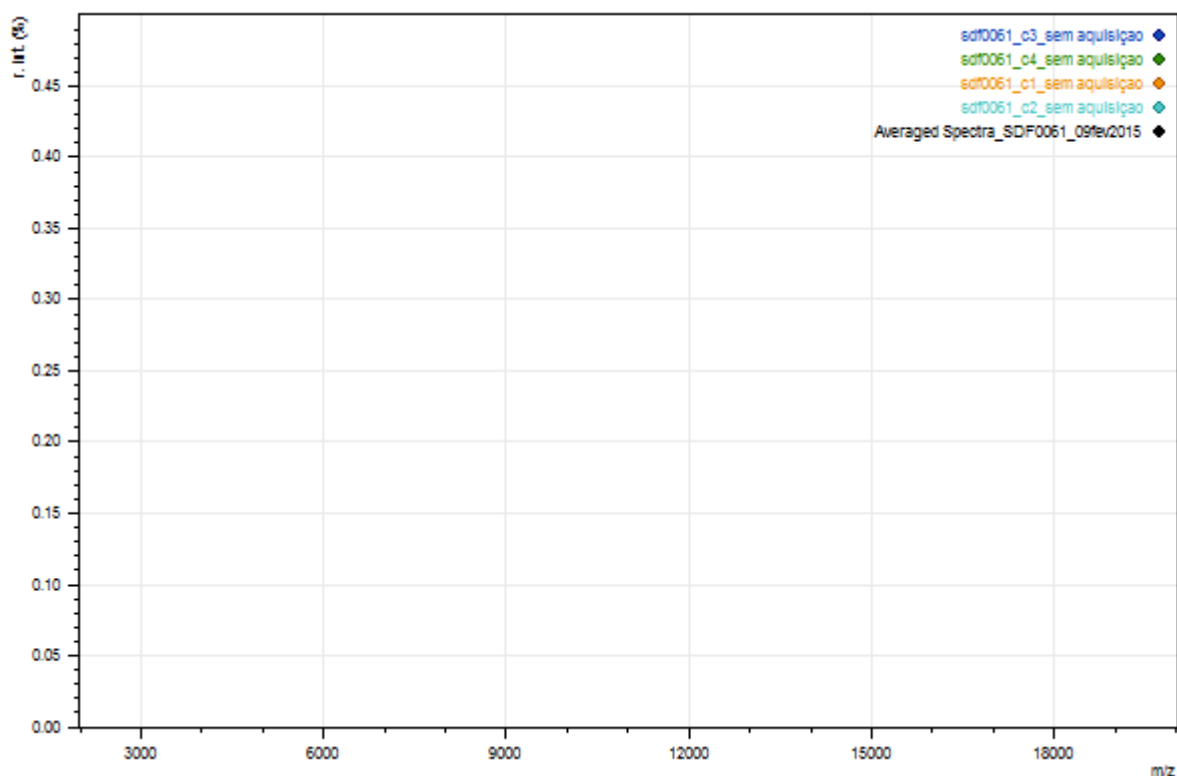
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_SDF0061_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	0



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0061_c3_sem aquisicao
- sdf0061_c4_sem aquisicao
- sdf0061_c1_sem aquisicao
- sdf0061_c2_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 28 horas

D = 2 mm

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

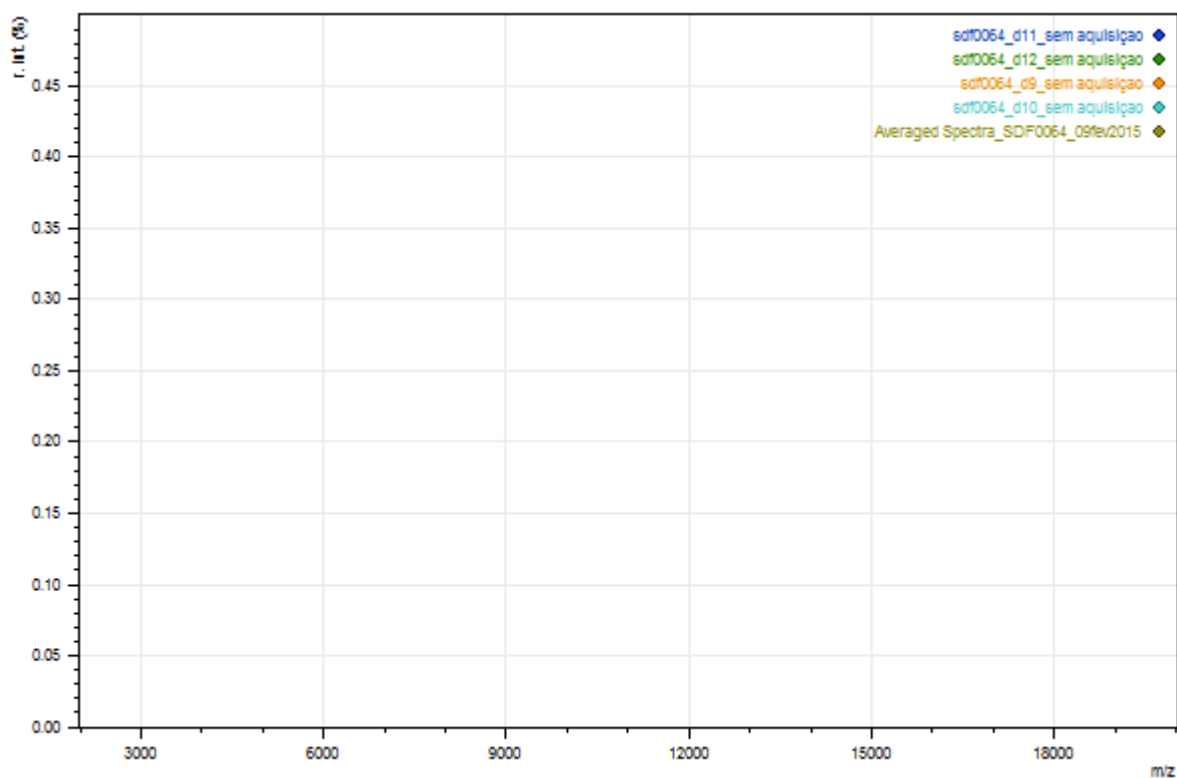
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_SDF0064_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	0



Notes

Averaged Spectra:

- sdf0064_d11_sem aquisicao
- sdf0064_d12_sem aquisicao
- sdf0064_d9_sem aquisicao
- sdf0064_d10_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 29 horas

D = 2 mm

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

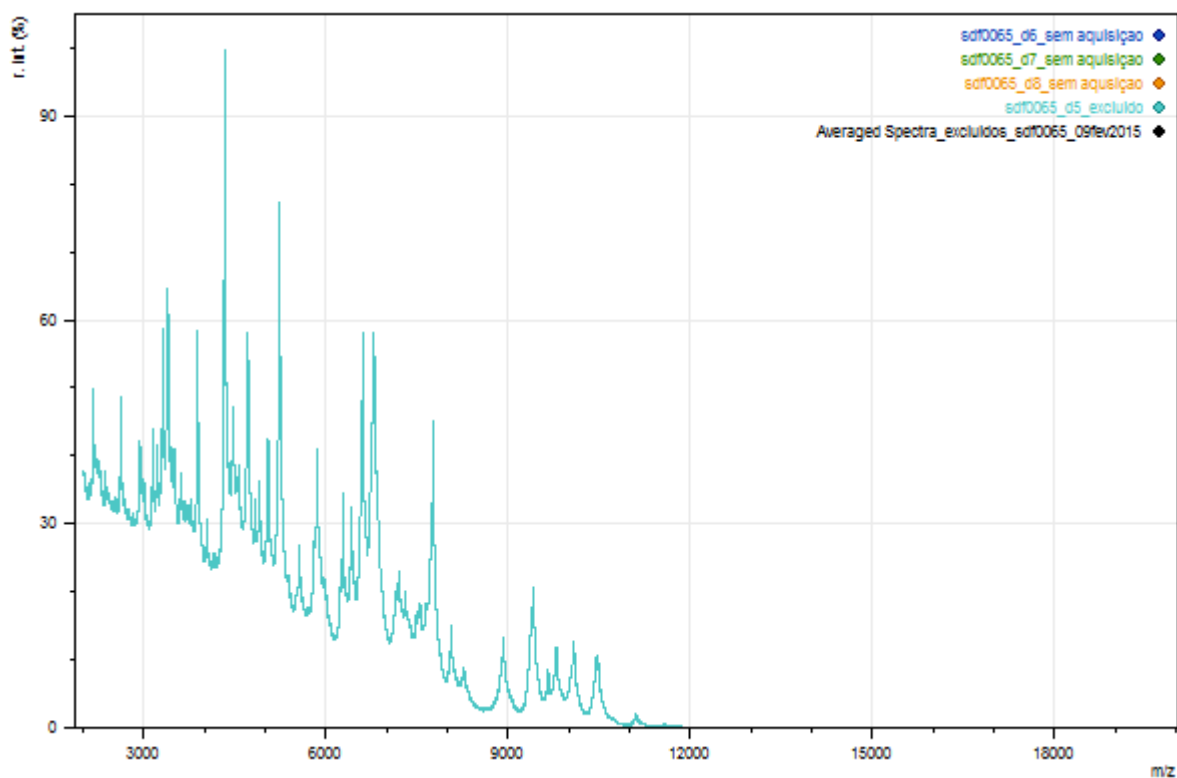
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_excluidos_sdf0065_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	207



Notes

Averaged Spectra:
- sdf0065_d5_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 29 horas

D = 2 mm

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

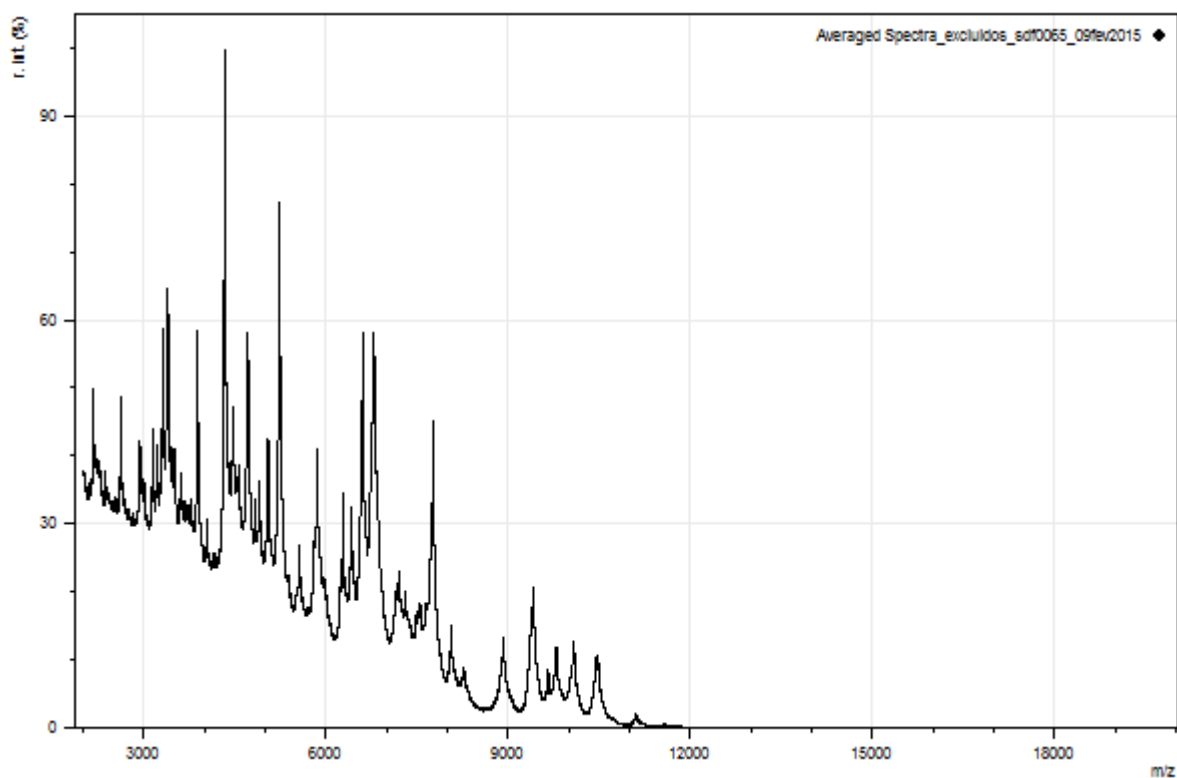
Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_excluidos_sdf0065_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	207

**Notes**

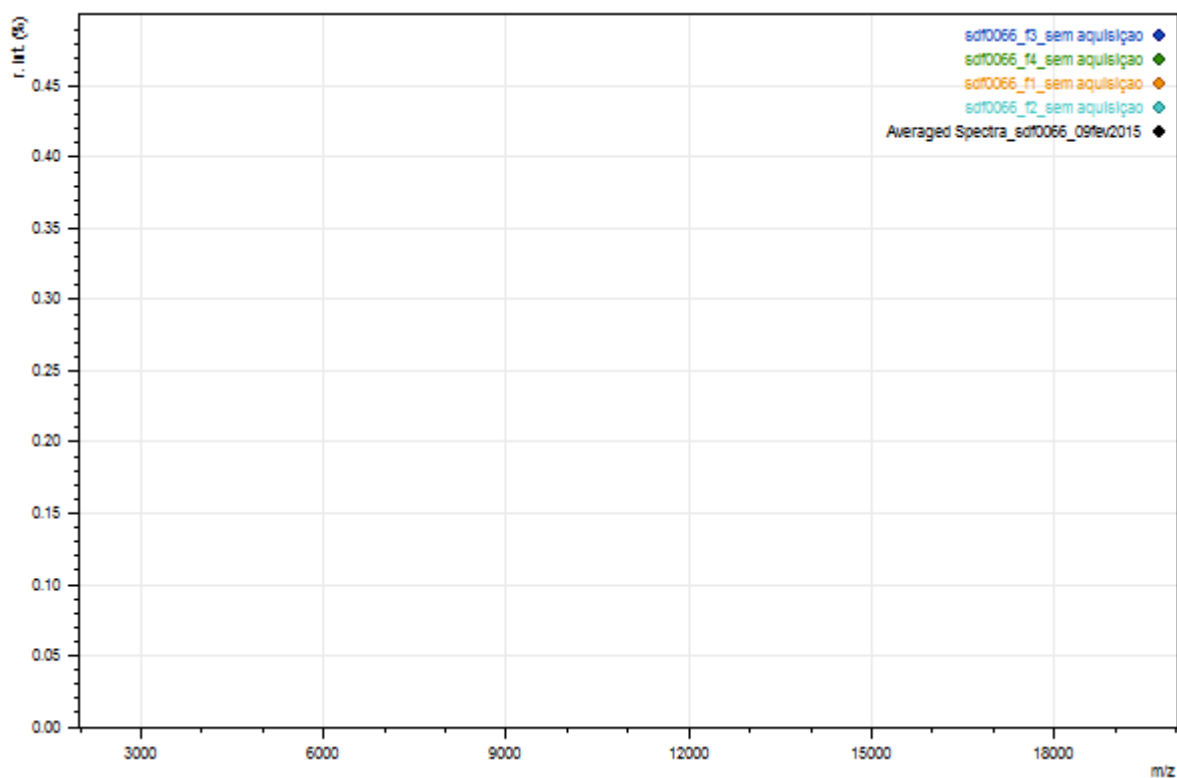
Averaged Spectra:
- sdf0065_d5_excluido

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 29 horas
D = 2 mm
Dissolução em água = Boa
Dissolução em AcN = Boa
Dissolução em AF = Boa
Cultivos = 1
Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0066_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0066_f3_sem aquisicao
- sdf0066_f4_sem aquisicao
- sdf0066_f1_sem aquisicao
- sdf0066_f2_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 29 horas

D = 2 mm

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Ruim

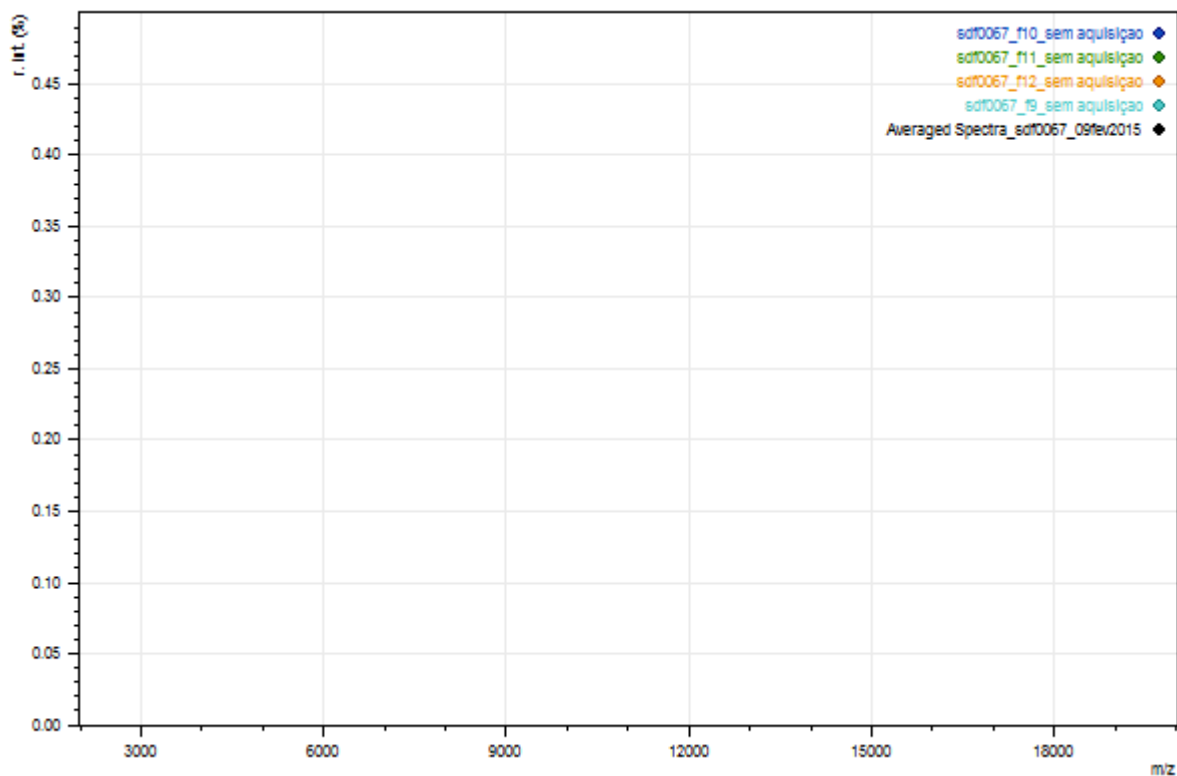
Dissolução em AF = Ruim

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015

mMass Report: Averaged Spectra_sdf0067_09fev2015

Date	09fev2015	Scan Number	
Operator	Flavia PortoCarreiro	Retention Time	
Contact		MS Level	
Institution	UnB	Precursor m/z	
Instrument	Bruker MicroFlex	Polarity	unknown
		Spectrum Points	26783
		Peak List	0

**Notes**

Averaged Spectra:

- sdf0067_f10_sem aquisicao
- sdf0067_f11_sem aquisicao
- sdf0067_f12_sem aquisicao
- sdf0067_f9_sem aquisicao

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

tc = 30 horas

D = 2 mm

Dissolução em água = Boa

Dissolução em AcN = Boa

Dissolução em AF = Boa

Cultivos = 1

Origem = RP 11 - 09fev2015